



UNICAMP

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

**Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos
(*Tabernaemontana catharinensis* A.DC.), cidrão (*Aloysia
triphylla* L'Hérit. Britton) e manga (*Mangifera indica* L.)
por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de
processo, caracterização e atividade antioxidante dos
extratos**

Camila Gambini Pereira

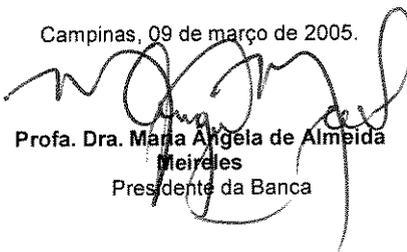
Engenheira de Alimentos, 1999 (UNESP- São José do Rio Preto- SP)
Mestre em Engenharia de Alimentos, 2002 (UNICAMP- Campinas- SP)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Camila Gambini Pereira** aprovado pela Comissão Julgadora em 09 de março de 2005.

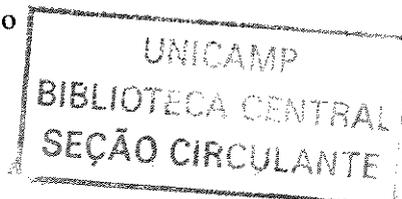
Campinas, 09 de março de 2005.


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

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

Campinas- São Paulo

i



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	P414o
V	EX
TOMBO BC/	63183
PROC.	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	15/04/05
Nº CPD	

Bifid 348194

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

P414o	<p>Pereira, Camila Gambini</p> <p>Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (<i>Tabernaemontana catharinensis</i> A.DC.), cidrão (<i>Aloysia triphylla</i> L'Hérit.Britton) e manga (<i>Mangifera indica</i> L.) por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, caracterização e atividade antioxidante dos extratos / Camila Gambini Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2005.</p> <p>Orientador: Maria Ângela de Almeida Meireles Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. <i>Aloysia triphylla</i>. 2. Atividade antioxidante. 3. Extração com fluido supercrítico. 4. <i>Mangifera</i>. 5. <i>Tabernaemontana catharinensis</i>. I. Meireles, Maria Ângela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(ckn/fea)</p>
-------	--

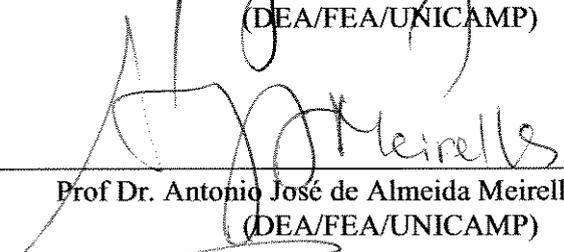
Palavras-chave em inglês (Keywords): *Aloysia triphylla*, Antioxidant activity, Supercritical fluid extraction, *Mangifera*, *Tabernaemontana catharinensis*

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora: Maria Ângela de Almeida Meireles
Antonio José de Almeida Meirelles
Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Mary Ann Foglio
João Ernesto de Carvalho

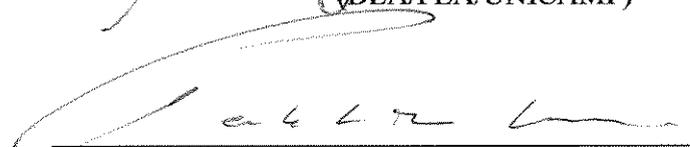
Banca Examinadora



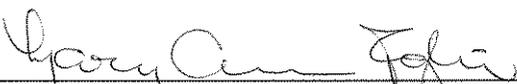
Prof.ª Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles (Orientadora)
(DEA/FEA/UNICAMP)



Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles (Membro)
(DEA/FEA/UNICAMP)



Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa (Membro)
(DEA/FEA/UNICAMP)



Dra. Mary Ann Foglio (Membro)
(CPQBA/UNICAMP)



Dr. João Ernesto de Carvalho (Membro)
(CPQBA/UNICAMP)

Prof. Dr. Munir Salomão Skaf (Suplente)
(IQ/UNICAMP)

Prof.ª Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira (Suplente)
(LATESC/EQA/UFSC)

171805002

*“Feliz aquele que transfere o
que sabe e aprende o que ensina”*

(Cora Coralina)

E ainda acredito que...

“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 carinho.
Pela paciência e por estarem
sempre presentes na minha vida.

Aos meus irmãos, Rogério e Daniel, e
“irmãzinhas”, Vivi e Dany, pelo
incentivo e compreensão que sempre
demonstraram.

E aos meus sobrinhos Carol e Bruno...

Com muito amor...

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra Maria Angela de Almeida Meireles pela oportunidade, constante aprendizado, e incentivo demonstrados durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (01/14982-2 e 99/01962-1) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao Dr Paulo de Tarso Vieira e Rosa pelas informações, auxílio e constante contribuição.

Ao Dr. Antônio Carlos Siani da Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ pela doação das matérias primas (*T. catharinensis*) que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

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

A Dra Vera L.G. Redher, Dra Marili V.N. Rodrigues e ao Adilson Sartoratto do CPQBA pelo fornecimento da matéria-prima (*Aloysia triphylla*) e análises dos extratos.

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

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

Às amigas Cíntia e Christiane pela amizade e carinho que sempre demonstraram.

À Isabela pela possibilidade de poder ensinar, aprender e compartilhar conhecimentos adquiridos.

Aos colegas do LASEFI Mara, Silvânia, Patrícia, Sócrates e Julian pelo companheirismo e momentos que passamos juntos.

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

ÍNDICE GERAL

<i>Resumo</i>	xvii
<i>Abstract</i>	xxi
1- INTRODUÇÃO	1
2.1- OBJETIVOS	5
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1- EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	7
2.1.1. Propriedades dos Fluidos Supercríticos.....	9
2.1.2- Dióxido de Carbono Supercrítico	12
2.1.3- Co-Solvente.....	13
2.1.4- Interações Soluta-Solvente	15
2.1.5. Processo de Extração com Fluido Supercrítico	17
2.1.6. Modelagem Matemática	19
2.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS E PRODUTOS FITOTERÁPICOS	30
2.2.1 Compostos Bioativos das Plantas.....	32
2.2.2- <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	38
2.2.3- <i>Aloysia triphylla</i>	43
2.2.4- <i>Mangifera indica</i> L	45
3- MATERIAIS e MÉTODOS	49
3.1- MATÉRIA-PRIMA	49
3.1.1- <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	49
3.1.2- <i>Aloysia triphylla</i>	50
3.1.3- <i>Mangifera indica</i>	50

3.1.4- Preparação e caracterização das matérias-primas	51
3.2- EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO	53
3.3- HIDRODESTILAÇÃO	54
3.4- SOXHLET	54
3.5- PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	54
3.5.1- Equipamentos	54
3.5.2- Procedimento Experimental	58
3.6- PLANEJAMENTO DAS EXTRAÇÕES	62
3.6.1- <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	62
3.6.2- <i>Aloysia triphylla</i>	63
3.6.3- <i>Mangifera indica</i>	63
3.7- ANÁLISE DOS EXTRATOS	64
3.7.1- <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	64
3.7.2- <i>Aloysia triphylla</i>	66
3.7.3- <i>Mangifera indica</i>	67
3.8- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	69
3.9- ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	70
3.10- AJUSTE DE MODELOS MATEMÁTICOS ÀS CURVAS DE EXTRAÇÃO	71
3.11- ANÁLISE ECONÔMICA	72
3.12- DIFICULDADES EXPERIMENTAIS.....	72
4- RESULTADOS e DISCUSSÃO	75
4.1- TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS.....	75
4.1.1- Testes iniciais de (X_0)	76
4.1.2- Determinação de X_0 , variando o tipo de co-solvente a 5%.....	80
4.1.3- Extrações com CO_2SC e a mistura EtOH-IsoC3 como co-solvente (5% v/v),	

em diferentes proporções	89
4.1.4- Testes iniciais com a Nova MP (MP2): determinação do rendimento global (X_0), massa de alcalóides totais e de voacangina.....	91
4.1.5- Soxhlet e Extração a Baixa Pressão (LPSE)	93
4.1.6- Determinação de X_0 , variando o tipo e teor de co-solvente (10 e 15%)	96
4.1.7- Isotermas de Rendimento Total	98
4.1.8- Ensaio cinéticos	102
4.1.9- Ensaio cinéticos vs Determinação de X_0	106
4.1.10- Ajuste de Modelos Matemáticos às Curvas de extração.....	111
4.1.11- Estimativa do Custo de Produção de extratos de <i>T. catharinensis</i>	114
4.2- ALOYSIA TRIPHYLLA	123
4.2.1- Hidrodestilação e SFE (Isotermas de Rendimento Total).....	123
4.2.2- Análise dos extratos de <i>Aloysia triphylla</i>	125
4.2.3 Atividade antioxidante dos extratos de <i>Aloysia triphylla</i>	129
4.3- MANGIFERA INDICA.....	132
4.3.1- Hidrodestilação, Extração a baixa pressão (LPSE) e Extração Supercrítica (SFE)	132
4.3.2 Análise dos extratos de <i>M. indica</i>	132
4.3.3 Atividade antioxidante dos extratos de <i>M. indica</i>	135
5- CONCLUSÕES	137
6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	140
7- REFERÊNCIAS	142
8- ANEXO	166
ANEXO 1. LISTA DA PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO PERÍODO	166
A.1.1. Artigo publicado.....	166

A.1.2. Artigos submetidos para publicação.....	166
A.1.3. Trabalhos apresentados em congressos.....	167
A.1.4- Lista de produção em co-autoria	169
A.1.5- Co-orientação de aluno de iniciação científica.....	170
ANEXO 2: BIOCÍNTese DE ALCALÓIDES INDÓLICOS	171
ANEXO 3: INTERAÇÕES SOLVENTE-SOLUTO-SOLVENTE	174
ANEXO 4: ESTUDO DA PREDIÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS ALCALÓIDES EM CO₂SC + CO-SOLVENTES	179
ANEXO 5: RESULTADOS EXPERIMENTAIS	196
A.5.1- <i>T. catharinensis</i>	196
A.5.2: <i>Aloysia triphylla</i>	209
ANEXO 6: CROMATOGRAMAS OBTIDOS NAS ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA A GÁS COM ESPECTRO DE MASSAS (CG-EM)	210
A.6.1: <i>Aloysia triphylla</i>	210
A.6.2: <i>Mangifera indica</i>	212
ANEXO 7: SAÍDA DO PROGRAMA DE AJUSTE LINEAR - SAS 6.12	214
ANEXO 8: SAÍDA DO PROGRAMA DE AJUSTE NÃO LINEAR - SAS 6.12	218
ANEXO 9: DETERMINAÇÃO DE X₀ PARA OUTRAS ESPÉCIES	222
A.9.1- <i>Attalea excels e Pterodon emarginatus</i>	222
A.9.2- <i>Laranja Murcote e Pera</i>	223
ANEXO 10: NOVA METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS EXTRATOS OBTIDOS NA SFE.....	224

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Camila Gambini Pereira

TÍTULO: Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (*Tabernaemontana catharinensis* A.DC.), cidrão (*Aloysia triphylla* L'Hérit. Britton) e manga (*Mangifera indica* L.) por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, caracterização e atividade antioxidante dos extratos.

ORIENTARORA: Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

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

RESUMO

Este trabalho visou obter extratos bioativos de leiteira de dois irmãos (*T. catharinensis* A.DC.), cidrão (*A. triphylla* L'Hérit. Britton) e manga (*M. indica* L.) por extração com fluido supercrítico (SFE). Os estudos foram realizados em termos de rendimento global, composição e atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica. Outras técnicas também foram utilizadas para comparar os resultados: hidrodestilação, extração a baixa pressão e Soxhlet.

Um estudo mais abrangente foi realizado na extração de alcalóides de *T. catharinensis* com CO₂ supercrítico. Foram avaliados os efeitos do co-solvente (tipo e teor) sobre o rendimento do processo, composição e cinética de extração. Foram utilizados etanol, isopropanol, metanol, água e suas misturas como co-solvente. Isotermas de rendimento total foram construídas a 35 e 45 °C. Foram calculados os parâmetros cinéticos: taxa de transferência de massa para o período de taxa constante de extração, período de taxa

constante de extração e razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna. As curvas de extração foram ajustadas a diversos modelos matemáticos. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), e os alcalóides foram quantificados por cromatografia a gás com detector de ionização em chamas (CG-DIC). Extrações a baixa pressão e por Soxhlet também foram realizadas. O custo de produção de extratos de *T. catharinensis* obtidos por SFE foi calculado.

Um outro estudo foi realizado com folhas de *A. triphylla*. A extração foi realizada com CO₂ supercrítico, sem adição de co-solvente, em diferentes condições de temperatura e pressão. Os ensaios foram realizados a pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar e temperaturas de 35 e 45 °C. Os constituintes dos extratos e óleo volátil obtido por hidrodestilação foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) sendo a quantificação realizada no CG-DIC. Uma análise da atividade antioxidante dos extratos obtidos por SFE também foi realizada usando-se a reação acoplada do β-caroteno e ácido linolênico.

Extrações a baixa pressão, extração supercrítica e hidrodestilação foram também realizadas em folhas de *M. indica*. Os efeitos dos diferentes processos de extração sobre o rendimento global, composição e atividade antioxidante dos extratos de *M. indica* foram avaliados. A SFE foi realizada a 250 bar e 45 °C. Os extratos foram analisados por CCD e os constituintes identificados por CG-EM e quantificados por CG-DIC.

Os principais resultados para a *T. catharinensis* foram: *i*) O rendimento global, para uma razão de massa de solvente por massa de alimentação igual a 54, foi aproximadamente constante ($2,4 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ kg/kg) para os co-solventes alcoólicos a 5% v/v e significativamente maior ($12,9$ a $15,8 \times 10^{-2}$ kg/kg) para os co-solventes água e sua mistura

com os álcoois a 5% v/v; entretanto foram observadas várias dificuldades experimentais quando água e sua mistura com álcoois foram utilizadas; *ii*) Nos ensaios em que se comparou o uso de diferentes tipos e teores de co-solvente, o valor máximo do rendimento global, para uma relação massa de solvente por massa de alimentação igual a 28, foi obtido quando se utilizou etanol como co-solvente ($1,8 \pm 0,2$ e $2,3 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ kg/kg, para 10 e 15%, v/v, respectivamente); *iii*) As isotermas de rendimento global mostraram que os maiores valores de rendimento global, para uma relação massa de solvente por massa de alimentação igual a 19, foram obtidos a 35 °C e 45 °C, ambos a 350 bar e etanol a 5% v/v ($1,30$ e $1,543 \times 10^{-2}$ kg/kg, respectivamente); *iv*) As curvas de extração foram melhor ajustadas para o modelo de Goto.

Para o estudo realizado com *A. triphylla* os resultados mostraram que: *i*) O maior rendimento global foi obtido a 45 °C/ 350 bar (1,49%); *ii*) Foi observado um comportamento retrógrado na região entre 150 e 250 bar; *iii*) A atividade antioxidante dos extratos de *A. triphylla* obtidos por SFE foi superior a do controle (β -caroteno).

Para o estudo realizado com *M. indica*, os principais resultados foram: *i*) O rendimento global obtido por SFE ($1,00 \pm 0,07\%$) foi inferior a aquele obtido por extração a baixa pressão ($3,04 \pm 0,02\%$); *ii*) A atividade antioxidante de ambos os extratos foi superior a do controle (β -caroteno).

Palavras chave: *Aloysia triphylla* L'Hérit. Britton, atividade antioxidante, cidrão, extração com fluido supercrítico, leiteira de dois irmãos, manga, *Mangifera indica* L., parâmetros de processo, rendimento global, *Tabernaemontana catharinensis* A.DC.

DOCTORATE THESIS

AUTHOR: Camila Gambini Pereira

TÍTULO: Recovery of the extrats from “leiteira de dois irmãos” (*Tabernaemontana catharinensis* A.DC.), lemon verbena (*Aloysia triphylla* L’Hérit. Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) by supercritical extraction: the study of process parameter, characterization and antioxidant activity of the extracts.

MAJOR PROFESSOR: Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Dept. Food Engineering – College of Food Engineering – UNICAMP (State University of Caminpas)

ABSTRACT

The aim of this work was to obtain bioactive extracts from “leiteira de dois irmãos” (*T. catharinensis* A.DC.), “cidrão” (*A. triphylla* L’Hérit. Britton) and mango (*M. indica* L.) by supercritical fluid extraction (SFE). The studies were performed in terms of global yield, composition and antioxidant activity of the extracts obtained by supercritical fluid extraction. Other techniques were also used to compare the results: hydrodistillation, low pressure extraction and Soxhlet extraction.

A more complete study was carried out related to extraction of alkaloids from *T. catharinensis* by supercritical CO₂. The effects of cosolvent (type and content) on process yield, composition and kinetic were evaluated. Ethanol, isopropyl alcohol, methanol, water and their mixtures were used as cosolvent. The global yield isotherms were built at 35 and 45 °C. The kinetic parameters mass transfer rate for the constant extraction rate period

(CER), the duration of the CER period, and mass ratio of solute in the fluid phase at the bed outlet were calculated. The extraction curves were adjusted by several mathematical models. The extracts were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and the alkaloids were quantified by gas-chromatography/flame ionization detector (GC-FID). Low pressure and Soxhlet extracts were also obtained. The manufacturing cost of extracts from *T. catharinensis* obtained by SFE was calculated.

Another study was made with the leaves of *A. triphylla*. Extraction with supercritical CO₂, without cosolvent, at different conditions of temperature and pressure, was performed. The experiments were carried out at pressures of 100, 150, 200, 250, and 300 bar and temperatures of 35 and 45 °C. The constituents of the SFE extracts and the volatile oil obtained by hydrodistillation were identified by gas chromatography/ mass spectroscopy (GC-MS), and their quantifications were made by GC-FID. The antioxidant activity was also evaluated in the extracts obtained by SFE by the coupled reaction of β-carotene and linolenic acid.

Low pressure extraction, supercritical extraction and hydrodistillation were also performed in *M. indica* leaves. The effects of different extraction processes on global yield, composition and antioxidant activity of *M. indica* extracts were evaluated. SFE was conducted at 250 bar/ 45 °C. The extracts were analyzed by TLC and the constituents identified by GC-MS and quantified by GC-FID.

The main results for *T. catharinensis* were: *i*) The global yield, for a mass of solvent to mass of to feed ratio equal of 54 was approximately constant ($2.4 \pm 0.1 \times 10^{-2}$ kg/kg) for the alcoholic cosolvents at 5% v/v and significantly larger (from 12.9 to 15.8×10^{-2} kg/kg) for the cosolvent water and its alcoholic mixtures; at 5% v/v; nonetheless,

several experimental difficulties were observed when water and its alcoholic mixtures were used; *ii*) In the assays where type and content of alcoholic cosolvent were compared, the maximum global yield, for a mass of solvent to mass of feed ratio equal to 28, was obtained when ethanol was used as cosolvent (1.8 ± 0.2 and $2.3 \pm 0.1 \times 10^{-2}$ kg/kg, for 10 and 15%, v/v, respectively); *iii*) The global yield isotherms showed that larger yields, for a mass of solvent to mass of feed ratio of 19, were obtained at 35 °C and 45 °C, both at 350 bar and ethanol at 5% v/v (1.30 and 1.543×10^{-2} kg/kg, respectively); *iv*) The overall extraction curves were better fitted by the Goto's model.

For the study with *A. triphylla* the results showed that: *i*) The larger global yield was obtained at 350 bar/ 45 °C (1.49%); *ii*) The retrograde behavior was observed at 150 and 250 bar; *iii*) The antioxidant activity of the *A. triphylla* extracts obtained by SFE were larger than that of the control (β -carotene).

For the study with *M. indica*, the main results were: *i*) The global yield obtained by SFE ($1.00 \pm 0.07\%$) was lower than that obtained by low pressure extraction ($3.04 \pm 0.02\%$); *ii*) The antioxidant activity of both extracts were larger than that of the control (β -carotene).

Key-words: *Aloysia triphylla* L'Hérit. Britton, antioxidant activity, global yields, leiteira de dois irmãos, lemon verbena, *Mangifera indica* L., mango, processes parameters, supercritical fluid extraction, *Tabernaemontana catharinensis* A.DC.

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é um país muito rico em produtos naturais. A biodiversidade encontrada no Brasil é extremamente ampla. Rico em frutas, condimentos, plantas aromáticas e medicinais, o país se destaca por apresentar produção das mais diversas espécies ao longo de todo seu território. Com essa grande diversidade, o interesse das indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos por produtos com propriedades terapêuticas se torna ainda maior. Nos últimos anos, tem sido visto um crescente interesse em alimentos que possam, além de suprir as carências nutricionais, ser utilizados na redução de risco de doenças. Alimentos com essa característica são chamados de alimentos funcionais.

Vale ressaltar a importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos. Em muitas situações, a descoberta da atividade dessas substâncias não representou apenas o surgimento de um novo grupo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SIMÕES *et al*, 1999).

A extração de compostos pelos métodos convencionais é uma operação que pode ser difícil e demorada, como é o caso da extração de alcalóides por Soxhlet. Além disso, o extrato obtido por esses métodos contém uma fração elevada de impurezas, o que demanda uma grande quantidade de diversos solventes orgânicos na purificação. Um outro fator, é o uso de temperaturas elevadas, que pode acarretar na degradação térmica de alguns compostos termo-sensíveis.

De encontro a isso, o crescente interesse em tecnologias que forneçam produtos isentos de resíduos de solventes orgânicos, e que nos produtos finais sejam mantidas as características organolépticas e nutricionais desejáveis vem aumentando, tanto pela indústria como por parte dos consumidores.

Dessa forma, a extração supercrítica, considerada uma tecnologia limpa, vem sendo muito utilizada por ser capaz de produzir extratos com elevada pureza, isentos de solvente, e por utilizar temperaturas moderadas, o que minimiza as perdas de compostos termolábeis.

O grupo de pesquisa “Tecnologia Supercrítica Aplicada ao Processamento de Produtos Naturais” do LASEFI é um grupo que vem desenvolvendo pesquisas na área de extração supercrítica desde 1989. Diversas matérias-primas foram fonte de estudos nesses últimos anos: cravo-da-índia, pimenta-do-reino, *Spirulina máxima*, capim-limão, estévia, camomila, semente de maracujá, bacuri, gengibre, dentre outras. Com intuito de ampliar o conhecimento e aplicabilidade dessa tecnologia, foi desenvolvido neste trabalho um estudo utilizando três plantas distintas: leiteira de dois irmãos (*T. catharinensis*), cidrão (*A. triphylla*) e manga (*M. indica*). Plantas estas com importantes propriedades nutricionais e terapêuticas, conforme apresentado a seguir.

JUSTIFICATIVA

O uso de muitas espécies do gênero *Tabernaemontana* pela medicina como agentes antivirais, bactericidas, anestésicos, cardiovasculares, dentre outros, se deve a grande quantidade de alcalóides nelas presente. Quase todos os alcalóides possuem atividade farmacológica.

A *Tabernaemontana catharinensis* é uma árvore da família Apocynaceae rica em alcalóides indólicos. Estudos farmacológicos dos extratos brutos e frações de *T. catharinensis* têm demonstrado atividades anti-tumoral, anti-inflamatória, analgésica e anticancerígena (RATES *et al*, 1993; PEREIRA, 1999; PEREIRA *et al*, 2003a). Recentemente, foi verificado que os extratos brutos e alcalóides indólicos isolados dessa espécie possuem ação tripanomicida e leishmanicida (PEREIRA, 1999; DELORENZI, 1998; SOARES *et al*, 2003). Dentre os constituintes isolados da *Tabernaemontana catharinensis*, os alcalóides indólicos: coronaridina e voacangina apresentam especial importância por possuírem ação leishmanicida (DELORENZI, 1998).

A Leishmaniose é considerada um grande problema de saúde pública mundial 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. Existem diversas drogas aprovadas para o uso clínico que apresentam curas parasitológicas e de lesões na maioria dos casos. Entretanto, além do grande número de efeitos tóxicos das drogas convencionais, os tratamentos são muito prolongados e nem sempre são efetivos. De um modo geral, ainda não existe nenhuma droga que apresente um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade para a cura desta doença (IWU *et al*, 1994; DELORENZI, 1998; PASSOS, 2000). Alguns estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas, entretanto, ainda não foi descoberta nenhuma vacina considerada efetiva (WHO, 2004). A Doença de Chagas é outra doença parasitária que atinge de 16-18 milhões de pessoas na América Latina. As drogas utilizadas no tratamento desta apresentam diversos efeitos colaterais (40 a 70% dos pacientes tratados com as drogas disponíveis apresentaram sérias reações, o que forçou metade destes a

desistirem do tratamento). Várias substâncias têm sido testadas no combate a Doença de Chagas, entretanto até o momento, também não existe nenhuma considerada eficaz para a disseminação desta (RIVAS *et al*, 1999; WHO, 2002). Em adição, vêm aumentando os casos de co-infecção Leishmaniose/ HIV e Doença de Chagas/ HIV (WHO, 2001, SARTORI e LOPES, 2002).

O interesse pela *T. catharinensis* como possível planta medicinal utilizada para o tratamento contra Leishmaniose, advém da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, que desenvolve atividades de pesquisa básica e aplicada para a produção de vacinas e medicamentos dentre outras atividades. A idéia inicial era aplicar a tecnologia supercrítica na extração dos alcalóides coronaridina e voacangina, uma vez que por técnicas convencionais estes alcalóides não eram facilmente obtidos. Embora, de um modo geral, os alcalóides sejam mais polares que o CO₂, é possível através da adição de um modificador (co-solvente) alterar a polaridade do solvente supercrítico possibilitando a extração desses compostos (TAYLOR, 1996).

Embora, em geral alcalóides sejam substâncias tóxicas, é possível que em dosagem subclínica sejam bem tolerados. Desta forma, devido às propriedades funcionais do extrato bruto de *T. catharinensis*, seria interessante um estudo sobre a formulação de alimentos para grupos populacionais específicos, como por exemplo, crianças residentes em regiões pobres em saneamento básico, que pudessem controlar as infecções por parasitas. A simples ingestão dessa planta sob forma de chá poderia prevenir e tratar a população no combate a essas doenças parasitárias. Ou ainda, para indivíduos infectados com o vírus HIV, tendo em vista o aumento de casos de co-infecção desta com doenças parasitárias

(PASSOS, 2000, SARTORI e LOPES, 2002). Sendo assim, a ingestão de alimentos como forma preventiva ou curativa poderia ser uma alternativa e um importante aliado.

Tendo em vista que no trabalho desenvolvido durante o mestrado foi estudado a mesma espécie e parte da planta (galhos de *T. catharinensis*) que foi fonte de estudo no doutorado; houve um interesse em se estudar outros materiais e outras espécies com SFE. Por outro lado, plantas como *Aloysia triphylla* e *Mangifera indica* despertaram interesse por se tratarem de alimentos com importante potencial terapêutico e nutricional (OHNO *et al*, 2003; COWAN, 1999; HILGERT, 2001; AWE *et al*, 1998; DAS *et al*, 1989; GARRIDO *et al*, 2004; SAÍRAM *et al*, 2003; ANILA e VIJAYALASKHMI, 2003; KABUTI *et al*, 2000). Essas plantas vêm sendo estudadas por pesquisadores de instituições renomadas, como é o caso das folhas de cidrão (*Aloysia triphylla*) estudada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/ UNICAMP; e das folhas de manga (*Mangifera indica*), estudada na UNICAMP e UNESP (LIMA *et al*, 2003; SEVERI *et al*, 2003). As extrações foram realizadas em outras duas unidades de extração supercrítica diferentes da que foi utilizada com a *T. catharinensis*. A importância desse estudo foi o de aumentar o conhecimento na tecnologia de fluidos supercríticos na obtenção de extratos com valor funcional.

1.1- Objetivos

Estudar o uso de diferentes processos de extração na obtenção de extratos com elevado valor funcional; avaliando o rendimento, composição e atividade antioxidante dos extratos de diferentes plantas.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1- Obter extratos por diferentes métodos: extração supercrítica, extração a baixa pressão, hidrodestilação e soxhlet;
- 2- Determinar o rendimento global (X_0) do processo;
- 3- No caso da *T. catharinensis*, avaliar os efeitos do co-solvente sobre o rendimento do processo, composição e cinética de extração; sendo utilizado os seguintes co-solventes: etanol, isopropanol, metanol, água e suas misturas; em diferentes porcentagens.
- 4- Realizar as análises dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo a identificação e quantificação feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia a gás com detector de ionização em chamas (CG-DIC), respectivamente.
- 5- Realizar uma análise da atividade antioxidante de diversos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração (*M. indica* e *A. triphylla*).
- 6- Ajustar as curvas de extração obtidas para a *T. catharinensis* por diversos modelos matemáticos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Extração com Fluidos Supercríticos

A extração supercrítica é uma operação unitária que explora o poder de solvatação de fluidos a temperatura e pressão acima de seus pontos críticos. Os fluidos supercríticos são únicos porque possuem propriedades que são similares a gases e outras a líquidos. Neste estado as propriedades físico-químicas do fluido como densidade, viscosidade e difusividade são facilmente controladas por mudanças na temperatura e pressão. As implicações que as propriedades do solvente supercrítico trazem ao processo de extração são de grande importância, principalmente no que se refere ao fenômeno de transferência de massa e seletividade dos compostos extraíveis.

O estado supercrítico foi reportado pela primeira vez em 1822 pelo Barão de Carginard de la Tour. Mais tarde, em 1879, Hanay e Hogarth demonstraram o elevado poder de solvatação de um fluido supercrítico. Entretanto, somente um século depois, em meados de 1970, foi reportado o uso dessa tecnologia na indústria alimentícia com a descafeinização de grãos verdes de café com dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC). Em seguida, sua aplicação se estendeu a outros produtos como chá, tabaco, lúpulo, especiarias, aroma e óleos essenciais (TAYLOR, 1996).

Devido ao aumento das exigências governamentais com relação ao uso de solventes nos processos de extração de produtos naturais, aliado ao aumento da procura por parte dos consumidores de produtos com elevado grau de pureza, o uso da tecnologia supercrítica vem despertando interesse nos diversos setores industriais. Nas últimas décadas, o processo

de extração com fluidos supercríticos vem sendo aplicado com sucesso na obtenção de uma grande variedade de compostos orgânicos de plantas e ervas (KING e BOOT, 1993, ROSA e MEIRELES, 2004).

Considerada uma tecnologia limpa, a extração com fluido supercrítico (SFE: supercritical fluid extraction) é hoje bem aceita em diversas áreas, principalmente aquelas que atuam em setores ligados à saúde humana, como alimentos e medicamentos. A extensa pesquisa nessa área é indicada pelo fato de que 19 patentes foram solicitadas nos EUA, entre 1974 e 1984, somente para a descafeinização do café (SINGH e SINGH, 1996). As indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos possuem grande interesse por processos que forneçam produtos isentos de resíduo tóxico e que a incidência de degradação dos compostos ativos seja quase nula. O uso de CO₂ como fluido supercrítico nos processos de extração é bem atrativo, uma vez que as temperaturas utilizadas são relativamente baixas e o produto obtido é isento de solvente (BRUNNER, 1994). Um exemplo da seletividade desse processo é a extração do alcalóide vindolina; extraído dentre mais de 100 alcalóides presentes na folha de *Catharantus roseus* (SONG *et al*, 1992). Ingredientes e substâncias funcionais também são obtidas com elevada pureza por essa tecnologia, como trans-licopeno, α -tocoferol e β -caroteno extraídos do tomate (casca e polpa sem sementes) (GOMES-PRIETO *et al*, 2003).

Diversos trabalhos têm comprovado a importância dessa tecnologia para a obtenção de produtos naturais de alto valor agregado, principalmente, quando se trata de compostos termo-sensíveis. No setor de produtos naturais, a tecnologia supercrítica pode ser aplicada a diversos produtos, como extração de óleos voláteis, compostos odoríferos, 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 (JANICOT *et al*, 1988 e 1990; KING e BOOT, 1993; BRUNNER, 1994).

Outros setores industriais, como químico e petroquímico, também têm interesse por essa técnica devido as características que a extração com fluido supercrítico oferece frente aos processos convencionais de extração. Quando se trata do uso de CO₂ como fluido supercrítico, outras vantagens são atribuídas a esse processo, como a fácil remoção do solvente a partir do extrato, elevada seletividade do solvente, e uso de temperaturas relativamente baixas, o que é ideal para produtos termo-sensíveis. Em adição, é um processo de extração rápido, e requer menor gasto de energia térmica que a destilação (CHARPENTIER e SERVENANTS, 1988).

2.1.1. Propriedades dos Fluidos Supercríticos

Uma substância no seu estado supercrítico apresenta propriedades que fazem deste um solvente atrativo: sua densidade é similar a de líquidos, e viscosidade e difusividade são mais próximas a de gás. A Tabela 2.1 lista as propriedades físicas para os fluidos em diferentes estados.

Tabela 2.1: Propriedades físicas associadas a diferentes estados físicos (RIZVI *et al*, 1986)

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

O poder de dissolução de um fluido supercrítico está diretamente relacionado com sua densidade, sendo facilmente manipulado por mudanças na temperatura e pressão do processo. Nas vizinhanças do ponto crítico, grandes mudanças de densidade podem ser produzidas por pequenas mudanças na pressão e temperatura: 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 ao ponto crítico do que em pressões elevadas, como apresentado pela Figura 2.1 (CHARPENTIER e SERVENANTS, 1988).

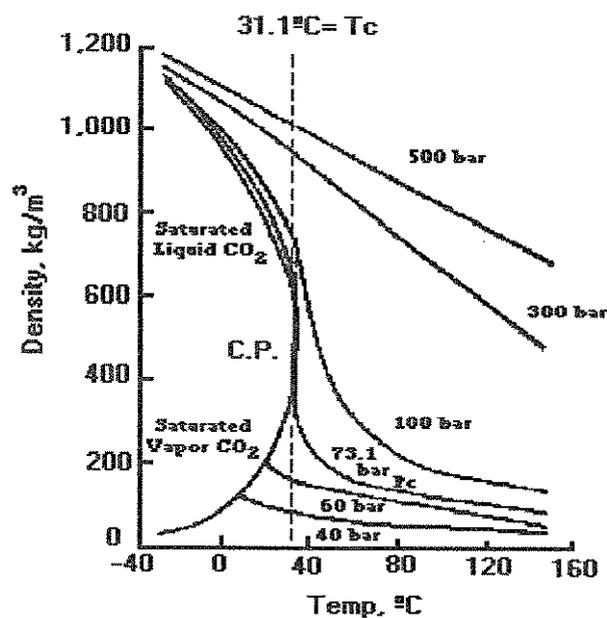


Figura 2.1: Densidade do CO₂ em função da temperatura e da pressão.

A solubilidade de um soluto em fluidos supercríticos é influenciada por variações de temperatura e pressão, em geral, é função da densidade do solvente. Entretanto, o efeito da temperatura sobre a solubilidade é bastante complexo devido à existência de dois fatores que atuam de forma contrária: pressão de vapor do soluto e densidade do solvente, um tende a aumentar a solubilidade com o aumento da temperatura e o outro tende a diminuí-la. O aumento da temperatura do sistema faz com que haja um aumento na pressão de vapor do soluto, proporcionando maior solubilidade. Por outro lado, esse aumento na temperatura faz com que a densidade do solvente diminua, o que provoca uma diminuição na solubilidade (MARENTIS, 1988). Esse efeito da temperatura e pressão sobre a solubilidade pode ser observado pela Figura 2.2. Pode-se observar que entre 100 e 240 bar, a solubilidade da cafeína diminui com o aumento da temperatura, indicando que o efeito da densidade do solvente é predominante. A partir de 240 bar, ocorre uma inversão de comportamento, no qual a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura, embora haja uma diminuição na densidade do solvente. Nesta região, o efeito da pressão de vapor do soluto é mais efetivo que o efeito da densidade do solvente.

O comportamento similar ao mostrado pela Figura 2.2 vem sendo verificado em outros sistemas, como teobromina/CO₂, teofilina/CO₂, *Rosmarinus officinallis*/CO₂ (SALDAÑA *et al*, 1999; CARVALHO JUNIOR *et al*, 2003).

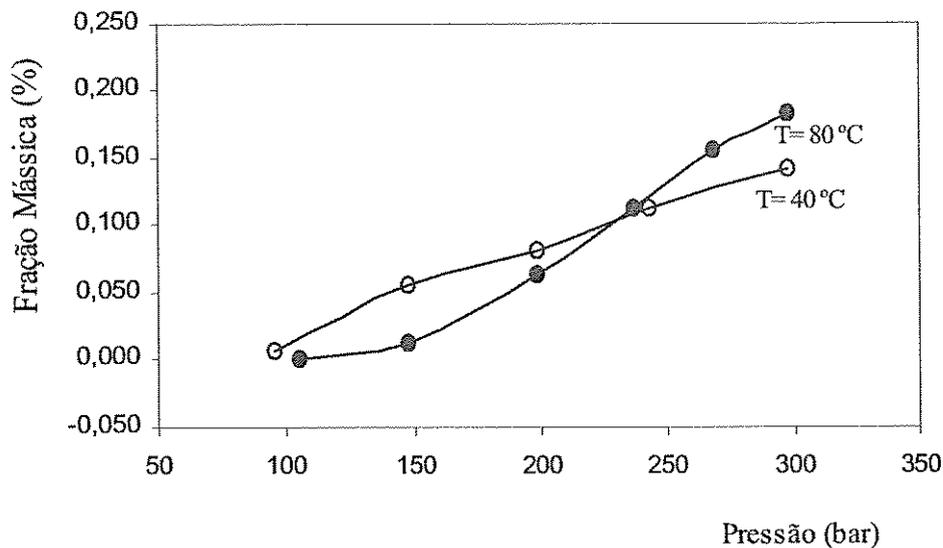


Figura 2.2: Solubilidade da cafeína em CO₂SC em função da temperatura e pressão (LI *et al*, 1991)

Devido a sua alta densidade, o fluido supercrítico (FSC) possui um elevado poder de solubilização, enquanto baixos valores de viscosidade combinados com altos valores de difusividade conferem ao fluido supercrítico um alto poder de penetração, o que pode promover elevadas taxas de transferência de massa, dependendo da matriz e solutos envolvidos.

2.1.2- Dióxido de Carbono Supercrítico

Dentre os solventes supercríticos, o CO₂ é o mais indicado devido às condições críticas amenas (304,1 K e 73,8 bar), aliado ao fato de ser atóxico, não inflamável, sem odor e ter custo relativamente baixo. Sua alta volatilidade, facilita a sua separação do

extrato. Além disso possui alta difusividade, baixa viscosidade e pequena entalpia de vaporização.¹ É um solvente apolar, e sua seletividade na fase supercrítica pode ser alterada pelo controle da pressão e temperatura do sistema (FILLIPPI, 1982; MARENTIS, 1988).

2.1.3- Co-Solvente

Mesmo a altas densidades, o CO₂ possui habilidade limitada em dissolver moléculas polares. Entretanto, as características dos fluidos supercríticos podem ser modificadas pela adição de compostos miscíveis e polares, mencionado na literatura como co-solvente ou modificador (TAYLOR, 1996). Os co-solventes normalmente possuem volatilidade intermediária entre o solvente e o componente a ser extraído (KING e BOOT, 1993).

A solubilidade de muitos compostos pode ser então aumentada utilizando um co-solvente. Uma das explicações de como o co-solvente atua na mistura supercrítica baseia-se na mudança da polaridade do solvente. A adição de um co-solvente com uma polaridade pouco mais elevada, irá aumentar a polaridade do solvente supercrítico e dessa forma a solubilidade de um certo soluto ou de uma classe de compostos. Outro fator importante é a ocorrência de interações físicas e químicas entre o co-solvente e o soluto, que também afetam e alteram a solubilidade do soluto no fluido supercrítico (EKART *et al*, 1993).

Pelo menos 17 co-solventes têm sido estudados em extração com fluido supercrítico de produtos naturais. De todos esses modificadores, o metanol é o solvente polar mais utilizado. Acredita-se que elevada porcentagem de metanol (MeOH) pode romper o vínculo

¹ A entalpia de vaporização de outros solventes como etanol, isopropanol e água é cerca de 3 a 5 vezes maior que a entalpia de vaporização do CO₂, para $0,6 < Tr < 1$. O cálculo foi realizado através do programa PR1.BAS (SANDLER, 1989).

soluto-matriz sólida. Etanol (EtOH) é outra boa escolha por possuir baixa toxicidade. Uma mistura de metanol e água também pode ser empregada como co-solvente (LANG e WAI, 2001).

Dessa forma, a extração de diferentes compostos com fluidos supercríticos pode ser otimizada com a mudança nas condições de processo (temperatura e pressão), afetando a densidade do solvente e portanto a sua seletividade; e também com a adição de um modificador, que pode atuar de diferentes formas, conforme descrito anteriormente.

NOSSACK *et al* (2000) extraíram alcalóides quinolizidínicos de *Lupinus spp.* com CO₂ supercrítico, utilizando como co-solventes MeOH, EtOH, isopropanol (IsoC3) e H₂O. Os melhores resultados, em termos de rendimento de alcalóides, foram obtidos quando se utilizou 10% de EtOH e 5% de H₂O.

Na otimização do processo de extração supercrítica de cocaína de folhas de *Erythroxylum coca var coca*, BRACHET *et al* (2000) investigaram o uso de co-solvente dentre outras variáveis de processo. Neste trabalho, foi utilizada uma mistura de metanol/água em diferentes proporções: 9:1, 8:2, 7:3. Verificaram que a região ótima de extração de cocaína se encontra entre 9,5-13 % de co-solvente, em uma mistura 7:3 de metanol/ água.

Compostos fenólicos também foram extraídos com a técnica de fluidos supercríticos. CHIU *et al* (2002) extraíram flavonóides de *Ginkgo biloba* L por SFE nas condições de 242-312 bar e 60 e 120 °C, utilizando 10, 12 e 24 % de etanol como co-solvente. A maior quantidade de flavonóides foi obtida na condição de 312 bar, 60 °C, e 24 % de etanol.

2.1.4- Interações Soluto-Solvente

O efeito da adição de modificadores sobre a matriz e sobre a extração de compostos em condições supercríticas tem sido estudado por muitos pesquisadores. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito da adição de um modificador na extração supercrítica. Um deles é o aumento da solubilidade do soluto devido a interações soluto-co-solvente. Outra explicação é o inchaço da matriz devido a sua interação com o co-solvente, o que permite a exposição do soluto ao solvente SC. Além disso, o efeito da mudança na polaridade do solvente pela adição do co-solvente é outro fator que interfere no aumento da solubilidade. O efeito que irá predominar em uma extração com FSC vai depender do tipo de co-solvente e matriz de que se trata e do soluto que se deseja extrair. Variações nas condições de temperatura e pressão também afetam a solubilidade (FAHMY *et al*, 1993).

Assim, uma forma de compreender as alterações e os resultados obtidos nos processos de extração é tentar entender o mecanismo e as interações existentes no sistema.

Em 1999, SALDAÑHA *et al* verificaram que a solubilidade de um composto puro em CO₂SC é bem diferente da solubilidade do mesmo composto quando associado à matriz, podendo variar em até 2 ordens de grandeza. Verificaram também que embora apresentem estruturas muito similares, a cafeína, teofilina e teobromina apresentaram solubilidades bem distintas entre si; o que foi explicado pela presença de um grupo metil na teobromina e teofilina, acarretando na formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas.

A medição da solubilidade dos compostos puros é bem estudada, entretanto, quando se trata da obtenção de um composto através da extração a partir de um produto natural, a

esta solubilidade devem ser incorporados outros fatores relacionados à matriz (RODRIGUES *et al*, 2002; SOUZA *et al*, 2002). Dessa forma, um conhecimento da real composição química do extrato e estrutura do material que será utilizado na extração irá fornecer informações relevantes para o entendimento das interações soluto-soluto, matriz-soluto, solvente-soluto e co-solvente-matriz existentes. A Tabela 2.2 apresenta a solubilidade em CO₂ de alguns compostos (alcalóides e flavonóides) em diferentes faixas de temperatura e pressão com ou sem o uso de cosolvente.

Tabela 2.2: Solubilidade de alguns compostos (alcalóides e compostos fenólicos) em CO₂ supercrítico com e sem co-solvente, em diferentes faixas de temperatura (T) e pressão (P)

Substância	Solubilidade × 10 ⁴ (kg/kg)	Faixa T e P	Ref.
Alcalóides			
codeína	9,0	150 bar, 40 °C	1
tebaína	2,0	150 bar, 40 °C	1
papaverina	0,4	150 bar, 40 °C	1
noscapina	0,9	150 bar, 40 °C	1
cafeína	2,2-20,8	140-240 bar, 40-70 °C	2
teofilina	0,055-0,14	140-240 bar, 40-70 °C	2
teobromina	0,016-0,083	140-240 bar, 40-70 °C	2
paclitaxel	0,011-0,074	141-346 bar; 38-56 °C	3
Compostos Fenólicos			
Catequina*	0,36-32,1	80-130 bar; 40 °C	4
Quercentina*	0,22-6,37	80-120 bar; 40 °C	5

* solubilidade em CO₂+etanol (5-30%)

1- TAYLOR (1996) ; 2- SALDAÑA *et al* (1999); 3- VANDANA e TEJA (1997); 4- BERNA *et al* (2001); 5- CHAFER *et al* (2004).

2.1.5. Processo de Extração com Fluido Supercrítico

A extração de um componente de uma matriz sólida é realizada pelo contato direto entre o substrato sólido e o solvente supercrítico (FSC). Sob o ponto de vista celular, a extração de compostos solúveis do material vegetal ocorre na seguinte seqüência (BRUNNER, 1994):

- A matrix 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 habilidade em se remover um certo soluto a partir da matriz sólida depende dos seguintes fatores: solubilidade do soluto a ser extraído pelo FSC, interação soluto- matriz sólida, localização do soluto na matriz e porosidade do sólido. A solubilidade de certo componente nem sempre implica na sua extração pelo fluido supercrítico. Um exemplo é o caso da cafeína, que embora seja solúvel em CO_2SC , é verificado o oposto quando presente em grãos de café seco (TAYLOR, 1996). Quando se trata de produtos naturais, deve se considerar a grande complexidade das estruturas e a localização do soluto nessa estrutura.

Se por um lado, existe interesse em plantas cuja localização do soluto está na superfície da estrutura, ou de fácil obtenção como é o caso dos óleos voláteis presentes nas folhas e sementes, em outros casos, o composto de interesse pode estar presente dentro de estruturas muito complexas e de difícil acesso, como é o caso de alcalóides, presentes nos vacúolos celulares (SOVOVÁ, 2005, SIMÕES *et al*, 1999). Dessa forma, quando se trata da extração de produtos naturais, deve se ter em mente a complexidade estrutural existente nos materiais em questão.

Sob o ponto de vista macroscópico, o processo de extração supercrítico consiste basicamente em duas etapas: 1) a extração, e 2) a separação do extrato do solvente. Inicialmente, o solvente (FSC) é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. Durante a extração, o solvente escoar através do leito fixo e solubiliza os componentes extraíveis. A mistura soluto/solvente é removida do extrator até o precipitador, onde ocorre a separação pelo abaixamento da pressão ou aumento da temperatura (BRUNNER, 1994).

O processo de extração supercrítico pode ser representado e monitorado através das curvas de extração. Estas são determinadas pela massa total de extrato obtida 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 extrato (kg);

$Y(H,t)$ é a razão entre a massa de soluto e a massa de solvente 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.

A representação das curvas de extração em três regiões distintas tem sido verificada para diversos sistemas de produtos naturais com CO_2 supercrítico, como na extração de carotenóides e lipídios de buriti (FRANÇA *et al*, 1999), extração do óleo essencial de camomila (POVH, 2000), extração de caroteno e lipídios de óleo de palma (FRANÇA e MEIRELES, 2000).

2.1.6. Modelagem Matemática

O conhecimento das taxas de transferência de massa durante o processo de extração bem como das restrições termodinâmicas (solubilidade e seletividade) é de grande

importância no dimensionamento de equipamentos e “scale up” de um processo com fluidos supercríticos (FERREIRA e MEIRELES, 2002).

Vários modelos matemáticos vêm sendo propostos para a extração de produtos naturais utilizando fluidos pressurizados (GOODARZANIA e EIKANI, 1998, REVERCHON *et al*, 1999, TEZEL *et al*, 2000, REIS-VASCO *et al*, 2000, COCERO e GARCIA, 2001, FERREIRA e MEIRELES, 2002; MARTINEZ *et al*, 2003). As equações que descrevem o processo de transferência de massa na extração supercrítica em meios porosos são determinadas através do balanço de massa em ambas as fases: sólida e fluida. O mecanismo físico da transferência de massa na extração pode ser explicado baseando-se na natureza (morfológica) da matriz, na distribuição do soluto na matriz sólida, composição e poder de solvatação do fluido supercrítico (CORREA *et al*, 2001).

Alguns modelos são bem simples, considerando apenas valores médios e determinando-se os parâmetros do modelo através do ajuste da equação aos dados experimentais. Entretanto, esses parâmetros podem não ter nenhum significado físico. Para a modelagem do processo de forma mais real, seria ideal considerar fatores como dispersão axial e radial, difusão intraparticular, transferência de massa através da interface sólido fluido, resistência à transferência de massa devido a reações químicas e transição de fase. Entretanto, modelos com grande número de considerações dificultam o ajuste não somente em termos matemáticos como também pelo elevado número de parâmetros a serem determinados. Na realidade, os fenômenos que não são considerados nas equações do modelo acabam sendo incorporados aos parâmetros, que ficam mascarados nos ajustes com dados experimentais (POVH, 2000).

O fato é que as dificuldades na modelagem de sistemas complexos, como produtos naturais, estão associadas ao grande número de compostos presentes no material, além da existência de interações entre componentes do extrato, o solvente e a matrix sólida (FERREIRA e MEIRELES, 2002).

Alguns modelos, porém, estão sendo utilizados pelo grupo LASEFI por apresentarem considerações como simplicidade matemática (CRANK, 1975, ESQUÍVEL *et al*, 1999; TAN e LIOU, 1989); significado físico aos parâmetros do modelo (SOVOVÁ, 1994); aplicação em sistemas similares ao sistema folhas/FSC (GOTO *et al*, 1993) e a possibilidade de representar o extrato como uma somatória de classe de compostos (MARTINEZ *et al*, 2003).

2.1.6.1 Modelo de CRANK (1975)

O modelo de CRANK (1975) foi descrito como sendo um modelo de transferência de massa desenvolvido a partir da analogia entre os fenômenos de transferência de massa e calor de uma partícula esférica em um meio uniforme. Considera-se que a partícula esférica é o sólido que contém o soluto a ser extraído. Dessa forma, aplicando a segunda Lei de Fick para a difusão e resolvendo o balanço de massa, obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{X}{X_0} = \left(\frac{6}{\pi^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 Dt}{r^2} \right) \quad \text{Eq.(2)}$$

onde: X é a concentração do soluto remanescente na esfera ;

X_0 é a concentração inicial do material a ser extraído;

r é o raio da esfera;

D é o coeficiente de difusão do soluto na esfera (único parâmetro ajustável);

t é o tempo de extração.

2.1.6.2 Modelo de ESQUÍVEL *et al* (1999)

ESQUÍVEL *et al* (1999) descreveram três modelos matemáticos para representar as curvas de extração de óleo de casca de azeitona: o modelo empírico, modelo esfera simples (que considera o leito constituído por esferas porosas inertes), e o modelo de Lack's modificado por SOVOVÁ (1994). No modelo empírico, a equação que representou as curvas de extração do óleo de casca de azeitona é descrita a seguir:

$$e = e_{\text{lim}} \left(\frac{t}{k+t} \right) \quad \text{Eq.(3)}$$

onde: e é a razão massa de óleo extraído pela massa inicial de alimentação;

e_{lim} é a razão massa de óleo extraído pela massa inicial de alimentação considerando um tempo infinito de extração;

k é o parâmetro ajustável.

2.1.6.3 Modelo de TAN e LIOU (1989)

Este modelo descreve a transferência de massa interfacial como um modelo cinético de primeira ordem, desconsiderando a dispersão axial e a difusão intra-partícula. As equações de balanço de massa que regem esse modelo são:

$$\varepsilon\rho \frac{\partial Y}{\partial t} + u\rho \frac{\partial Y}{\partial h} = -(1-\varepsilon)\rho_s \frac{\partial X}{\partial t} \quad (\text{na fase fluida}) \quad \text{Eq.(4)}$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -k_d X \quad (\text{na fase sólida}) \quad \text{Eq.(5)}$$

onde k_d é a constante de desorção (parâmetro ajustável);

ρ é a densidade do solvente;

ρ_s é a densidade do sólido;

u é a velocidade superficial;

ε é a porosidade do leito.

Considerando as condições iniciais $Y(h, t=0)=0$; $X(h, t=0)= X_0$ e de contorno $Y(h=0, t)=0$ na resolução das equações 3 e 4, obtém-se a equação que representa a razão mássica do extrato no solvente na saída do extrator, em função do tempo:

$$Y(h=H, t) = \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \left[\exp\left(\frac{k_d \varepsilon H}{u}\right) - 1 \right] \exp(-k_d t) \quad \text{Eq.(6)}$$

onde H é a altura do leito de extração;

t é o tempo de extração;

X_0 é a concentração inicial do material a ser extraído.

Ao se aplicar a condição inicial $Y(h, t=0)=0$ na equação acima, verifica-se que esta não é obedecida. Essa restrição do modelo indica a existência de um possível erro na resolução das equações de balanço de massa.

2.1.6.4 Modelo de GOTO *et al* (1993)

GOTO *et al* (1993) descreveram o processo de extração do óleo volátil de menta como sendo um processo de desorção cujo equilíbrio é atingido instantaneamente. Definiram que a transferência de massa ocorre através da superfície das folhas, a qual é tratada como sendo um sólido poroso, e que a partícula sólida apresenta um formato de placa plana cuja espessura é muito menor que as outras dimensões. Dessa forma, a equação de transferência de massa é dada por:

$$\beta \frac{\partial X_{\text{poros}}}{\partial t} + (1 - \beta) \frac{\partial X_{\text{folhas}}}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 X_{\text{poros}}}{\partial h^2} \quad \text{Eq.(7)}$$

$$\frac{\partial X_{\text{folhas}}}{\partial t} = k_d \left(X_{\text{poros}} - \frac{\partial X_{\text{folhas}}}{\partial K} \right) \quad \text{Eq.(8)}$$

onde: β é a porosidade das folhas;

D é a difusividade efetiva intrapartículas;

k_d é o coeficiente de desorção;

K constante de equilíbrio de desorção;

Neste modelo, D e k_d são os parâmetros ajustáveis.

2.1.6.5 Modelo de MARTINEZ *et al* (2003)

MARTINEZ *et al* (2003) consideram que o extrato é uma mistura de diversos compostos ou grupo de compostos de similar estrutura química. Neste modelo, as equações de balanço de massa apresentam termos relacionados a fenômenos de transporte que podem ocorrer durante o processo de extração, conforme descrito a seguir:

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{aY} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad (\text{fase fluida}) \quad \text{Eq.(9)}$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{aX} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(X, Y)}{1-\varepsilon} \frac{\rho}{\rho_s} \quad (\text{fase sólida}) \quad \text{Eq.(10)}$$

Considerando estado estacionário e sem dispersão axial na fase fluida, tem-se:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad \text{Eq.(11)}$$

onde u é a velocidade intersticial do solvente;

h é a coordenada axial do leito de extração;

Da_Y é o coeficiente de dispersão axial;

Da_X é o coeficiente de difusão na fase sólida;

ρ é a densidade do solvente;

ρ_S é a densidade do sólido;

ε é a porosidade do leito;

$J(X,Y)$ é o fluxo de transferência de massa interfacial.

O termo de transferência de massa interfacial, $J(X,Y)$, pode ser interpretado de diversas formas. Neste, MARTINEZ *et al* (2003) descrevem $J(X,Y)$ como uma função logística dependente da composição do extrato ao longo do processo. A resolução das equações acima, na condição inicial $Y(h=0, t)=0$, possibilita obter por integração, a equação que representa a curva de extração:

$$m_i(h=H, t) = \frac{Q_{CO_2} HA_i}{u\varepsilon} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - \frac{1}{1 + \exp[b_i t_{mi}]} \right\} \quad \text{Eq.(12)}$$

onde A_i , b_i e t_{mi} são os parâmetros ajustáveis do modelo.

Pela Eq. 12, quando o tempo tende ao infinito, a massa do composto extraído tende a um valor fixo, denominado como a quantidade máxima de soluto extraída a uma certa

condição de processo (m_{ti}). Rearranjando a Eq 12, tem-se a Eq. 13, na qual se verifica uma redução no número de parâmetros ajustáveis (b_i e t_{mi}).

$$m_i(h=H,t) = \frac{m_{ti}}{\exp(b_i t_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq.(13)}$$

2.1.6.6 Modelo de SOVOVÁ (1994)

SOVOVÁ (1994) propôs um modelo matemático que considera a existência de células intactas e células rompidas formando o leito. Dessa forma, o soluto se apresenta sob duas condições: soluto de fácil acesso (X_p) e o soluto de difícil acesso (X_k). Durante o processo de extração o soluto de fácil acesso é extraído primeiro, sendo seguido pelo soluto de difícil acesso, e a partir de então se inicia a fase final de extração descrita como etapa difusiva. O processo pode então ser dividido em três etapas. As equações simplificadas do balanço de massa são:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X,Y)}{\varepsilon} \quad (\text{fase fluida}) \quad \text{Eq.(14)}$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{-J(X,Y)}{1-\varepsilon} \frac{\rho}{\rho_s} \quad (\text{fase sólida}) \quad \text{Eq.(15)}$$

O termo $J(X,Y)$ se refere à transferência de massa interfacial e é definido por SOVOVÁ (1994) como:

$$J(X, Y) = k_{YA} (Y^* - Y) \quad \text{para } X > X_k \quad \text{Eq.(16)}$$

$$J(X, Y) = k_{XA} X \left(1 - \frac{Y}{Y^*}\right) \quad \text{para } X < X_k \quad \text{Eq.(17)}$$

Através da resolução das equações 13 e 14, SOVOVÁ (1994) apresentou as equações que representam a curva de extração com a massa total de extrato na saída do extrator, em função do tempo:

$$m(h=H, t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-Z)] \quad \text{para } t \leq t_{CER} \quad \text{Eq.(18)}$$

$$m(h=H, t) = Q_{CO_2} Y^* [t - t_{CER} \exp(Z_w - Z)] \quad \text{para } t_{CER} \leq t \leq t_{FER} \quad \text{Eq.(19)}$$

$$m(h=H, t) = m_{SI} \left\{ X_0 \frac{Y^*}{W} \ln \left[1 + \left[\exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp\left[\frac{WQ_{CO_2}}{m_{SI}}(t_{CER} - t)\right] \left(\frac{X_p}{X_0}\right) \right] \right\} \quad \text{para } t \leq t_{FER} \quad \text{Eq.(20)}$$

onde:

$$Z = \frac{m_{SI} k_{YA} \rho}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon) \rho_S} \quad \text{Eq.(21)}$$

$$W = \frac{m_{SI} k_{XA}}{Q_{CO_2} (1-\varepsilon)} \quad \text{Eq.(22)}$$

$$Z_w = \frac{ZY^*}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp \left[\frac{WQ_{CO_2} (t_{CER} - t)}{m_{SI}} \right] - X_k}{X_0 - X_k} \right\} \quad \text{Eq.(23)}$$

$$t_{CER} = \frac{m_{SI} X_p}{Y^* Z Q_{CO_2}} \quad \text{Eq.(24)}$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_{SI}}{Q_{CO_2} W} \ln \left[\frac{X_k + X_p \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right)}{X_0} \right] \quad \text{Eq.(25)}$$

Neste modelo, os parâmetros ajustáveis são k_{AY} e k_{AX} (coeficientes de transferência de massa nas fases fluida e sólida, respectivamente).

2.2 Alimentos Funcionais e Produtos Fitoterápicos

O Brasil é um grande produtor de frutas, condimentos, plantas aromáticas e medicinais. Estes são utilizados não só nas indústrias alimentícias, mas também pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. A produção nacional de frutas é bastante variada. No Nordeste, frutas como o mamão, a manga, o melão e a uva se destacam dentre as frutas com produção irrigada para a exportação. O valor de exportação destas quatro frutas em 1996 era de 306,6 milhões de reais, e evoluiu para 667,5 milhões em 2001, um aumento de 117,7% no período (IBGE, 2004). Estima-se ainda que 82% da população brasileira utiliza produtos a base de ervas. O setor movimenta anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e emprega mais de 100 mil pessoas no Brasil (ABIFITO, 2004).

A biodiversidade encontrada no Brasil é extremamente ampla. Estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. É considerado o país com maior biodiversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, relativo a 10-15% do total estimado (SIMÕES *et al*, 1999). A implicação disso é o fornecimento de um elevado número de produtos de importância econômica; produtos estes visados pela indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Essa variedade de espécies existente permite a utilização de plantas em diversos setores, principalmente para fins alimentícios e/ou medicinais. Neste ponto, o termo alimento funcional vem sendo extensivamente aplicado.

O termo alimento funcional se refere aos alimentos que podem além de nutrir, fornecer benefícios à saúde ou atuar na redução do risco de doenças (PENNINGTON,

2002). Segundo a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, alimentos funcionais são aqueles que possam conter componentes, nutrientes ou não nutrientes com ação biológica, em quantidades que causem efeitos benéficos à saúde (Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999).

O termo foi introduzido primeiramente no Japão em meados dos anos 80; sendo este conhecido como “Alimentos para Uso Específico de Saúde” (FOSHU- foods for specified health use) (HASLER, 2001). Atualmente, o conceito de alimentos funcionais já se encontra amplamente difundido. Estudos e pesquisas vêm demonstrando a aplicação de diversos alimentos na redução do risco de doenças como: doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, diabetes e outras. Embora, o termo seja recente, a idéia de se utilizar alimento como remédio não é de hoje. Hipócrates, filósofo que viveu por volta de 2500 AC já afirmava: “Alimentos são remédios e remédios são alimentos”. Dentre os alimentos considerados funcionais, podem ser citados: aveia, soja, tomate, linhaça, uva, vinhos, chá verde, dentre outros (GOLDBERG, 1994; HASLER, 2001).

Já se sabe que dietas ricas em frutas, legumes e verduras reduzem a incidência de câncer e hipertensão. No entanto, não está ainda totalmente esclarecido de que forma ou que componentes exercem este efeito benéfico, entretanto a explicação mais aceita é a presença de compostos antioxidantes nesses alimentos. Os compostos fenólicos são a maior classe de antioxidantes que são encontradas nas plantas, sendo verificado altas concentrações nas frutas e vegetais (LEMOS, 2002).

PENNINGTON (2002) listou cerca de 120 alimentos considerados funcionais por apresentarem componentes bioativos, dentre eles a manga, os chás verde e preto. O chá perde apenas para a água como sendo o alimento mais consumido do mundo. A grande

importância dos chás se deve aos constituintes fenólicos presentes, principalmente no chá verde. Os polifenóis constituem mais de 30% do peso bruto das folhas do chá fresco. Nos últimos anos, houve um grande interesse nos efeitos farmacológicos do chá verde, principalmente devido à sua ação quimiopreventiva contra o câncer e também pela indicativa de reduzir o risco de doenças cardiovasculares (HASLER, 2001).

2.2.1 Compostos Bioativos das Plantas

As plantas são fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos. Dentre os metabólitos secundários, os alcalóides, polifenóis (flavonóides, taninos, antraquinonas), e terpenóides vêm sendo amplamente estudados devido à extensa aplicação de diversos compostos pertencentes a essas classes.

2.2.1.1- Alcalóides

Alcalóides são compostos nitrogenados, com características básicas; constituem-se num vasto grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas presentes nas plantas (SIMÕES *et al*, 1999).

Esta classe é definida como substâncias de ocorrência natural, não sendo vitais para os organismos que a produzem. 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; PHILLIPSON e ZENK, 1980).

Os alcalóides apresentam elevada atividade farmacológica, sendo encontrados predominantemente nas angiospermas. Aproximadamente 13.000 espécies de plantas conhecidas têm sido utilizadas como medicamento pelo mundo. Os constituintes de várias espécies de plantas têm servido como modelo para medicamentos sintéticos, como atrofina para tropicamina, quinina para cloroquina, e cocaína para procaína e tetracaína (KUTCHAN, 1995). A maior parte dos alcalóides possui ação sobre o sistema nervoso (CORDELL, 1998). Devido ao elevado número de atividades biológicas atribuídas aos alcalóides, estes vêm sendo alvo de estudos, desde o século XVII.

São altamente tóxicos e na maioria das vezes possuem sabor amargo. Geralmente são 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 (KILLOP, 1970).

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 alcalóides indólicos monoterpênicos podem ser classificados em 8 tipos, de acordo com a estrutura de seus esqueletos. Esta subdivisão foi proposta por Kisakurek e Hesse, em 1980. Entretanto, em 1984, Van Beek *et al* incluíram mais três classes. A numeração baseia-se no esqueleto da ioimbina (Figura 2.3), proposto por Le Men e Taylor, em 1965, levando em conta a sua biogênese (PHILLIPSON e ZENK, 1980).

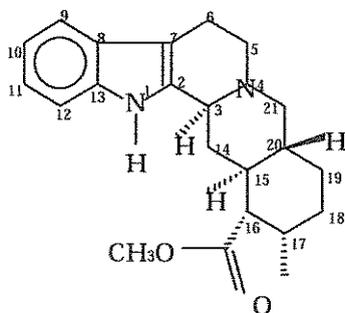


Figura 2.3: Iombina (PHILLIPSON e ZENK, 1980).

A dificuldade apresentada pela complexidade dos sistemas cíclicos, do ponto de vista de elucidação das estruturas, a pouca estabilidade, associada ao baixo rendimento com que são encontradas nas plantas, obriga a busca de métodos de análise mais rápidos e que não haja ocorrência de degradações químicas (PEREIRA, 1999).

Atualmente, os alcalóides indólicos vêm apresentando grande importância econômica. Devido às suas propriedades farmacológicas comprovadas, muitos já estão sendo utilizados pela medicina, como é o caso da vincristina e vimblastina (anti-leucêmicos); a ergotamina (combate à enxaqueca); a ajmalicina e a ioimbina (distúrbios do fluxo sanguíneo); e reserpina (antihipertensivo) (SIMÕES *et al*, 1999).

2.2.1.2- Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, encontrando-se amplamente distribuída no Reino Vegetal. Hoje, cerca de 4200 flavonóides são conhecidos, e encontram-se divididos em 12 classes (SIMÕES *et al*, 1999).

Possuem uma unidade básica de 15 carbonos, que inclui dois anéis aromáticos hidroxilados, ligados entre si por um fragmento de 3 carbonos (DI STASI, 1996). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas de núcleos A, B e C, conforme mostra a Figura 2.4 (SIMÕES *et al*, 1999).

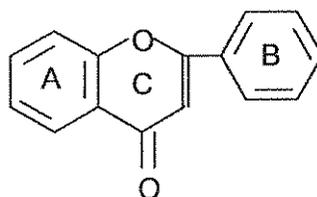


Figura 2.4: Núcleo fundamental dos flavonóides (SIMÕES *et al*, 1999).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados, e vários deles conjugados com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. Os O-heterosídeos, são aqueles que são ligados por intermédio de uma hidroxila, e os C-heterosídeos, aqueles que são ligados por um átomo de carbono. Se o flavonóide encontra-se de forma livre, sem o açúcar, este é chamado de aglicona (SIMÕES *et al*, 1999).

O interesse da indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos pelos flavonóides advém das importantes propriedades que estes proporcionam. Além de conferirem cor e valor nutricional a alguns alimentos, os flavonóides exercem efeitos benéficos no combate a diversas doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, o que tem sido atribuído à sua propriedade antioxidante e antiinflamatória (SIMÕES *et al*, 1999; WILLIAMS *et al*, 2004).

Dentre os flavonóides com propriedades farmacológicas comprovadas, estão a rutina (antioxidante, anti-hemorrágica, antiespasmódica), a apigenina (antiinflamatória), a galangina (antitumoral), a quercentina (antiviral, antioxidante, antiinflamatória, anti-hemorrágica, antiespasmódica, antiúlcera) (SIMÕES *et al*, 1999).

2.2.1.3-Terpenóides

Os terpenóides são substâncias derivadas biogeneticamente da molécula de isopreno, e são classificadas de acordo com as várias formas de ciclização. Estão divididos em: monoterpenos (10 unidades de C), sesquiterpenos (15 unidades de C), diterpenos (20

unidades de C), sesteterpenos (25 unidades de C), triterpenos (30 unidades de C), tetraterpenos (40 unidades de C) (HARBONE, 1991; DI STASI, 1996).

Os terpenóides são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Pesquisas mostram que os triterpenos ácido betunílico e ácido ursólico possuem atividade inibitória contra o vírus HIV (COWAN, 1999). Vários trabalhos evidenciam a utilização do ácido betunílico como agente anti-HIV tipo 1, antiinflamatório, antibacteriano, antimalarial e antitumoral (EVERS *et al*, 1996; KASHIWADA *et al*, 1996; FUJIOKA *et al*, 1994, SOLER *et al*, 1996; RECIO *et al*, 1995; MUKHERJEE *et al*, 1997; BRINGMANN *et al*, 1997).

Os óleos voláteis, também chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas e que apresentam aroma agradável e intenso. São em sua grande maioria constituídos de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides. Os compostos terpênicos mais freqüentes presentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (representam cerca de 90% dos compostos presentes nos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (SIMÕES *et al*, 1999).

Produzidos por estruturas secretoras especializadas, como por exemplo pêlos glandulares e canais odoríferos, os óleos voláteis podem ser armazenados em diferentes partes da planta (folhas, flores, caule, raízes, frutos e sementes). Entretanto, sua composição química, características físicas e aroma podem variar segundo sua localização (SIMÕES *et al*, 1999).

Uma grande variedade de propriedades terapêuticas é encontrada nos óleos voláteis obtidos de diversas espécies; como ação carminativa, antiespasmódica, estimulante, anestésica, antiinflamatória, anti-séptica, sobre o SNC, dentre outras (SIMÕES *et al*, 1999). Em virtude das diversas características organolépticas e propriedades terapêuticas, a

principal aplicação dos óleos voláteis é verificada nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

2.2.2- *Tabernaemontana catharinensis*

Tabernaemontana catharinensis A.DC. (*P. catharinensis*) é uma árvore conhecida como jasmim, leiteira de dois irmãos e casca de cobra. Pertence à família Apocynaceae (tribo Tabernaemontanae), essa árvore (Figura 2.5) é encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai, Sul e Sudeste do Brasil. A infusão de partes da planta é utilizada como antídoto contra picada de cobra, anestésico para dor de dente, para curar verrugas, e como vermífugo (ALLORGE, 1985; retirados de SPITZER *et al*, 1995). Segundo revisão monográfica apresentada por LEEUWEMBERG (1994), *T. catharinensis* possui as seguintes sinônimas: *T. affinis*, *T. australis*, *P. australis*, *T. hilariana*, *T. hybrida*, *T. acuminata*, *T. salicifolia*, *P. albidiflora*.

Os alcalóides presentes nas espécies de *Tabernaemontana* apresentam diversas atividades farmacológicas que fazem deste gênero uma importante fonte de micromoléculas bioativas, como por exemplo: ação bactericida (voacamina), atividade cardiovascular (voacamina e voacorina), hipoglicêmica (catarantina e coronaridina), analgésica (conofaringina), antitumoral (camptotequina), etc. (PELLETIER, 1988, LEEUWEMBERG, 1994).

RATES *et al* (1993) avaliaram a atividade antineoplásica, antiinflamatória e analgésica de extratos de folhas, sementes e cascas da árvore da *T. catharinensis*, e verificaram que os extratos brutos das folhas e sementes apresentaram atividade

antineoplásica; os extratos aquosos e alcoólicos, administrados em ratos, tiveram efeito antiinflamatório. Além disso, alguns extratos apresentaram atividade analgésica contra a irritação abdominal induzida pelo ácido acético. As análises indicaram a presença de sete alcalóides indólicos: coronaridina, tabersonina, olivacina, coronaridina-hidroindolenina, catarinensina, decarbometoxivoacamina e tabernamina.



Figura 2.5: *Tabernaemontana catharinensis*²

² Foto tirada no Guará/Campinas/SP.

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

PEREIRA (1999) isolou e identificou 13 alcalóides indólicos, 12 triterpenos e 2 esteróis presentes em várias partes da *T. catharinensis*. Neste trabalho, pôde ser constatada, através de ensaios biológicos, a atividade antiofídica, anti-tumoral e tripanomicida dos extratos, frações e substâncias isoladas. Dentre os compostos foi verificado a presença dos triterpenóides: ac. betulínico e ac. ursólico que possuem diversas atividades, incluindo ação contra o vírus HIV comprovada, conforme descrito anteriormente .

BATINA *et al* (2000) e ALMEIDA *et al* (2004) também demonstraram atividade antiofídica e antitumoral dos extratos de *T. catharinensis*. BATINA *et al* (2000) avaliaram o efeito dos extratos aquosos e etanólicos dessa espécie na neutralização do veneno letal de *Crotalus durissus terrificus*. Verificaram que tanto o extrato aquoso quanto o extrato etanólico apresentaram atividades antiofídica e antitumoral. O extrato etanólico foi fracionado em seis frações, a primeira apresentou compostos basicamente polares, terpenos e esteróis. A quarta fração apresentou elevada atividade antiofídica, nesta fração identificaram a presença do alcalóide 12-metoxi-4-metilvoachalotina. Foi verificado que este alcalóide isolado promoveu uma inibição de 100% na ação letal do veneno. Por outro lado, ALMEIDA *et al* (2004) avaliaram o efeito dos extratos aquosos de *T. catharinensis* na inibição do veneno letal de *C. d. terrificus*. Neste trabalho, o extrato aquoso liofilizado foi fracionado, obtendo oito frações (P_I à P_{VIII}). A fração P_{VII} apresentou elevada atividade antiofídica. Verificaram que esta fração contém como composto majoritário o alcalóide 12-

metoxi-4-metilvoachalotina. As frações P_I, P_{VI} e P_{VIII} apresentaram atividade antitumoral. Esses resultados indicam que a atividade antiofídica e antitumoral exercida pelos extratos aquosos de *T. catharinensis* são desempenhadas por diferentes substâncias presentes nas frações analisadas. Além disso, esses resultados indicam que um extrato de *T. catharinensis* fracionado poderá proporcionar diferentes aplicações no combate a doenças distintas.

GUIDA *et al* (2003) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos brutos e frações ricas em alcalóides de *T. catharinensis*. A análise foi efetuada contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*. Os resultados indicaram que a atividade antibacteriana está relacionada com a presença de alcalóides encontrados nessa espécie.

O efeito leishmanicida de extratos de caule de *T. catharinensis* foi estudado por DELORENZI (1998). Este verificou que o extrato bruto do caule obtido por Soxhlet adicionado a 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. catharinensis*, utilizando a técnica de extração com fluidos supercríticos. Para tanto, utilizaram CO₂ como solvente e etanol (5% v/v) como co-solvente. Testes *in vitro* realizados com o extrato bruto etanólico das cascas de *T. catharinensis*, suas frações brutas (obtidas após o fracionamento do extrato bruto etanólico)

e com algumas substâncias isoladas (voacangina e coronaridina), constataram a ação leishmanicida da espécie.

A ação leishmanicida de extratos do caule e folhas de *T. catharinensis* foi confirmada por SOARES *et al* (2003). Os pesquisadores utilizaram frações ricas em alcalóides (AF) conseguidas a partir de extratos obtidos por extração supercrítica, nas condições de 250 bar/45 °C (E2) e 300 bar/55 °C (E4), com uso de etanol como cosolvente (5%, v/v). Verificaram que a fração E2, nas quantidades de 10 e 100 µg/mL, conseguiu inibir 20 e 80%, na sobrevivência das amastigotas; enquanto a fração E4, com 10 e 100 µg/ml, foi possível inibir 26 e 100%, o crescimento do parasita, respectivamente. Ambas frações apresentaram toxicidade nula para os macrófagos.

Recentemente, PEREIRA *et al* (2003a) avaliaram a atividade anticancerígena de extratos de *T. catharinensis* obtidos por extração supercrítica (300 bar/ 55 °C, 5% etanol v/v), e identificaram os principais compostos presentes nesses extratos. A atividade anticancerígena foi testada contra sete linhagens de tumores humanos: pulmão, mama, mama (fenótipo de resistência a múltiplas drogas), melanona, cólon, próstata e rim. Foi verificado que o extrato bruto de *T. catharinensis* apresentou atividade antiproliferativa a partir de 0,25 µg/mL com efeito citostático e citolítico, concentração dependente e sem seletividade entre as linhagens celulares utilizadas. A análise da fração rica em alcalóides (AF) indicou a presença majoritária dos alcalóides voacangina e coronaridina.

2.2.3- *Aloysia triphylla*

Aloysia triphylla (L'Hérit.) Britton, conhecida como cidrão ou falsa erva cidreira (Figura 2.6), cresce espontaneamente na América do Sul, e é cultivada no Norte da África e Sul da Europa. Nessas regiões, as folhas são amplamente utilizadas como chá devido ao seu aroma, e também a suas propriedades digestivas e antiespasmódicas (CARNAT *et al*, 1999). Pertencente à família Verbenaceae, possui os seguintes sinônimos botânicos: *Aloysia citridora* Palau, *Lippia citridora* (Lam.) Kunth, *Verbena triphylla* (ZAMORANO-PONCE *et al*, 2004).

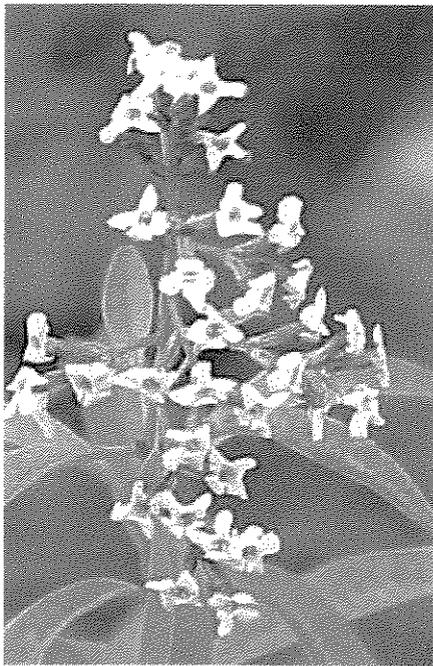


Figura 2.6: Flores e folhas de *Aloysia triphylla*³

³ Foto retirada do site: www.ispb.univ-lyon1.fr/.../liste%20dicot.htm

O cidrão, apresentado na, tem sido utilizado na medicina popular no controle de febre, resfriados e espasmos e contra tosse (DUKE, 1985; BÉZANGER-BEAUQUESNE *et al*, 1990, citados por CARNAT *et al*, 1999, HILGERT, 2001). Algumas propriedades farmacológicas, como antiespasmódica e antimicrobiana, foram atribuídas ao óleo volátil (TORRENT, 1976; DE PASQUALE *et al*, 1977, MARUZZELLA e SICURELLA, 1960; PELLECUER *et al*, 1980, citados por CARNAT *et al*, 1999). Atividade antibacteriana contra *E. coli*, *M. tuberculosis* *S. aureus* também foi verificada pelo do óleo volátil de *A. triphylla* (COWAN, 1999).

Devido ao seu efeito calmante, a infusão de *A. triphylla* é um dos remédios mais comuns utilizados em Porto Alegre no combate a insônia e ansiedade (WANNMACHER *et al*, 1990, citado por CARNAT *et al*, 1999).

OHNO *et al* (2003) verificaram que o óleo essencial de *A. triphylla* possui atividade antibacteriana, *in vitro* e *in vivo*, contra *H. pylori*. Análise do óleo volátil indicou a presença das seguintes substâncias: limoneno, neral, geranial, acetato de geranila, α pineno, sabineno, 1,8 cineol, trans- β -ocimeno, β -cariofileno, germacreno D, farseneno, e canfeno.

VALENTÃO *et al* (2002) verificaram que a infusão das folhas de *A. triphylla* possui atividade antioxidante, devido à presença de flavonóides e ácidos fenólicos. Recentemente, foi verificado que a infusão de folhas de *A. triphylla* também exerce uma ação antígeno-tóxica (*in vivo*), pelo aumento do poder antioxidante das células (ZAMORANO-PONCE *et al*, 2004).

Estudos revelam que o chá feito pela infusão das folhas de *A. triphylla* contém elevada quantidade de compostos poli-fenólicos incluindo verbascosida e luteolina 7-diglucuronida. Este também possui óleo volátil contendo: geranial, citral, limoneno, cineol, citrolenol, óxido de cariofileno, e espatulenol como sendo seus principais constituintes (CARNAT *et al*, 1999).

2.2.4- *Mangifera indica* L

Mangifera indica L, popularmente conhecida como manga (Figura 2.7), é uma das frutas tropicais mais antigas cultivadas. Pertencente à família Anacardiaceae, é originária do Sul da Ásia, sendo cultivada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. A Índia é o maior produtor de manga, sendo a maior parte consumida localmente. No Brasil, hoje o oitavo maior produtor, esta fruta é cultivada em grande escala nos estados do Sudeste e do Nordeste (MONARCA, 1979; ANDRADE *et al*, 2000; FAO, 2004).



Figura 2.7: Folhas e frutos de *Mangifera indica* L.⁴

⁴ Foto tirada no jardim da FEA/DEA/UNICAMP.

Além do elevado valor nutritivo desta fruta, estudos farmacológicos com a *M. indica* revelam que os extratos desta espécie possuem importantes atividades: antiespasmódica, antipirética, antiinflamatória, e ação contra diarreia (AWE *et al*, 1998; DAS *et al*, 1989; GARRIDO *et al*, 2004; SAÍRAM *et al*, 2003). Recentemente, foi reportado que extratos obtidos a partir de várias partes da manga apresentam atividades antioxidantes (ANILA e VIJAYALASKHMI, 2003; MARTINEZ *et al*, 2000, SOONG e BARLOW, 2004).

KABUTI *et al* (2000) estudaram o efeito inibitório dos extratos alcoólicos da amêndoa de *M. indica* sobre 18 espécies de bactérias, com 43 tipos de organismos. Os extratos de manga mostraram atividade contra ambas bactérias gram-positivas e gram-negativas, para todas as espécies, com os menores valores de MIC (minimum inhibitory concentration: 50 ppm) apresentados contra *Staphylococcus aureus*, tipos: B-E, TSS1, MRSA.

MAKARE *et al* (2001) avaliaram a atividade imunomodulatória⁵ de extratos alcoólicos da casca da árvore de *M. indica* em ratos. Os resultados indicaram que o extrato possui expressiva propriedade imunoestimulante.

LIMA *et al* (2003) estudaram os efeitos tóxicos e antiulcerogênicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. indica*. Os estudos foram efetuados através da administração oral em camundongos Swiss albinos machos e/ou ratos Wistar machos. Verificaram que os extratos de *M. indica* reduziram significativamente as lesões gástricas

⁵ Imunomodulação é um processo em que se pode alterar o sistema imune de um organismo por interferência de suas funções. Se esta resultar em um aumento das reações imunológicas, esta é chamada de imunoestimulante. Por outro lado, se resultar na redução da resistência contra infecções, esta é chamada de imunossupressora. Tanto a imunoestimulação quanto a imunossupressão são necessários para regular o funcionamento do sistema imunológico (MAKARE *et al*, 2001)

induzidas com HCl/etanol_0,2mL/animal nas doses de 500 mg/kg (46,7%) e 1000 mg/kg (70,5%), não produzindo nenhum efeito tóxico nos animais tratados. Os resultados confirmaram a indicação popular atribuída à espécie de possuir efeito gastroprotetor.

Com essas propriedades, a manga, como um todo, é vista como uma fruta de grande aplicação nas mais diversas áreas industriais. O que já vem sendo realizado em Cuba. Extratos aquosos da casca da árvore de *M. indica* estão sendo produzidos em escala industrial para serem utilizados como suplemento nutricional, fitoterápico e cosmético. Estudos prévios indicaram a possibilidade de se utilizar o extrato de *M. indica* devido à sua ação antioxidante. Uma análise química deste extrato aquoso de *M. indica* isolou sete compostos fenólicos (SELLÉS *et al*, 2002).

Flavonóides, triterpenóides e compostos voláteis são os compostos mais importantes presentes nos extratos de *M. indica*. A literatura reporta que esses compostos podem ser obtidos a partir de várias partes da planta como as sementes, amêndoa e casca, e folhas (ANDRADE *et al*, 2000; ANILA e VIJAYALASKSHMI, 2002 e 2003; ANJANEYULU *et al*, 1999, SEVERI *et al*, 2003).

SEVERI *et al* (2003) realizaram um estudo químico do extrato hidroalcoólico obtido a partir de folhas de *M. indica*. Utilizando reveladores específicos como NP/PEG, dragendorff e anisaldeído, verificaram a presença de flavonóides, esteróides e terpenos e a ausência de alcalóides nos extratos hidroalcoólicos de folhas de manga. Dentro do grupo dos flavonóides, verificaram a presença de rutina e outros flavonóides menos e mais polares que este. Análises em CCD das frações do extrato, quando reveladas com β -caroteno, devido à coloração apresentada, indicaram a presença de constituintes com possível ação antioxidante. Vários estudos realizados com flavonóides confirmam que esses compostos

3.1.2- *Aloysia triphylla*

As folhas de *A. triphylla* foram cultivadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biologia e Agrícola (CPQBA/UNICAMP), em Campinas/SP. Uma exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, sob N° UEC - 121.412. O material foi seco em estufa com circulação de ar forçado (Blue M, Blue Island, EUA) a 40 °C por 3 dias, em seguida triturado em um moinho de facas (Manesco & Ranieri, modelo MMR 320, Piracicaba, SP). O material foi então acondicionado em sacos plásticos e estocados em um freezer doméstico (Metalfrio, double action, São Paulo, SP) a temperatura inferior a -10 °C.

3.1.3- *Mangifera indica*

Folhas de *M. indica* foram coletados em Campinas (Local: FEA, pátio do DEA, Campinas, SP). O material foi seco à temperatura ambiente à sombra, e em seguida triturado em um moinho de facas (Tecnal, modelo TE-631, Piracicaba, SP). O material foi então acondicionado em sacos plásticos e estocados em um freezer doméstico (Metalfrio, double action, São Paulo, SP) a temperatura inferior a -10 °C.

3.1.4- Preparação e caracterização das matérias-primas

As matérias-primas foram caracterizadas quanto à umidade, distribuição do tamanho de partículas, densidade real e aparente do sólido. Além disso, foi determinada a porosidade do leito e de partículas.

• Umidade: Foram utilizados o Método de JACOBS (1973) e um Analisador de Umidade comercial para a determinação de umidade. O equipamento utilizado no Método de JACOBS (1973) 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. Este método é indicado para matérias-primas contendo material volátil. No caso da *T. catharinensis*, poderia ser empregado método convencional que utiliza estufa, entretanto, foi aplicado o método descrito acima pela facilidade e por ter sido utilizado com outras matérias-primas no LASEFI. O outro método utiliza a aplicação de microondas para medida de umidade. O equipamento, Analisador de Umidade (marca CEM, modelo SMART 5, Matthews, EUA), também possui uma balança interna que possibilita a leitura da massa das amostras durante a aplicação de microondas e uma impressora para registro dos dados. Este equipamento utiliza cerca de $2 - 4 \times 10^{-3}$ kg de matéria-prima, o que foi ideal para a determinação de umidade da *A. triphylla* e *M. indica*, uma vez que se dispunha de pouca quantidade desses materiais. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microondas Aplicada do DEA/FEA/UNICAMP.

• Diâmetro Médio das Partículas: A distribuição do tamanho das partículas da matéria-prima foi determinada utilizando um agitador de peneiras (ProduTest, model 3580, São Paulo, SP); com uma série de peneiras (mesh: 16, 24, 32, 48 e 80), do tipo *Tyler*, sob agitação mecânica, por 10 minutos. O diâmetro médio geométrico (d_{gw}) das partículas foi calculado através da equação que utiliza o diâmetro da partícula de superfície externa média, de acordo com o método de Sauter:

$$d_{gw} = \frac{\sum_{i=1}^n (w_i d_i^3)}{\sum_{i=1}^n (w_i d_i^2)} \quad \text{Eq (26)}$$

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

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

• Densidade real ou absoluta (d_r): A determinação da densidade real das partículas foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP, utilizando a técnica de picnometria em gás Hélio.

• Densidade aparente (d_a): Para seu cálculo, foi utilizado o volume da coluna de extração e a massa de matéria-prima contida na mesma.

• *Porosidade total do leito e das partículas (ε):* Com os dados da densidade real e aparente, foi calculada a porosidade total do leito e das partículas, como segue:

$$\varepsilon = 1 - (d_a/d_r) \quad \text{Eq.(27)}$$

3.2- Extração a Baixa Pressão

As extrações a baixa pressão (low pressure extracton: LPSE) foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando etanol (P.A., Merck, lotes K31865683 312, lote K33237283 422) como solvente. Foram empregados dois procedimentos: *i)* Uso do Shaker: neste, cerca de $5,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ kg matéria-prima foram acondicionadas em erlemeyer de 250 mL, e então foi adicionado o etanol (proporção 1:10, m/v, matéria-prima:etanol), e mantidos em um shaker (Marconi, modelo MA 420, Piracicaba, SP) por três horas, a temperatura ambiente (25 °C). Após esse período, foi feita uma filtração em papel filtro de 15 μm (J.Prolabe, São José dos Pinhais, PR) e o material filtrado foi evaporado em um evaporador rotativo (Laborota, modelo 4001, Viertrieb, Alemanha) com controle de vácuo (Heidolph Instruments GMBH, Viertrieb Alemanha) a 40 °C. Foram utilizadas as matérias-primas MP1 e MP2 da *T. catharinensis*; *ii)* Uso da centrífuga: neste, cerca de $3,00 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ kg de material foram colocados em contato com o etanol e colocados em uma centrífuga (Jouan, modelo BR4i, St Herblain, França) a 2000 rpm por 12 minutos. Após esse período, o material foi filtrado e evaporado da mesma forma como descrito para o procedimento anterior. O primeiro procedimento foi utilizado para a *T. catharinensis* e o segundo para as folhas de *M. indica*.

3.3- Hidrodestilação

A hidrodestilação foi realizada em um destilador tipo Clevenger. Essa extração foi realizada para *M. indica* e *A. triphylla*, na qual foi utilizado cerca de 30 e $50 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ kg de matéria-prima, respectivamente. O processo durou cerca de 3 horas, conforme descrito pela AOAC 962.17. Este processo foi realizado no LASEFI-DEA/ FEA-UNICAMP, para a *M. indica*; e no CPQBA/UNICAMP, para a *A. triphylla*.

3.4- Soxhlet

A extração foi realizada a 78 °C, por 24 horas utilizando etanol (P.A., Merck, lote K30916283 231) como solvente, conforme descrito por DELORENZI (1998). Para essa extração foi utilizada a MP1 da *T. catharinensis*. Foram utilizados $100,25 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ kg de matéria-prima para 0,5 L de etanol.

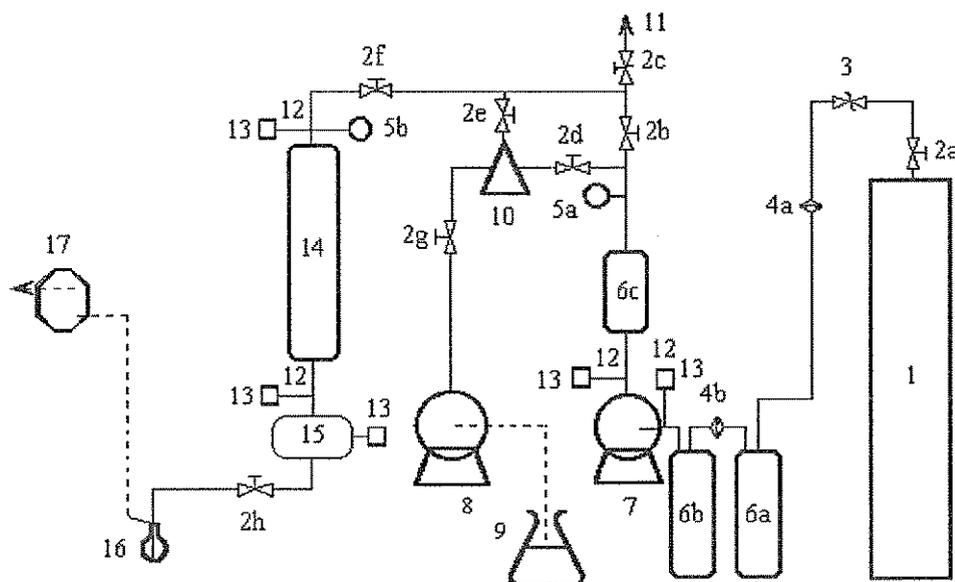
3.5- Processo de Extração com Fluido Supercrítico

3.5.1- Equipamentos

As extrações com fluido supercrítico foram realizadas em três equipamentos que se encontram no LASEFI-DEA/ FEA-UNICAMP, e estão descritos a seguir.

3.5.1.1- Unidade SFE I:

Este consiste basicamente de uma coluna de extração, duas bombas de alta pressão, dois banhos termostáticos programáveis e um medidor de vazão. Detalhes do equipamento podem ser encontrados em ZANCAN *et al* (2002). Um desenho esquemático da unidade de extração pode ser observado na Figura 3.1.

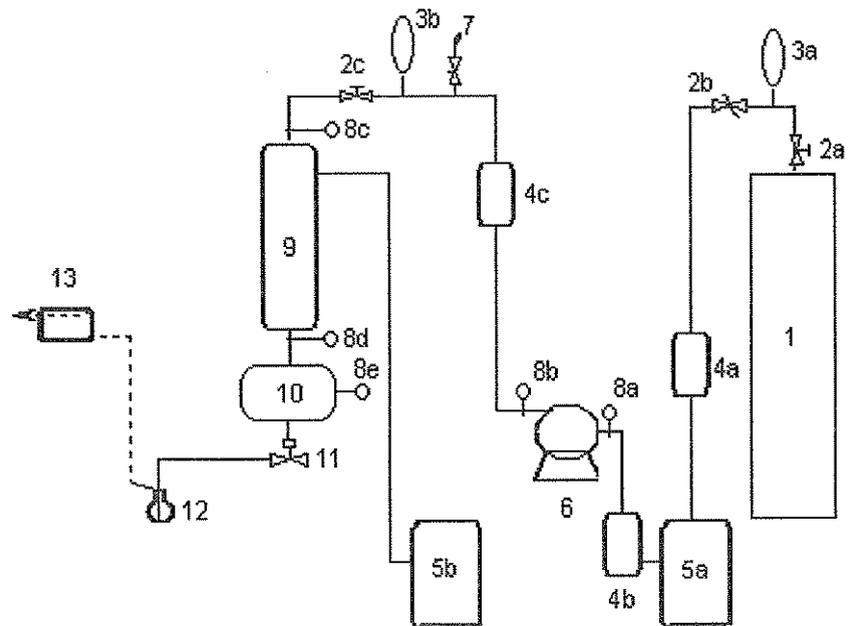


- | | |
|---|---|
| 1- Cilindro de CO ₂ com pescador | 10- Misturador de CO ₂ e Co-solvente |
| 2- Válvulas | 11- Purga |
| 3- Válvula de Retenção | 12- Termopar Ferro-Constantan |
| 4- Filtro de Linha | 13- Indicador de Temperatura |
| 5- Manômetro | 14- Extrator encamisado |
| 6- Trocador de calor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

Figura 3.1: Desenho esquemático da Unidade SFE_I.

3.5.1.2- Unidade SFE II:

Esta unidade é similar à unidade SFE_I, com a exceção da ausência da bomba de co-solvente. Detalhes do equipamento podem ser encontrados em RODRIGUES *et al* (2002). A Figura 3.2 apresenta um desenho esquemático da unidade de extração SFE_II.

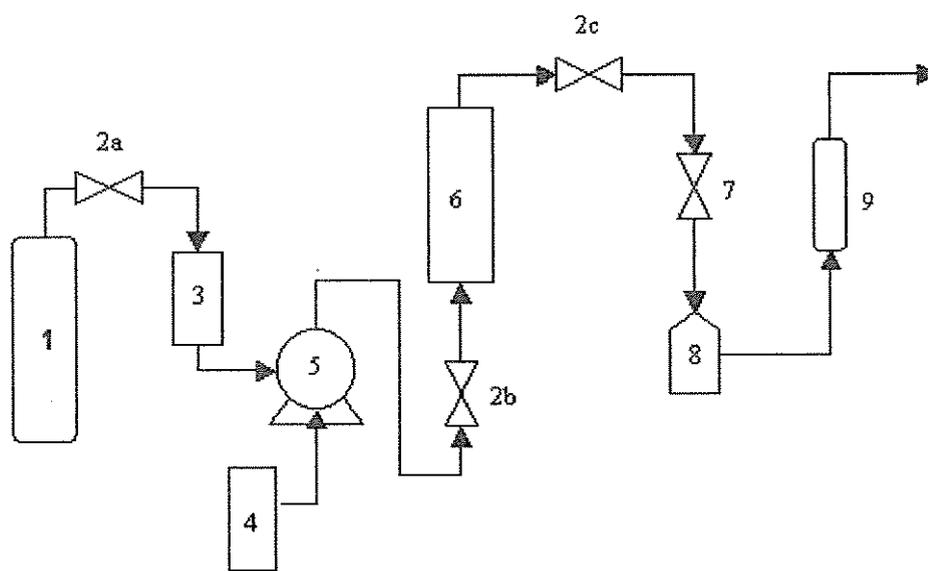


- | | |
|---|----------------------------------|
| 1- Cilindro de CO ₂ com pescador | 8- Indicador de Temperatura |
| 2- Válvula de Retenção | 9- Extrator encamisado |
| 3- Manômetros | 10- Manta |
| 4- Trocador de calor | 11- Válvula micrométrica |
| 5- Banhos termostáticos | 12- Frasco coletor de extrato |
| 6- Bomba de CO ₂ | 13- Totalizador de volume gasoso |
| 7- Purga | |

Figura 3.2: Desenho esquemático da Unidade SFE_II

3.5.1.3- Unidade SFE III: Spe_ed

A unidade de extração SFE_III é uma unidade comercial (Spe_ed SFE, Applied Separations, modelo 7071, Allentow, EUA), com uma coluna de 5 mL (Thar Designs, Pittsburgh, EUA). O desenho esquemático da unidade é apresentado na Figura 3.3.



- | | |
|---|------------------------------|
| 1- Cilindro de CO ₂ com pescador | 6- Coluna de Extração |
| 2- Válvulas de retenção | 7- Válvula micrométrica |
| 3- Banho termostático | 8- Frasco coletor de extrato |
| 4- Cilindro de N ₂ | 9- Medidor de Vazão |
| 5- Bomba de CO ₂ | |

Figura 3.3: Desenho esquemático da unidade SFE_III

3.5.2- Procedimento Experimental

- *Unidades de extração SFE_I e SFE_II*

A matéria-prima seca e moída foi empacotada de duas formas: *i)* em um primeiro instante foi utilizado uma célula de extração de aço inoxidável 316 de $221 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ ($37,5 \times 10^{-2} \text{ m}$ de comprimento e $2,74 \times 10^{-2} \text{ m}$ de diâmetro) na qual a matéria-prima era empacotada e então inserida no extrator encamisado (SFE_I); *ii)* Em um segundo instante, foi utilizada uma célula de nylon no acondicionamento da matéria-prima. Segundo ensaios realizados por MOURA (2004) e CARVALHO JUNIOR (2004), quando se utilizava a célula de aço inoxidável, uma pequena área entre a coluna de extração e a célula de aço inoxidável que contém a matéria-prima, não era preenchida; o solvente SC escoava não só por dentro do leito, como também por esse espaço entre a coluna de extração e a célula de aço inoxidável. A célula de nylon não permite que haja esse espaço vazio pois esta é colocado de tal forma que se adapta perfeitamente à coluna de extração. No caso dos ensaios realizados pelos pesquisadores do grupo, foi verificada grande diferença nos resultados, principalmente em termos de cinética de extração. Uma vez que parte do solvente não era propriamente utilizado no processo de extração. Dessa forma, os demais pesquisadores do grupo começaram a utilizar a mesma metodologia de acondicionamento do material em células de nylon, para evitar que ocorra um problema parecido. Assim sendo, foram realizados ensaios utilizando as células de nylon.

Após o empacotamento da matéria-prima, esta foi então inserida no extrator encamisado (SFE_I e SFE_II). As temperaturas dos banhos, que aquece a camisa do

extrator e que resfria o cabeçote da bomba, foram ajustadas de acordo com a temperatura de processo e temperatura de operação da bomba (-10 °C), sendo o sistema pressurizado em seguida. Na pressurização, o CO₂ líquido foi bombeado continuamente do cilindro de CO₂ até o trocador de calor e deste até o extrator encamisado, mantendo a válvula micrométrica sempre fechada. No caso da unidade SFE_I, devido ao uso de co-solvente, existe um misturador entre o trocador de calor e o extrator encamisado que permite que o CO₂ líquido entre em contato com o co-solvente, também bombeado de um reservatório. A mistura (CO₂ + co-solvente) segue do misturador até o extrator encamisado, onde ocorre a pressurização do leito. Ao atingir a pressão de operação, o processo de extração se inicia. Os extratos foram recolhidos em frascos coletores (100 × 10⁻⁶ m³) em intervalos de tempo pré-determinados.

Para os extratos obtidos com o uso de co-solvente foi necessária uma etapa de retirada do co-solvente antes de se armazenar o extrato. Caso o co-solvente utilizado fosse alcoólico, os frascos depois de pesados, foram levados para a estufa a vácuo (Napco-modelo 5831, Winchester, EUA; e Tecnal, modelo TE 395-1, Piracicaba, SP) na qual permaneceram por 24 horas, sem uso de aquecimento. Se o co-solvente fosse aquoso, os extratos então eram liofilizados (FTS Systems, modelo TE 395-1, Stone Ridge, EUA), também por 24 horas. Após a retirada do co-solvente, os frascos eram então novamente pesados, lacrados e armazenados em freezer doméstico para posterior análise.

- *Unidade de extração SFE_III*

Para a unidade de extração SFE_III, o procedimento foi um pouco diferente. Neste, o CO₂ foi pressurizado por meio de uma bomba pneumática, com ar pressurizado. A

matéria-prima foi acondicionada diretamente na coluna de 5 mL, sem a necessidade do uso de uma célula para adaptar o material à coluna. Entre as extremidades da coluna e o material empacotado, foi colocada lã de vidro a fim de evitar que parte do material empacotado ficasse retido no sistema de rosqueamento da tampa da coluna. A célula foi então colocada na unidade de extração. Após a temperatura do forno atingir a temperatura de operação e a temperatura do banho para resfriamento do CO₂, atingido -10 °C, o sistema foi pressurizado. No caso dos ensaios com *Aloysia triphylla*, os frascos coletores eram mantidos a 0 °C, em um banho de gelo, para minimizar a perda dos voláteis. Terminado o processo de extração, ocorreu a despressurização do sistema. Os frascos foram pesados, lacrados e armazenados em freezer doméstico para posterior análise.

3.5.2.1- Determinação do Rendimento Global (X_0)

Para a determinação da razão mássica de soluto presente no sólido (X_0), foram feitos ensaios de extração exaustiva da matéria-prima. Os ensaios tiveram uma duração de 30 minutos a 4 horas, dependendo da matéria-prima e unidade de extração utilizadas. Nos experimentos realizados nas unidades SFE_I e SFE_II, a matéria-prima ocupou de 3% a 23% do volume da célula, sendo o volume restante completado com esferas de vidro (Mesh 10), ou coluna de teflon (ocupando cerca de 87,5% do volume da coluna de extração). Enquanto que para a SFE_III, a matéria-prima ocupou quase a totalidade do volume da coluna. Os ensaios foram realizados na vazão de solvente (CO₂ ou CO₂+co-solvente) máxima admissível na unidade de extração (SFE_I e SFE_II) ou considerando um limite operacional que evita o arraste de material (SFE_III). A razão mássica de soluto presente no sólido (X_0) foi calculada como a razão entre massa de extrato e a massa inicial de

alimentação (kg/kg), em base seca. Os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata. O fim do processo foi determinado quando era verificado quando não havia mais material sendo extraído.

3.5.2.2- Construção das Isotermas de Rendimento Global

As isotermas de rendimento global foram construídas a partir de valores de X_0 obtidos nas temperaturas de 35 °C e 45 °C, para pressões de 100, 150, 200, 250, 300 e 350 bar. Foram mantidas constantes as massas de matéria-prima iniciais, vazão total de solvente, teor e tipo de co-solvente, quando utilizado. Os ensaios foram realizados nas unidades SFE_I e SFE_III.

3.5.2.3- Determinação experimental das curvas de extração

As curvas de extração foram determinadas com a massa acumulada de soluto extraída como função do tempo de extração. O experimento foi realizado na unidade SFE_I, na qual a célula de nylon foi empacotada com matéria-prima, a qual ocupou todo volume da célula. Em seguida, foi efetuado o processo de extração, conforme o procedimento descrito anteriormente (seção 3.5.2). Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.6- Planejamento das Extrações

3.6.1- *Tabernaemontana catharinensis*

As extrações foram todas realizadas na unidade de extração SFE_I. Primeiro, foi feito uma série de ensaios cujo planejamento foi de um fatorial completo para estudar a influência do tipo e teor (5, 10 e 15% v/v) de co-solvente, baseado nos resultados de PEREIRA *et al* (2004), a temperatura de 45 °C, e pressão de 250 bar e vazão total do solvente máxima permitida pelo equipamento, na determinação da razão mássica máxima de soluto (X_0) utilizando a técnica de superfície de resposta. Os ensaios foram realizados a uma vazão total de solvente de $(6,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ kg/s. Foram utilizados os seguintes co-solventes: metanol (MeOH: Merck, P.A., lote K30177809), etanol (EtOH: Merck, P.A., lotes K29614683, K31865683 312), isopropanol (IsoC3: Merck, P.A., lote K29992334), água e as misturas de água com álcoois. Foram utilizadas de $(2,55 \pm 0,01$ à $19,00 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ kg de *T. catharinensis*.

A segunda etapa foi construir as isotermas de rendimento total em diferentes condições de temperatura (35 e 45 °C) e pressão (150, 200, 250, 300, 350 bar), utilizando o tipo e teor de co-solvente escolhidos na etapa anterior. Foram utilizadas $12,155 \pm 0,005 \times 10^{-3}$ kg de *T. catharinensis*. Nesses ensaios, a vazão total de solvente utilizada foi de $(3,7 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ kg/s.

Na terceira etapa, foram realizados ensaios cinéticos e também estimados os parâmetros cinéticos. A vazão total de solvente utilizada foi de $(3,6 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ kg/s. As

condições de temperatura, pressão, teor e tipo de co-solventes foram otimizadas durante todo o desenvolvimento de trabalho. Foram utilizadas $85,00 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ kg de *T. catharinensis*.

Extrações a baixa pressão (LPSE) e por Soxhlet também foram realizadas a fim de comparar os diferentes rendimentos obtidos nos processos utilizados.

3.6.2- Aloysia triphylla

Para a *Aloysia triphylla*, foram realizados ensaios para a determinação de X_0 na unidade de extração SFE_III. Os ensaios, com duração de 35 minutos, foram realizados a uma vazão total de solvente de $(7,3 \pm 0,5) \times 10^{-5}$ kg/s, variando a temperatura e pressão de processo para a construção das isotermas de rendimento total. Estas foram construídas nas temperaturas de 35 e 45 °C, empregando pressões de 100, 150, 200, 250, 300, 350 bar. Foram utilizadas $(2,01 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ kg de *A. triphylla* em cada ensaio. Os resultados foram comparados com o processo de hidrodestilação realizado no CPQBA.

3.6.3- Mangifera indica

Para a *Mangifera indica*, foram realizados ensaios para a determinação de X_0 na unidade SFE_II a uma única condição de temperatura e pressão, devido à pouca quantidade do material. Os ensaios foram realizados a 250 bar e 45 °C a uma vazão total de solvente de

$(3,96 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ kg/s, com duração de 60 minutos de extração. Foram utilizadas $(4,95 \pm 0,05) \times 10^{-3}$ kg de *M. indica*.

Extrações a baixa pressão e por hidrodestilação também foram realizadas a fim de realizar uma comparação entre os processos utilizados.

3.7- Análise dos Extratos

3.7.1- Tabernaemontana catharinensis

A análise dos extratos de *T. catharinensis* foi realizada em três etapas: primeiro foi feito um fracionamento do extrato bruto para obtenção da fração alcaloídica, sendo em seguida evidenciada por Cromatografia em Camada Delgada (DELORENZI, 1998; VAN BEEK *et al*, 1984a). Então, foi realizada a identificação dos alcalóides voacangina e coronaridina, segundo PEREIRA *et al* (2004) e a quantificação por Cromatografia a Gás com Detector por Ionização em Chamas, conforme realizado por CARDOSO *et al* (1997), e PEREIRA *et al* (2004).

3.7.1.1- Fracionamento do Extrato

O extrato bruto foi ressuspenso em ácido clorídrico 5 % (fumegante, 37%, Merck, P.A) e lavado três vezes com hexano (Merck, P.A., lote K26803774934), para a retirada das substâncias graxas. O extrato aquoso ácido foi alcalinizado com hidróxido de amônio (25%, Merck, P.A.), e então lavado três vezes com clorofórmio (Merck, P.A., lote K28335045). A

fração orgânica foi evaporada até a secura em evaporador rotativo (Laborota, modelo 4001, Viertrieb, Alemanha) com controle de vácuo (Heidolph Instruments GMBH, Viertrieb Alemanha), a 40 °C.

3.7.1.2- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato orgânico obtido no fracionamento foi analisado por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando a sílica gel (60-PF254, Merck, 20 × 20 cm, 0,25 mm de espessura, lote 940378601) como adsorvente. O extrato foi eluído com uma mistura de vários eluentes: (S1) ciclohexano (Merck, P.A., lotes K2680374934 e K33039974), clorofórmio (Merck, P.A., lotes K28335045 e K31503045) e diclorometano (Merck, P.A., lote K24900450809) 6:3:1; (S2) clorofórmio-metanol (Merck, P.A., lote K26224109909) 9:1; (S3) ciclohexano:acetato de etila (EM Science, Grau cromatográfico grade, lote 3903991) 4:1; (S4) clorofórmio, e revelado com Dragendorff (reagente específico para visualização de alcalóides).

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

A fração alcaloídica foi analisada em Cromatógrafo a Gás com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC) (*Shimadzu*, modelo CG 17A, Kyoto, Japão), com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (*J&W Scientific*; 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Folsom, EUA), utilizando como gás de arraste hélio na vazão de 1,7 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 280 °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, EM

Science, Grau cromatográfico, lote 3903991). A coluna foi aquecida a uma temperatura de 100 °C por 5 min sendo então aumentada para 280 °C a 10 °C/min, permanecendo nesta por 10 minutos. A identificação foi baseada na análise comparativa dos cromatogramas dos extratos com a literatura (CARDOSO *et al*,1997; CARDOSO *et al*,1998; PEREIRA *et al*, 2004) 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). A quantificação dos alcalóides foi feita através das curvas padrão dos mesmos, conforme PEREIRA *et al* (2004). Esta análise foi realizada no LASEFI-DEA/FEA- UNICAMP.

3.7.2- Aloysia triphylla

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

Os constituintes químicos dos extratos de *A. triphylla* foram identificados no CPQBA. A identificação foi realizada em um Cromatógrafo a Gás acoplado à Espectrometria de Massas (Hewlett Packard 5980/5971, Palo Alto, CA, EUA) equipado com uma coluna HP5 (30 m × 0,2 mm × 0,33 μm). A coluna foi aquecida de 60 °C (3 °C /min) até 240 °C permanecendo por 7 min. As temperaturas do injetor e detector foram de 220 °C e 250 °C, respectivamente. A vazão do gás de arraste hélio utilizada foi de 1mL/min. O índice de retenção dos compostos foi determinado em relação aos n-alcenos. A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação de seus índices de retenção e espectros de massas das substâncias com o banco de dados do CG-EM (Nist 98, Wiley libraries).

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

A quantificação das substâncias presentes nos extratos de *A. triphylla* foi feita em um Cromatógrafo a Gás com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC) (*Shimadzu*, modelo CG 17A, Kyoto, Japão), com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (*J&W Scientific*; 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Folsom, EUA). As temperaturas de injetor e detector, programação aquecimento da coluna e demais condições foram iguais ao do CG-EM, descritas na seção 3.7.2.1. Esta análise (CG-DIC) foi realizada no LASEFI- DEA/FEA- UNICAMP.

3.7.3- *Mangifera indica*

3.7.3.1- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos de *M. indica* foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando a sílica gel (60-PF254, Merck, 20 × 20 cm, 0,25 mm de espessura, lote 940378601) como adsorvente. O extrato foi eluído com uma mistura de vários eluentes: [S5] acetato de etila: metanol, nas proporções 100:0, 50:50, 75:25; e [S6] n hexano:clorofórmio, nas proporções 75:25; 50:50; 25:75, conforme descrito por ANAJANELULU *et al* (1999), e ANILA e VEJAYALASKSHMI (2003). As placas foram reveladas com anisaldeído e dois reveladores que identificam a presença de flavonóides: 1) ácido bórico / ácido oxálico dissolvidos em etanol (FRANZ e KOEHLER, 1992); (2) 2-Aminoetil difenilbromato (CAS 524-95-8 Sigma 123k2512), as últimas visualizadas no UV-365 nm depois de 15 min (254 e 366 nm, UVP Upland, modelo cc10, EUA).

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

Os constituintes químicos do extrato da *M. indica* obtido por SFE foram identificados por CG-EM (Hewlett Packard 5980/sérieII) equipado com uma coluna HP-Ultra 2 column (25 m × 0,2 mm × 0,33 μm). A programação de aquecimento da coluna foi: 60 °C (3 °C /min) até 300 °C (5 min). As temperaturas do injetor e detector foram de 220 °C e 240 °C, respectivamente. A vazão do gás de arraste hélio utilizada foi de 1mL/min. A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do CG/EM (Nist) e com os espectros de massas de substâncias da literatura (ADAMS, 2001). A análise foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

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

A quantificação dos compostos presentes no extrato de *M. indica* foi realizada em um Cromatógrafo a Gás com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC) (*Shimadzu*, modelo CG 17A, Kyoto, Japão), com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (*J&W Scientific*; 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Folsom, EUA). As temperaturas de injetor e detector, programação aquecimento da coluna e demais condições foram as mesmas do CG-EM, de acordo com a seção 3.7.3.2. Esta análise (CG-DIC) foi realizada no LASEFI-DEA/ FEA- UNICAMP.

3.8- Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada para os diferentes extratos de *M. indica* e *A. triphylla* obtidos por extração supercrítica e extração a baixa pressão (no caso da *M. indica*). Para essa análise, foi utilizada a metodologia de HAMMERSCHIMIDT e PRAT (1978) com algumas modificações (LEAL *et al*, 2003). O substrato foi preparado utilizando 10 mg de β -caroteno (99% Acros, 40415-0010), 10 mL de clorofórmio (Merck, P.A., lote K28335045), 60 mg de ácido linolênico (99%, Sigma, U-59A- D4-G) e 200 mg de Tween 40 (Sigma, P.A., lote 030k0104). Esta solução foi concentrada em rota-evaporador (Laborota, modelo 4001 WB, Viertrieb, Alemanha) a 50 °C e em seguida diluída com 50 mL de água bidestilada. A reação foi realizada utilizando-se 1 mL de substrato adicionando 2 mL de água bidestilada e 0,05 mL de extrato diluído em etanol (99,8%, Merck, P.A., lote K31865683 312) (0,02 g de extrato/1 mL de etanol). A mistura foi colocada em banho (Tecnal, TE 159, Piracicaba, SP) a 40 °C e o produto foi monitorado usando espectrofotômetro (HITACHI, U-3010, Tóquio, Japão) com leitura em 470 nm em 0, 1, 2 e 3 horas de reação. O índice de inibição (%) foi calculado através da equação apresentada a seguir:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}_t}{\text{Abs}_{t=0}} \times 100 \quad \text{Eq. (28)}$$

3.9- Estimativa dos Parâmetros Cinéticos

Curvas de extração, similares à Figura 3.4, foram construídas com os dados experimentais obtidos nos ensaios cinéticos com a *T. catharinensis*. Os parâmetros cinéticos foram estimados a partir da curva de extração, e utilizando um programa escrito em linguagem SAS de ajuste linear e um outro programa de ajuste não linear, uma estimativa final para os parâmetros foi apresentado, conforme POVH *et al* (2001) e RODRIGUES *et al* (2002). O procedimento acima descreve as curvas de extração por um spline linear, sendo a intersecção das retas determinada pelo algoritmo de FREUND e LITTELL (1985). Com estes valores finais, pode ser determinado o período de taxa constante de extração (t_{CER}), taxa de transferência de massa para o período de taxa constante de extração (M_{CER}), e então ser calculado o valor da razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (Y_{CER}).

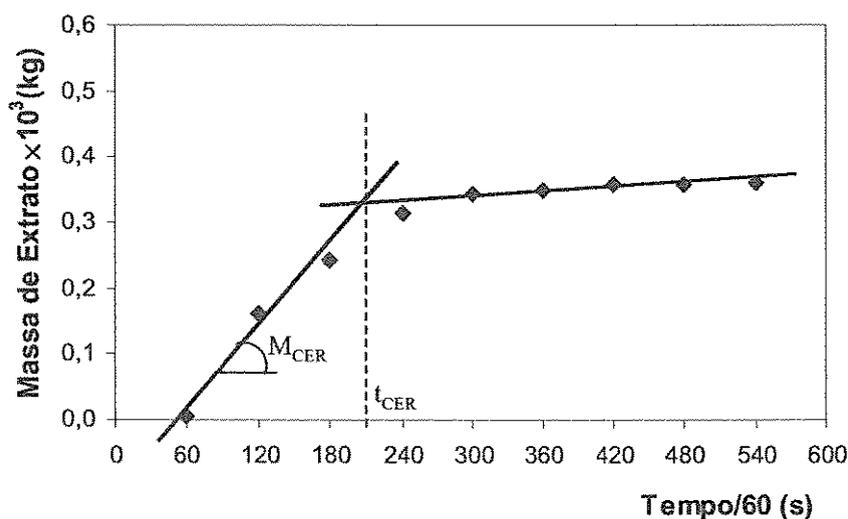


Figura 3.4: Curva de extração para o sistema *T. catharinensis*/CO₂/etanol (10%, v/v), obtida a 55 °C, 300 bar, $3,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total de solvente (PEREIRA *et al*, 2004).

3.10- Ajuste de Modelos Matemáticos às Curvas de Extração

O ajuste de modelos matemáticos às curvas de extração foi realizado para os ensaios com a *T. catharinensis* nas condições de 35 °C e 45 °C a 350 bar. Os valores experimentais de massa de extrato por tempo de extração foram utilizados como dados de entrada para o ajuste de parâmetros utilizando diferentes modelos. A modelagem foi realizada com ajuda do programa Tecanalysis V 1.0 desenvolvido no LASEFI por ROSA e MEIRELES (2001). Foram utilizados os seguintes modelos: CRANK (1975), GOTO *et al* (1993) e empírico (ESQUÍVEL *et al*, 1999) e TAN e LIOU (1989). O modelo de SOVOVÁ (1994), necessita do valor de solubilidade como dado de entrada e este não é conhecido para o sistema *T. catharinensis*+CO₂+co-solvente, por esse motivo, esse modelo não foi empregado. O modelo de MARTINEZ *et al* (2003) não foi testado por dificuldades computacionais.

Os parâmetros ajustados para cada modelo utilizado foram:

- Modelo de CRANK (1975): coeficiente de difusão de massa (D);
- Modelo de GOTO *et al* (1993): constante de equilíbrio de dessorção (k) e um parâmetro adimensional relativo ao coeficiente global de transferência de massa (Φ);
- Modelo empírico de ESQUÍVEL *et al* (1999): parâmetro ajustável do modelo (k);
- Modelo de TAN e LIOU (1989): coeficiente de dessorção (k_d).

3.11- Análise Econômica

Foi realizada uma análise econômica para estimar o custo de produção (COM: manufacturing cost) de extratos contendo alcalóides de *T. catharinensis* obtidos por extração supercrítica. Para isso, foi empregada a metodologia descrita por ROSA e MEIRELES (2001), que considera o COM como sendo função de cinco fatores: custos de matéria-prima, custo de mão de obra operacional, tratamento de resíduo, utilidades e capital de investimento. A expressão final para o COM é:

$$\text{COM} = 0,304\text{FCI} + 2,73\text{COL} + 1,23 (\text{CUT} + \text{CWT} + \text{CRM}) \quad \text{Eq.(29)}$$

onde: FCI é o capital fixo de investimento (fixed capital investment);

COL é o custo de mão de obra operacional (operational labor cost);

CUT é o custo de utilidades (utility cost);

CWT é o custo para o tratamento de resíduos (waste treatment cost);

CRM é o custo da matéria-prima (raw material cost).

3.12- Dificuldades experimentais

A principal dificuldade observada durante o desenvolvimento deste trabalho foi com relação à etapa analítica para os extratos de *T. catharinensis* devido à pouca quantidade de extrato, uma vez que o procedimento de determinação de rendimento global empregava

pouca quantidade de matéria-prima. Dessa forma, pouca quantidade de extrato bruto era obtida para se realizar a análise. Por ser uma etapa de baixa sensibilidade, podendo ocorrer perdas durante a execução, a etapa analítica acabava sendo mais demorada que a própria extração. Além disso, existe a possibilidade de oxidação dos alcalóides.⁶ O processo de purificação de alcalóides requer que a quantidade de extrato bruto inicial seja tal que mesmo ocorrendo perdas durante essa etapa seja possível obter uma quantidade mensurável dos compostos.

Além disso, mesmo uma análise aparentemente simples por CCD não forneceu resultados satisfatórios, uma vez que foi efetuada uma varredura com relação ao eluente clorofórmio-n-hexano (9:1 à 1:9) e somente uma banda foi observada. Outros eluentes foram testados, entretanto nenhuma melhora foi verificada. Embora não tenha sido possível separar os compostos presentes no extrato, foi verificada a presença de alcalóides pelo uso do revelador Dragendorff, que é específico para alcalóides.

Nos ensaios realizados com o uso de água como co-solvente vários experimentos tiveram que ser refeitos, decorrente de perdas de extrato na etapa de retirada da água do extrato. Isso ocorreu devido a problemas de estabilidade no liofilizador e também de manter os extratos congelados o suficiente para serem colocados neste equipamento (imprescindível para o uso do mesmo).

Com relação às extrações, quando se utilizou co-solvente a 15% e água com suas misturas a 5%, não foi possível contabilizar a quantidade de solvente presente na matéria-prima após a extração pois o material dentro da célula ficava encharcado, e na pesagem certa quantidade de massa foi perdida, não podendo ser contabilizada. Essa massa de

⁶ Prof Dr. Wagner Vilegas (Instituto de Química de Araraquara/UNESP), Comunicação Pessoal, 2003.

solvente é importante para se realizar a conversão da porcentagem de co-solvente volumétrica (v/v) para mássica (m/m), que é realizado através do balanço de massa (YODA, 2001). Por esse motivo, foi considerado a quantidade de co-solvente em porcentagem volumétrica (v/v).

É importante esclarecer também o motivo pelo qual foram utilizadas duas matérias-primas para a *T. catharinensis*. O material utilizado para a realização do trabalho experimental de doutorado (MPI) foi escolhido baseado em trabalhos anteriores (PEREIRA *et al*, 2004). Entretanto, na ocasião determinada para se realizar a segunda coleta, fomos informados de que um mês antes a árvore, que é de uma propriedade particular, havia sido cortada pela prefeitura de Campinas, sem o consentimento dos proprietários, que sabiam de nossa pesquisa. Isso, porque parte da árvore estava cobrindo a fiação da rua na qual ficava (cerva de 2/3 da parte aérea). Dessa forma, vimos a necessidade de realizar uma coleta em uma nova árvore (MP2). Esta, também foi estudada em trabalhos anteriores. Embora tenha sido utilizado duas matérias-primas de diferentes locais e épocas de coleta, as conclusões obtidas com os resultados apresentados continuam sendo válidas, uma vez que o objetivo foi avaliar as variáveis de processo, e isso foi feito utilizando um tipo de material em cada etapa, separadamente. Além disso, foi realizado um ensaio comparativo entre as matérias-primas, possibilitando uma comparação entre os resultados (Seção 4.1.4 e 4.1.5).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- *Tabernaemontana catharinensis*

O trabalho com a *T. catharinensis* foi desenvolvido utilizando a seqüência experimental: preparação e caracterização da matéria-prima, extrações (SFE, LPSE, Soxhlet), fracionamento dos extratos e análise dos resultados para cada etapa (teor e tipo de co-solvente, isotermas de rendimento total e cinética de extração). Ao longo do trabalho surgiram dificuldades na etapa de fracionamento dos extratos com relação as quais foram colocadas hipóteses para se tentar entender e explicar a fenomenologia do processo de extração. Dessa forma, será apresentada a seqüência experimental na qual as hipóteses colocadas foram avaliadas e validadas ou não para a etapa em questão. Embora as hipóteses iniciais não tenham sido totalmente confirmadas quando aplicadas nas etapas seguintes do trabalho, os resultados serão apresentados na seqüência em que o estudo foi realizado, discutindo e avaliando cada hipótese testada.

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* (MP1, MP2).⁷

Matéria-Prima	Umidade (% b.u.)	Distribuição granulométrica (mesh)	D_p $\times 10^4$ (m)	$d_r \times 10^{-3}$ (kg/m ³)	$d_a \times 10^{-3}$ (kg/m ³)	ϵ
MP1	9,9	de 24 à 48	5,94	1,216	0,345	0,716
MP2	9,6	de 24 à 48	5,85	1,360	0,310	0,772

4.1.1- Testes iniciais de (X_0)

Os ensaios realizados nesta primeira etapa foram feitos mantendo-se a pressão, a temperatura e a vazão do solvente constantes em 250 bar, 45 °C e $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, respectivamente. Nesta fase, foram empregados diferentes co-solventes, sem variar o teor destes (5% v/v) no solvente. Foram utilizados etanol (EtOH), isopropanol (IsoC3) e metanol (MeOH). Inicialmente utilizou-se uma massa de $2,55 \times 10^{-3}$ kg de matéria-prima, equivalente a quase 3% do volume da célula de extração. Realizaram-se triplicatas para cada determinação de X_0 . Os resultados são apresentados na Tabela 4.2.

⁷ A densidade real das partículas também foi calculada empregando o método de BUCZEK e GELDART (1986), que utiliza um picnômetro de 10 cm³ previamente calibrado com água destilada a 25 °C, e microesferas de vidro de 200 mesh como fluido picnométrico. Entretanto, a densidade real apresentou um valor bem inferior (cerca de 40% menor) ao valor obtido pela a técnica picnometria com gás Hélio e inferior ao normalmente encontrado por outras matérias primas utilizadas no LASEFI. Tendo em vista que a técnica picnometria com gás Hélio é mais precisa, foi considerado então o valor da densidade real obtido por esta análise (Tabela 4.1). O método de BUCZEK e GELDART (1986) foi usado por PEREIRA *et al* (2004), uma vez que a técnica com gás hélio, realizada na Central Analítica do IQ/ UNICAMP, não produziu resultados satisfatórios. Desta forma, a determinação da densidade real deste tipo de matéria-prima ainda requer estudos, que fogem do escopo do presente trabalho. Esta informação foi utilizada na modelagem matemática das curvas de extração; logo, para aqueles modelos que fazem uso da densidade real, os parâmetros ajustados variaram com o valor da densidade real utilizado.

Tabela 4.2: Razão mássica máxima de soluto (X_0) obtida em extrações utilizando diferentes co-solventes (5% v/v), a 45 °C, 250 bar e $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, utilizando a MP1.

Co-solvente	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)*
EtOH	$2,4 \pm 0,1$
IsoC3	$2,7 \pm 0,2$
MeOH	$2,5 \pm 0,3$

* em relação à alimentação

Pela Tabela 4.2, e realizando uma análise de variância (ANOVA), foi verificado que não houve diferenças significativas entre o uso desses co-solventes ($p_{\text{valor}} = 0,401$). Esperava-se que a diferença entre esses fosse observada no teor de coronaridina (C) e voacangina (V). Ao realizar uma análise por CG-DIC dos extratos alcalóidicos (AF), obtidos após o fracionamento dos extratos brutos, verificou-se a presença de traços ou ainda a inexistência de picos característicos dos alcalóides de interesse. Uma possível causa seria devido à ocorrência de alguma perda de material (AF) durante a etapa de fracionamento, sendo esta perda significativa, uma vez que a massa inicial de matéria-prima utilizada na extração foi de $2,55 \times 10^{-3}$ kg, e que a quantidade de AF obtida variou de 17 a 20% do extrato bruto (EB). Desta forma, aumentou-se a massa de matéria-prima para ocupar 9 e 23% do volume da célula de extração, e novos ensaios para a determinação de X_0 foram realizados em duplicata, utilizando etanol (5%) como co-solvente. Os valores obtidos de X_0 não apresentaram muita diferença ($2,5$ e $2,4 \pm 0,1$) $\times 10^{-2}$ kg/kg. Ao analisar os extratos fracionados por CG-DIC, foi verificada a presença somente do pico característico do alcalóide voacangina (V), não havendo diferenças na relação massa de voacangina/massa

de alimentação. Sendo assim os demais ensaios foram realizados utilizando massa de matéria-prima para ocupar 9% do volume da célula de extração. Observou-se ainda que a magnitude do pico (pico 4, Figura 4.1) foi muito pequena quando comparado com os resultados obtidos por PEREIRA (2002) (Figura 4.2).

Essa diferença pode ter ocorrido devido à época de colheita da matéria-prima. Segundo PEREIRA (2002), tanto a época da colheita quanto o local de plantio e as partes da planta utilizadas na extração afetam o rendimento do processo. Em seu trabalho, verificou que o valor ótimo de rendimento foi obtido quando se utilizou a matéria-prima colhida em Guará-Campinas, no mês de novembro (época de floração). A mesma influência da época de corte da planta no teor de extrato foi encontrado por BISWAS (1973, citado por 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, citado por PELLETIER, 1988) como sendo responsáveis por diferenças na composição química.

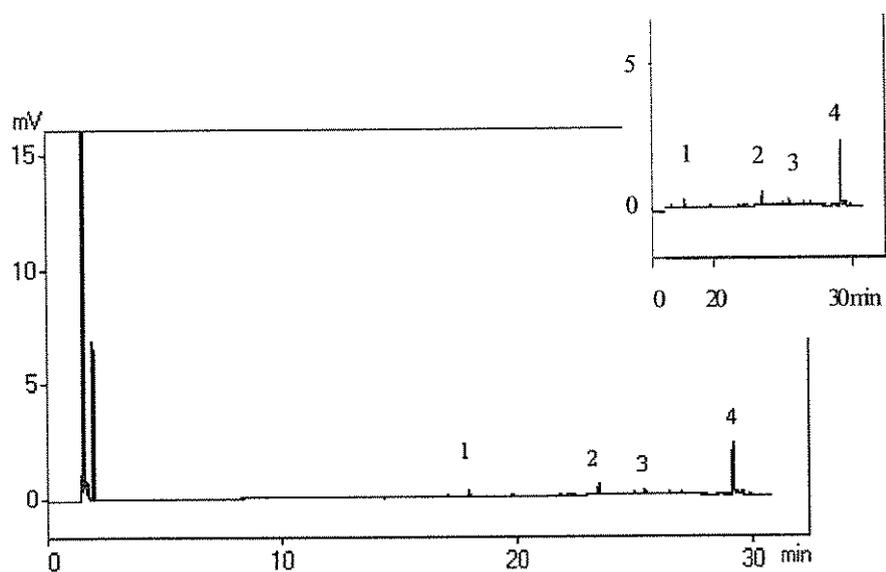


Figura 4.1: Cromatograma do extrato AF obtido no experimento efetuado a 250 bar, 45 °C, 5% (v/v) etanol (V: pico 4), utilizando 9% do volume da célula, utilizando a MP1.

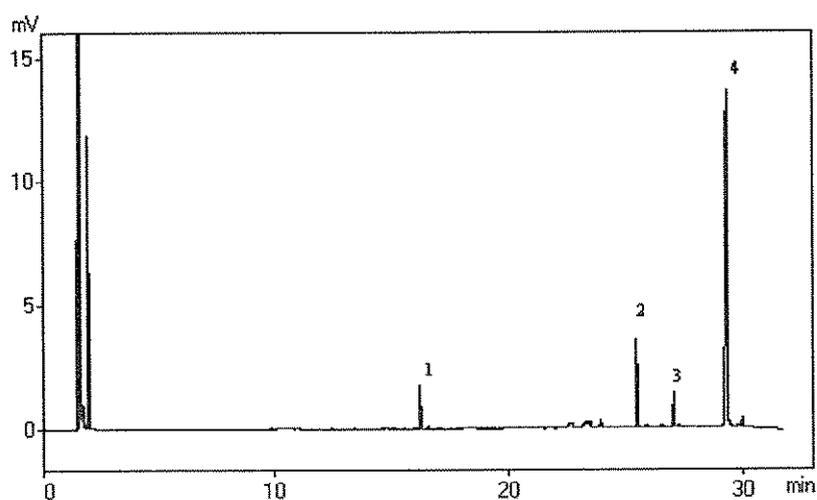


Figura 4.2: Cromatograma da amostra obtida em 240 minutos de extração do experimento efetuado a 250 bar, 35 °C, 5% (v/v) etanol (C: pico 2, V: pico 4) (PEREIRA, 2002).

Mesmo sabendo da pouca quantidade de voacangina e coronaridina (traços) presente nesta matéria-prima, tentou-se realizar os ensaios já estabelecidos anteriormente para verificar a influência do uso de diferentes co-solventes na obtenção destes alcalóides.

4.1.2- Determinação de X_0 , variando o tipo de co-solvente a 5%

A Tabela 4.3 apresenta os valores de X_0 obtidos para os ensaios realizados com diferentes co-solventes, utilizando a MP1. Nesses ensaios a matéria-prima ocupou 9% célula de extração, e considerando que a vazão total de solvente foi de $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, então foi utilizada uma relação S/F igual a 54 (kg de solvente/kg de alimentação, em base seca). Dessa forma, o termo $X_{0, S/F=54}$ foi então definido como sendo a quantidade máxima de material extraível a dada condição de temperatura e pressão quando S/F=54. Os ensaios foram divididos em dois grupos: 1) co-solventes alcoólicos, e 2) co-solventes aquosos.

Tabela 4.3 : Rendimento global ($X_{0, S/F=54}$) obtido em ensaios feitos a 45 °C, 250 bar, $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, utilizando diferentes co-solventes (5 %) e suas misturas (1:1), utilizando a MP1.

Co-solvente	$X_{0, S/F=54} \times 10^2$ (kg/kg)*
(1) Alcoólico	
EtOH	$2,4 \pm 0,2$
IsoC3	$2,5 \pm 0,1$
MeOH	$2,5 \pm 0,4$
EtOH-IsoC3	$2,3 \pm 0,1$
EtOH-MeOH	$2,5 \pm 0,2$
MeOH-IsoC3	$2,1 \pm 0,2$
(2) Aquoso	
H ₂ O	$15,8 \pm 0,2$
H ₂ O- EtOH	$15,0 \pm 1,0$
H ₂ O-MeOH	$15,1 \pm 0,1$
H ₂ O-IsoC3	$12,9 \pm 0,5$

* em relação à alimentação

A análise de variância (ANOVA) para os ensaios do grupo (1), mostrou que o rendimento global não foi influenciado pelo tipo de co-solvente ($p_{\text{valor}} = 0,269$), apresentando um valor médio de $2,4 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ kg/kg. Para os ensaios do grupo (2), foi verificado um aumento significativo no valor de $X_{0, S/F=54}$, variando de 12,9 a $15,8 \times 10^{-2}$ kg/kg, entretanto, esses ensaios apresentaram vários problemas. Durante o processo de extração foram observados formação de espuma, e constante entupimento da válvula de saída do extrator (por causa do extrato se apresentar de forma desigual: extrato-espuma), o

que não era solucionado, mesmo se a temperatura da manta fosse aumentada (chegando a temperaturas até 150 °C). A formação de espuma se deve à presença de saponinas que são extraídas na presença de água (MATOS, 1997). A Figura 4.3 mostra o extrato obtido quando se utilizou água como co-solvente. A etapa de fracionamento desses extratos também foi dificultada. A presença de saponinas e de outros compostos não desejáveis que foram extraídos com a água podem ter dificultado a etapa de fracionamento. A presença desses outros compostos pode ser facilmente constatada pela coloração marrom muito intensa dos extratos brutos (Figura 4.3), diferente dos extratos obtidos com os co-solventes alcoólicos que apresentaram uma coloração esverdeada.



Figura 4.3: Extrato obtido na extração supercrítica utilizando água como co-solvente (5% v/v), a 250 bar, 45 °C e $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, utilizando a MP1.

Embora a água seja utilizada com sucesso na extração de outros alcalóides com CO₂SC (BRACHET *et al*, 2000, BICCHI *et al*, 1991; CHOI *et al*, 1999) o mesmo problema com a formação de espuma foi observado por outros pesquisadores (NOSSACK *et al*, 2000; SCHAEFFER *et al*, 1989). Essas dificuldades também podem estar relacionadas com o equilíbrio de fases dos sistemas CO₂/H₂O e CO₂/H₂O/álcoois. De acordo com BAMBERGER *et al* (2000), o sistema CO₂/H₂O nas condições utilizadas neste trabalho (250 bar e 45 °C) se apresenta na região de duas fases, formada por uma fase rica em CO₂ e uma fase rica em H₂O. Para os sistemas CO₂/H₂O/álcoois a 250 bar/ 45 °C se apresentam na região de equilíbrio líquido-líquido (YOON *et al*, 1994; LEE *et al*, 1996). Dependendo do álcool presente no sistema ternário (CO₂/H₂O/álcoois), na região de 40 a 160 bar e temperatura de 25 à 100 °C, o equilíbrio poderá apresentar-se em 3 ou 4 fases.

YODA *et al* (2003) também reportaram um comportamento não esperado para o sistema H₂O/CO₂/folhas de estévia a 30 °C e 250 bar. Os resultados indicaram a possibilidade de existir o fenômeno de retrogradação nesta região (30 °C/250 bar). Porém, este resultado (condição realizada em triplicata) não pôde ser esclarecido simplesmente em termos da influência da temperatura e pressão (pressão de vapor *vs* densidade do solvente). Para se tentar explicar tal resultado, seriam necessárias maiores informações sobre o equilíbrio de fases para o sistema H₂O/CO₂/folhas de estévia, que não era conhecido. Por outro lado, RAEISSI e PETERS (2001) realizaram um estudo em que descrevem o fenômeno da duplo-retrogradação. Neste trabalho, foi apresentado o diagrama P-x-y para o sistema etano/limoneno no qual pôde ser verificada a existência de uma região com três ou quatro pontos de orvalho para uma mesma composição. Em 2002 e 2004, RAEISSI e

PETERS mostraram esse mesmo comportamento para outros dois sistemas: sistemas etano/linalol e etano/óleo da casca de laranja. Segundo RAEISSI e PETERS (2001, 2002, 2004), esse fenômeno ocorre na região de temperatura próxima e logo acima a temperatura crítica do componente mais volátil. O fenômeno da duplo-retrogradação é caracterizado no diagrama P-x-y como sendo uma seqüência de fases em transição ocorrendo a uma concentração fixa da seguinte forma: gás → líquido + gás → gás → líquido + gás → fluido. Esse fenômeno pode ter ocorrido nos ensaios de YODA *et al* (2003) com o sistema H₂O/CO₂/folhas de estêvia e também com os sistemas *T. catharinensis*/CO₂/H₂O e *T. catharinensis*/CO₂/H₂O/álcoois apresentados neste trabalho.

Interações específicas (pontes de hidrogênio), bem como dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido, entre os co-solventes e um ou mais solutos podem estar influenciando a solubilidade dos solutos no solvente supercrítico/e ou no solvente utilizado no fracionamento. A literatura cita trabalhos desenvolvidos por vários pesquisadores que avaliaram as interações entre soluto, co-solvente, e matriz em fluidos supercríticos com intuito de correlacionar e ajustar parâmetros em modelos físico-químicos (EKART, *et al*, 1993; ALSTEN e ECKERT, 1993; TING *et al*, 1993). Entretanto, para entender a ocorrência de interações específicas, é necessário conhecer quais compostos estão presentes no extrato bruto.

4.1.2.1 Análise dos extratos

A Tabela 4.4 mostra as quantidades de alcalóides totais e voacangina, obtidos após a análise dos extratos.

Tabela 4.4: Massa de alcalóides totais (AF)* e de voacangina (V)* obtida após o fracionamento dos extratos obtidos em ensaios feitos a 45 °C, 250 bar, $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, utilizando diferentes co-solventes (5% v/v) e suas misturas (na proporção 1:1), utilizando a MP1.

Co-solvente	AF $\times 10^4$ (kg/kg)	V $\times 10^4$ (kg/kg)
(1) Alcoólico		
EtOH	21 \pm 4	1,3 \pm 0,1
IsoC3	15 \pm 1	1,0 \pm 0,1
MeOH	58 \pm 1	2,8 \pm 0,1
EtOH-IsoC3	31 \pm 17	2,0 \pm 0,5
EtOH-MeOH	29 \pm 2	2,5 \pm 0,8
MeOH-IsoC3	31 \pm 10	2 \pm 1
(2) Aquoso		
H ₂ O	100 \pm 10	tr
H ₂ O- EtOH**	66,2	tr
H ₂ O-MeOH**	109,0	tr
H ₂ O-IsoC3**	74,8	tr

* em relação à alimentação; ** sem replicação

Ao analisar os extratos fracionados (Tabela 4.4), foi verificado com relação às frações alcaloídicas (AF), uma diferença significativa entre o uso dos diferentes co-solventes ($p_{\text{valor}} = 0,023$), sendo o metanol o co-solvente que forneceu maior quantidade dessa fração (AF= $58 \pm 1 \times 10^{-4}$ kg/kg). Com relação ao teor de voacangina, tanto o metanol quanto a mistura EtOH-MeOH, promoveram uma maior extração desse alcalóide ($2,8 \pm 0,1$ e $2,5 \pm 0,8 \times 10^{-4}$ kg/kg, respectivamente); entretanto, estatisticamente não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p_{\text{valor}} = 0,110$). Embora tenha sido verificado que os

maiores rendimentos em AF e V foram obtidos com o uso de MeOH como co-solvente, este não foi mais utilizado nos ensaios seguintes por não ser considerado um solvente GRAS (generally recognized as safe).

Observa-se ainda na Tabela 4.4, que a quantidade de AF obtida pelas misturas EtOH-IsoC3 e MeOH-IsoC3 apresentaram grande desvio. Uma hipótese inicial (H_0) é que este desvio pode ter ocorrido devido a presença de IsoC3 nas misturas de co-solventes. Ou melhor, estas misturas com IsoC3 teriam extraído compostos que possuem forte interação com os solventes da etapa de fracionamento. Essas interações teriam afetado de tal forma a etapa de separação que acabaram refletindo nos resultados. O elevado desvio também foi observado com relação ao teor de voacangina obtida, entretanto este ocorreu para todos os ensaios que utilizaram misturas como co-solvente. De um modo geral, o erro experimental foi observado em maior intensidade na etapa de fracionamento. Além disso, é uma etapa susceptível a maiores perdas, principalmente porque se dispunha de uma pequena quantidade de extrato.

Verificou-se ainda um baixo teor de voacangina, cerca de 6,3% do total de alcalóides extraídos, e somente traços de coronaridina foram detectados. Entretanto, PEREIRA (2002) verificou que a quantidade de coronaridina + voacangina representava cerca de 15 a 25% da fração alcaloídica. Embora a matéria-prima utilizada nesta etapa do trabalho (MP1) tenha sido da mesma árvore utilizada por PEREIRA em 2002, a coleta foi realizada em épocas diferentes. PEREIRA (2002) utilizou material coletado em agosto de 2000, enquanto que a MP1 foi colhida em maio de 2002. Essa diferença pode estar ocorrendo devido ao estágio de biossíntese de alcalóides na planta (PHILLIPSON e ZENK,

1980; VAN BEEK *et al*, 1984b), ocorrendo um acúmulo máximo de alcalóides após a floração da mesma (outubro-novembro).⁸

Um fator importante, e neste caso fundamental, é a questão da biossíntese de alcalóides na planta. Apesar de existirem muitas informações sobre o efeito farmacológico dessas substâncias, pouco se sabe a respeito da forma como são sintetizadas pelas plantas. Isto se deve, em parte, às complexas estruturas de muitos alcalóides contendo múltiplos centros assimétricos. Nenhum progresso na identificação de enzimas biossintéticas de alcalóides foi obtido até 1970. Somente por volta dos anos 80, novas descobertas com relação a enzimas e etapas da biossíntese foram sendo descobertas, e então as classes de alcalóides parcialmente caracterizadas (KUTCHAN, 1995). A biossíntese de alcalóides indólicos é descrita esquematicamente no Anexo 2.

Levando em consideração a época de coleta da matéria-prima (maio), e que os alcalóides indólicos são obtidos após várias conversões biossintéticas, pressupõe-se que os alcalóides marcadores, coronaridina e voacangina, ainda se encontravam em formação na ocasião da coleta.

4.1.2.2- Análise das frações AF em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foi realizada uma análise em CCD dos extratos fracionados (AF) para verificar a presença de outros alcalóides separadamente, ou ainda outras classes de alcalóides, utilizando amostras de cada extrato fracionado anteriormente. As análises foram efetuadas

⁸ Dr. Alaíde Barreto (Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ), Comunicação Pessoal, 2002.

em placas cromatográficas, utilizando sílica gel como adsorvente. Foram testadas várias misturas de eluentes conforme descrito na secção 3.7.1.2. De acordo com a Figura 4.4, as placas reveladas não apresentaram separação de bandas, ou seja, para os sistemas S1, S3 e S4 as bandas permaneceram na base da placa, na aplicação das amostras, e para o sistema S2 as bandas correram toda a placa, finalizando no topo da mesma. Foi realizado ainda um teste saturando o meio com NH₃, entretanto, não foi verificada nenhuma diferença nos resultados. Apesar de não ter sido verificado a separação dos alcalóides pelos sistemas de eluentes utilizados, comprovou-se a existência desses em todas as amostras dos diferentes extratos aplicados.

Sabe-se que o extrato fracionado (AF) é composto por alcalóides que podem não ser detectados no CG-DIC, mas que são identificados por CCD, espectrofotometria UV-Visível, e podem ser elucidados por outras técnicas analíticas, como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13 (RMN de ¹H e ¹³C) (PEREIRA *et al*, 2004).⁹

⁹ Foi realizado um estudo avaliando-se a atividade antioxidante e antimicobacteriana das frações e extratos brutos de *T. catharinensis* obtidos por SFE, apresentados nessa seção (4.1.2). Dentre os resultados apresentados, foi verificado que todas as frações (AF, fração hexâmica e aquosa, resultados do fracionamento), apresentaram atividade antioxidante (AA) superior ao β-caroteno. A maior AA foi verificada nos extratos brutos, e não nas frações do extrato sugerindo que as diferentes substâncias químicas presentes no extrato bruto (EB) podem estar interagindo aumentando então a AA do EB. Uma discussão mais detalhada assim como outros resultados poderão ser verificados no trabalho de PEREIRA *et al*: "Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by Supercritical CO₂ + cosolvent" que se encontra submetido ao *Journal of Medicinal Foods*.

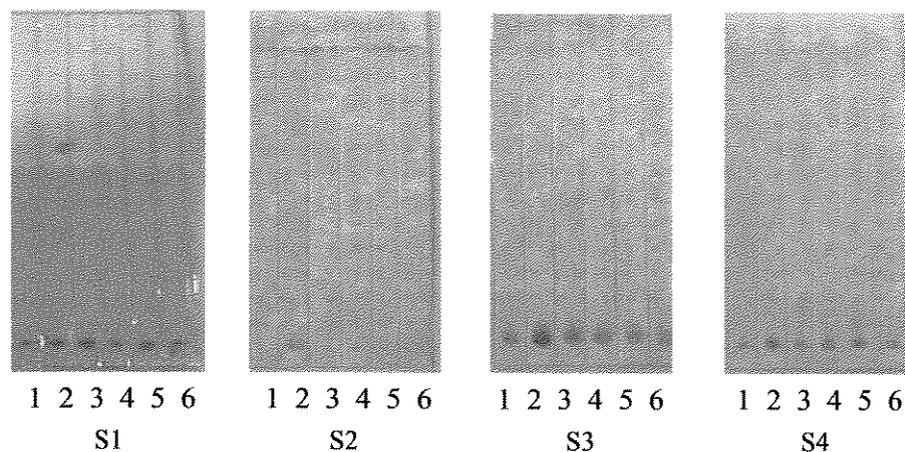


Figura 4.4: Análise em CCD de AF obtido após o fracionamento do extrato obtido por SFE utilizando diferentes co-solventes 1- EtOH; 2- IsoC3; 3- MeOH; 4- EtOH-IsoC3; 5- EtOH-MeOH; 6- MeOH-IsoC3, utilizando diferentes misturas de eluentes: (S1) ciclohexano-clorofórmio-diclorometano (6:3:1); (S2) clorofórmio-metanol (9:1); (S3) ciclohexano-acetato de etila (4:1); (S4) clorofórmio.

4.1.3- Extrações com CO_2SC e a mistura EtOH-IsoC3 como co-solvente (5% v/v), em diferentes proporções

Esses ensaios foram realizados para se verificar a existência de interações devido ao uso de IsoC3 como co-solvente, uma vez que resultados anteriores indicaram maiores desvios experimentais nos valores de AF obtidos nas extrações com o uso deste álcool como parte da mistura de co-solventes. A Tabela 4.5 apresenta valores de rendimento global, teor de alcalóides totais (AF) e voacangina para os experimentos que foram feitos utilizando a mistura EtOH-IsoC3 nas proporções 1:3 e 3:1. Os valores indicados na Tabela 4.5 para a proporção 1:1 são os mesmos apresentados na Tabela 4.3 e Tabela 4.4, e foram colocados para termos de comparação.

Tabela 4.5: Rendimento global ($X_{0, S/F=54}$), teor de alcalóides totais (AF) e voacangina (V) obtidos a 45 °C, 250 bar, $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, utilizando diferentes proporções de co-solvente (5% v/v), utilizando a MP1.

Co-solvente	$X_{0, S/F=54} \times 10^2$ (kg/kg)	AF $\times 10^4$, kg/kg	V $\times 10^4$, kg/kg
EtOH - IsoC3 (1:3)	$2,3 \pm 0,3$	25 ± 14	$1,2 \pm 0,3$
EtOH - IsoC3 (1:1)*	$2,3 \pm 0,1$	31 ± 17	$2,0 \pm 0,5$
EtOH - IsoC3 (3:1)	$2,4 \pm 0,2$	35 ± 14	$1,5 \pm 0,2$

* Tabelas 4.3. e 4.4

Novamente, um elevado desvio na fração alcaloídica (AF) foi observado nos três casos, chegando a ser 56 % no caso do ensaio com uso de EtOH + IsoC3 (1:3). Nos resultados anteriores (Seção 4.1.2.1), foi feita uma suposição de que o elevado desvio nos resultados era devido ao uso de isopropanol como co-solvente. Verifica-se que o maior desvio nos valores de AF (56% no valor de AF) foi observado nos ensaios cuja proporção dos álcoois na mistura de co-solvente apresentou maior quantidade de IsoC3. Assim, a hipótese inicial (H_0) continua sendo válida. Para o ensaio que utilizou a proporção 1:1, verificou-se a obtenção de maior quantidade de voacangina ($2,0 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ kg/kg). Mesmo sendo pequena a diferença de polaridade entre esses dois solventes, a alteração na proporção destes promoveu uma variação na quantidade de voacangina, embora não haja diferenças significativas entre os resultados ($p_{\text{valor}} = 0,224$). Outro fato observado, foi que embora a proporção 3:1 tenha fornecido maior quantidade de alcalóides totais, a quantidade de V foi menor quando comparada à proporção 1:1. Isso indica que houve uma extração de outros alcalóides um pouco mais polares que a voacangina. Como a proporção 1:1

promoveu maior teor de voacangina, os experimentos seguintes foram efetuados utilizando essa mesma proporção (1:1).

4.1.4- Testes iniciais com a Nova MP (MP2): determinação do rendimento global (X_0), massa de alcalóides totais e de voacangina

Primeiramente, foi realizado um teste com a MP2 utilizando quantidade de material similar ($7,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ kg) ao utilizado nos ensaios com a MP1. Mas, devido a pouca quantidade de extrato obtida com esse novo material, a etapa analítica ficou comprometida devido a perdas de material durante a etapa de fracionamento. Sendo assim, foram realizados novos testes, com maior quantidade de matéria-prima ($12,1 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ kg). A Tabela 4.6 mostra os valores de rendimento total, alcalóides totais e voacangina obtidos a partir da MP2, em comparação com MP1. Foi realizado também um teste utilizando ao invés da coluna de aço inoxidável, uma célula de nylon no acondicionamento da matéria-prima, conforme descrito na seção 3.5.2. Os resultados também são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Rendimento global (X_0), massa de alcalóides totais (AF) e voacangina (V) obtidos a 45 °C, 250 bar, $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s, utilizando 5% (v/v) de etanol para diferentes matérias primas (MP1 e MP2).

	Época da Coleta	Célula	Massa de MP $\times 10^3$ kg	S/F kg/kg	$X_0 \times 10^2$ kg/kg	AF $\times 10^4$ kg/kg	V $\times 10^4$ kg/kg
MP1	05/2002	aço inoxidável	7,145 \pm 0,007	54	2,4 \pm 0,2	21 \pm 4	1,3 \pm 0,1
MP2	11/2002	aço inoxidável	7,0 \pm 0,2	54	1,25 \pm 0,03	-	-
MP2	11/2002	aço inoxidável	12,1 \pm 0,1	28	1,2 \pm 0,1	23 \pm 3	1,3 \pm 0,2
MP2	11/2002	nylon	12,161 \pm 0,03	28	1,5 \pm 0,2	35 \pm 5	2,2 \pm 0,1

Com relação ao aumento da quantidade de material utilizado nos ensaios com MP2, os resultados indicaram que esse aumento foi suficiente para realizar os ensaios analíticos. Considerando que a vazão total de solvente foi mantida constante, pode ser verificado, para MP2, que a redução de S/F de 54 para 28, devido ao aumento da massa de alimentação, permitiu ainda utilizar quantidade de solvente suficiente para obter todo material extraível da matriz, uma vez que o valor de X_0 se manteve em $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ kg/kg, em ensaios com a célula de aço inoxidável. Sendo assim, os ensaios subsequentes foram realizados utilizando a relação S/F=28.

Pela Tabela 4.6, verifica-se que embora a MP1 (colhida em maio de 2002) tenha fornecido maior rendimento em extrato bruto, a MP2 forneceu maior teor de AF: 19,5% do extrato bruto, enquanto que para MP1, AF representou 8,4% do extrato bruto. Foi

observado ainda um baixo teor de alcalóides e voacangina presentes na MP2 quando comparado a resultados anteriores (PEREIRA, 2002). De acordo com HOFT *et al* (1998), a quantidade dos alcalóides majoritários de *T. pachysiphon* varia com a idade e forma de crescimento da folha, posição e idade da árvore. Variações sazonais na quantidade de alcalóides também foram observados por BISWAS (1973) citado por PELLETIER (1988). Vale lembrar que fatores ambientais também podem ser responsáveis pela variação dos alcalóides na planta (SEIGLER, 1981 citado por PELLETIER, 1988). Embora tenha sido reportado (VAN BEEK *et al*, 1984b; PHILIPSON e ZENK, 1980) que a quantidade máxima de alcalóides ocorre após a floração, nos meses de outubro-novembro, o oposto foi verificado neste caso. Isso sugere que outros fatores influenciaram a biossíntese desses alcalóides na planta.

Com relação ao teste utilizando a célula de nylon, para a MP2, foi verificado que houve um ligeiro aumento no rendimento total, refletindo em um aumento da fração AF. Esse resultado confirma a indicativa inicial da existência de um pequeno espaço vazio entre a célula de inoxidável e a coluna de extração, apresentado na Seção 4.4.2. Assim, os ensaios seguintes foram realizados com essa nova matéria-prima (MP2), utilizando a célula de nylon.

4.1.5- Soxhlet e Extração a Baixa Pressão (LPSE)

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos nas extrações por Soxhlet e LPSE. Foram incluídos os resultados da extração supercrítica a fim de comparação.

Tabela 4.7: Rendimento global (R_{Total}), teor de alcalóides totais (AF) e voacangina (V) obtidos por extração com fluido supercrítico (SFE), extração a baixa pressão (LPSE) e Soxhlet de duas matérias primas de *T. catharinensis*.

Processo	Matéria-Prima	R_{Total} (%)	$AF \times 10^4$ (kg/kg)	$V \times 10^4$ (kg/kg)
SFE* (EtOH, 5%)	MP1	$2,4 \pm 0,2$	21 ± 4	$1,3 \pm 0,1$
	MP2	$1,2 \pm 0,1$	23 ± 3	$1,3 \pm 0,2$
LPSE	MP1	$3,04 \pm 0,03$	58 ± 14	tr
	MP2	$1,36 \pm 0,08$	21 ± 11	tr
Soxhlet	MP1	10,7	119,3	tr

* extração feita com a célula de aço inoxidável.

Foi verificado que na extração supercrítica, o rendimento total foi de $2,4 \pm 0,2$ e $1,2 \pm 0,1\%$, para MP1 e MP2 respectivamente. A extração por Soxhlet forneceu um rendimento de $10,7\%$, porém pela coloração marrom dos extratos, este processo apresentou, além dos alcalóides, elevada quantidade de outros compostos que não foram identificados, o que acabou tornando a etapa analítica muito mais demorada e de menor sensibilidade aos alcalóides.

Embora as extrações por Soxhlet e a baixa pressão tenham fornecido maior rendimento, esses processos não conseguiram extrair voacangina em quantidades mensuráveis. Isso pode ter ocorrido devido a vários fatores: *i*) degradação de compostos quando submetidos a temperaturas mais elevadas, no caso do Soxhlet, *ii*) ocorrência de algum tipo de interação dos alcalóides com alguma classe de compostos que foi extraído por esses processos, formando um grupo complexo contendo a voacangina que não foi separada durante a etapa de fracionamento, ou ainda *iii*) o fato de esses processos não terem

extraído os alcalóides coronaridina e voacangina, permanecendo estes na matéria-prima. A Tabela 4.7 mostra ainda que esses processos apresentaram maior quantidade de alcalóides totais (58 ± 14 e $119,3 \times 10^{-4}$ kg/kg, para MP1 utilizando LPSE e Soxhlet, respectivamente, e $21 \pm 11 \times 10^{-4}$ kg/kg, para MP2 utilizando LPSE) e traços de voacangina o que indica que outros alcalóides foram extraídos.

É importante ressaltar que a obtenção de maior quantidade de voacangina, alcalóide com importante atividade leishmanicida (DELORENZI, 1998), só foi possível com a extração supercrítica. Na realidade, somente SFE possibilitou a extração de voacangina em quantidades mensuráveis ($1,3 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ kg/kg). Essa informação é de grande importância quando se tem como objetivo obter compostos com finalidades específicas, neste caso o tratamento da leishmaniose.

Além disso, deve ser considerado o fato de que na extração com Soxhlet e a baixa pressão o elevado consumo de solvente orgânico exige uma etapa eficiente de retirada deste do extrato obtido, o que acaba diminuindo assim a sensibilidade do processo e aumentando o tempo e custo do mesmo. A retenção de grande quantidade solvente pela matriz também é uma desvantagem se for considerado que esse material poderá ser reutilizado para outros fins, como em adubo ou ração.

4.1.6- Determinação de $X_{0, S/F=28}$, variando o tipo e teor de co-solvente (10 e 15%)

A Tabela 4.8 apresenta os valores de $X_{0, S/F=28}$ e de AF obtidos a 250 bar, 45 °C, utilizando diferentes co-solventes a 5, 10 e 15% (v/v). Nesses ensaios foi mantida a relação S/F igual a 28 (kg de solvente/kg de alimentação, base seca).

Tabela 4.8: Rendimento global ($X_{0, S/F=28}$) e massa de alcalóides totais (AF) obtidos a 250 bar, 45 °C, utilizando diferentes co-solventes a 5, 10 e 15% (v/v), $6,2 \times 10^{-5}$ kg/s utilizando a MP2 e célula de nylon.

Co-solvente	$X_{0, S/F=28} \times 10^2$ (kg/kg)	AF $\times 10^4$ (kg/kg)
EtOH, 5%	$1,5 \pm 0,2$	35 ± 4
EtOH, 10%	$1,8 \pm 0,2$	33 ± 5
IsoC3, 10%	$1,4 \pm 0,1$	$15,75 \pm 0,01$
EtOH-IsoC3 (1:1), 10%	$1,5 \pm 0,1$	$15,3 \pm 0,1$
EtOH, 15%	$2,3 \pm 0,1$	23 ± 3
IsoC3, 15%	$1,7 \pm 0,3$	6 ± 2
EtOH-IsoC3 (1:1), 15%	$1,8 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,4$

Com relação aos valores de $X_{0, S/F=28}$, o erro experimental não interferiu na análise dos resultados. Entretanto, com relação ao AF, foi verificado um desvio elevado, este não foi relacionado a nenhum co-solvente específico. A princípio, nos ensaios realizados com o

uso de co-solvente a 5% (Tabela 4.4), foi feita uma suposição (H_0) de que o uso de isopropanol, devido ao elevado desvio nos resultados, pudesse estar extraindo compostos que estariam interagindo com algum solvente na etapa de fracionamento através de alguma interação mais forte capaz de afetar os resultados. Por outro lado, essa hipótese não foi válida para a condição a 10%, na qual, o valor de AF teve um desvio de 0,01 e 0,1, quando IsoC3 foi utilizado puro ou em mistura, respectivamente. Sendo assim, o erro de medida observado se torna inerente a etapa de fracionamento, sem haver correlação com o tipo de co-solvente utilizado.

Uma vez verificado que a etapa de fracionamento possui baixa sensibilidade, um fracionamento utilizando pouca quantidade de extrato pode refletir em um erro experimental considerável, o que acabou acontecendo em alguns extratos. Para a mistura EtOH-IsoC3 a 5%, foi observado um erro em torno de 40% no valor de AF (Tabela 4.4), e esse tipo de medida não pode ser considerado como ponto de discussão na avaliação dos diferentes teores e tipos de co-solvente.

Uma avaliação da incerteza presumida indica um erro experimental previsto para essa análise. Para isso foi realizado um cálculo de propagação de erro e foi verificado que este é maior que o desvio observado, e que o erro presumido foi avaliado em 8×10^{-4} (kg/kg) para o valor de AF. Neste caso, todas as análises apresentaram erro experimental dentro do esperado, com exceção da análise realizada no extrato obtido quando se utilizou EtOH-IsoC3 como co-solvente (5%), em que, o erro experimental foi 1,5 vezes maior que o previsto. Por outro lado, o erro presumido desta medida chega a ser o valor da própria medida ou até maior, como é no caso da quantidade de AF obtida com o uso de IsoC3 a

15% ($6 \pm 2 \times 10^{-4}$ kg/kg). Isso indica que esta variável resposta não pode ser quantificada por esse procedimento.

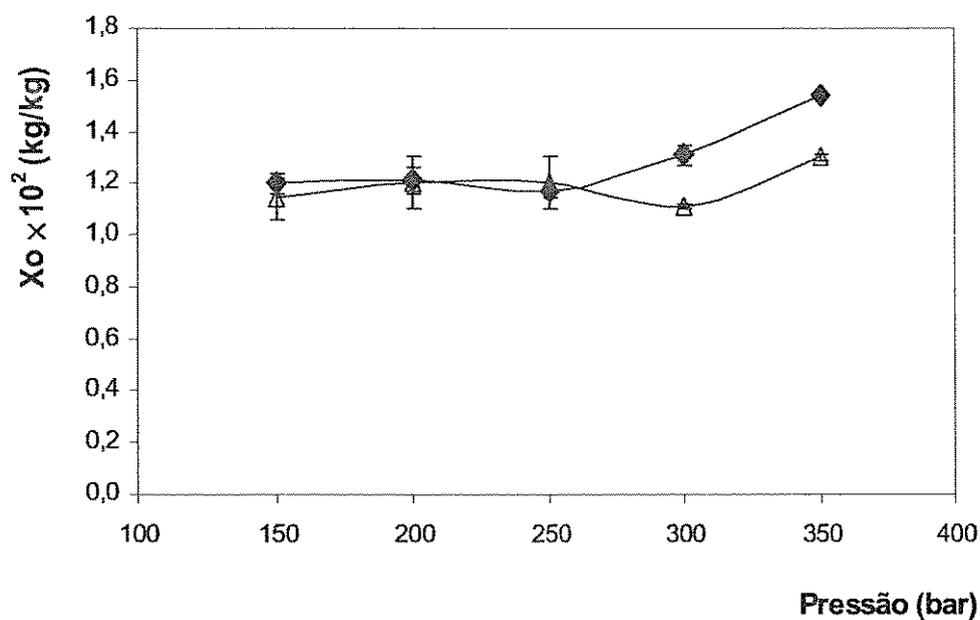
Sendo assim, a variável resposta utilizada nos experimentos seguintes foi $X_{0, S/F=28}$. A análise de variância (ANOVA) mostrou que o tipo de co-solvente exerce influência significativa sobre o rendimento global ($p_{\text{valor}} = 0,016$ e $p_{\text{valor}} = 0,026$, para 10 e 15%, v/v, respectivamente). Os maiores valores de $X_{0, S/F=28}$ foram obtidos quando se utilizou etanol como co-solvente ($1,8 \pm 0,2$ e $2,3 \pm 0,1 \times 10^{-2}$ kg/kg), para o uso de 10 e 15%, v/v, respectivamente. Pela Tabela 4.8, pode ser verificado que o aumento do teor (%) de co-solvente não proporcionou um aumento expressivo na quantidade de $X_{0, S/F=28}$. Segundo a análise de Tukey, os valores de $X_{0, S/F=28}$ não apresentaram diferenças significativas entre si ($0,99 < p_{\text{valor}} < 0,063$), exceto quando os valores de $X_{0, S/F=28}$ são comparados com aquele cujo co-solvente utilizado foi EtOH a 15% ($p_{\text{valor}} < 0,026$). Dessa forma, analisando o processo de extração supercrítica em termos energéticos e econômicos, pode-se concluir que o uso de etanol a 5 % é o mais indicado, pois além de se utilizar menor quantidade solvente (menor custo), sua recuperação após a extração (retirada do extrato bruto) necessitará de menor gasto de energia. Sendo assim, as isotermas de rendimento total a 35 e 45 °C foram realizadas com 5% de etanol como co-solvente.

4.1.7- Isotermas de Rendimento Total

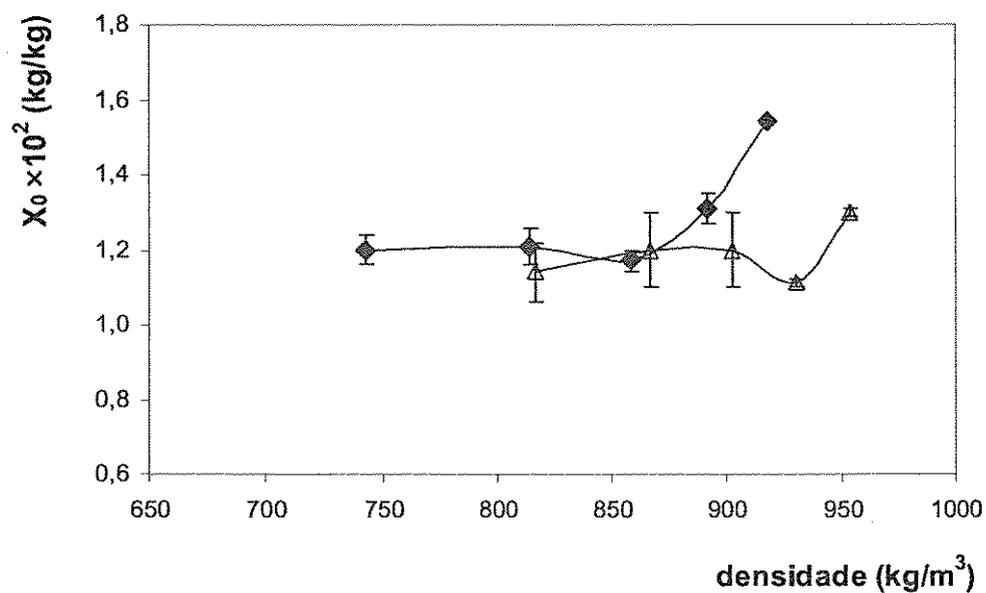
Nesses ensaios, ao invés das esferas de vidro utilizadas nos ensaios anteriores, foi utilizada uma coluna de teflon para completar o volume que não era ocupado pela matéria-

prima na coluna. A coluna de teflon foi utilizada com o intuito de diminuir o tempo de extração, uma vez que ao utilizar a coluna de teflon, a quantidade de espaços vazios nessa parte do leito era menor. Uma análise da porosidade do leito indicou que esta foi reduzida de 0,7124 para 0,012 quando foi utilizada a coluna de teflon ao invés das esferas de vidro. Essa redução na porosidade promoveu uma diminuição em 1 hora no processo de extração, relativo à 30 minutos em cada etapa de pressurização e despressurização. Se for considerado que o tempo total de processo para a determinação de X_0 era de 4 horas (45 min: pressurização, 30 min: período estático; 90 min: extração semi-contínua; 30 min: perfil de pressão; 45 min: despressurização), essa redução no tempo equivale a diminuição na quantidade de solvente utilizado durante a pressurização e em 25 % no custo energético.

Nesses ensaios, a vazão total de solvente foi de $3,7 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ kg/s, dessa forma foi utilizada uma relação S/F igual a 19. A Figura 4.5 (a) apresenta as isotermas de rendimento total ($X_0, S/F=19$), com a barra de erros experimentais, e para termos de comparação foi apresentado em (b) os valores de $X_0, S/F=19$ em função de densidade do solvente.



(a)



(b)

Figura 4.5: (a) Isotermas de rendimento total e (b) valores de X_0 , $S/F=19$ em função da densidade do solvente de extratos de *T. catharinensis* obtidos a: Δ : 35 °C; \blacklozenge : 45 °C.

Pela Figura 4.5 pode ser verificado que o $X_{0, S/F=19}$ apresentou um valor quase inalterado quando a condição de extração utilizada apresentou uma densidade do solvente entre 743,0 e 866,8 kg/m³. Nesta faixa de densidade, tanto a variação da pressão quanto a variação da temperatura não foram suficientes para afetar o valor de $X_{0, S/F=19}$. Entretanto, a partir de 866,8 kg/m³, pode ser verificado que o aumento da temperatura, a pressão constante, causou uma diminuição na densidade do solvente e um aumento no valor de $X_{0, S/F=19}$ o que indica que o efeito da pressão de vapor do soluto foi predominante. Nesta região, a temperatura constante, o aumento na pressão em 50 bar promoveu um aumento em cerca de 17% no valor de $X_{0, S/F=19}$, por outro lado esse aumento da pressão afetou muito pouco a densidade do solvente, variando de 930,2 para 953,3 kg/m³ a 35 °C e de 891,5 para 918,3 kg/m³ a 45 °C. A literatura cita outros trabalhos de extração de alcalóides com CO₂SC, nos quais o efeito da temperatura é mais efetivo que o efeito da pressão. Em alguns casos, é observado um comportamento retrógrado, como é o caso da cafeína para processos na região 180-250 bar/ 40-80 °C. Entretanto, para a teobromina e teofilina, compostos de estruturas muito parecidas a cafeína, esse comportamento não é verificado (SALDAÑA *et al*, 1999; LI *et al*, 1991). Outra informação importante é que nos estudos da predição da solubilidade dos alcalóides com CO₂SC + etanol 5% (Anexo 3, 2ª parte), verifica-se o aumento na solubilidade desses alcalóides com aumento da temperatura. Esse comportamento ocorre em toda faixa de pressão estudada, e não somente a partir de 250 bar. Entretanto, neste estudo não foram considerados os parâmetros de interação binários entre os solutos e o solvente, o que é de grande importância quando se trata de sistemas assimétricos como os formado pelos alcalóides/CO₂.

Pelos resultados acima expostos, as condições de extração que promoveram os maiores valores de $X_{0, S/F=19}$ foram 35 °C e 45 °C a 350 bar. Sendo assim, os ensaios cinéticos foram realizados nessas condições a fim de avaliar o comportamento cinético nas etapas de extração constante, extração decrescente e difusional.

4.1.8- Ensaios cinéticos

A Figura 4.6 mostra as curvas de extração e a Tabela 4.9 apresenta os parâmetros cinéticos para as extrações realizadas a 35 e 45 °C a 350 bar.

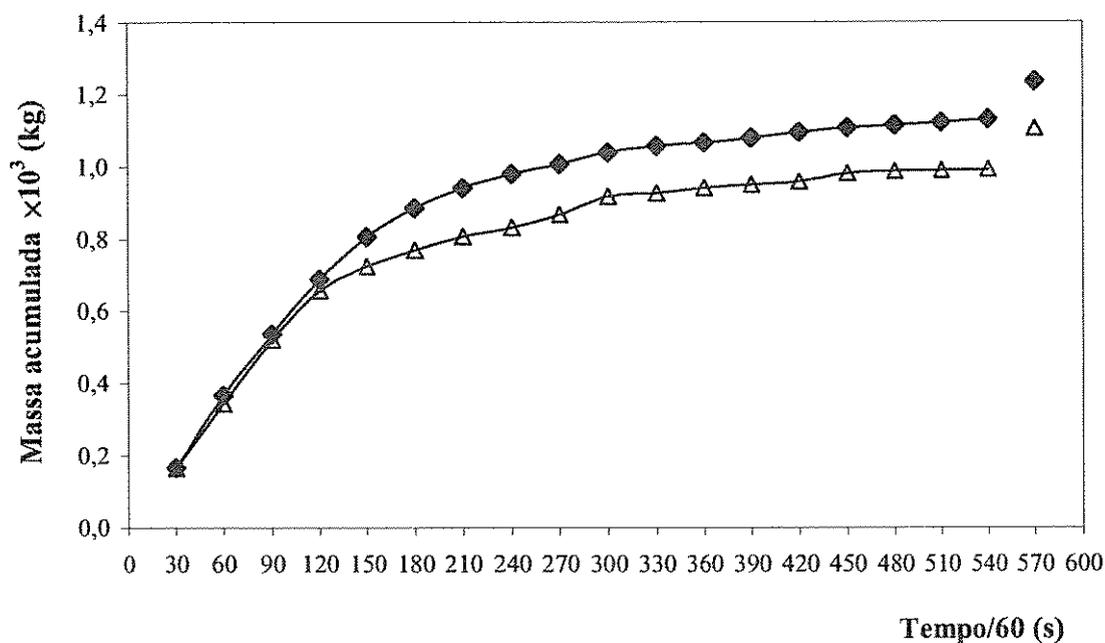


Figura 4.6: Curvas de extração para o sistema *T. catharinensis*/CO₂/etanol (5%) obtidas a 350 bar, a 35 °C (Δ) e a 45 °C (\blacklozenge). Os pontos em 570 min representam a massa acumulada incluindo a etapa de despressurização.

Tabela 4.9: Parâmetros Cinéticos obtidos nas condições de 35 e 45 °C a 350 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} (%)
35	3,80 ± 0,06	137,0 ± 0,1	9,25 ± 0,03	2,44 ± 0,03	1,00 ± 0,02	1,436 ± 0,003
45	3,5 ± 0,1	167 ± 7	9,0 ± 0,8	2,6 ± 0,3	1,19 ± 0,03	1,61 ± 0,03

O último ponto da curva é referente à quantidade de extrato obtida na depressurização do sistema, este representa cerca de 9,4 % do extrato total.

Pela Figura 4.6, até 120 min a quantidade de extrato obtida nas duas condições de extração é praticamente igual. A partir de 120 min, o processo a 35 °C entra na etapa FER, enquanto na condição de 45 °C, o processo ainda está na etapa CER. Essa diferença na duração da etapa CER promoveu ao final do processo um rendimento maior para o ensaio realizado a 45 °C. Isso pode ser facilmente explicado quando se comparam os parâmetros cinéticos obtidos pelas duas condições de processo (Tabela 4.9). O fato de M_{CER} apresentar valores semelhantes nas duas cinéticas, explica porque nos primeiros 120 min de extração as curvas de extração coincidem. Por outro lado, os valores de t_{CER} foram distintos. No ensaio a 35 °C, o valor de t_{CER} foi de 137,0 ± 0,1 min. A partir deste, o processo entra no período de etapa decrescente de extração. Entretanto, para o ensaio a 45 °C, o valor de t_{CER} foi 167 ± 7 min. Dessa forma, na condição de 45 °C, o processo permaneceu um maior tempo na etapa CER, o que permitiu a obtenção de maior quantidade de extrato.

A Tabela 4.10 apresenta os valores de densidade, viscosidade do CO₂ e Reynolds de partícula (Re) na condição de 35 e 45 °C a 350 bar. Nestas condições, o valor da densidade pouco se alterou, assim como viscosidade do CO₂, o que acaba afetando pouco o número de

Reynolds de partícula. Portanto, este resultado é consistente com valores similares das taxas de extração nas duas temperaturas.

Tabela 4.10: Densidade e viscosidade do CO₂ e n° de Reynolds a 35 e 45 °C, a 350 bar

T (°C)	ρ (kg/m ³)*	$\mu \times 10^6$ (kg/ms)	Re
35	953,3	97,4	0,744
45	918,3	90,3	0,764

* ANGUS *et al* (1976)

Outro modo de se avaliar a cinética de extração é em termos de massa de solvente por massa de alimentação utilizada (S/F), conforme Figura 4.7.

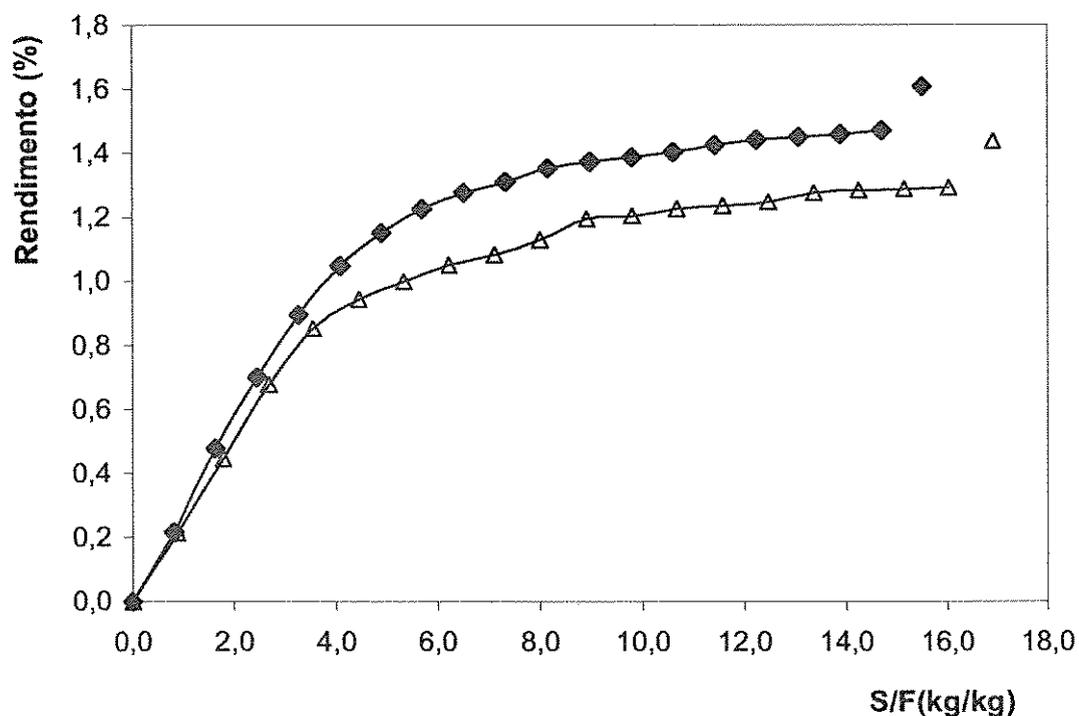


Figura 4.7: Curvas de extração obtidas a 350 bar, a 35 °C (Δ) e a 45 °C (◆), em termos de rendimento (%) em função relação da massa de solvente pela massa de alimentação (S/F).

Pela Figura 4.7, com exceção da despressurização, para valores de S/F acima de 8, o rendimento sofre pouca alteração, indicando que a partir deste ponto o processo encontra-se na etapa difusiva. Com os valores de t_{CER} , M_{CER} e Y_{CER} estimados a partir dos dados experimentais da cinética, a região da etapa CER pode ser descrita em termos de S/F. Para o ensaio a 35 °C, a etapa CER ocorreu em valores de S/F até 4,0, e para a condição de 45 °C, esta etapa se apresentou para valores de S/F até 4,5, e se mantém ambos na etapa decrescente de extração até S/F se apresentar em cerca de 8-9. Esses valores confirmam a maior permanência na etapa CER para o processo a 45 °C, uma vez que a vazão, e a massa de alimentação foram aproximadamente iguais.

Pode ainda ser verificado na Figura 4.7, que para valores de S/F a partir de 8-9 o processo de extração entra na sua etapa final (difusional). É importante salientar que cerca de 75,1 % do rendimento total de extração é obtido no período CER. Em se tratando de parâmetros de processo, o maior interesse está justamente na etapa CER. De um modo geral, deseja-se utilizar um menor valor de t_{CER} com um maior valor de R_{CER} possível, uma vez que a partir dessa etapa, o ganho em massa extraída é muito inferior ao obtido na etapa CER. Embora a condição a 35 °C tenha um menor valor de t_{CER} (137,0 min), o ganho em termos de rendimento global durante os 30 minutos finais da etapa CER para a condição a 45 °C foi 19% maior que a 35 °C. Neste caso, a condição 45 °C/350 bar é mais indicada, apresentando valores superiores de t_{CER} (167 min) e R_{CER} (1,19 %).

CARVALHO JUNIOR *et al* (2005) realizaram um estudo com alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e CO₂ supercrítico a 300 bar, 40 °C, $8,33 \times 10^{-5}$ kg/s, e diferentes relações de altura/diâmetro do leito (H/D). Considerando que os ensaios com a *T. catharinensis* para a

construção das isotermas a relação H/D utilizada foi de 4,7, pode-se tentar relacionar os resultados obtidos com alecrim a uma relação H/D próxima a esse valor. Foi verificado no trabalho de CARVALHO JUNIOR *et al* (2005), para uma relação altura/diâmetro de 5,6, que a etapa CER se apresentou no período no qual a relação $S/F \leq 8$, e que a partir de $S/F=16$, aumento no rendimento do processo foi pouco expressivo, indicando a existência da etapa difusiva. Embora o sistema *Rosmarinus officinallis*/CO₂ seja diferente do sistema *T. catharinensis*/CO₂/etanol, não somente em termos de matéria-prima, mas também em termos de composição do extrato e uso de co-solvente, pode ser verificado que o rendimento obtido na etapa CER foi 74% do rendimento total. Esses resultados indicam que mesmo havendo diferenças nas relações de S/F_{CER} para cada sistema, sabe-se que a quantidade de solvente utilizada deve ser superior o suficiente para permitir uma relação S/F que garanta permanência do período CER no processo de extração.

4.1.9- Ensaios cinéticos vs Determinação de X_0

Um ponto importante foi observado ao se comparar os resultados obtidos nos ensaios cinéticos e ensaios de determinação de X_0 , $S/F=19$. Verificou-se que o valor do rendimento total obtido nos ensaios cinéticos ($1,436 \pm 0,004\%$ e $1,61 \pm 0,04\%$) foi superior ao valor obtido pelos ensaios de isotermas de rendimento total com $S/F=19$, nos quais os valores de X_0 , $S/F=19$ foram de $1,30 \pm 0,01\%$ e $1,543 \pm 0,002\%$, para 35 e 45 °C respectivamente. O que pode ser explicado pelo fato de que nos ensaios de determinação de X_0 , $S/F=19$ para a construção das isotermas a relação S/F foi igual a 19 e não 28, conforme ensaios apresentados na seção 4.1.4 e 4.1.6.

A Tabela 4.11 apresenta os valores de X_0 obtidos nos ensaios com S/F=19 (Grupo 2 e 3) e S/F=28 (Grupo 1), e de rendimento total obtidos no ensaio cinético a 45 °C. O valor de $X_{0,S/F=28}$ obtido na condição de 45 °C, 250 bar é o mesmo apresentado na Tabela 4.8, com o uso de 5% de etanol .

Tabela 4.11: Valores de X_0 obtidos nas extrações realizadas com o uso das esferas de vidro, coluna de teflon, e de rendimento total (R_{Total}) e na etapa CER (R_{CER}) obtido pelas cinéticas de extração à 45 °C, onde F é a massa de alimentação, S é a massa de solvente utilizada, e Q a vazão de solvente.

	Determinação de X_0			Cinética de extração
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
	c/ Esferas de Vidro S/F=28 (kg/kg)	c/ Coluna de Teflon S/F=19 (kg/kg)	c/ Coluna de Teflon S/F=19 (kg/kg)	S/F=15 (kg/kg)
Pressão (bar)	250	250	350	350
$F \times 10^3$ (kg)	12,1614	12,1527	12,1540	85,00
$Q \times 10^5$ kg/s	5,58	3,95	3,87	3,50
$S \times 10^3$ (kg)	301,5	213,9	205,0	1131
$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)	1,5 ± 0,2	1,17 ± 0,03	1,543 ± 0,002	-
R_{Total} (%)	-	-	-	1,61 ± 0,03
R_{CER} (%)	-	-	-	1,19 ± 0,03

Nos ensaios com S/F=19, a vazão máxima de solvente permitida no equipamento, 250-350 bar, foi em torno de $3,91 \times 10^{-5}$ kg/s. Essa vazão foi suficiente para manter o sistema pressurizado e sem flutuação, por não haver muito espaço vazio dentro da coluna (a coluna de teflon ocupou cerca de 87,5% volume da coluna). Uma avaliação da perda de carga nos leitos utilizados indicou que a coluna de teflon apresentou uma perda de carga

4,4 vezes maior que no leito utilizando esferas de vidro.¹⁰ Isso explica porque nos ensaios com esferas de vidro foi possível a utilização de uma vazão maior de solvente no processo (1,4 vezes maior). Para que essa relação fosse mantida em torno de 28, seria necessário um tempo maior de processo (cerca de 27 minutos) para que a mesma quantidade de solvente fosse utilizada, ou uma menor quantidade de matéria-prima. Entretanto, esta última não é recomendável, pois, conforme indicado no início do trabalho, menor massa de alimentação pode acarretar em uma maior variação e menor precisão nos resultados.

Embora a medida de $X_{0, S/F=19}$ tenha sido precisa, sabe-se que o erro presumido dessa medida deve ser avaliado. Calculando-se esse valor, constata-se que o erro presumido para a medida de X_0 é de $0,04 \times 10^2$ kg/kg. Dessa forma, os desvios nos resultados obtidos pelos ensaios cinéticos (R_{Total}) e ensaios de determinação de $X_{0, S/F=19}$ a 45 °C/350 bar estão coerentes. A análise de variância (ANOVA) indica que não há diferenças significativas ($p_{valor} = 0,154$) entre esses valores, confirmando a coerência nos resultados ($X_{0, S/F=19}$ e R_{Total}). Por outro lado, considerando os ensaios a 35 °C/ 350 bar, isso não ocorreu, uma vez que a análise de variância indica que há diferenças significativas entre os valores de $X_{0, S/F=19}$ e R_{Total} ($p_{valor} = 0,007$).

Comparando os valores de rendimento total obtido pela cinética (350 bar), e os valores de rendimento total obtidos pelas isotermas ($X_{0, S/F=19}$), pode-se estimar o valor de $X_{0, S/F=28}^*$ para 45 °C/350 bar, a partir dos resultados obtidos a 45 °C/ 250 bar. Isso é possível, uma vez que a condição 45 °C/250 bar foi utilizada nos dois experimentos: tanto nos ensaios iniciais (avaliação do teor e tipo de co-solvente, Tabela 4.8), na qual foi

¹⁰ A perda de carga foi calculada utilizando as Equações de Darcy e de Blake-Koezeny para os leitos preenchidos com coluna de teflon e esferas de vidro, respectivamente (SISSOM e PITTS, 1988).

utilizada a relação S/F=28; quanto em um dos ensaios para a construção das isotermas de rendimento total, com S/F=19. Dessa forma, assumindo uma relação linear entre o valor de $X_{0, S/F=28}$ e o $X_{0, S/F=19}$ (45 °C/250 bar), o valor estimado de $X_{0, S/F=28}^*$ para a condição de 45 °C/ 350 bar seria equivalente a $1,986 \times 10^2$ (kg/kg). Esse resultado indica que no processo semi-contínuo de extração a 45 °C/350 bar, cujo $R_{Total} = 1,61 \pm 0,03 \%$, 81% de todo material extraível nessa condição foi obtido.

Considerando ainda que o valor de $X_{0, S/F=19}$ obtido a 45 °C/ 350 bar é 18,7% maior que o valor de $X_{0, S/F=19}$ obtido a 35 °C/350 bar (ver Figura 4.5), então mantendo-se o mesmo fator de aumento, poderia ser estimado um valor de $X_{0, S/F=28}^*$ para 35 °C/350 bar igual a $1,673 \times 10^2$ (kg/kg). Assim, pode ser verificado que o processo semi-contínuo de extração utilizando uma relação S/F=28 poderá fornecer um equivalente a 86 % de todo material extraível na condição de 35 °C/ 350 bar. Esses valores são apresentados na Tabela 4.12 para melhor compreensão.

Tabela 4.12: Comparação entre os valores de rendimento total (R_{Total}), de $X_{0, S/F=19}$ e $X_{0, S/F=28}$, obtidos experimentalmente, com os estimados ($X_{0, S/F=28}^*$) para a condição de 35 °C e 45 °C a 350 bar.

T (°C)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)				R_{Total} (%) 350 bar
	250 bar		350 bar		
	Grupo 1 $X_{0, S/F=28}$	Grupo 2 $X_{0, S/F=19}$	Grupo 3 * $X_{0, S/F=28}^*$	Grupo 3 $X_{0, S/F=19}$	
45	$1,5 \pm 0,2$	$1,17 \pm 0,03$	1,986	$1,543 \pm 0,002$	$1,61 \pm 0,03$
35			1,673	$1,30 \pm 0,01$	$1,436 \pm 0,004$

Analisando ainda a Tabela 4.11, pode ser observado um outro fator importante: o tempo de contato do solvente com a matriz sólida. Pela Tabela 4.11, verifica-se na condição de 45 °C/ 350 bar que embora a relação S/F nos ensaios de determinação de $X_{0, S/F=19}$ tenha sido maior (S/F=19) que nos ensaios cinéticos (S/F=15), o rendimento total obtido nos ensaios cinéticos foi superior ($R_{Total} = 1,61 \pm 0,03 \%$). Comparando a duração de cada tipo de experimento: 90 e 540 min para os ensaios de $X_{0, S/F=15}$ e cinéticos, respectivamente (desconsiderando o período de pressurização e despressurização), observa-se que o tempo de contato do solvente com a matriz sólida foi maior para os ensaios cinéticos. Esse tempo de contato permitiu uma maior interação do tipo matriz/soluto/solvente, o que acabou influenciando o rendimento do processo. Isso explica o fato de que mesmo tendo utilizado menor relação S/F, o rendimento obtido nos ensaios cinéticos foi superior. Essa informação não teria sido obtida se os ensaios de determinação de $X_{0, S/F=19}$ fossem realizados utilizando a relação S/F=28. Uma forma de verificar até que ponto o tempo de contato do solvente exerce influência sobre o rendimento, seria realizar um ensaio mantendo-se o solvente em contato com a matriz por um certo período de tempo, permanecendo todos os outros parâmetros constantes, e variando o tempo de contato do solvente-matriz. Entretanto, esses resultados não invalidam os ensaios realizados para a determinação de $X_{0, S/F=19}$, uma vez que o procedimento experimental utilizado foi o mesmo em todas as condições para a construção das isotermas.

Embora tenha sido utilizada uma quantidade insuficiente de solvente para a medida de X_0 para a construção das isotermas (S/F=19), todos os ensaios dessa etapa foram efetuados da mesma forma, e o desvio padrão médio relativo dos resultados foi baixo.

Sendo assim, a conclusão de aumento no valor de X_0 com aumento da temperatura nas densidades de solvente acima de $866,8 \text{ kg/m}^3$ continua sendo válida.

Pelas Figuras 4.5 e 4.6, independente do tipo de análise (determinação de X_0 ou cinética de extração), foi verificado que os maiores rendimentos foram observados para a condição de $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Essa tendência existe tanto em termos de X_0 (para pressões acima de 250 bar) quanto em termos de rendimento cumulativo em toda curva de extração (350 bar).

4.1.10- Ajuste de Modelos Matemáticos às Curvas de Extração

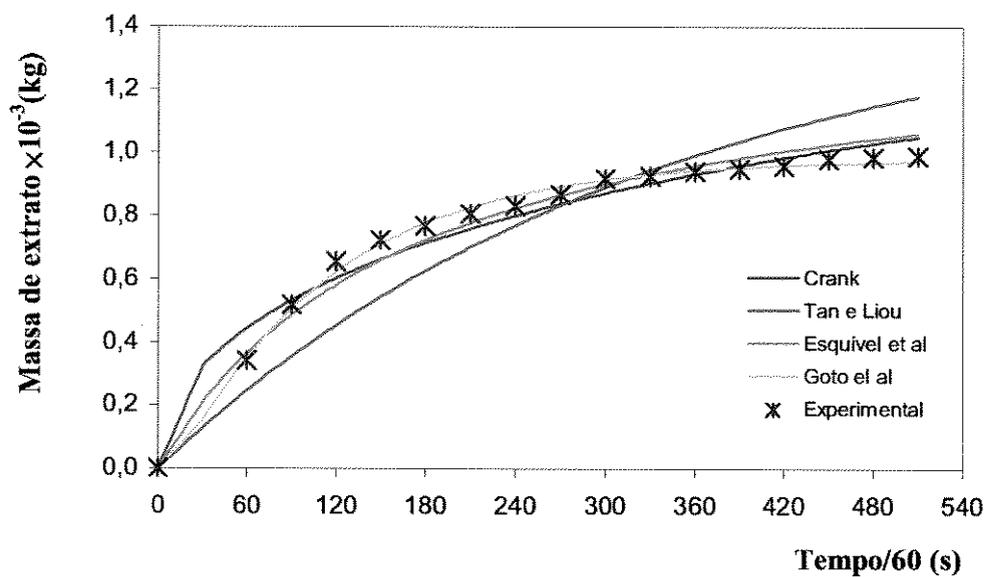
O ajuste de modelos matemáticos às curvas de extração foi realizado utilizando os seguintes modelos: CRANK (1975); ESQUÍVEL *et al* (1999); TAN e LIOU (1989) e GOTO *et al* (1994). A Tabela 4.13 apresenta os parâmetros ajustados e os desvios quadrados médios (SSD) de cada modelo. Os modelos de GOTO *et al* (1993) e ESQUÍVEL *et al* (1999) apresentaram os menores desvios. Na Figura 4.8 (a) e (b) é apresentado os ajustes dos modelos juntamente com os dados experimentais.

Tabela 4.13: Parâmetros de modelos ajustados para as curvas de extração supercrítica a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 350 bar para o sistema *T. catharinensis*/CO₂/etanol (5%)

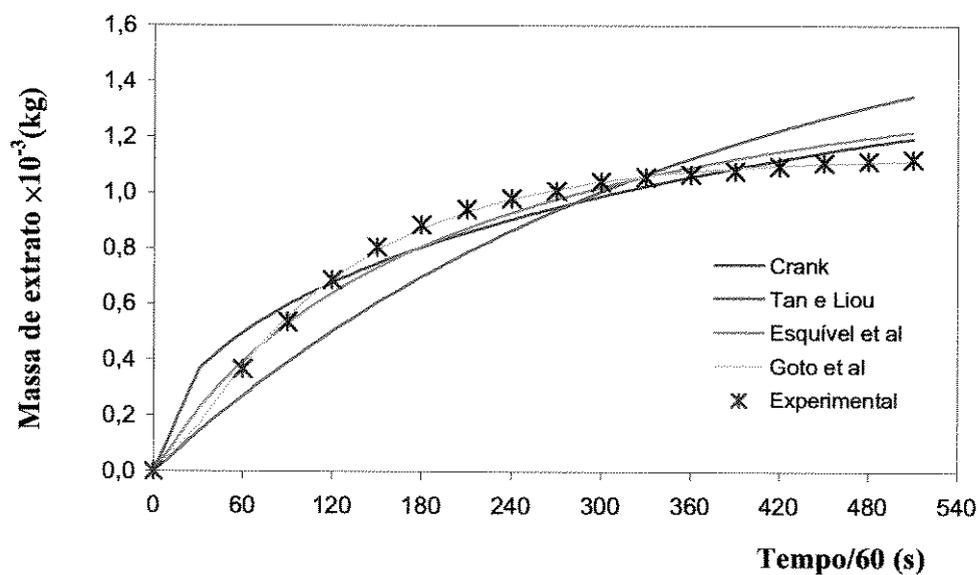
T (°C)	MODELOS								
	CRANK (1975)		GOTO <i>et al</i> (1993)			ESQUÍVEL <i>et al</i> (1999)		TAN e LIOU (1989)	
	$D \times 10^7$ (cm ² /s)	SSD	k	Φ	SSD	$k \times 10^{-2}$	SSD	$k_d \times 10^4$ (s ⁻¹)	SSD
35	1,47	0,060	2,361	1,061	0,004	1,73	0,031	7,54	0,646
45	1,29	0,101	2,591	1,141	0,003	1,95	0,053	7,06	0,804

No modelo de GOTO *et al* (1993), as partículas possuem forma plana, com dimensões de espessura desprezível, além disso o modelo possui dois parâmetros ajustáveis que descrevem bem os fenômenos de transferência de massa e desorção. MARTINEZ 2002, realizou um estudo com vários modelos matemáticos apresentados pela literatura aplicados a diversos sistemas com CO₂ supercrítico: óleo de cravo-da-índia, oleoresina de gengibre, óleo de pimenta-do-reino, óleo de camomila, óleo de kaoa, lipídios de *Spirulina máxima*, em diferentes condições experimentais. Neste trabalho, pôde concluir que não existe um único modelo capaz de expressar todas as curvas de extração, principalmente devido a grande diversidade existentes entre as partículas estudadas. Entretanto, verificou que de um modo geral, o modelo de GOTO *et al* (1993) e SOVOVÁ (1994), apresentaram bons ajustes às curvas de extração. Em um outro estudo, CARVALHO JUNIOR *et al* (2005) verificaram que para o sistema *Rosmarinus officinallis*/CO₂, os modelos que melhor descreveram as curvas de extração foram GOTO *et al* (1993), SOVOVÁ (1994) e ESQUIVEL *et al* (1999).

O modelo de CRANK (1975), que trata o processo de extração como sendo um processo unicamente difusivo, não apresentou bons ajustes. Embora seja conhecido que a difusão é predominante na etapa final de extração, o resultado apresentado pelo modelo indica que o processo não é controlado pela difusão.



(a)



(b)

Figura 4.8: Comparação entre as curvas de extração ajustadas por diferentes modelos matemáticos e experimentais obtidas para *T. catharinensis* a 350 bar (a) 35 °C e (b) 45 °C.

O modelo empírico de ESQUIVEL *et al* (1999) apresenta bom ajuste para curvas com formato hiperbólico (MARTINEZ, 2002), no qual todo soluto encontra-se de fácil acesso, sendo extraído nos primeiros minutos de processo. No caso das curvas de extração apresentadas com a *T. catharinensis*, embora tenha apresentado um desvio relativamente baixo, o modelo não se ajustou bem, o que se deve ao fato de que o soluto se encontra localizado em estruturas que dificultam o acesso do solvente.

O modelo de TAN e LIOU (1989) não apresentou bons ajustes, o que se deve provavelmente ao fato de existir uma restrição do modelo que não obedece a uma das condições iniciais: $Y(h, t=0)=0$. Essa restrição acaba refletindo em elevados valores de massa de extrato quando observado na etapa final de extração.

4.1.11- Estimativa do Custo de Produção de extratos de T. catharinensis

Para a estimativa do custo de produção de extratos de *T. catharinensis* foi assumido que o rendimento de extração no processo industrial seria similar à escala laboratorial, se for mantida constante a razão entre a massa de solvente e a massa de alimentação. Foi utilizado 1 ano de operação, ou 7920 horas (330 dias, 24 horas/dia), como base de cálculo. A Figura 4.9 apresenta a influência do tempo de processo sobre o custo de produção (COM), considerando os dados experimentais apresentados na Figura 4.6, a 45 °C/350 bar. Nesta figura, pode ser verificado que o menor custo de produção é obtido quando a extração é finalizada a 90 minutos de processo. Dessa forma, foi considerado um tempo de extração de 90 minutos. A vazão de solvente foi de 184 kg/h, considerando a densidade do

leito igual à densidade em escala laboratorial. Considerando o uso de 2 colunas de 400 L operando alternadamente, tem-se o número de bateladas por ano por unidade de extração foi de 5280.

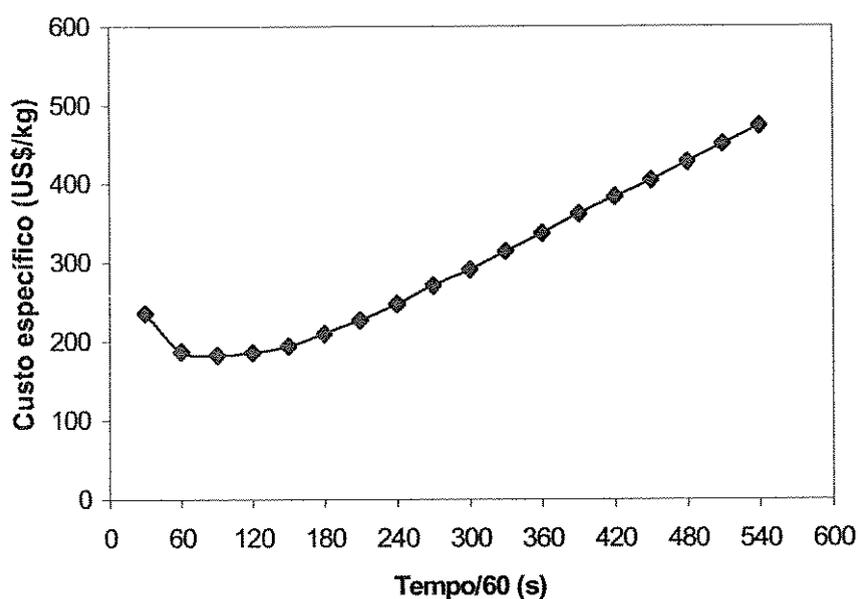


Figura 4.9: Influência do tempo de extração no custo específico de produção (COM) de extratos de *T. catharinensis*

O capital fixo de investimento (FCI) consiste basicamente de uma unidade de extração supercrítica. Considerando uma unidade em escala industrial de 2 colunas de 400 L, estimado em um preço de US\$ 2.000.000,00. A tendência é a utilização de uma planta industrial contendo 3 colunas de extração. Esse tipo de unidade, embora aumente o investimento, simula um processo contínuo.¹¹

Para o custo de matéria-prima, por se tratar de uma árvore nativa, não há dados de custo de produção da *T. catharinensis*. Sendo assim, para o custo de produção *T.*

¹¹ Dr M.Ângela A. Meireles (FEA/UNICAMP), Comunicação Pessoal, 01/2005.

catharinensis foi considerado o custo da erva mate (*Ilex paraguaiensis*) (IBGE, 2004) que cresce na mesma região, além de ser utilizada não só na indústria alimentícia, mas também na indústria farmacêutica por apresentar similaridade nas características funcionais pela presença de alcalóides como a cafeína, teobromina e teofilina. Sendo assim, considerando que cerca 75% do material coletado é galho, o custo de comercialização de *T. catharinensis* é de US\$ 83,00 / toneladas de galhos. Na etapa de pré-tratamento: secagem e moagem, foi estimado um custo de US\$ 30,00/tonelada utilizando o software Super-pró Designer v4.7 (Demo). Portanto, o custo total da matéria-prima é de US\$ 113,00/tonelada. Para uma densidade do leito em 310 kg/m³ e uma coluna de 0,4 m³, considerando uma perda de 2% de CO₂ e 10% de etanol.¹² Assim, a Tabela 4.14 apresenta os valores de custo de matéria-prima (CRM).

Tabela 4.14: Custo de matéria-prima (CRM)

Matéria-Prima	Custo específico (US\$/ton)	Quantidade Total (ton/ ano)	Custo (US\$)
<i>T. catharinensis</i>	113,00	655,6	74.100,9
CO ₂	150,00	27,7	4.149,0
Etanol	221,00	7,29	1.608,6
Total (CRM)			79.858,5

O custo de mão de obra operacional (COL) utilizado foi calculado considerando as tabelas apresentadas por ULRICH (1984). Para uma unidade de extração contendo 2 colunas de extração, um reservatório de CO₂, um condensador, um trocador de calor e uma

¹² A perda de solvente foi estimada utilizando um simulador de processos: Super-pró Designer v4.7 (Demo).

válvula de expansão foram considerados 2 operadores por turno. Sendo assim, o custo operacional foi de US\$ 3,00/h e o custo de mão de obra operacional total foi de US\$ 47.5200,00.

Tendo em vista que o resíduo sólido do processo poderá ser reutilizado como adubo ou ração, sendo possivelmente revertido em ganho de capital; considerando que também não haja resíduos de líquidos, e que o CO₂ liberado após a extração não precise de tratamento, então não há custo no tratamento de resíduos.

O custo de utilidades (CUT) está apresentado na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Custo de utilidades.

Equipamento	Energia (Mcal)	Custo específico (US\$/Mcal)	Custo (US\$)
Destilador flash	50.834,39	0,01	676,10
Condensador	-70.588,78	0,08	5.908,28
Bomba	16.325,75	0,07	1.147,70
Trocador de calor	9.958,94	0,01	132,45
Total (CUT)			7.864,53

Assim, utilizando a Eq 29, o custo total de produção de extratos de *T. catharinensis* foi de 182,50 US\$/kg de extrato. O principal fator que influenciou o COM foi o custo de investimento (72,86 %), seguido do custo operacional (14,41%), custo de matéria-prima (11,56%), e custo de utilidades (1,16%).

PEREIRA *et al* (2003b) realizaram uma estimativa do custo de produção de extratos de *T. catharinensis* obtidos a 55 °C, 300 bar, $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão de solvente utilizando 10% de etanol e mesma matéria-prima colhida em agosto de 2000. Nesta condição, o rendimento obtido foi de 0,96 % e a taxa de extração para o período CER foi de $7,6 \times 10^{-8}$ kg/s. Os resultados indicaram um valor de COM de US\$ 191,84/kg de extrato, para um período de 2 horas de extração. Comparando com os resultados obtidos por PEREIRA *et al* (2003b), pode ser verificado que a condição a 45 °C e 350 bar, além de ter apresentado maior rendimento (1,61%), forneceu um menor custo de produção, o que se deve às condições operacionais que favoreceram maior taxa de extração para o período CER ($9,0 \pm 0,8 \times 10^{-8}$ kg/s).

Para o cálculo aqui realizado foi considerado o rendimento obtido a 90 minutos, sem ser considerado a rendimento da etapa de despressurização. No trabalho de PEREIRA *et al* (2003b), esse acréscimo de extrato na despressurização foi considerado no rendimento e no cálculo do custo de produção. Assim, considerando esse acréscimo de extrato obtido na despressurização (+ 30 min), o custo de produção (COM) de extratos de *T. catharinensis* passa a ser 102,91 US\$/kg de extrato, o que equivale a uma redução em 46,4% no valor do COM obtido por PEREIRA *et al* (2003b).

Vale lembrar que a matéria-prima utilizada foi a mesma, entretanto colhidas em épocas diferentes. Para termos de comparação, pode ser verificado pela Figura 4.5 e resultados apresentados em outro estudo por PEREIRA *et al* (2004), a 250 bar/45 °C, 5% etanol e mesma matéria-prima, o valor de rendimento total foi diferente. No trabalho aqui realizado, embora a vazão total de solvente tenha sido inferior ($3,6 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ kg/s) ao

utilizado por PEREIRA *et al* (2004) ($4,3 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ kg/s), o rendimento obtido foi superior (1,2% neste trabalho a 45°C/ 250 bar, e 0,66% em PEREIRA *et al*, 2004) indicando que a idade da planta e época de colheita interferem no rendimento do processo, conforma constatado por PEREIRA *et al* (2004) e também na Sessão 4.1.1. Esse resultado fornece uma informação importante que reflete diretamente no custo de produção de extratos de *T. catharinensis*.

Outro fator, é que no cálculo do custo de produção dos extratos de *T. catharinensis* foi considerado que o custo da matéria-prima é igual ao custo da erva mate (*Ilex paraguayensis*). O valor de COM pode ter sido então sub ou superestimado, uma vez que a *T. catharinensis* é uma árvore nativa que ainda não possui uma agricultura desenvolvida para esse fim. Sendo assim, foi considerado ao invés da erva mate, outras plantas no cálculo do COM de extratos de *T. catharinensis* obtidos por extração supercrítica como: mangabeira (*Hancornia speciosa*), e maniçoba (*Manihot glaziovii* MUELL. ARG). Essas plantas foram escolhidas por se tratarem de árvores cujo interesse comercial é muito grande. A mangabeira é uma árvore de porte médio, de 5 à 10 metros de altura, produtora de látex. Ocorre exclusivamente no Brasil, sendo mais abundante nos Nordeste. Seu fruto, a mangaba, é industrializado na forma de polpa congelada (para sucos) e como sorvete, além de serem feitos doces, xaropes, compotas, vinhos e vinagres (GLOBO RURAL, 2005). A maniçoba, nativa da região nordeste e região central do Brasil, possui uma copa de até 15 metros de altura. Apresenta como principais produtos, o látex e o óleo das sementes, já utilizados, respectivamente, na indústria da borracha e de tintas (ARAGÃO *et al*, 1979). A Tabela 4.16 que apresenta os valores de CRM e COM para a produção de extratos de *T.*

catharinensis, considerando o custo das diferentes plantas acima descritas. Nos cálculos foram mantidas as mesmas condições operacionais (45 °C e 350 bar), em um processo com duração de 120 minutos, sendo assim foi considerado no rendimento do processo o extrato obtido também na despressurização.

Tabela 4.16: Custo de matéria-prima, e de produção de extratos de *T. catharinensis* considerando diferentes plantas.

Planta	Custo específico (US\$/ton)*	CRM (US\$)	COM (US\$/kg de extrato)
Erva mate	113,0	61.336,0	102,91
Mangabeira	256,0	131.620,2	113,88
Maniçoba	110,6	60.144,1	102,68

* IBGE (2005)

Pelo apresentado na Tabela 4.16, embora o valor do custo específico da matéria-prima tenha variado em até 100%, o valor de COM variou muito pouco: entre 102,68 e 113,88 US\$/kg de extrato. Na realidade, o custo específico da matéria-prima representou cerca de 9 - 18% do valor de COM. Mesmo considerando o custo da mangabeira que apresentou maior CRM, o valor de COM obtido ainda é baixo se for comparado com o custo de produção outros materiais por extração supercrítica, como a oleoresina de gengibre ROSA e MEIRELES (2005) avaliaram o custo de produção da oleoresina de gengibre com CO₂ supercrítico. Neste trabalho, foi reportado um custo de 99,80 US\$/kg de oleoresina, sendo obtido um rendimento de 2,7% no período CER, em 165 min. Mesmo apresentando um rendimento 2,3 vezes superior no período CER ($R_{CER} = 1,19\%$ para *T. catharinensis*), a

diferença entre o custo de produção dessa oleoresina e de extratos de *T. catharinensis*, com apenas 2,9 e 14,1 US\$/kg, para o menor e maior o valor apresentado na Tabela 4.16, respectivamente. Deve-se considerar que o tempo de processo utilizado na extração da oleoresina de gengibre foi maior (165 min), que o considerado para a *T. catharinensis* (120 min). Embora sejam materiais distintos com características de extrato bem diferentes, observa-se que a estimativa realizada para a *T. catharinensis* é coerente.

Em um primeiro momento, essa estimativa, pode ser considerada válida, uma vez que não se têm dados de produção desta árvore. Entretanto, acredita-se que em trabalhos futuros essa análise de custo poderá ser efetuada de uma forma mais precisa. Vem sendo realizado, desde 2002, um acompanhamento de cultivo da *T. catharinensis* que poderá indicar a viabilidade de produção desta árvore. Sementes da árvore (MP1), foram coletadas em maio de 2002, em Guará/Campinas. Após a secagem das sementes, estas foram plantadas, em outubro de 2002, em Mongaguá, região da Mata Atlântica, quente e úmida, ao nível do mar. Após a germinação, foram transferidas para os “saquinhos”/bags em novembro do mesmo ano. Após um período de 5-6 meses, com cerca de 50 cm de altura, as mudas das planta foram transferidas para o solo em diversas regiões: *i*) no próprio local, em Mongaguá; *ii*) cinco regiões de Campinas: jardim da FEA/UNICAMP, Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), em Barão Geraldo (casa dos professores Dra. M.Ângela de Almeida Meireles, e Dr. Antônio José de Almeida Meirelles), e em Guará/Campinas no sítio do Dr. Antônio Siani, pesquisador da FIOCRUZ. Hoje, em Mongaguá, as árvores apresentam uma altura média de 0,90 a 1,90 m. Na FEA, a árvore encontra-se com uma altura de 1,70 m. Ou seja, em um período de cerca de 1 ano e 7 meses, a árvore cresceu

cerca de 1,20 m. Sabe-se que a árvore pode chegar a 5-6 metros de altura, quando adulta (SPITZER *et al*, 1995). Se a planta continuar a se desenvolver nesse ritmo, acredita-se que daqui a cerca de 2 anos, a árvore já terá alcançado esse porte. Dessa forma, existe essa perspectiva de estudo que poderá ser realizada continuamente.

Ainda avaliando o custo de produção de extratos de *T. catharinensis* possui atividade leishmanicida (DELORENZI, 1998, SOARES *et al*, 2003). Dentre os medicamentos aplicados no tratamento da leishmaniose, as drogas antimoniais são as mais utilizadas. Entretanto, diversas reações são descritas quando estes medicamentos são utilizados, como náuseas, vômitos, aumento no nível de enzimas hepáticas, batimentos cardíacos irregulares, dores musculares, perda de apetite, dentre outros (SHARMA e PIWNICA, 1999). O custo do antimonial meglumina é de US\$ 2.000,00/kg (FARMAMONDO, 2003). Embora tenha sido efetuada uma estimativa do custo de produção para a obtenção do extrato bruto de *T. catharinensis* por SFE, PEREIRA *et al* (2003b) realizou ainda uma avaliação do custo para a produção de alcalóides, e foi verificado um custo total de US\$ 732,18/kg de alcalóides, inferior ao custo do medicamento utilizado no tratamento de Leishmaniose.

4.2- *Aloysia triphylla*

As folhas de *Aloysia triphylla* apresentaram um teor de umidade de 4,5%. Nos processos de extração com fluido supercrítico (SFE) foram utilizadas partículas com distribuição granulométrica entre 24 e 48 mesh, apresentando um diâmetro médio de partícula de $6,42 \times 10^{-4}$ m. A densidade real das partículas foi de $1,436 \pm 0,006 \times 10^3$ kg/m³.

4.2.1- Hidrodestilação e SFE (Isotermas de Rendimento Total)

A Figura 4.10 apresenta as isotermas de rendimentos total a 35 e 45 °C para a *Aloysia triphylla*.

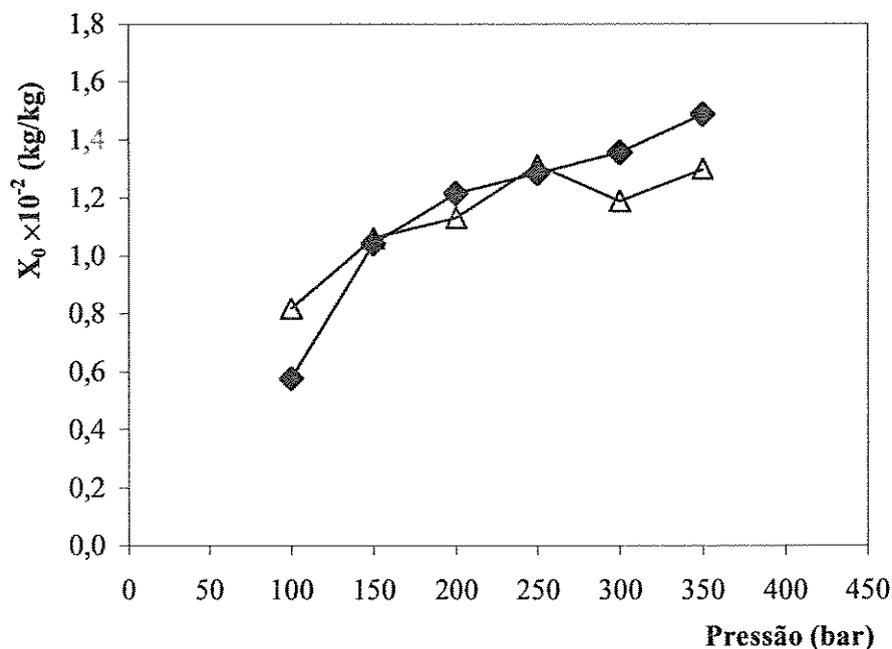


Figura 4.10: Isotermas de rendimento total de extratos de *Aloysia triphylla* obtidos a 100, 150, 200, 250, 300 e 350 bar: Δ: 35 °C; ◆: 45 °C.

O rendimento máximo (1,49%) foi obtido a 350 bar/45 °C e o mínimo (0,58%) a 100 bar/ 45 °C. O rendimento de óleo volátil fornecido pela hidrodestilação foi 1,15 %. A análise de variância (ANOVA) mostrou que o rendimento global sofre influência somente da pressão ($p_{\text{valor}}= 0,004$), e não da temperatura ($p_{\text{valor}}= 0,855$).

Analisando a Figura 4.10 pode ser verificado que a 45 °C, o aumento de 250 para 300 bar (correspondendo a um aumento na densidade do solvente de 858,4 para 891,5 kg/m³) resultou em um aumento de 17% no valor de X_0 . Por outro lado, a 35 °C, a mesma variação de pressão (correspondendo a um aumento na densidade do solvente de 902,4 para 930,2 kg/m³) promoveu uma diminuição no valor de X_0 . Esse fenômeno está associado com um comportamento retrógrado dos compostos em solventes pressurizados, na qual é dependente da temperatura e pressão. Acima de 250 bar, o efeito da pressão de vapor é predominante, pois o aumento da temperatura refletiu no aumento do rendimento obtido, embora a densidade do solvente tenha diminuído. Por outro lado, abaixo de 150 bar o aumento da temperatura causou uma diminuição no rendimento, nessa região, o efeito da densidade é predominante: o aumento da temperatura causou uma diminuição na densidade do solvente, causando uma diminuição na solubilidade dos compostos extraídos. O fenômeno de retrogradação é um comportamento apresentado pela solubilidade que é encontrado em muitos sistemas (SALDAÑA *et al* 1999, LI *et al*, 1992, CARVALHO JUNIOR *et al*, 2003). Além disso, para os ensaios realizados a 250 bar, o erro experimental associado ao valor de X_0 foi maior que o observado nas outras condições. Isso pode indicar que nessas condições as interações de *A. triphylla* + CO₂ são fortemente influenciadas pelo fenômeno da retrogradação.

4.2.2- Análise dos extratos de Aloysia triphylla

A Tabela 4.17 apresenta a quantificação (% área) dos compostos presentes nos extratos obtidos por SFE e no óleo volátil obtido por hidrodestilação realizada em CG-DIC. Cerca de 47% dos compostos, presentes no extrato obtido por SFE, detectados no CG-EM foram identificados. A identificação dos compostos e o cromatograma obtido nesta análise são apresentados no Anexo 4.1.

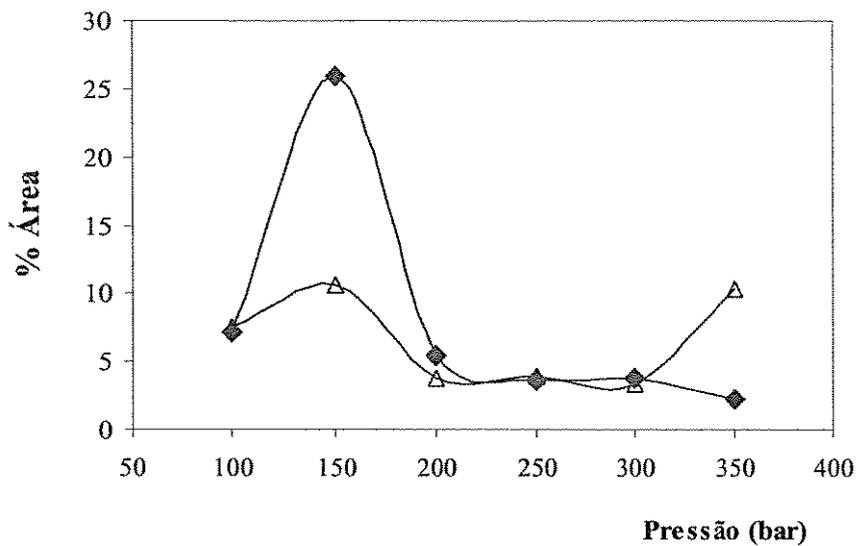
Tabela 4.17: Quantificação dos compostos presentes nos extratos de *A. triphylla* obtidos por extração supercrítica (SFE) a 35 °C e 45 °C, e no óleo volátil por hidrodestilação (hidro), onde ni: não identificado. Análise realizada no por CG-DIC.

tr (min)	Compostos	% Área																	
		Hidro					35 °C					45 °C							
		100 bar	150 bar	200 bar	250 bar	300 bar	350 bar	100 bar	150 bar	200 bar	250 bar	300 bar	350 bar	100 bar	150 bar	200 bar	250 bar	300 bar	350 bar
18,3	ni	-	1,9	1,0	1,2	2,7	2,6	0,2	1,8	-	-	-	1,8	-	-	-	1,0	1,8	-
22,05	ni	-	1,6	0,6	-	0,6	1,1	0,6	-	-	-	-	0,6	-	-	-	0,6	0,6	0,4
27,53	ni	-	0,4	1,7	0,7	1,1	1,4	1,4	-	-	-	-	1,4	-	-	-	0,9	1,1	-
31,43	neral (ou Z-citral)	19,2	7,7	6,8	5,2	5,4	5,7	8,1	8,0	16,6	8,3	4,5	6,6	2,9					
31,65	geranial (ou E-citral)	27,8	2,3	2,0	1,9	2,7	3,0	2,6	2,6	3,9	3,5	1,9	2,5	1,0					
33,92	acetato de geranila	3,9	3,0	2,5	2,1	1,9	2,0	3,1	2,9	6,0	2,7	1,6	2,4	1,0					
36,86	trans-cariofileno	3,4	6,6	7,5	4,3	3,8	3,8	7,5	5,1	19,7	6,1	3,6	4,4	2,3					
42,22	germacreno D	-	0,4	4,3	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-					
45,43	<AR> curcumeno	8,15	7,6	10,6	3,7	3,9	3,3	10,3	7,2	26	5,4	3,6	3,8	2,2					
50,34	nerolidol	-	8,4	7,5	4,8	4,6	3,0	8,7	10,1	10,9	3,6	4,3	3,7	3,2					
50,23	espatulenol	13,6	4,3	4,3	2,3	2,4	2,0	3,7	2,4	5,0	0,6	1,5	1,4	0,8					
51,14	óxido de cariofileno	16,6	20,5	22,1	12,3	12,1	9,1	18,7	8,6	8,1	6,6	7,6	5,1	4,4					
51,88	EPI- alfa-cadinol	4,7	0,4	0,7	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-					
60,76	MM= 286	2,7	28,9	17,5	41,3	41,4	57,2	31,1	19,2	-	27,7	65,3	64,7	77,2					
61,36	MM= 314	-	4,1	3,1	20,2	13,3	-	2,4	32,2	-	35,3	0,9	-	3,7					
-	outros	-	2,1	7,7	0,00	3,7	5,7	1,5	0,00	3,8	0,3	2,4	1,9	1,1					

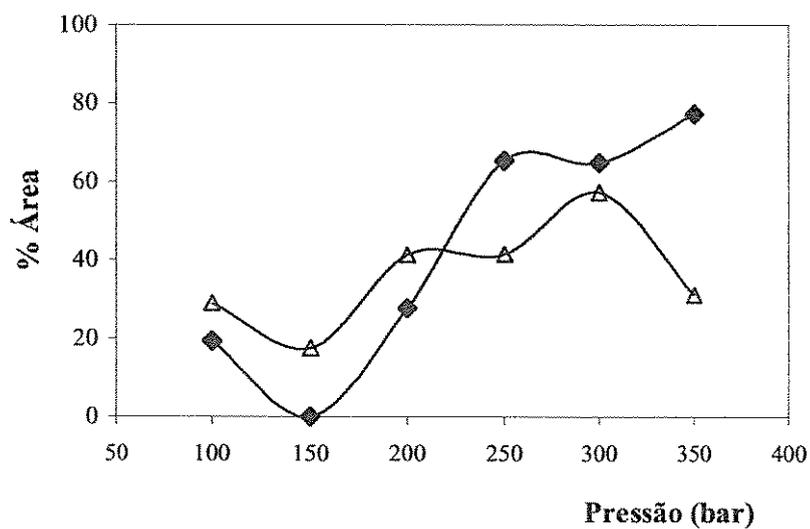
Pela Tabela 4.17, verifica-se que o óleo volátil obtido por hidrodestilação é constituído principalmente pelos compostos neral (19,2%), geranial (27,8%), e óxido de cariofileno (16,6 %). Por outro lado, devido à sensibilidade do processo a variações de temperatura e pressão, observa-se que a extração supercrítica permitiu a obtenção de uma variedade de compostos, incluindo as substâncias extraídas por hidrodestilação, em diversas proporções. Os compostos extraídos em maior proporção a 35 e 45 °C foram neral (16,6 %), trans-cariofileno (19,7 %), <AR> curcumeno (26 %), e nerulidol (10,9 %) a 150 bar/ 45 °C e óxido de cariofileno (22,1 %) e EPI- alfa-cadinol (0,7%) a 150 bar e 35 °C. Observa-se que condições mais brandas de pressão permitiram a obtenção de um extrato mais rico em compostos mais voláteis. O aumento da pressão favoreceu que compostos com maior massa molecular pudessem ser extraídos com o CO₂ supercrítico, o que era de se esperar, pois um aumento da pressão e da temperatura, nas condições supercríticas, tende a aumentar o poder de solvatação do solvente.

Foi observada em extrações realizadas com FSC, nas condições de pressões mais elevadas, uma grande quantidade de um composto de alta massa molecular, codificado como sendo MM=286. A 45 °C e 350 bar, este composto representa 77,2 % do extrato obtido nessa condição. Entretanto, existe a necessidade de outros métodos analíticos para identificar tal composto.

A Figura 4.11 representa a influência da temperatura e pressão para os compostos neral, acetato de geranila, trans-cariofileno e <AR> curcumeno (a), e MM=286 (b).



(a)



(b)

Figura 4.11: Influência da temperatura e pressão na obtenção dos compostos neral, acetato de geranila, trans-cariofileno e <AR> curcumeno (a), e composto com MM=286 (b), com fluido supercrítico a 100, 150, 200, 250, 300 e 350 bar: Δ : 35 °C; \blacklozenge : 45 °C.

Pode ser verificado que o comportamento retrógrado também é apresentado para esses compostos. Para os compostos representados pela Figura 4.11(a), acima de 300 bar, o efeito da densidade do solvente é predominante, pois o aumento da temperatura refletiu na diminuição da densidade do solvente e com isso uma diminuição no rendimento obtido. Por outro lado, para a Figura 4.11 (b), para o composto MM=286, a partir de 250 bar, aumento da temperatura causou uma aumento no rendimento; nessa região, o efeito pressão de vapor é predominante. Embora tenha sido verificado efeito de retrogradação para esses compostos, a análise de variância (ANOVA) mostrou que estes não sofrem influência da pressão ($0,461 < p_{\text{valor,P}} < 0,108$) e nem da temperatura ($0,722 < p_{\text{valor,T}} < 0,523$).

4.2.3 Atividade antioxidante dos extratos de *Aloysia triphylla*

A Tabela 4.18 apresenta a codificação dos extratos utilizados para a análise da atividade antioxidante. A Figura 4.12 apresenta a atividade antioxidante dos extratos de *A. triphylla* obtidos por SFE comparados com a do β -caroteno, no período de 3 horas de reação.

Tabela 4.18: Codificação das amostras de *A. triphylla* obtidas por extração supercrítica utilizadas nas análises de atividade antioxidante.

Código da amostra	T (°C)	Pressão (bar)
EA_1	35	100
EA_2	35	150
EA_3	35	200
EA_4	35	250
EA_5	35	300
EA_6	35	350
EA_7	45	100
EA_8	45	150
EA_9	45	200
EA_10	45	250
EA_11	45	300
EA_12	45	350

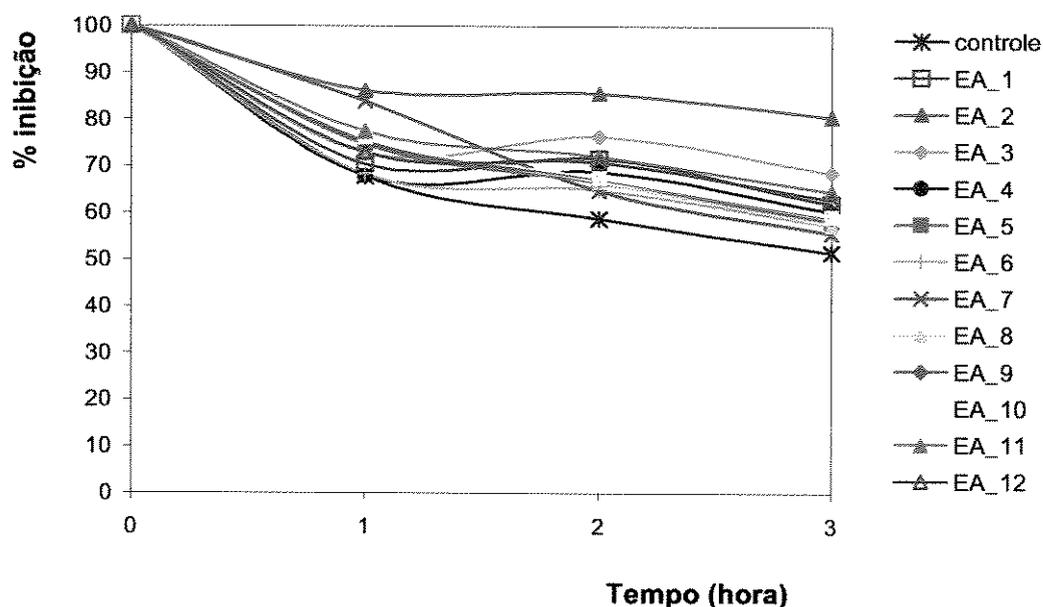


Figura 4.12: Atividade antioxidante dos extratos de *A. triphylla* obtidos por extração supercrítica em diferentes condições comparados com a do β -caroteno (controle) no período de 3 horas de reação.

Em todos os casos, os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram atividade superior ao do β -caroteno. Variando entre 86 e 65 % de inibição entre a 1ª e a 3ª hora de reação. A amostra que apresentou maior atividade antioxidante foi a EA_2, obtida a 35°C e 150 bar. Conforme a Tabela 4.17, essa amostra é rica em óxido de cariofileno (22,1%) e EPI-alfa-cadinol (0,7%), além do composto MM=286 (28,9%). Esses compostos podem ter atuado juntos de forma positiva na atividade antioxidante dessa amostra.

4.3- *Mangifera indica*

Para as folhas de *M. indica*, foi verificado um teor de umidade de 9,0%. Nos processos de SFE foram utilizadas partículas com distribuição granulométrica entre 24 e 48 mesh na qual apresentaram um diâmetro de partícula de $6,24 \times 10^{-4}$ m. A densidade real das partículas foi de $1,363 \pm 0,004 \times 10^3$ kg/m³.

4.3.1- Hidrodestilação, Extração a baixa pressão (LPSE) e Extração Supercrítica (SFE)

O rendimento global obtido nas extrações foi ($1,00 \pm 0,07\%$) e ($3,04 \pm 0,02\%$) para os processos de SFE e LPSE, respectivamente. A hidrodestilação não forneceu nenhum rendimento. Esse resultado indica que ou há ausência de óleo essencial na matéria-prima, ou que a quantidade obtida por esse processo não foi mensurável.

4.3.2 Análise dos extratos de *M. indica*

As análises em CCD mostraram a presença de 7 bandas para a placa eluída com n-hexano:clorofórmio (25:75) e 5 bandas para a placa eluída com n-hexano: clorofórmio (50:50). As bandas azuis no topo da placa podem indicar a presença de cumarina¹³ nos extratos obtidos por SFE. A visualização em UV (365 nm) indicou a presença de flavonóides (1ª banda inferior em ambos extratos). Tentou-se melhorar a separação das bandas superiores e inferiores, utilizando como eluentes as seguintes misturas: n-

¹³ Dr Carmem L. Quiroga (CPQBA/UNICAMP) Comunicação Pessoal, 2004.

hexano:acetato de etila (75:25), e acetato de etila: metanol (90:10). Entretanto não foi verificada nenhuma melhoria na separação dos compostos. A Figura 4.13 mostra a placa obtida com o uso da mistura de eluente n-hexano: clorofórmio (25:75), sendo revelado com anisaldeído. As bandas foram melhor visualizadas na placa que foi revelada com o revelador de flavonóides (1), e visualizadas em UV-visível.

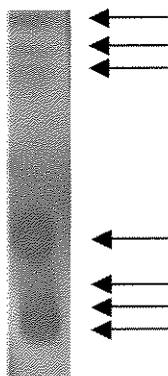


Figura 4.13: Placa cromatográfica do extrato obtido por SFE eluída com a mistura n-hexano:clorofórmio (25:75), e revelada com anisaldeído.

A análise em CG-EM identificou somente 59% dos compostos apresentados no cromatograma. A identificação dos compostos bem como o cromatograma obtido é apresentado no Anexo 4.2. Os compostos que aparecem em maior quantidade não foram identificados. A Tabela 4.19 apresenta a porcentagem relativa em área dos possíveis compostos presentes no extrato obtido por SFE e que foram quantificados por CG-DIC.

Tabela 4.19: Quantificação dos possíveis compostos presentes no extrato de *M. indica* obtidos por extração supercrítica (SFE) a 250 bar/ 45 °C, onde tr é tempo de retenção e ni: não identificado

Tr	Composto	% Área
44,29	ni	31,5
49,09	ni	3,9
49,67	1,2 ácido benzeno dicarboxílico	4,1
49,88	ni	17,7
50,62	ácido palmítico	1,2
58,64	ni	3,8
61,65	ni	37,8

Está sendo indicado como possíveis compostos presentes no extrato uma vez que, embora tenham sido identificados pelo banco de dados do CG-EM, para comprovação da presença destas substâncias existe a necessidade da injeção de padrões, entretanto, não foi possível realizar esta etapa.

Embora tenha sido identificada a presença de compostos voláteis no extrato obtido por SFE na análise por CG-EM, não foi verificada a presença destes no CG-DIC. De acordo com o CG-EM, estes compostos estão presentes em quantidades muito pequenas. Como na análise por CG-DIC não quantificou esses compostos, isso indica que ou houve perda desses voláteis, ou que não foi possível a quantificação devido à pouca quantidade deles no extrato. O que explica o fato de que não foi possível obter um óleo volátil por hidrodestilação, pois a quantidade destes é tão pequena que não permite a quantificação nem mesmo em termos de rendimento.

Deve-se considerar que este trabalho foi apenas introdutório. Um estudo mais amplo não só da composição do extrato como também com relação ao uso da tecnologia

supercrítica na extração de diversos compostos se faz necessário. Além disso, sabe-se que o conhecimento da composição química é de extrema importância para se otimizar o processo de extração. Em outras palavras, conhecendo-se a composição química de um certo extrato, poderá ser otimizada a obtenção de um certo composto ou classe de compostos, por ajuste das condições temperatura e pressão. É importante ressaltar que muito pouco é informado pela literatura a respeito das folhas de manga, principalmente com relação à composição de extratos. Na maioria dos trabalhos citados, os estudos são realizados para se avaliar a atividade farmacológica do fruto e das sementes da *M. indica*. Dessa forma, reconhece-se que é cedo para afirmar qual técnica, ou ainda qual condição de processo poderia ser utilizada, uma vez que na análise química dos extratos foi possível observar uma gama muito ampla de compostos, a maioria não identificada, principalmente aqueles presentes em maior quantidade ($t_r = 36,73$ e $63,00$ min). Além disso, o processo de hidrodestilação não forneceu nenhum rendimento, indicando que o óleo essencial ou está ausente, ou está presente em quantidade muito insuficiente para ser quantificado na matéria-prima.

4.3.3 Atividade antioxidante dos extratos de *M. indica*

A Figura 4.14 apresenta a atividade antioxidante dos extratos de *M. indica* obtidos por SFE e LPSE comparados com a do β -caroteno, no período de 3 horas de reação.

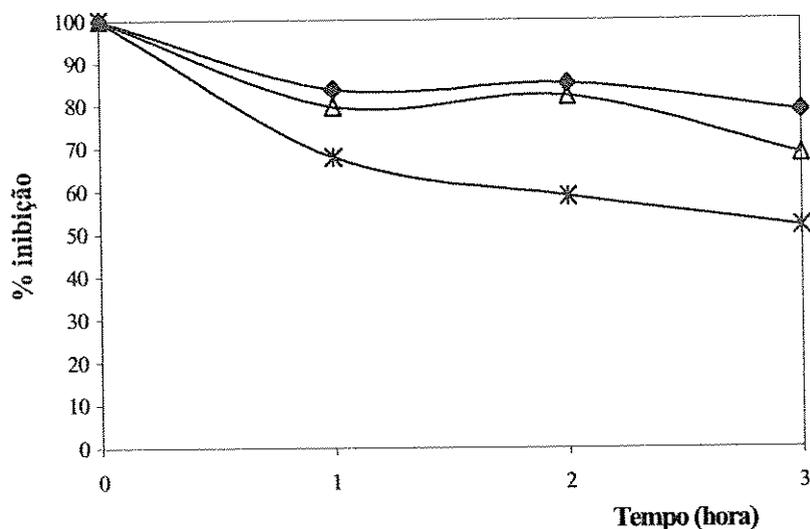


Figura 4.14: Atividade antioxidante dos extratos de manga obtidos por extração supercrítica (Δ) e baixa pressão (◆) comparados com a do β-caroteno (controle: *) no período de 3 horas de reação:

Pode ser verificado que tanto o extrato obtido por extração supercrítica, quanto por baixa pressão apresentou atividade superior ao do β-caroteno. Variando entre 84 e 68% de inibição entre a 1^a e a 3^a hora de reação. Em todo período de análise, verifica-se que o extrato obtido por baixa pressão possui uma atividade superior ao extrato obtido por SFE (de 3,5 à 14,9 % maior) sendo mais expressivo na terceira hora de reação.

As análises em CCD mostraram a presença de 7 bandas, apresentando na banda uma indicativa de flavonóides nos extratos. A literatura reporta que extratos obtidos a partir de várias partes da manga apresentam atividades antioxidantes. A atividade antioxidante foi associada à presença de flavonóides e outros compostos fenólicos (ANILA e VIJAYALASKSHMI, 2003; MARTINEZ *et al*, 2000, SOONG e BARLOW, 2004; SEVERI *et al*, 2003). Por outro lado, as outras bandas que não puderam ser caracterizadas, podem estar atuando na atividade antioxidante dos extratos juntamente com os flavonóides.

5. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que a época de coleta é um fator importante quando se deseja otimizar o processo de extração. Entretanto, existem outros fatores como a idade e forma de crescimento da folha, posição e idade da árvore e variações sazonais que devem ser consideradas.

Com relação ao processo de extração para a determinação de X_0 , deve se considerar que a quantidade mínima de matéria-prima ideal para a extração seja tal que garanta uma análise precisa dos extratos e que possíveis perdas analíticas não afetem os resultados, permitindo, dessa forma, que as conclusões possam ser asseguradas.

Comparando a extração supercrítica com outros processos de extração na obtenção de alcalóides pode ser verificado que embora outros processos tenham proporcionado maior rendimento global, somente a extração supercrítica pode extrair voacangina em quantidades mensuráveis.

Em termos de rendimento total, para os ensaios com a *T. catharinensis*, foi verificado que as extrações com água e sua mistura com álcoois como co-solvente apresentaram alguns problemas como formação de espuma e constante entupimento da válvula de saída do extrator. A presença de saponina nestes extratos foi observada devido à presença de espuma. Com relação ao uso de co-solventes alcoólicos a 5%, em termos de rendimento total, não houve diferenças significativas nos resultados. O MeOH não foi utilizado em todos os ensaios por não ser considerado um solvente GRAS.

A análise dos extratos através do fracionamento forneceu valores de AF com elevados desvios. Uma hipótese H_0 foi apresentada indicando que os elevados desvios

verificados em alguns extratos eram decorrentes da presença de IsoC3 relacionada com fortes interações entre compostos extraídos e os solventes utilizados no fracionamento. Essa hipótese foi rejeitada, em ensaios seguintes, com uso de co-solvente a 10%.

A real causa dos desvios observados nos valores de AF é devido à baixa sensibilidade da etapa de fracionamento. Uma análise da incerteza presumida indicou um erro experimental previsto para essa análise em 8×10^{-4} (kg/kg) para o valor de AF.

Com relação à escolha do teor e tipo de co-solvente, o aumento do teor (%) de co-solvente não proporcionou um aumento expressivo na quantidade de $X_{0, S/F=28}$. Os maiores valores de X_0 foram obtidos quando se utilizou etanol como co-solvente. Em termos econômicos e energéticos o etanol a 5% deve ser o mais indicado.

As isotermas de rendimento total indicaram um valor de $X_{0, S/F=19}$ quase inalterado para densidades até de $866,8 \text{ kg/m}^3$. A partir desta, o efeito da pressão de vapor é predominante: o aumento da temperatura, causa um aumento no valor de $X_{0, S/F=19}$, e uma diminuição na densidade do solvente. Os ensaios a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$, ambos a 350 bar e etanol a 5%, forneceram maior rendimento em extrato.

O uso da coluna de teflon como alternativa para ser utilizada na célula de extração apresentou maior perda de carga e promoveu menor porosidade do leito, o que alterou a vazão de processo, impedindo que todo o soluto extraível fosse obtido no tempo previsto. Dessa forma, $X_{0, S/F=19}$ foi determinada como uma quantidade insuficiente de solvente .

A cinética de extração foi realizada nas condições de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 350 bar, e os parâmetros cinéticos foram calculados: a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, o valor de t_{CER} foi superior ao do ensaio a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Por apresentarem valores de M_{CER} semelhantes, as curvas de extração até 120 minutos são coincidentes.

As curvas de extração foram melhores ajustadas para o modelo de GOTO *et al* (1993).

A análise do custo de produção de extratos de *T. catharinensis* indicou que a SFE fornece um custo de 182,50 US\$/kg de extrato, para um processo com duração de 90 minutos, a etapa de despressurização. Considerando, a massa adicional obtida na despressurização, o valor do COM passa a ser 102,91 US\$/kg de extrato.

Para o estudo realizado com *A. triphylla* a condição de 45 °C/ 350 bar forneceu maior rendimento em extrato. Foi verificado um comportamento retrógrado na região entre 150 e 250 bar. A análise dos extratos indicou a presença de compostos voláteis em quantidades diversas nas diferentes condições de processo. Foi verificado um comportamento retrógrado para os compostos: neral, acetato de geranila, trans-cariofileno e <AR> curcumeno, e MM=286. A atividade antioxidante foi verificada em todos os extratos de SFE, sendo superior ao controle (β -caroteno). O extrato obtido a 35 °C/150 bar apresentou maior atividade antioxidante.

Para o estudo realizado com *M. indica*, embora introdutório, foi possível verificar que o rendimento obtido por SFE foi inferior ao obtido por LPSE. A hidrodestilação não forneceu nenhum rendimento, indicando ou a ausência de óleo essencial na matéria prima, ou a presença de óleo volátil em quantidades não mensuráveis. A análise dos extratos permitiu a identificação de somente 59% dos compostos presentes no extrato obtido por SFE, sendo que os majoritários não foram identificados. A atividade antioxidante foi verificada nos extratos de SFE e LPSE, sendo este último mais efetivo. Ambos extratos apresentaram atividade superior ao controle (β -caroteno).

6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Pelo trabalho desenvolvido e resultados apresentados, propõe-se:

1- Para a *T. catharinensis*:

- Adequar a etapa de análise de obtenção de alcalóides a partir dos extratos brutos, devido à baixa sensibilidade observada na etapa de separação dos alcalóides;

- Identificar os demais compostos e classe de compostos presentes no extrato bruto, avaliando a interação destes com outras substâncias presentes no extrato e sua real importância na atividade dos extratos de *T. catharinensis*;

- Com relação à predição da solubilidade dos alcalóides, utilizar outras regras de mistura para se validar a metodologia de predição, e realizar estudos com relação ao sistema alcalóide/CO₂/co-solvente, considerando o efeito da matriz e presença de outros compostos no extrato.

- Para o programa tecanalysis, adicionar uma opção que permita o uso de co-solvente em diferentes porcentagens, uma vez que no cálculo do COM pelo programa Tecanalysis este não é considerado (para o cálculo apresentado na seção 4.11, o custo de co-solvente foi feito separadamente sendo adicionado ao valor de COM obtido pelo programa).

2- Para um estudo com a *Aloysia triphylla*:

- Realizar extrações em condições mais moderadas com intuito de se obter, de forma mais seletiva, maior quantidade de compostos voláteis, os quais apresentaram possível influência na atividade antioxidante da planta;

- Construir curvas de extração, a fim de se obter os parâmetros cinéticos que são importantes na otimização e desenvolvimento de um processo de extração;

3- Para a *M.indica*:

- Por ter sido pouco explorada nas extrações com fluido supercrítico, propõe-se uma análise mais efetiva com relação à influência das condições de temperatura e pressão no rendimento, composição e atividade da planta;

- Devido ao resultado apresentado nas análises do extrato por CG-EM, vê-se a necessidade de outras análises (IV, CLAE, RMN⁺) com o intuito de identificar os compostos presentes em maior quantidade no extrato.

7. REFERÊNCIAS

- ABIFITO. **Citações e referências a documentos eletrônicos.** www.abifito.org.br (10/2004).
- ACHENBACH, H.; BENIRSCHKE, M.; TORRENEGRAS, R. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. **Phytochemistry**, v 45, p. 325-335, 1997.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, Allured Publishing, Carol Stream, 2001, 456p.
- ALMEIDA, L.; CINTRA, A.C.O.; VERONESE, E.L.G.; NOMIZO, A.; FRANCO, J.J.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.137, p.19-27, 2004.
- ALSTEN, J.C.V.; ECKERT, C.A. Effect of entrainers and of solute size and polarity in supercritical solutions. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.38, p.605-610, 1993.
- ANAJANELULU, V.; SATYANARAYANA, P.; VISWANADHAM, KN.; JYOTHI, V.G.; NAGESWARA RAO, K.; RADHIKA, P. Triterpenoids from *Mangifera indica* **Phytochemistry**, v. 50, p. 1229-1236, 1999.

- ANDRADE, H.H.A.; MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B. Aroma Volatile constituintes os Brazilian Varieties of Mango fruit. **Journal Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 27-33, 2000.
- ANGUS, S.; B. ARMSTRONG, B.; REUCK, K.M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State – Carbon Dioxide**, Pergamon Press: Oxford, England, 1976, 385p.
- ANILA, L.; VIJAYALASKSHMI, N.R. Antioxidant action of Flavonoids from *Manguilera indica* and *Emblica officialis* in hypercholesteromic rats. **Food Chemistry**, v.83, p 569-574, 2003.
- ANILA,L.; VIJAYALASKSHMI, N.R. Flavonoids from *Emblica officialis* and *Manguilera indica* – effectiveness for dyslipidemia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.81-87, 2002.
- ANVISA. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. www.anvisa.gov.br (07/2004).
- AOAC- Association of Official Analytical Chemysts. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th, 3rd rev; Cuniff P., Ed., AOAC International: Gaithersburg, M.A., 1997, v.2.
- ARAGÃO, R. G. M.; ALVES, A.F; SOBRAL, R.M.; VERDE L.W.L. Enraizamento de estacas de caule de maniçoba (*Manihot glaziowii* MUELL. ARG.), tratadas com substâncias químicas a base de auxinas. **Ciência e Agronomia**, v.9, p.99-104, 1979.

- AWE, S.O.; OLAJIDE, O.A.; OLADIRAN, O.O.; MAKINDE, J.M. Antiplasmodial and antipyretic screening of *Manguilera indica L.* **Phytotherapy Research**, v.12, p. 437-438, 1998.
- BAMBERGER, A.; SIEDER, G.; MAURER, G. High-pressure (vapor-liquid) equilibrium in binary mixtures of (carbon dioxide + water or acetic acid) at temperatures from 313 to 353 K. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.17, p.97-110, 2000.
- BATINA, M.F.C.; CINTRA, A.C.O.; VERONESE, E.L.G.; LAVRADOR, M.A.S.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; DIAS, D.A.; FRANÇA, S.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the Lethal and Myotoxic Activities of *Crotalus durissus terrificus* Venom by *Tabernaemontana catharinesis*: Identification of one of the active components. **Planta Medica**, v.66, p. 424-428, 2000.
- BERNA, A.; CHAEFER, A.; MONTÓN, J.B.; SUBIRATS, S. High-pressure solubility data of system ethanol (1) + catechin (2) + CO₂ (3). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p.157-162, 2001.
- BICCHI, C.; RUBIOLO, P.; FRATTINI, C. Off-line supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species. **Journal of Natural Products**, v.54, p.941-945, 1991.
- BRACHET, A.; CHRISTEN, P.; GAUVRIT, J.Y.; LONGERAY, R.; LANTÉRI, P.; VEUTHEY, J.L. Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from cocoa leaves. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.43, p.353-366, 2000.

- BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L.A.; FRANÇOIS, G.; NARAYANANN, S.; PETERS, K.; PETERS, E.M. Betunilic Acid: Isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneana*. Antimalarial activity, an cristal structure of benzil esters. **Planta Médica**, v.63, p.255-257, 1997.
- BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and The Aplication to Separation Process**, Steikopff Darmastadt, New York, Springer, 1994, v.4, 387p.
- BRUNNER, G.; JOHANNSEN, M. Solubilities of xantines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.95, p.215-226, 1994.
- BUCZER, B; GELDART, D. - Determination of density of porous particules using very fine dense powders. **Powder Tecnology**, v.45, p.173-176, 1986.
- BUSH, D.; ECKERT, C.A. Estimation of solid solubilitys in supercritical carbon dioxide from solute solvatochromic parameters, in **Supercritical Fluid- Extraction and Polluitio Prevention**. Ed. Abraham, M.A. e Sunol, A.K., American Chemical Society, Washington, D.C., 1997.
- CARDOSO, C.A.L. **Análise Cromatográfica de Plantas e Produtos Fitoterápicos - 2000** Tese (Doutorado em Química Analítica), Instituto de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araraquara.
- CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; POZETTI, G.L. Gas Chromatographic analysis of indole alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. **Journal of Chromatography A**, v.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**, v.808, p.264 - 268, 1998.
- CARNAT A.; CARNAT A.T.; FRAISSE, D. AND LAMAISON, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v.70, p.44-49, 1999.
- CARVALHO JUNIOR, R.N. **Obtenção do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinallis*): determinação das isotermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos e do equilíbrio de fases.** – 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO JUNIOR, R.N.; MOURA, L.S.; QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, P.T.V.; MING, L.C.; MEIRELES, M.A.A. Determination of the global yield isotherms for the system rosemary (*Rosmarinus officinallis*) + CO₂. **Anais do 6th International Symposium on Supercritical Fluids (6th ISSF)**, Versailles (França), 2003.
- CARVALHO JUNIOR, R.N.; MOURA, L.S.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinallis*): kinetic data, extract's global yield, composition and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2005, *in press*.
- CHAFER, A.; FORNARI, T.; BERNA, A.; STATEVA, R.P. Solubility of quercetin in Supercritical CO₂ + ethanol as a modifier: measurements and Thermodynamic modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.32, 89-96, 2004.
- CHARPENTIER, A. B.; SEVENANTS, M.R. **Supercritical Fluid Extraction and Chromatography**, 2^a ed., Ed.Copyringht, 1988, 254p.

- CHIU, K.L.; CHENG, Y.C.; CHEN, J.H.; CHANG, C.J.; YANG, P.W. Supercritical Fluids extraction of Ginko glikgolides and flavonoids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.24, p.77-87, 2002.
- CHOI, Y.H.; CHIN, Y.W.; KIM, J.; JEON, S.H.; YOO, K.P. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. **Journal of Chromatography A**, v.863, p. 47- 55, 1999.
- CHRASTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **Journal of Physical Chemistry**, v.86, p.3016-3021, 1982.
- COCERO, M. J. ; GARCÍA, J. Mathematical model of supercritical extraction applied to oil seed extraction by CO₂+saturated alcohol — I. Desorption model. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.20, n.3, p.229-243, 2001.
- CONSTANTINOU, L.; GANI, R. New group contribution method for estimating properties of pure compounds, **AIChE Journal**, v.40 (10), p.1697-1710, 1994.
- CORDELL, G.A. **The Alkaloids_ Chemistry and Biology**, Academic Press, Ed by Cordell, G.A, San Diego Academic 1998, v.50, 590p.
- CORREA, N.F., ARAÚJO, M.E., MACHADO, N.T., FRANÇA, L.F. Mass transfer modeling for supercritical extraction from solid material. **Anais do TUTH**, 2001.
- COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.564-582, 1999.
- CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**, Clarendon Press, Oxford, 1975, 85p.
- DAS, P.C.; DAS, A.; MANDAL, S. Antiinflammatory and antimicrobial activies of the seed kernel of *Manguilera indica*. **Fitoterapia**, p.235-240, 1989.

- DEL VALLE, J.M.; AGUILERA, J.M. Improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research.**, v.27, p.1551- 1553, 1988.
- 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.
- DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência- Um guia de estudo interdisciplinar**, Ed Unesp, 1996.
- 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**, v.39, p.235-248, 1993.
- ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of Olive Husk oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.16, p.43-58, 1999.
- EVERS, M.; POUJADE, C.; FRANCÚ OISE SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.; LELIEVRE, Y.; GUEGUEN, J.C.; REISDORF, D.; MORIZE, I.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; HE'NIN, Y.; BOUSSEAU, A.; MAYAUX, J.F.; LE PECQ, J.B.; DEREU, N.; Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Inhibitors with a New Mode of Action **Journal of Medical Chemistry**, v.39, p.1056-1068, 1996.

- FAHMY, T.M.; PAULAITIS, M.E.; JOHNSON, D.M.; MCNALLY, A.E.P. Modifier Effects in the Supercritical Fluid Extraction of Solutes from Clay, Soil, and Plant Materials **Analytical Chemistry**, v.65, p.1462-1469, 1993.
- FAO. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. www.fao.org (10/2004).
- FARMAMONDO. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. www.farmamondo.com/vista.cfm?ID=440&LI=e (02/2003).
- FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v.54, p. 263-269, 2002.
- FILLIPPI, R.P. CO₂ as a solvent: applications to fats, oils and other materials. **Chemistry Industry**, v.12, p.390-394, 1982.
- FRANÇA, L.F.; MEIRELES, M.A.A. Modeling the extraction of carotene and lipids from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.18, p.35-47, 2000.
- FRANÇA, L.F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.A.; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G.- Supercritical Extraction of Carotenoids and Lipids from Buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.14, n.3, p.247-256, 1999.
- FRANZ, G.; KOEHLER, H. **Drogen und Naturstoffe**, Springer_Verlog, Berlin, 1992, 140p.
- FREUND, R.J.; LITTEL, R.C. **SAS System for Regression- SAS Series in Statistical Applications**, SAS Institute Inc., NC, 2nd ed, 1985.

- FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y. Anti-aids agents, 11. Betunilic acid and platonic acid as anti-HIV principles from *SYZIGIUM clavviform*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v.57, n.2, p.243-247, 1994.
- GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y. GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. Extract_(VIMANG®). **Pharmacology Research**, v.50, p.143-149, 2004.
- GLOBO RURAL. Citações e referências a documentos eletrônicos. <http://globorural.globo.com> (01/2005).
- GOLDBERG, I. **Functional Foods: Designer Foods, pharmafoods, nutraceuticals**. Ed. Goldberg, I., Chapman & Hall, NY, 1994.
- GOMEZ-PRIETO, M. S.; CAJA, M. M.; HERRAIZ, M.; SANTA-MARIA, G. Supercritical Fluid Extraction of *all-trans*-Lycopene from Tomato **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.1, p.3-7, 2003.
- GOODARZANIA, I.; EIKANI, M. H. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils: Modeling and simulation. **Chemical Engineering Science**, v.53, p.1387-1395, 1998.
- GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. **Introduction to Plant Biochemistry**. Pergamon Press, New York, 1990, 2ª ed.
- GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.26, p.401-407, 1993.

- GUIDA, A.; BATTISTA, G.; BARGARDI, S. Actividad antibacteriana de alcalóides de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Ars Pharmaceutica**, v.2, p.167-173, 2003.
- HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, p.556-559, 1978.
- HARBONE, J.B. **Phytochemical Methods: A guide to the modern techniques of plant analysis**, Chapman an Hall, 2^a ed, 1991, 288p.
- HASLER, C.M. Alimentos Funcionais: seu papel na prevenção de Doenças e na Promoção da saúde. Institute of Food Technologists, painel de Especialistas em Segurança Alimentar e Nutrição, 2001.
- HILGERT, N. I. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.11-34, 2001.
- HOFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by Endogenous and Enviromental Factors in the Natural Habitat. **Planta Medica**, v.64, p. 148- 152, 1998.
- IBGE. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. www.ibge.gov.br (12/2001); www.sidra.ibge.gov.br/bda/extveg (12/2004 e 01/2005).
- IWU, M.M., JACSKON, J.E., SCHUSTER, B.G. Medicinal Plants in the Fight against Leishmaniasis. **Parasitology Today**, v.10, n.2, p.64-68, 1994.
- JACOBS, M.B. **The chemical analysis of food and products**. 3rd.Ed, Robert Krieger Publishing Co. New York, p.21-23, 1973.

- JANICOT, J. L.; CAUDE, M.; ROSSET, R. Extraction of major alkaloids from poppy straw with near-critical mixtures of carbon dioxide and polar modifiers. **Journal of Chromatography**, v.505, p.247-271, 1990.
- JANICOT, J.L.; CAUDE, M.; ROSSET, R. Separation of opium alkaloids by carbon dioxide sub- and supercritical fluid chromatography with packed columns : Application to the quantitative analysis of poppy straw extracts **Journal of Chromatography A**, v.437, p.351-364, 1988.
- JEONG, M.L.; CHESNEY, D.J. Investigation of modifier effects in supercritical CO₂ extraction from various solid matrices. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.16, p.33-42, 1999.
- JOBACK, K.G.; REID, R.C. – Estimation of pure-components properties from group-contribution, **Chemical Engineering Communications**, v.57, p.233-243, 1987.
- KABUTI, T.; NAKAJIMA, H.; ARAI, M.; UEDA, S.; KUWABARA, Y.; DOSAKO, S. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. **Food Chemistry**, v.71, p. 61-66, 2000.
- KAMLET, M.J.; ABBOUD, J.L.M.; ABRAHAM, M.H.; TAFT, R.W. Linear Solvation energy Relationships. 23. A Comprehensive collection of the solvatochromic parameters α , β e π^* and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. **Journal of Organic Chemistry**, v.48, p.2877-2887, 1983.
- KASHIWADA, Y.; HASHIMOTO, F.; COSENTINO, L.M.; CHEN, C.H.; GARRETT, P.E.; LEE, K.H. Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives as Potent Anti-HIV Agents 1. **Journal of Medical Chemistry**, v.39, p.1016-1017, 1996.

- KILLOP, A.M. **An Introduction to chemistry of the alkaloids.** London Butterworths, 1970, 212p.
- KING, M.B.; BOOT, T.R. **Extraction of Natural Products Using Near- Critical Solvents,** Chapman & Hall, 1993, 325p.
- KING, W.J.; FRANCE, J.E. Basec Principles of Analitical Superrcritical Fluid extraction. **In Analysis of Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography.** Ed by Bernd Wenclawiak. Spring-Verlag, Alemanha, 1992.
- KLINCEWICS, K.M.; REID, R.C. Estimation of critical properties with group contribution methods, **AIChE Journal**, v.30, n.1, p.137-142, 1984.
- KUTCHAN, M.T. Alkaloid Biosynthesis- The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **Plant Cell**, v.7, p.1059-1070, 1995.
- LANG, Q.; WAI, C.M. Supercritical Fluid extraction in herbal and natural product studies- pratical review. **Talanta**, v.53, p.771-782, 2001.
- LEAL, P.F.; BRAGA, M.E.M.; SATO, D.N., CARVALHO, J.E.; MARQUES, O.M; MEIRELES, M.A.A, Functional properties of spice extracts obtained via Supercritical Fluid Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2520-2525, 2003.
- LEE, S.T.; REIGHARD, T.S.; OLESIK, S.V. Phase diagram studies of methanol-H₂O-CO₂ and acetonitrile-H₂O-CO₂ mixtures. **Fluid Phase Equilibria**, v.122, p.223-241, 1996.
- LEEUWEMBERG, A.J.M.- **A Revision of *Tabernaemontana*. The new world species and *Stemmandenia*.** Kew, The Royal Botanic Gardens, 1994, v.2, 442p.
- LEMOS, A.H. Alimentos Funcionais. **Revista Oxidologia**, v.1, p.8-11, 2002.

- LI, S.; VARADARAJAN, G.S.; HARTLAND, S.- Solubilities of teobromine and caffeine in supercritical carbon dioxide: correlation with density-based models. **Fluid Phase Equilibria**, v.68, p.263-280, 1991.
- LIMA, Z.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S. Efeitos Tóxicos a atividade antiulcerogênica do extrato de Folhas de mangífera indica L. **Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais**, São Pedro, São Paulo, 2003.
- LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.H. **Alkaloids**, Springer- Verlag, 1994, v.15, 274p.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S., RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.133-137, 2001.
- MARENTIS, R.T. Steps to developing a Comercial Supercritical Carbon Dioxed Processing Plant- in Chapermter & Servenants. **Supercritical Fluid extraction in Chromatography**. 2^a ed., Ed.Copyringht, 1988, 254p.
- MARTÍNEZ, G.; DELGADO, R.; PEREZ, G.; GARRIDO, G.; SELLES, A.J.N.; LEÓN, O.S. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Manguilera indica* L. Extract (Vingang). **Phytotherapy Research**, v.14, p. 424-427, 2000.
- MARTINEZ, J. **Estudo de modelos de transferência de massa na interface sólido-fluido durante o processo de extração supercrítica**. 2002 –Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MARTINEZ, J.; MONTEIRO, A.R.; ROSA, P.T.V.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.M. Multicomponent model to describe extraction of Ginger oleoresin with

- supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.42, p.1057-1963, 2003.
- MATOS, F.J.A. **Introdução á Fitoquímica Experimental**, Ed.UFC, 1997, 140p.
- MC HUGH, M.; KRUKONIS, V.J. **Supercritical Fluid Extraction. Principles and Prattice**. Butterworth-Heinemann, 1986.
- MCHUGH, M.; PAULAITIS, M. Solid solubilities of naphthalene and biphenyl in supercriti carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.25, p.326-329, 1990.
- MONARCA, G. **Fruticultura comercial: Manga e Abacate** Livraria Nobel S.A., Ed.Distribuidora, 1978.
- MOURA, L.S. **Obtenção por extração supercrítica do extrato de funcho (*Foeniculum vulgare*): determinação das isothermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos e do equilíbrio de fases**. – 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- MUKHERJEE, P.K.; SAHA, K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B.P. Studies on the antinflammatory activity of rizomes of *Nelumbo nucifera*. **Planta Medica**, v.63, p.367-369, 1997.
- NOSSACK, A.C.; VILEGAS, J.H.Y.; VON BAER, D., LANÇAS, F.M. Supercritical Fluid Extraction and Chromatographic Analysis (HRGC- FID and HRCG- MS) of *Lupinus spp.* Alkaloids. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.11, n.5, p.495-501, 2000.

- OHNO, T. KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.8, p.207-215, 2003.
- PASSOS, C. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. [http: www.FIOCRUZ.br](http://www.FIOCRUZ.br) (12/2000).
- PEISHENG, M., MING, X., WEN, X., JIANHOU, Z. New group contribution correlations for estimation of critical properties. **Journal of Chemical Industry and Engineering (China)**, v.5, p.2, 1990.
- PELLETIER, S.W. Alkaloids of *Tabernaemontana* species. In **Alkaloids: chemical and biological perspectives**; Pelletier, S.W Ed.; Institute for Natural Products Research, John Wiley & Sons – Interscience Publication: New York, NY, v.6, 542p, 1988.
- PENNINGTON, J.A.T. Food composition database for bioactive food components. **Journal of Food Composition Analysis**, v.15, p.419-434, 2002
- PEREIRA, C.G.- **Extração de Alcalóides Indólicos de *Tabernaemontana catharinensis* com Dióxido de Carbono Supercrítico + Etanol - 2002** –Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- PEREIRA, C.G., MARQUES, M.O.M, BARRETO, A., SIANI, A.C., FERNANDES, E. C., MEIRELES, M.A.A, Extraction of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using Supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of raw material origin and process variables. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.30, p.51-61, 2004.

- PEREIRA, C.G.; CARVALHO, J.E.; MEIRELES, M. A. A. Atividade anticancerígena de extratos de *Tabernaemontana catharinensis* obtidos por Extração Supercrítica. **Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, São Pedro, São Paulo, 2003a.
- PEREIRA, C.G.; ROSA; P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: technical and economical analysis. **Anais do 6th International Symposium on Supercritical Fluids (6th ISSF)**, Versailles (França), 2003b.
- 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.; ZENK, M.H. **Indole and Biogenetically Related Alkaloids**- Academy Press, London, 1980, 349p.
- POVH, N. P. **Obtenção do Óleo Essencial da Camomila (*Matricaria recutita* [L.] Rauschert) por Diferentes Métodos: Destilação por Arraste a Vapor, Extração com Solventes Orgânicos e Extração com CO₂ Supercrítico**. 2000. Tese de Doutorado (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). **The Journal of Supercritical Fluids**, v.21, p.245-256, 2001.

- PRETEL, E.J.; ARAYA, P.; MENGARELLI, A.; BRIGNOLE, E. A. Prediction of Physical Properties For Molecular Design of Solvents. **Latin American Applied Research**, v.22, p.187-194, 1992.
- RAEISSI, S.; PETERS, C.J. On the phenomenon of double retrograde vaporization: multi-dew point behavior in the binary system ethane + limonene. **Fluid Phase Equilibria**, v.191, p.33-40, 2001.
- RAEISSI, S.; PETERS, C.J. Double retrograde vaporization in the binary system ethane+linalool. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.23, p.1-9, 2002.
- RAEISSI, S.; PETERS, C.J. Double retrograde vaporization in a multi-component system: ethane+orange peel oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.29, p.69-75, 2004.
- RATES, S.M.K; SCHAPOVAL, E.E.S.; SOUZA, I.A.; HENRIQUES, A.T.- Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, n.4, p.288-294, 1993.
- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; GUEHO, J.; JULIEM, H.R., HOSTETTMANN, K; RIOS, J.L. Investigations on the Steroidal anti-inflammatory activity of terpenoids from *Diospyros leucomelas*. **Planta Medica**, v.61, p.9-12, 1995.
- REIS-VASCO, E.M.C.; COELHO, J.A.P.; PALAVRA, A.M.F.; MARRONE, C., REVERCHON, E. Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction. **Chemical Engineering Science**, v.55, p.2917-2922, 2000.
- REVERCHON, E.; DAGHERO, J; MARRONE, C.; MATTEA, M.; POLETTO M. Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: experiments and

- mathematical modeling. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v.38, p. 3069- 3075, 1999.
- RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.- Effects of some b-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.122, p.27–31, 1999.
- RIZVI, S.S.H.; DANIELS, J.A.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A.- Supercritical Fluid Extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**, v.40, n.7, p.57-64, 1986.
- RODRIGUES, V.M. **Efeitos da vazão do solvente na Cinética de Extração e na Qualidade do Óleo de Cravo da Índia obtido com CO₂ Liquefeito** - Campinas, 1996, Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 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. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.22, p.21-36, 2002.
- ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A.. Supercritical Fluids applied to the production of Natural Extracts and Functional Foods: Process Design Data. **Anais do 11th Supercritical Symposium on Supercritical Fluids Chromatography, Extraction, and Processing. 2004**. Pittsburgh, EUA.

- ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Influence of operating time on the costs of manufacturing extracts from natural substratum by SFE. **Anais do 4th Brazilian Meeting on Supercritical Fluids**, Salvador (BA), Brasil, 2001.
- ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Rapid estimation of manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.235-240, 2005.
- SAIRAM, K.; HEMALATHA, S.; KUMAR, A.; SRINIVASAN, T.; GANESH, J.; SHANKAR, M.; VENKATARAMA, S. Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Manguilera indica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.11-15, 2003.
- SALDAÑA M.D.A. **Extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos** - Tese de Doutorado- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2002.
- 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**, v.47, p.3804- 3808, 1999.
- SANDLER, S. I. **Chemical and Engineering Thermodynamics**, 2^a Ed., John Wiley & Sons, 1989, 587p.
- SANDLER, S. I. **Chemical and Engineering Thermodynamics**, 3^a Ed., John Wiley & Sons, 1999, 772p.
- SARTORI , A.M.C.; LOPES, M.H. Doença de Chagas e Infecção por HIV. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. www2.netpoint.com.br/sbmt/sbmj4.htm (10/2002).

- SASTRI, S.R.S; MONHANTY, S.; RAO, K.K. A new method for predicting critical volumes of organic compounds. **Fluid Phase Equilibria**, v.129, p.49-59, 1994.
- SCHAEFFER, S.T.; ZALKOW, L.H.; TEJA, A.T. Extraction and isolation of chemotherapeutic pyrrolizidine alkaloids from plant substrates. **ACS Symposium series**, p.417-433, 1989.
- SCHNEIDER, G.M. High pressure investigations of fluid mixtures-review and recent results. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.13, p.5-14, 1998.
- SELLÉS, AJN; CASTRO, HTV; AGUERO-AGUERO, J ; GONZALEZ-GONZALEZ, V.; NADDEO, F.; SIMONE, F; RASTRELLI, L. Isolation and Quantitative Analysis of Phenolic Antioxidants, Free Sugars, and Polyols from Mango (*Mangifera indica* L.) Stem Bark Aqueous Decoction Used in Cuba as a Nutritional Supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.762-766, 2002.
- SEVERI, J.A.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LIMA, Z.P.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W. Investigação Química do Extrato Hidroalcoólico de *Mangifera indica*. **Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, São Pedro, São Paulo, 2003.
- SHARMA, V.; PIWNICA, W, D. Metal complexes for therapy and diagnosis of drugs resistance. **Chemical Reviews**, 1999, v.99, p.2545-2560.
- 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.
- SINGH, P.C.; SINGH, R.K. Choosing an appropriate bioseparation Technique. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 49-58, 1996.

- SISSOM, L.E.; PITTS D.R. **Fenômenos de Transporte**. Tradução Adir M.Luiz, Guanabara, 1988, 765p.
- SOARES, D.C.; PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A.; SARAIVA, E.M.B. *Anti-leishmania (L.) amazonensis* activity of Supercritical CO₂+Ethanol extracts from *Tabernaemontana catharinensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, suppl 13, 110, 2003.
- SOLER, F.; POUJADE, C.; EVERS, M; CARRY, JC.; HENIN, Y.; BOUSSEAU, A.; HUET, T.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; MAYAUX, J.F.; LE PECQ, J.B.; DEREU, N. Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Specific Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. **Journal of Medical Chemistry**, v.39, p.1069-1083, 1996.
- SOMAYAJULU, G.R.- Estimation procedures for critical constants **Journal Chemical and Engineering Data**, v.34, p.106-200, 1989.
- SONG, KYU MIN; PARK, SANG WOO; HONG, WON HI; LEE, HUEN; KWAK, SANG SOO; LIU, JANG RYOL. Isolation of vindoline from *Catharanthus roseus* by supercritical fluid extraction. **Biotechnology Progress**, v.8, n.6, p.583-586, 1992.
- SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v.88, p.411 - 417, 2004.
- SOUZA, E.M.B.D.; CHIVONE-FILHO, O.; MORENO, M.T.; SILVA; D.N.MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A.. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* cham using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.229-241, 2002.

- SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.33, p.35-52, 2005.
- SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.3, p.409-414, 1994.
- SPITZER, V.; RATES, M.K.; HENRIQUES, A.T.; MARX, F.- The fatty acid composition of the seed oil of *Peschiera australis*. **Fett (Germany)**, v.97, p.334-335, 1995.
- TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. **AIChE Journal**, v.35, p.1029-1031, 1989.
- TAYLOR, L.T. **Supercritical Fluid Extraction**. John Wiley & Sons Inc., Canada, 1996, 180p.
- TEZEL, A., HORTAÇSU, A., HORTAÇSU, O. Multi-component models for seed and essential oil extractions. **The Journal of Supercritical Fluids** vol19, p 3-17, 2000.
- TING, S.S.T.; TOMASKO, D.L.T.; MACNAUGHTON, S.J.; FOSTER, N.R. Chemical-physical interpretation os cosolvent effects in supercritical fluids. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v.32, p. 1482-1487, 1993.
- ULRICH, G.D. **A Guide to Chemical Engineering Process Design and Economics**, John Wiley & Sons, New York, 1984.
- VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.10, p.1324-1327, 2002.

- VAN BEEK, T.A.; VERPOORTE, R.; SVENDSEN, A.B. Antimicrobially Active Alkaloids from *Tabernaemontana chippi*. **Journal of Natural Products**, v.48, n.3, p.401-423, 1985.
- VAN BEEK T.A.; VERPOORTE R.; SVENDSEN A.B. Identification of *Tabernaemontana* Alkaloids by mean of Thin- Layer Chromatography an Chromogenic Reactions. **Journal of Chromatography**, v.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**, v.10, n.1, 1984b.
- VANDANA, V.; TEJA, A.S. The solubility of paclitaxel in CO₂ and NO₂. **Fluid Phase Equilibria**, v.135, p. 83-87, 1997.
- VETERE, A. Predicting the vapor pressures of pure compounds by using the wagner equation **Fluid Phase Equilibria**, v.62, p. 1-10, 1991.
- WHO/ OMS- **Citações e referências a documentos eletrônicos.** <http://www.who.int/emc/diseases/leish> (04/2001); <http://www.who.int/ctd/chagas> (10/2002); <http://www.who.int> (12/2004).
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or Signaling Molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.7, p.838-849, 2004.
- YODA, S.K. **Estudo da cinética de extração dos glicosídeos da *stevia rebaudiana* Bertoni com mistura CO₂ + água.** - 2001 –Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

- YODA, S.K; BARRETO, A.S. **Relatório Interno das Atividades desenvolvidas na Unicamp com Extração Supercrítica – LASEFI - UNICAMP / FIOCRUZ – RJ, 2000.**
- YODA, S.K.; MARQUES, M.O.M; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extration from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted components. **Journal of Food Engineering**, v.57, p. 125-134, 2003.
- YONKER, C.R.; SMITH, R.D. Solvatochronic behavior of supercritical fluids: the carbon dioxide/2-propanol system. **Journal of Physical Chemistry**, v.92, p.2374-2378, 1988.
- YOON, J.H.; LEE, H.; CHUNG, B.H. High pressure three-phase equilibria for the carbon dioxide-ethanol-water system. **Fluid Phase Equilibria**, v.102, p.287-292, 1994.
- ZAMORANO-PONCE, E.; FERNANDÉZ, J.; VARGAS, G; RIVERA, P.; CARBALLO, M. Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage by cisplatin evaluated by the cornet assay technique. **Toxicology Letters**, v.152, p.85-90, 2004.
- ZANCAN, K.C; MAQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A - Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.24, p. 57-76, 2002.

8. ANEXOS

Anexo 1. Lista da produção bibliográfica do período

A.1.1. Artigo publicado

PEREIRA, C.G.; MARQUES, M.O.M; BARRETO, A.; SIANI, A.C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using Supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of raw material origin and process variables. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.30, p.51-61, 2004.

A.1.2. Artigos submetidos para publicação

PEREIRA, C.G; CARVALHO J.E.; MEIRELES, M.A.A. Anticancer activity of *Tabernaemontana catharinensis* extract obtained by supercritical fluid extraction. Submetido em 18/11/2004 à *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*.

PEREIRA, C.G; LEAL, P.L.; D.N. SATO, D.N., MEIRELES, M.A.A. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by Supercritical CO₂ + cosolvent. Submetido em 30/11/2004 ao *Journal of Medicinal Foods*.

A.1.3. Trabalhos apresentados em congressos.

PEREIRA, C.G, MEIRELES, M.A.A. Functional compounds from leaves of mango (*Mangifera indica* L.) obtained by supercritical fluid extraction 7th ISSF, Flórida/EUA, 2005 (a ser apresentado).

PEREIRA, C.G; LEAL, P.L.; SATO, D.N.; MEIRELES, M.A.A. Pharmacological Compounds from *Tabernaemontana catharinensis* obtained by Supercritical Fluid extraction: an evaluation of the cosolvent effect on the extract compositions and activities. 11th International Symposium & Exhibit on Supercritical Fluid Chromatography, Extraction, and Processing, Pittsburgh/EUA, 2004.

PEREIRA, C.G; MEIRELES, M.A.A. Effect of co-solvent in global yields for the system *Tabernarmontana catharinensis* + CO₂. Anais do V Encontro Brasileiro de Fluidos Supercrítico (V EBFS), Florianópolis/SC, 2004.

PEREIRA; C.G.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; RODRIGUES, M.V.N.; MEIRELES, M.A.A. Essential oil from *Aloysia triphylla* obtained by Supercritical Extraction. Anais do V Encontro Brasileiro de Fluidos Supercrítico (V EBFS), Florianópolis/SC, 2004.

PEREIRA, C.G.; ROSA; P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: technical and economical analysis. Anais do 6th International Symposium on Supercritical Fluids (6th ISSF), Versailles (França), 2003.

PEREIRA, C.G; LEAL, P.L.; SATO, D.N., MEIRELES, M.A.A. SFE of pharmacological compounds from *Tabernaemontana catharinensis*: analysis of antioxidant and bactericide activity. Anais do 6th International Symposium on Supercritical Fluids (6th ISSF), Versailles (França), 2003.

PEREIRA, C.G; MEIRELES, M.A.A. Supercritical extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: an evaluation of co-solvent and the extracts compositions. Anais do 6th International Symposium on Supercritical Fluids (6th ISSF), Versailles (França), 2003.

PEREIRA, C.G; CARVALHO J.E.; MEIRELES, M.A.A. Anticancer activity of *Tabernaemontana catharinensis* extracts from supercritical extraction. Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, São Pedro-SP, 2003 .

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Obtenção de alcalóides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis* por soxhlet e extração supercrítica: uma análise do uso de diferentes solventes e composição do extrato Anais do V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (V SLACA), Campinas/ SP, 2003.

A.1.4- Lista de produção em co-autoria

A.1.4.1- Artigo publicado

SOARES, D.C; PEREIRA, C.G; MEIRELES, M.A.A.; SARAIVA, E.M.B Anti-*Leishmania amazonensis* activity of supercritical CO₂+ethanol extracts from *Tabernaemontana catharinensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol 45 [suppl. 13], p 110, 2003.

A.1.4.2. Trabalhos apresentados em congressos.

KUSHIDA, M. M.; TORREZAN, R.; CECCATO, C. M.; PINTO NETO, M.; MARTINEZ, J.; SILVA, V. S.; PEREIRA, C. G.; CARATIN, C.; BARRETO, A. C. S.; IAMANAKA, B.; CARDELLO, H. M. A. B. Estudo do perfil sensorial e aceitação de três amostras de alimento com soja, sabor laranja, acondicionadas em embalagens longa vida, Anais do V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (V SLACA), Campinas/ SP, 2003.

PINTO NETO, M.; CARATIN, C.; SILVA, V.S.; PEREIRA, C.; CECCATO, C.M.; KUSHIDA, M.M.; TORREZAN, R.; MARTINEZ, J.; IAMANAKA, B.; BARRETO, A.C.S.; CARDELLO, H.M.A.B. Aplicação de testes de diferença em três amostras de alimento com soja, sabor laranja, acondicionadas em embalagens longa vida. Anais do

V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (V SLACA), Campinas/ SP, 2003.

A.1.5- Co-orientação de aluno de iniciação científica

Co-orientação da aluna da iniciação científica ISABELA PIZARRO GUALTIERI, no projeto intitulado de: “Obtenção dos constituintes químicos de *Achyrocline satureioides* DC por diferentes processos de extração”, no período de 2004-2005.

Anexo 2- Biossíntese de Alcalóides Indólicos

Todos os alcalóides contêm em sua estrutura o nitrogênio, na maioria das vezes integrante do anel heterocíclico. Seus precursores biossintéticos são quase sempre aminoácidos, dentre estes estão: L-ornitina, L-aspartate, L-lisina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-tirosina ou L-histidina (GOODWIN, 1990).

O sistema indólico é derivado do aminoácido L-triptofano. Este é descarboxilado pela enzima triptofano-descarboxilase (TDC) formando a triptamina (Figura A.2). Os alcalóides indólicos monoterpênicos são, na maioria das vezes, resultado da condensação da triptamina com a secologamina, que é formado a partir do monoterpene pirofosfato de geranila. Esta condensação, catalisada pela enzima strictosidina sintetase (SSS), forma a strictosidina, um alcalóide glicosilado. Entretanto, a eliminação da glicose presente na strictosidina, pela enzima strictosidina glicosidase (SG), forma um produto instável, de estrutura ainda não conhecida. As outras classes dos alcalóides indólicos monoterpênicos são formadas a partir desse intermediário por meios ainda não esclarecidos (SIMÕES, *et al*, 1999 e PHILLIPSON, 1980). A Figura A.2 mostra a relação entre as classes de alcalóides indólicos monoterpênicos, na qual uma única estrutura está sendo utilizada para representar cada classe (SIMÕES *et al*, 1999).

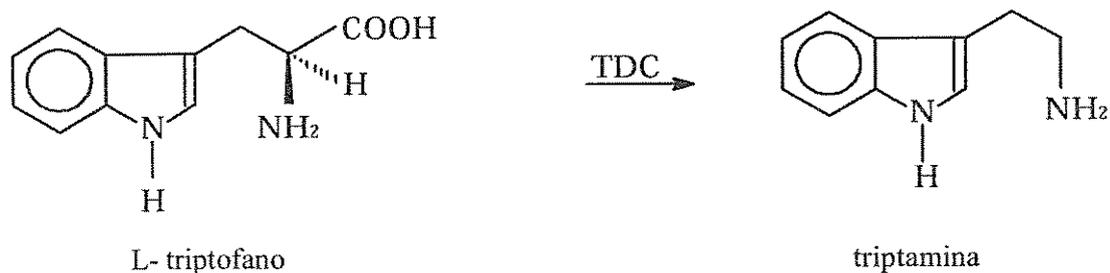
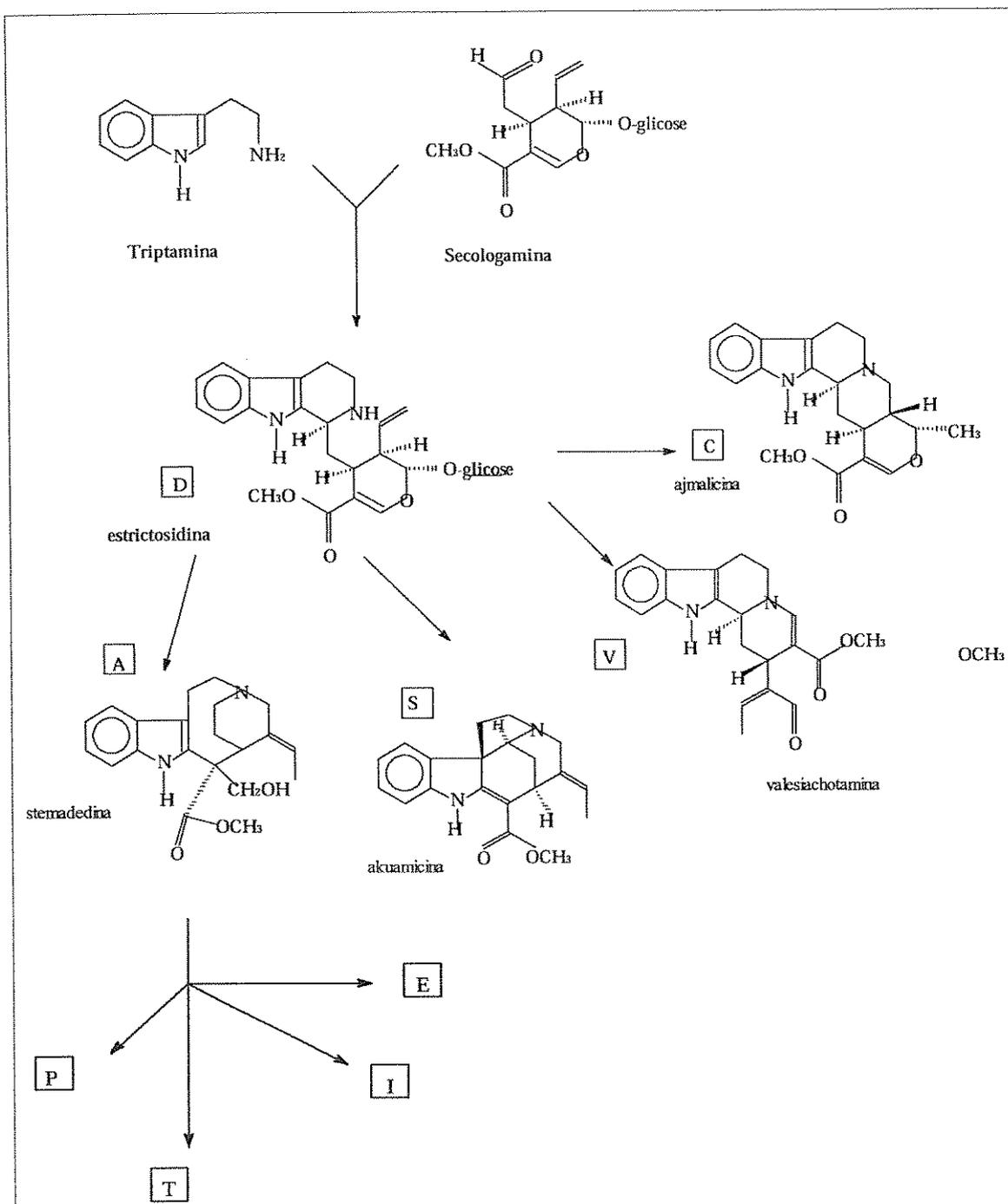


Figura A.1: Reação promovida pela enzima triptofano-descarboxilase (LDC)



(continuação na página seguinte).

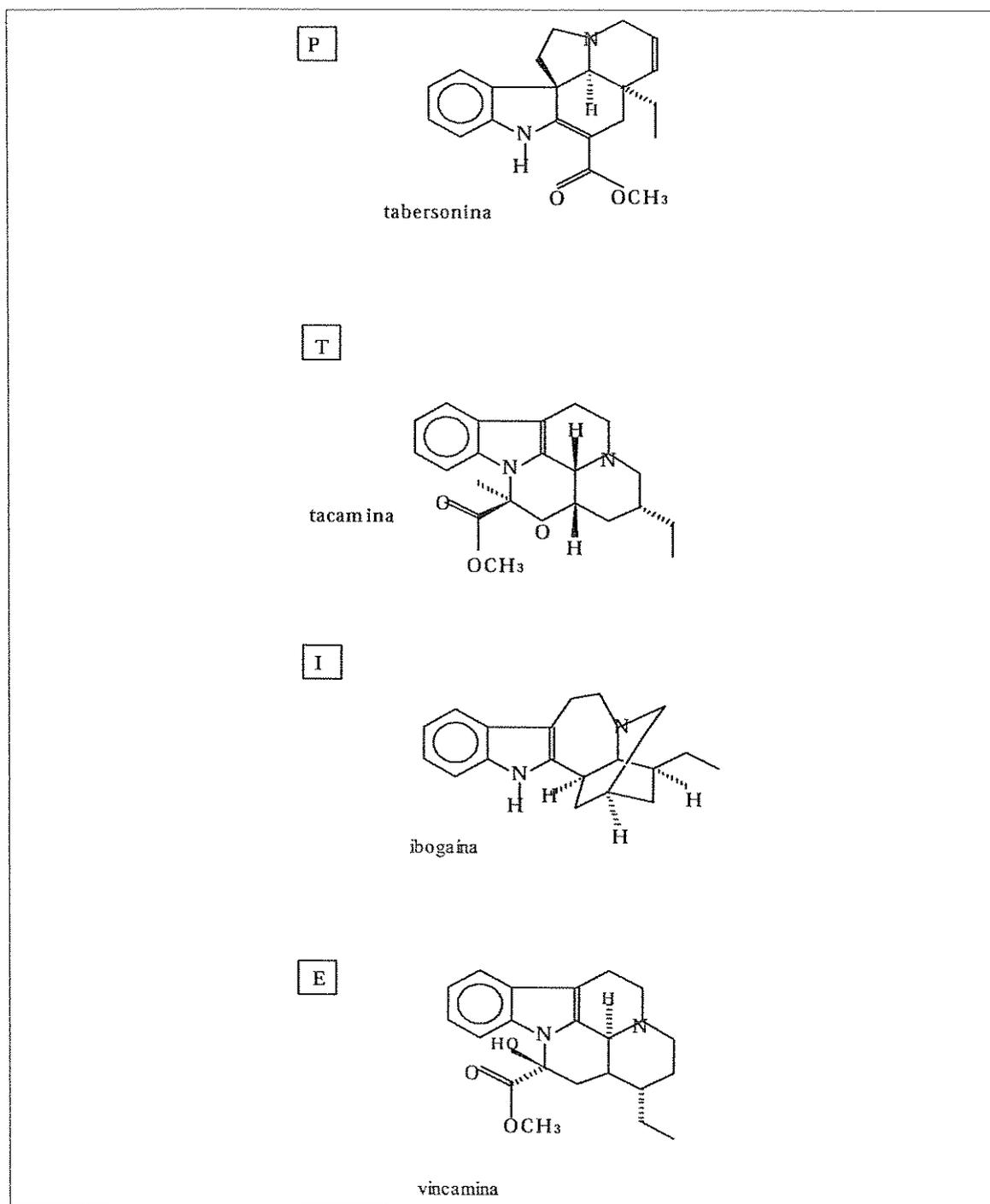


Figura A.2: Relação de biossíntese entre as classes de alcalóides indólicos monoterpênicos: C (corinanteano), V (vallesiacotamano), S (estriquinano), A (aspidospermatano), P (plumerano), T (tacamano), I (ibogano) e E (eburnano).

Anexo 3: Interações Solvente-Soluto_Solvente

A.3.1-Parâmetros de solubilidade entre os líquidos (Hildebrand)

Proposto por Hildebrand e Scott, em 1949, o parâmetro de solubilidade foi introduzido primeiramente para caracterizar o comportamento de uma solução regular soluto-solvente (SANDLER, 1999). Para líquidos, o parâmetro de solubilidade pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\delta = \left(\frac{\Delta \underline{U}^{\text{vap}}}{\underline{V}^{\text{L}}} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. A.1}$$

onde: δ é o parâmetro de solubilidade

$\Delta \underline{U}^{\text{vap}}$ é a variação da energia interna durante a vaporização

\underline{V}^{L} é o volume molar do líquido

Ou ainda,

$$\delta = \left(\frac{\Delta \underline{H}^{\text{vap}} - RT}{\underline{V}^{\text{L}}} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. A.2}$$

onde $\Delta \underline{H}^{\text{vap}}$ é a variação de entalpia durante a vaporização

T é a temperatura (K)

R é a constante dos gases ideais

Para uma mistura de multicomponentes:

$$\bar{\delta} = \sum_j \phi_j \delta_j \quad \text{Eq. A.3}$$

$$\phi_j = \frac{x_j V_j}{\sum_K x_K V_K} \quad \text{Eq. A.4}$$

onde ϕ_j é a fração volumétrica do composto j na mistura.

As Eqs A.1- A.4 são utilizadas para predizer o coeficiente de atividade de substâncias em uma mistura líquida multicomponente (soluções regulares). Entretanto, para fluidos supercríticos o parâmetro de Hilderbrand não é válido. Giddings *et al*, em 1969, estabeleceram uma relação do parâmetro δ com a densidade na fase supercrítica, que segue a seguinte forma (MC HUGH e KRUKONIS, 1986):

$$\delta_1 = 1,25 P_c^{1/2} (\rho_r / \rho_{r1}) \quad \text{Eq. A.5}$$

onde ρ_r é a densidade reduzida do fluido supercrítico,
 ρ_{r1} é a densidade reduzida do fluido nas condições de líquido saturado.

Utilizando a Eq. A.5, é possível, através de um método simples, avaliar as interações entre solvente SC e o soluto a altas pressões (KING e FRANCE, 1992). A Eq A.6 considera o parâmetro de interação global (X) como sendo a soma de parâmetros entálpicos (X_H) e entrópicos (X_S):

$$X = X_H + X_S = \frac{V_1}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2 + X_S \quad \text{Eq. A.6}$$

onde

δ_1 é o parâmetro de solubilidade do fluido supercrítico;

δ_2 é o parâmetro de solubilidade do soluto

V_1 é o volume molar do fluido

A Tabela A.1 apresenta os parâmetros de solubilidade de Hilderbrand (δ^H) e de Giddings (δ^G) calculados para os co-solventes utilizados nesse trabalho. Verifica-se que Utilizando a equação acima, os parâmetros (δ^G) apresentaram a mesma tendência: aumento de δ com aumento da polaridade do solvente, entretanto com uma ordem de magnitude maior.

Tabela A.1: Parâmetros de solubilidade de Hilderbrand (δ_i^H) e Giddings (δ_i^G) calculados para os diferentes co-solventes utilizados na extração supercrítica

Solvente	δ_i^H (J/m ³)	δ_i^G (J/m ³)
IsoC3	0,72	8,25
EtOH-IsoC3	0,77	9,05
Etanol	0,81	9,85
MeOH-IsoC3	0,83	9,60
MeOH-EtOH	0,87	10,40
Metanol	0,93	10,95
IsoC3- H ₂ O	1,09	12,41
EtOH- H ₂ O	1,14	13,21
MeOH- H ₂ O	1,20	13,76
H ₂ O	1,46	16,56

A.3.2-Parâmetros Solvatocrômicos

Outra forma de se avaliar as interações entre soluto-solvente a altas pressões foi desenvolvido por KAMLET *et al* (1983) e tem sido utilizado por muitos pesquisadores para interpretar as interações sólido-solvente existentes nas condições supercríticas (YONKER e SMITH, 1988, TING *et al*, 1993; BUSH e ECKERT, 1997; SCHNEIDER, 1998; JEONG e CHESNEY, 1999). Este método utiliza uma relação linear da energia de solvatação para interpretar os efeitos do solvente sobre o soluto. Através de medidas de absorvância em UV-visível, é possível relacionar as interações entre soluto-solvente em termos de parâmetros de polaridade. A polaridade inclui uma soma de todas interações solvente-soluto, que podem ser descritas através dos chamados parâmetros solvatocrômicos (α , β e π^*). Nestes parâmetros são consideradas as interações de pontes de hidrogênio (α e β) e as interações dipolo-dipolo (π^*) e são utilizados para interpretar as modificações nas interações soluto/ solvente/ matriz. KAMLET *et al* (1983) listaram uma série de compostos (258) dentre eles ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois, compostos aromáticos com seus valores de α , β e π^* . O parâmetro α indica a habilidade em doar elétrons, enquanto que o parâmetro β possui habilidade em receber elétrons. O parâmetro π^* indica o grau de polaridade do composto.

TING *et al*, em 1993, utilizaram um modelo físico-químico, na qual os parâmetros solvatocrômicos eram utilizados para avaliar o efeito dos co-solventes sobre a solubilidade do sólido (naproxeno) em CO₂SC. BUSH e EKERT (1997) também fizeram uso desses parâmetros para estimar a solubilidade de 37 sólidos em CO₂SC. A Tabela A.2 apresenta os parâmetros α , β e π^* para diversos solventes.

Tabela A.2: Parâmetros solvatocrômicos (α , β e π^*) para alguns álcoois (KAMLET *et al.*,1983).

Solvente	α	β	π^*
CO ₂	0,00	0,00	0,00
IsoC3	0,76	0,95	0,48
EtOH	0,86	0,77	0,54
MeOH	0,93	0,62	0,60
H ₂ O	1,83	0,18	1,09

Anexo 4: Estudo da predição da solubilidade dos alcalóides em CO₂SC + Co-solventes

Muitos pesquisadores têm proposto métodos para predizer e estimar a solubilidade de solutos/ou sólidos em fluidos supercríticos com e sem co-solvente. Entretanto, existe a necessidade de se determinar os valores de parâmetros binários de interação (k_{ij}) e outros parâmetros do modelo que são ajustados através de dados experimentais. Seja por EDE (Peng-Robinson, Van der Waals, utilizando diferentes regras de mistura) seja por modelos empíricos dependentes da densidade: CHARISTIL (1982), DEL VALLE e AGUILERA (1988), fator de aumento E (SANDLER, 1999), outros.

Uma forma de predizer a solubilidade de alcalóides em CO₂SC seria avaliar dentre os modelos termodinâmicos aquele que melhor se ajusta aos dados experimentais de sistemas já estudados, no caso sistemas como cafeína/CO₂, teofilina/CO₂ e teobromina/CO₂, e utilizar o melhor modelo na predição da solubilidade de outros alcalóides. Este estudo foi realizado considerando dados experimentais de diversos autores (BRUNNER e JOHANNSEN, 1994, LI *et al*, 1991).

Na predição da solubilidade (y^*) de um sólido, no caso um alcalóide, em um CO₂SC, considera-se o equilíbrio termodinâmico entre a fase sólida e a fase supercrítica. O equilíbrio sólido-FSC pode ser calculado a partir da igualdade das fugacidades destas fases para cada componente do sistema. Desde que o fluido não está presente na fase sólida, duas simplificações podem ser feitas. A primeira é que o critério de equilíbrio só é aplicado para o soluto sólido (i), e a outra consideração é que a fugacidade do soluto na fase sólida é a mesma que a de um soluto puro. Assim, a relação de equilíbrio pode ser escrita como:

$$f_i^S(T, P) = \bar{f}_i^F(T, P, \underline{x}) \quad \text{Eq.A.7}$$

O subscrito S e F é referente a fase sólida e fluida (no caso supercrítica).

Para o cálculo da fugacidade do sólido puro, tem-se:

$$f_i^S(T, P) = P_i^{subl}(T) \cdot \left(\frac{f}{P} \right)_{sat(T)} \cdot \exp \left[\frac{1}{RT} \sum_{j=1}^{p^{j+1}} \int_{p^j}^{p^{j+1}} \underline{V}^j dP \right] \quad \text{Eq.A.8}$$

A pressão de vapor do sólido é geralmente pequena, então o termo $(f/P)_{sat, T}$ é aproximadamente unitário. Assim a baixas pressões, tem-se:

$$f_i^S(T, P) = P_i^{subl}(T) \quad \text{Eq.A.9}$$

e a moderadas e elevadas pressões:

$$f_i^S(T, P) = P_i^{subl}(T) \cdot \exp \left[\frac{\underline{V}^S (P - P^{sat}(T))}{RT} \right] \quad \text{Eq.A.10}$$

Desde que a fase fluida pode ser considerada como um gás comprimido, então sendo:

$$\bar{\phi}_i = \frac{\bar{f}_i^V}{y_i P} \quad \text{Eq.A.11}$$

$$\text{tem-se } \bar{f}_i^F = \bar{\Phi}_i y_i P \quad \text{Eq.A.12}$$

Assim, substituindo as Eq A10 e A12 na Eq A7, pode-se obter a Eq A13:

$$P_i^{subl}(T) \cdot \exp\left[\frac{\bar{V}_i^S (P - P^{sat}(T))}{RT}\right] = y_i P \bar{\Phi}_i \quad \text{Eq.A.13}$$

Rearranjando, pode-se considerar a seguinte expressão para o cálculo de y_i^* :

$$y_i = \frac{P_i^{sub}(T) \cdot \exp\left(\frac{\bar{V}_i^S (P - P_i^{sub})}{RT}\right)}{P(T, P, y) \cdot \bar{\Phi}_i} \quad \text{Eq.A.14}$$

onde:

$P_i^{sub}(T)$ é a pressão de sublimação do sólido numa dada temperatura,

\bar{V}_i^S é o volume molar do sólido puro,

$\bar{\Phi}_i(T, P, y)$ é o coeficiente de fugacidade do fluido supercrítico

Esta equação (Eq A14) normalmente deve ser resolvida por interação, uma vez que o coeficiente de fugacidade do soluto é função da fração molar deste: $\bar{\Phi}_i(T, P, y)$. Assim, fica definido o fator de enriquecimento E como segue:

$$y_i = \left(\frac{P_i^{sub}}{P} \right) E(T, P, \underline{y}) \quad \text{Eq. A.15}$$

sendo:

$$E(T, P, \underline{y}) = \frac{\exp\left(\frac{\bar{V}_i^S (P - P_i^{sub})}{RT}\right)}{\bar{\Phi}_i} \quad \text{Eq. A.16}$$

Essa metodologia foi validada para o cálculo da solubilidade do naftaleno utilizando dados experimentais de MCHUGH e PAULAITIS (1980).

O programa VLMU.bas (SANDLER, 1989) utiliza a Eq. Peng-Robinson e Regra de Mistura de Van der Waals e permite calcular a fugacidade das fases a uma certa temperatura e pressão. Para isso é necessário ter como dados de entrada as propriedades críticas dos compostos presentes na mistura binária. Com o valor da fugacidade da fase supercrítica fornecidos pelo programa, calcula-se então a solubilidade y^* através da Eq. A.15.

1ª Parte: Estimativa das Propriedades Críticas e Validação do Método de Predição da Solubilidade de Alcalóides em CO₂SC.

Para a predição da solubilidade dos alcalóides em CO₂SC se faz necessário o conhecimento das propriedades críticas. Dessa forma, primeiramente foi feita uma

estimativa das propriedades temperatura crítica (T_c), pressão crítica (P_c), volume crítico (V_c), temperatura de ebulição (T_b), fator acêntrico (w), temperatura de fusão (T_m) utilizando vários métodos de contribuição de grupos, listados a seguir: CONSTANTINOU e GANI (1994); JOBACK e REID (1987); KLINCEWICS e REID (1984); PEISHENG *et al* (1990); PRETEL *et al* (1992); SASTRI *et al* (1994); SOMAYAJULU (1989). Alguns métodos preditivos necessitam dos valores da temperatura normal de ebulição e de fusão, como dados de entrada. Neste caso, são utilizados valores tabelados, ou na falta deles, emprega-se os valores preditos pelo método de CONSTANTINOU e GANI (1994).

Com as propriedades críticas calculadas pelos diferentes Métodos de Contribuição de Grupos (CG), foi calculada a pressão de vapor do sólido (VETERE, 1991), a várias temperaturas de interesse. Com as propriedades estimadas foi realizado então a predição da solubilidade do composto utilizando o programa VLMU.bas para cada método de CG e a Eq A.8.

A idéia inicial era escolher o método CG que fornecesse valores de solubilidade mais próximos dos dados experimentais da cafeína- CO_2 . Como não se tem dados de solubilidade dos compostos de interesse (coronaridina: C, voacangina: V) em CO_2SC , a idéia seria utilizar dados de solubilidade da cafeína, teobromina e teofilina em CO_2SC retirados da literatura para validar o método de predição e então estimar a solubilidade dos compostos: C e V, em CO_2SC com esse método.

As Tabela A.3, A.4 e A.5 mostram as propriedades da cafeína, teobromina e teofilina calculadas utilizando os diferentes métodos de contribuição de grupos.

Tabela A.3: Propriedades termofísicas da cafeína calculado utilizando os diferentes métodos de contribuição de grupos

Propriedade	Métodos de Contribuição de Grupos						Somayajulu*
	Constantinou e Gani	Joback e Reid	Klincewics e Reid*	Peisheng <i>et al</i> *	Pretel <i>et al</i> *	Sastri <i>et al</i>	
Tm (K)	378,06	714,24					
Tc (K)	846,01	1049,9	914,98	899,70	851,65		859,92
Pc (bar)	25,8	48,70	16,91	32,42	23,28		32,851
Tb (K)	638,67	763,64					
W	0,1196	-					-
Vc (cm ³ /mol)	744,66	548,5	562,13	417,43	595,13	404,00	562,39

*considerando Tb=638,67 K obtido por Constantinou e Gani (1994)

Tabela A.4: Propriedades termofísicas da teobromina calculado utilizando os diferentes métodos de contribuição de grupos

Propriedade	Métodos de Contribuição de Grupos						Somayajulu*
	Constantinou e Gani	Joback e Reid	Klincewics e Reid*	Peisheng <i>et al</i> *	Pretel <i>et al</i> *	Sastri <i>et al</i>	
Tm (K)	419,35	719,34					
Tc (K)	889,48	1029,7	963,12	915,06	918,76		901,74
Pc (bar)	37,46	56,96	16,80	40,61	21,86		37,046
Tb (K)	661,19	740,06					
W	0,1196	-					
Vc (cm ³ /mol)	638,66	438,5	506,68	311,23	558,43	348,00	507,39

*considerando Tb=661,19 K obtido por Constantinou e Gani (1994)

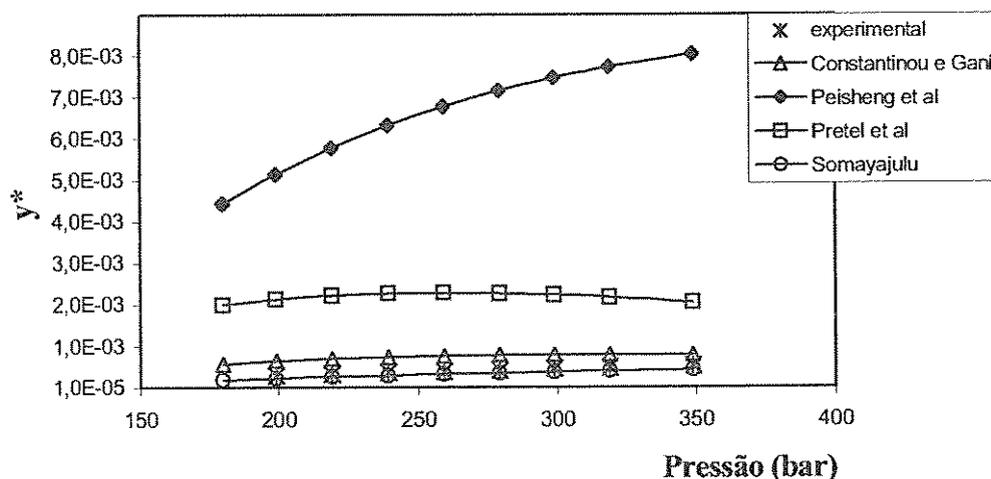
Tabela A.5: Propriedades termofísicas da teofilina calculado utilizando os diferentes métodos de contribuição de grupos

Propriedade	Métodos de Contribuição de Grupos						Somayajulu*
	Constantinou e Gani	Joback e Reid	Klincewics e Reid*	Peisheng <i>et al</i> *	Pretel <i>et al</i> *	Sastri <i>et al</i>	
Tm (K)	379,14	719,34					
Tc (K)	848,79	1029,7	923,50	879,69	883,24		863,92
Pc (bar)	32,21	56,96	16,80	40,37	21,86		36,159
Tb (K)	635,63	740,06					
w	0,0875	-					
Vc (cm ³ /mol)	696,53	438,5	506,68	311,23	558,43	348,00	513,33

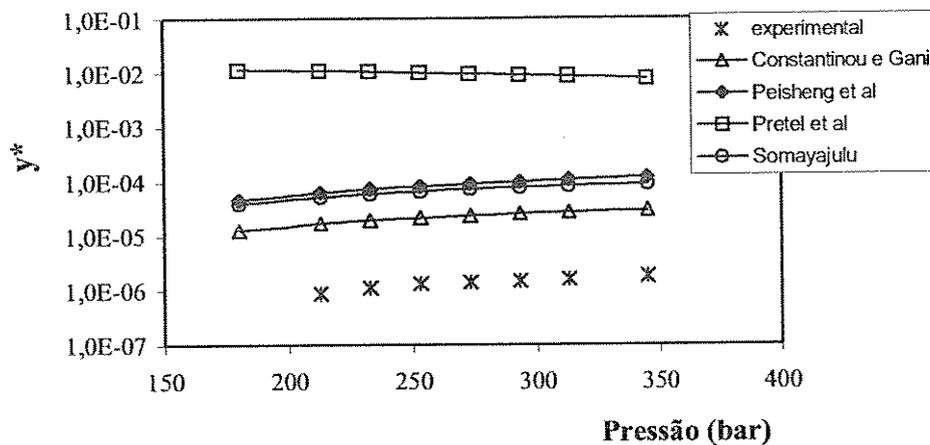
*considerando Tb=635,63 K obtido por Constantinou e Gani (1994)

Com os dados das Propriedades críticas e Pressões de vapor, foi calculada a solubilidade (y^*) empregando a Eq. Peng-Robinson e Regra de Mistura de Van der Waals. Foram considerados os valores de k_{ij} , para a Regra de de Van der Waals, obtidos por SALDANHA (2002) para cafeína, teobromina e teofilina: $k_{ij} = -0,16$ (cafeína); $-0,14$ (teobromina); $-0,31$ (teofilina). Os valores preditos de y simulados pelo programa computacional foram comparados com os valores experimentais de (BRUNNER e JOHANNSEN, 1994), a 313,15 K.

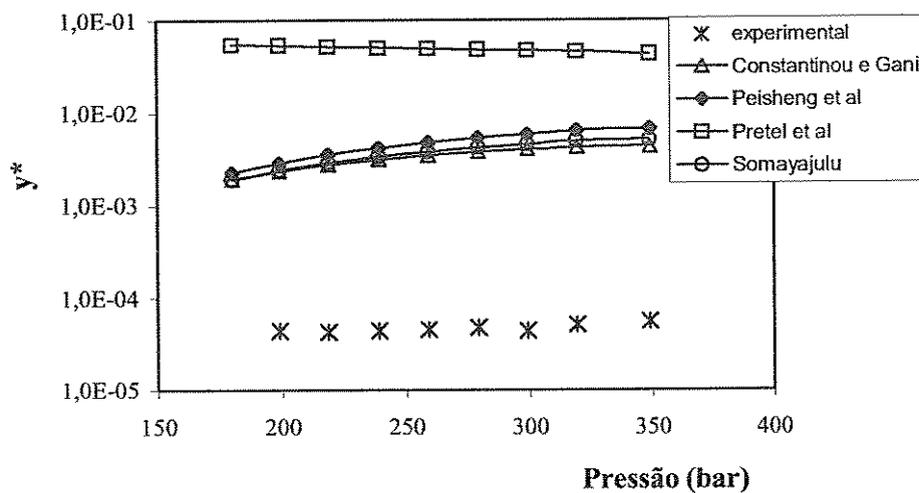
A Figura A.3 (a) mostra os valores de solubilidade simulados para a cafeína a 313,15 K juntamente com dados experimentais (BRUNNER e JOHANNSEN, 1994). Verifica-se que os métodos de CONSTANTINOU & GANI (1994) e de SOMAYAJULU (1989), forneceram dados mais próximos aos experimentais. O mesmo foi feito para a teobromina e teofilina (b e c), entretanto, SANDANHA (2000) não recomenda o uso do Métodos de JOBACK e REID (1987) e SOMAYAJULU (1989) para o caso da teofilina e teobromina, pelo fato de apresentarem o mesmo n° de átomos e mesma conformação (Figura A.4).



(a)



(b)



(c)

Figura A.3: Valores de solubilidades da (a) cafeína, (b) teobromina e (c) teofilina em CO_2 obtidos por predição: CONSTANTINO e GANI (1994); PEISHENG *et al* (1990); PRETEL *et al* (1992); SOMAYAJULU (1989); comparados com dados experimentais: BRUNNER e JOHANNSEN (1994).

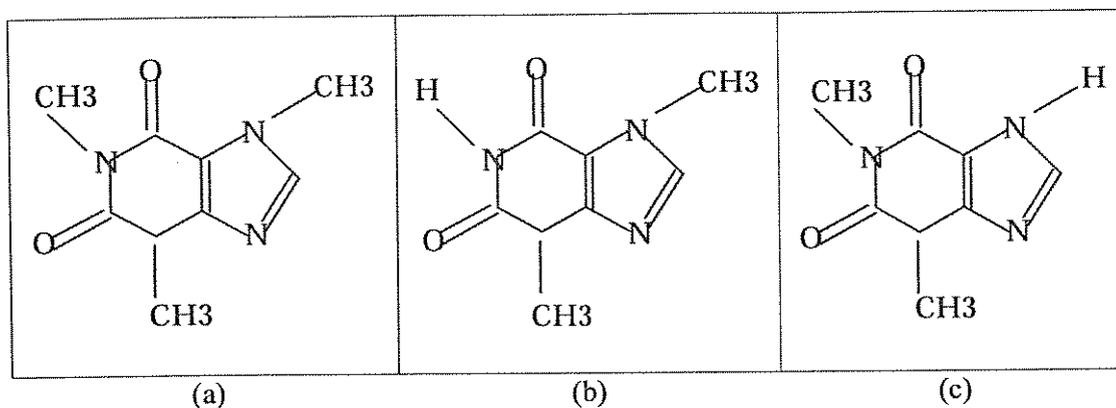


Figura A.4: Estrutura química dos alcalóides (a) cafeína, (b) teobromina e (c) teofilina.

Apesar da diferença entre os valores obtidos por simulação e os dados experimentais de solubilidade da cafeína, teobromina e teofilina em CO_2SC , foi escolhido o método de CONSTANTINO e GANI (1994) como método de contribuição de grupo por apresentar valores preditos mais próximos aos experimentais.

A diferença nos resultados preditos pode ser explicada pelo fato do programa ser utilizado para estimar o equilíbrio Líquido-Vapor. Do programa são retirados os valores referentes somente ao vapor, e estes não apresentaram boa aplicação para prever o Equilíbrio Sólido-Vapor. Além disso, SALDAÑA (2002) constatou que tanto a regra de mistura de Panagiotopoulos e Reid quanto a regra de mistura de Van der Waals não representaram de maneira efetiva os dados experimentais de solubilidade da cafeína, teobromina e teofilina.

A Tabela A.6 apresenta as propriedades críticas e demais propriedades dos alcalóides coronaridina e voacangina calculadas pelo método de CONSTANTINO e GANI (1994). Para o volume crítico foi considerado o método de SASTRI *et al* (1994),

pois foi o que melhor representou no caso da cafeína, teobromina e teofilina. A Tabela A.7 mostra os valores de pressão de vapor para a coronaridina e voacangina calculados por VETERE (1991).

Tabela A.6: Propriedades do alcalóides coronaridina e voacangina, calculados pelos métodos de CONSTANTINO e GANI (1994) e SASTRI *et al* (1994)*.

Propriedade	Coronaridina	Voacangina
Tm (K)	384,66	386,65
Tc (K)	849,33	859,63
Pc (bar)	19,51	16,71
Tb (K)	641,16	656,90
W	0,5417	0,5996
Vc* (cm ³ /mol)	914,0	989,0

Tabela A.7: Pressão de vapor do alcalóides coronaridina e voacangina, calculados pelo método de VETERE (1991)

T (K)	Pv × 10 ⁷ (bar)	
	Coronaridina	Voacangina
303,15	0,42	0,30
308,15	0,77	0,55
313,15	1,35	0,97
318,15	2,35	1,67
328,15	6,69	4,74

2ª Parte: Predição da Solubilidade de Alcalóides em CO₂SC + Co-solventes

Para tentar melhorar os resultados de predição, foi utilizado um programa computacional de Equilíbrio Sólido-Vapor. Este trabalho foi realizado com a supervisão do Dr. Marcos L. Corazza e Dr Lúcio Cardoso Filho, na Universidade Estadual de Maringá, em Maringá (PR).

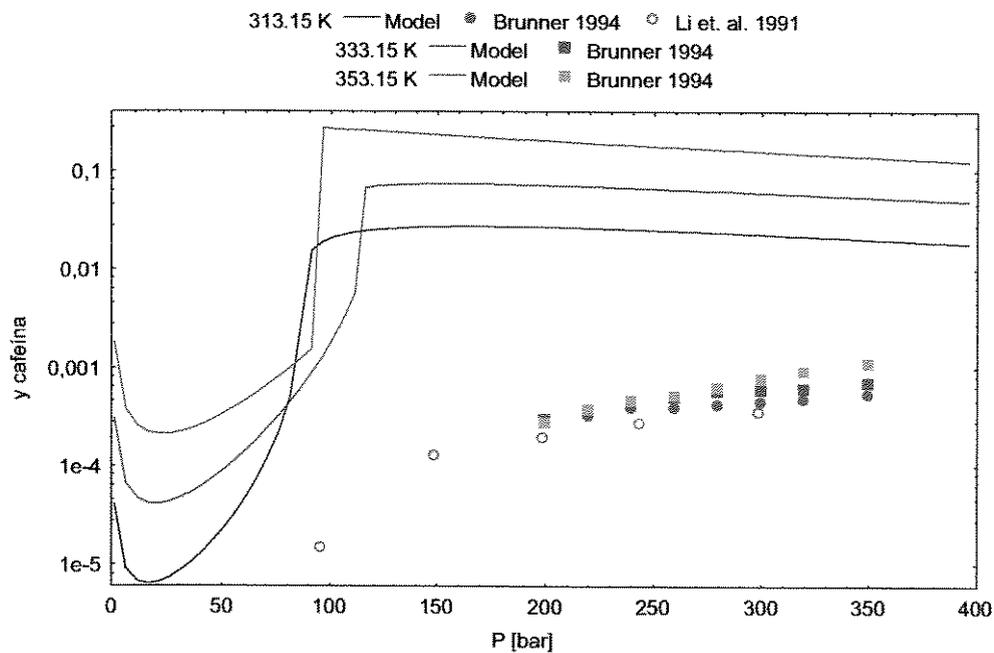
Da mesma forma, dados de equilíbrio da literatura para a cafeína, e teobromina foram utilizados para validar a metodologia de predição, comparando os valores obtidos pelo programa. Entretanto, inicialmente foi utilizado um valor de $k_{ij} = 0$, uma vez que não se tem na literatura parâmetros para coronaridina e voacangina. Se não fosse possível a predição, pelo menos para saber o quanto os valores estimados se diferem dos experimentais utilizando $k_{ij}=0$ em todos os casos.

A Figura A.5 (a) mostra dados de equilíbrio sólido-fluido para o sistema cafeína-CO₂ a 313,15, 323,15 e 333,15 K estimados e experimentais (BRUNNER e JOHANNSEN, 1994 e LI *et al*, 1991). A Figura A.5 (b) apresenta a mesma predição para o sistema teobromina-CO₂.

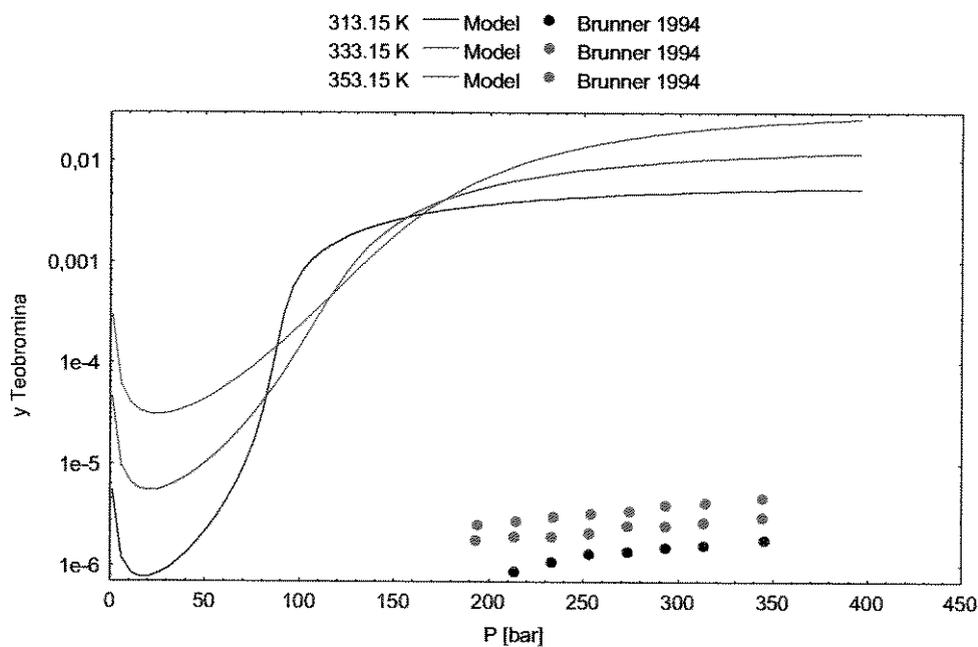
Pelas Figura A.5 (a) e (b), pode ser observado que os valores preditos são bem distintos dos experimentais, entretanto seguem a mesma tendência. Para as temperaturas de 333,15 e 353,15 K verifica-se a existência envelope LV na região de 80 a 120 bar. A tendência de região de retrogradação também foi caracterizada nos valores preditos, entretanto deslocada para a direita, a menores pressões. O mesmo foi verificado para o sistema teobromina-CO₂, como mostra a Figura A.5 (b). Essa diferença pode ser minimizada se forem ajustados os parâmetros de interação binária, k_{ij} , e então aplicados ao

programa. CO₂ e alcalóides são moléculas bem assimétricas, por isso a necessidade do ajuste de parâmetros.

Embora os valores preditos tenham se apresentado de forma diferente dos fornecidos pela literatura, o estudo continuou a ser realizado pelo menos para ilustrar qualitativamente qual é a tendência perante variações de temperatura, pressão, teor e tipo de co-solvente. Dessa forma, realizou-se a predição de solubilidade para os alcalóides coronaridina (C) e voacangina (V), mantendo-se os valores de $k_{ij}=0$. As Figura A.6 (a) e (b) simulam a solubilidade da coronaridina e voacangina em CO₂ + co-solvente (5 % m/m) a várias temperaturas. As Figura A.7 (a) e (b) ilustram a variação da solubilidade de C e V com relação ao teor de co-solvente.

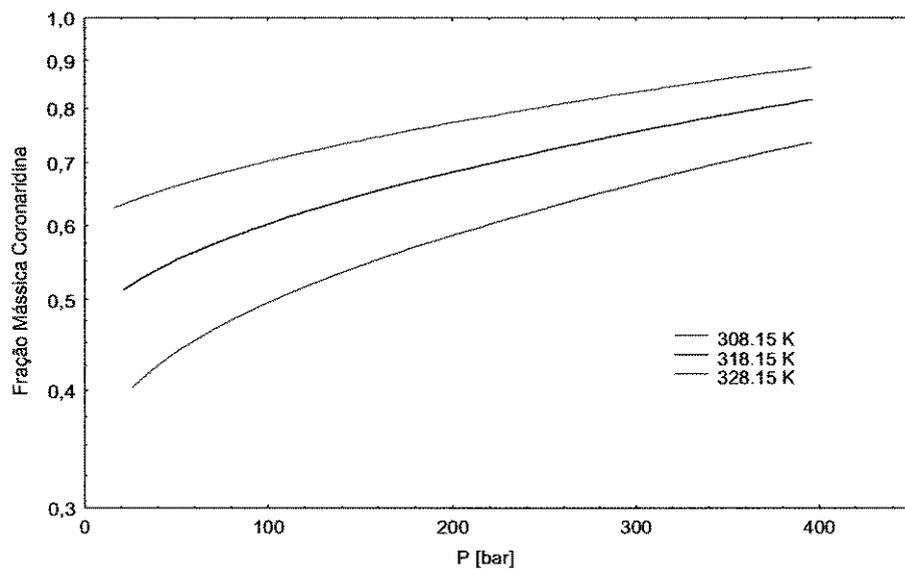


(a)

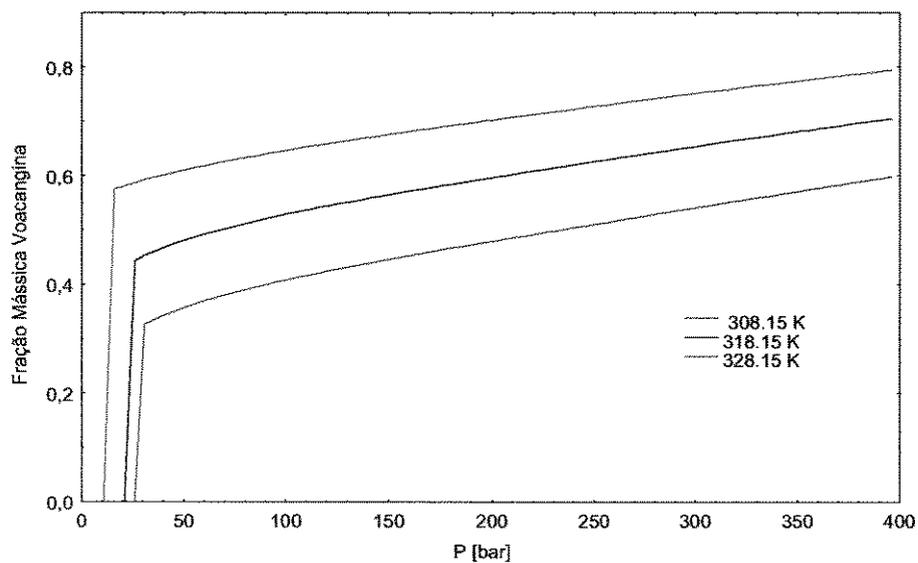


(b)

Figura A.5: Dados estimados e experimentais do equilíbrio de (a) cafeína- CO_2 e (b) teobromina- CO_2 a 313,15, 333,15 e 353,15 K (BRUNNER e JOHANNSEN, 1994).

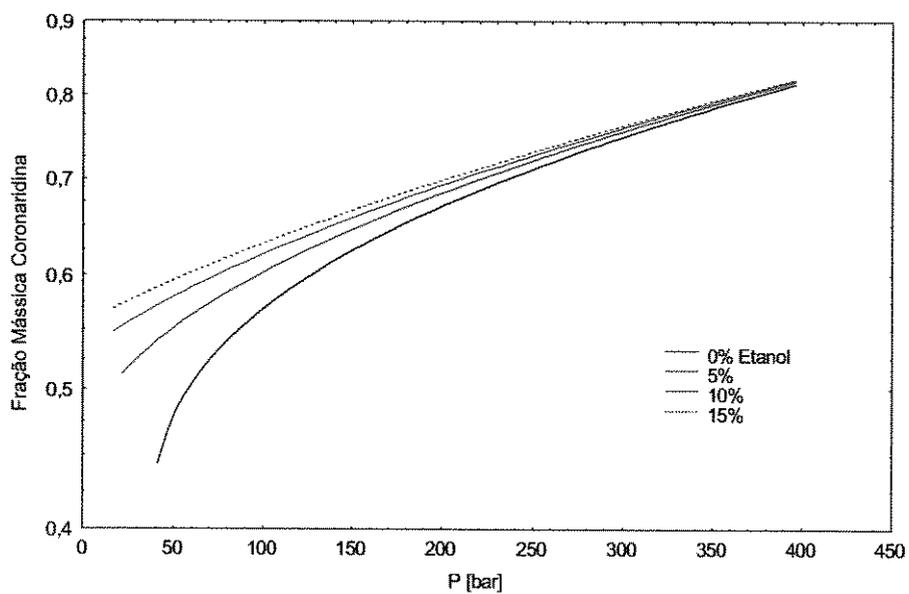


(a)

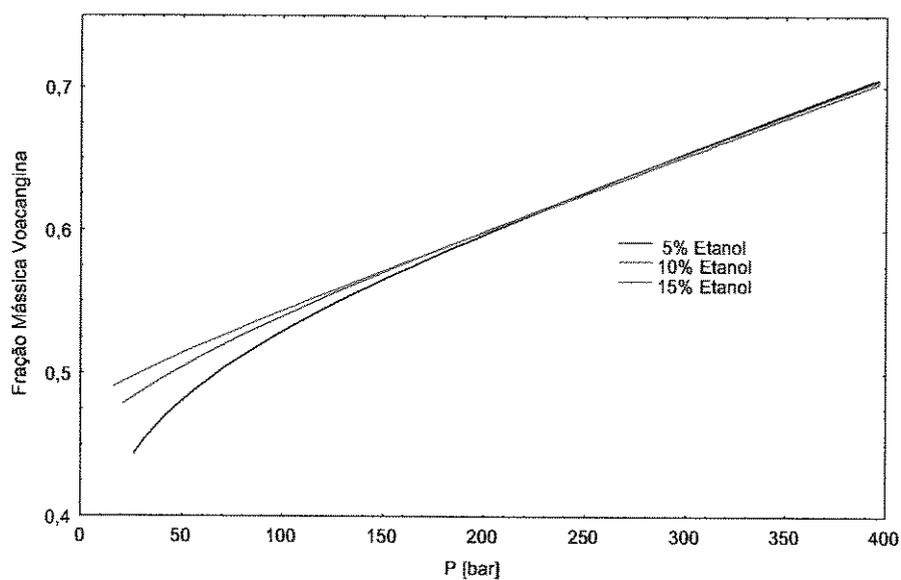


(b)

Figura A.6: Dados estimados do equilíbrio CO₂ - Etanol (5% m/m) - alcalóide: (a) coronaridina e (b) voacangina e a 308,15, 318,15 e 328,15 K.



(a)



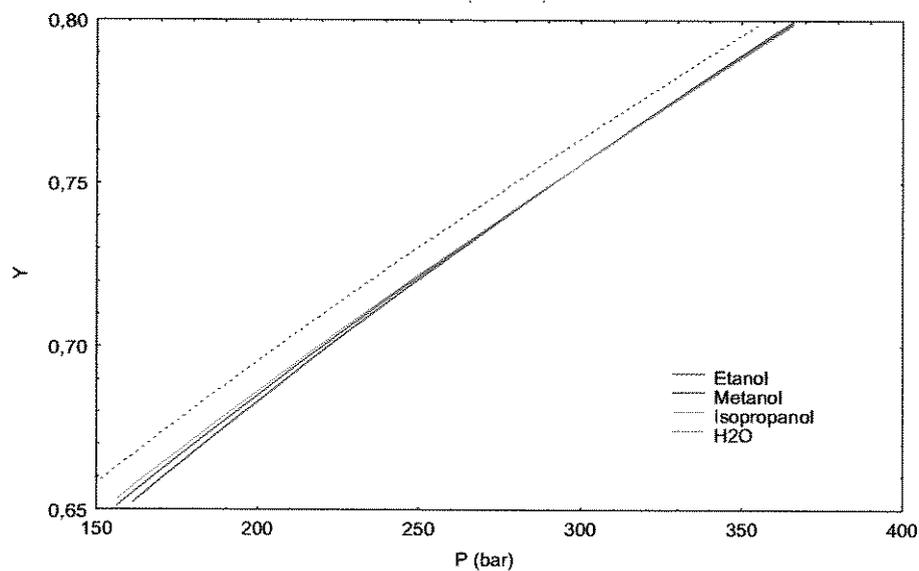
(b)

Figura A.7: Dados estimados do equilíbrio CO_2 - Etanol – alcalóide: (a) coronaridina e (b) voacangina a 318,15 K a 0, 5, 10 e 15% m/m de etanol.

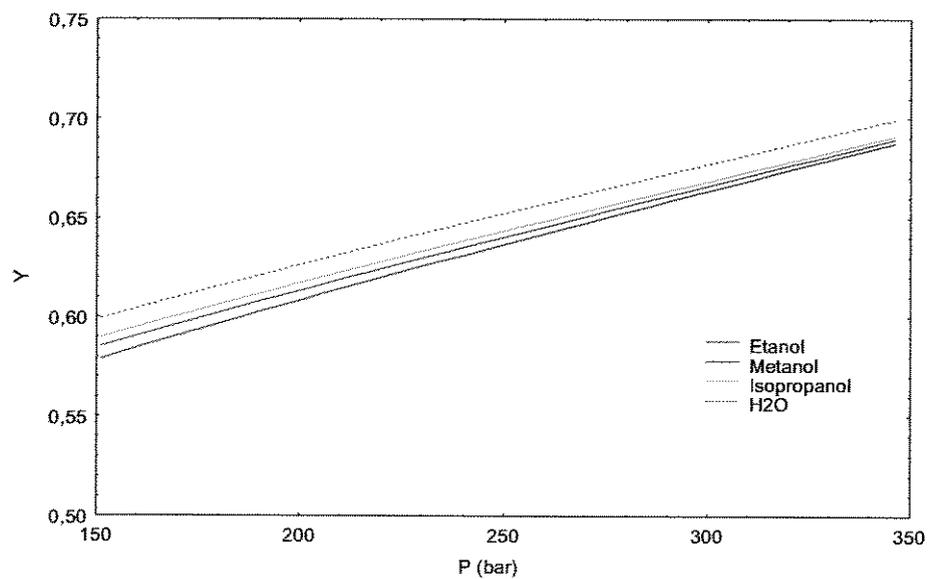
Pelas Figura A.6 (a) e (b), pode se verificar que a solubilidade dos alcalóides aumenta com a temperatura, não sendo tão influenciado pelo aumento da pressão do sistema. Pelas Figura A.7 (a) e (b), observa-se que o aumento do teor de co-solvente aumenta a solubilidade dos mesmos, entretanto a partir de uma certa pressão, o aumento no teor de co-solvente não afeta mais a solubilidade do mesmo. Deve-se levar em conta que as interações soluto-co-solvente, co-solvente solvente e co-solvente-matriz não estão sendo consideradas. O co-solvente está atuando somente sobre as características do CO₂SC (como densidade). Dessa forma, espera-se que o aumento do teor de co-solvente seja mais efetivo ou seja, ocorra uma influência maior sobre a solubilidade do que aparentemente é mostrado pela predição.

As Figura A.8 (a) e (b) mostram a provável variação da solubilidade de C e V com relação ao tipo de co-solvente. Estes gráficos são talvez os mais importantes para se tentar entender o que havia acontecido o comportamento experimental obtido quando foram utilizados diferentes tipos de co-solvente.

Pode ser verificado, pelas Figura A.8 (a) e (b), que a tendência mostrada no gráfico foi diferente ao que foi obtido experimentalmente. Pela predição, o uso da água como co-solvente aumentaria a extração de C e V, e o que não ocorreu. Isso indica a ocorrência que a interação dos co-solventes com os compostos que estão sendo extraídos é um fator que interfere muito. Isso evidencia a necessidade do ajuste dos parâmetros k_{ij} para cada sistema ternário. O ideal seria verificar experimentalmente o ESV entre o composto puro ou fração rica em alcalóides (AF) e os diferentes solventes e então determinar os valores de k_{ij} , entretanto não possuímos os alcalóides puros e também AF em quantidades suficientes para essa etapa.



(a)



(b)

Figura A.8: Dados estimados do equilíbrio CO_2 – co-solvente (5% m/m) – (a) coronaridina e (b) voacangina a 318,15 K, utilizando água, etanol, metanol, isopropanol como co-solventes.

Anexo 5: Resultados Experimentais

A.5.1. *T. catharinensis*

A.5.1.1: Ensaios de Determinação de Rendimento Total: Testes iniciais

(250 bar, 45 °C, 5% v/v, MP1)

Co-solvente (5%, v/v)	Massa inicial $\times 10^3$ (kg)	Massa de extrato $\times 10^3$ (kg)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)	Massa de AF $\times 10^3$ (kg)	AF $\times 10^4$ (kg/kg)
EtOH	2,54	0,0555	2,43	0,0085	37,14
	2,55	0,0575	2,50	0,0093	40,48
	2,55	0,0545	2,37	0,0095	41,35
IsoC3	2,5561	0,0666	2,89	0,0162	70,34
	2,5555	0,0598	2,60	0,0088	38,22
	2,5546	0,0579	2,52	0,0075	32,58
MeOH	2,5557	0,0646	2,81	0,0092	39,95
	2,5570	0,0548	2,38	0,0138	59,90
	2,5512	0,0506	2,20	0,0113	49,16

**A.5.1.2: Resultados dos ensaios de Determinação do Rendimento Global
com uso de diferentes co-solventes a 5% (45 °C e 250 bar, MP1)**

Co-solvente (5%, v/v)	Massa inicial $\times 10^3$ (kg)	Massa de extrato $\times 10^3$ (kg)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)	Massa de AF $\times 10^3$ (kg)	AF $\times 10^4$ (kg/kg)
EtOH	7,1494	0,1628	2,53	0,0120	18,6
	7,1400	0,1440	2,24	0,0154	23,9
	7,1413	0,1584	2,46	0,0131	20,4
IsoC3	7,1304	0,1523	2,37	0,0088	13,7
	7,1344	0,1638	2,55	0,0100	15,6
	7,1361	0,1660	2,58	0,0110	17,1
MeOH	7,1556	0,1401	2,17	0,0370	57,4
	7,1339	0,1761	2,74	0,0383	59,6
EtOH-IsoC3	7,1371	0,1427	2,22	0,0123	19,1
	7,1447	0,1537	2,39	0,0282	43,8
	7,1214	0,1541	2,40	0,0205	31,9
EtOH-MeOH	7,1489	0,1575	2,45	0,0204	31,7
	7,1455	0,1739	2,70	0,0199	30,9
	7,2480	0,1497	2,29	0,0183	28,0
MeOH-IsoC3	7,1580	0,1235	1,91	0,0257	34,9
	7,1295	0,1435	2,23	0,0154	24,0
	7,1380	0,1447	2,25	0,0247	38,4
H2O	7,1272	1,0017	15,6	0,0602	93,75
	7,1336	1,0225	15,9	0,0692	107,66
H2O-EtOH	7,1417	0,9106	14,2	0,0426	66,20
	7,1422	1,0234	15,9	-	-
H2O-MetOH	7,1468	0,9755	15,1	0,0702	109,02
	7,1325	0,9644	15,0	-	-
H2O-IsoC3	7,1482	0,8535	13,3	0,0482	74,84
	7,1454	0,8110	12,6	-	-

A.5.1.3: Resultados dos testes iniciais com a MP2 de Determinação do Rendimento Global utilizando a coluna de aço inox (45 °C, 250 bar, e etanol a 5%)

Co-solvente	Massa inicial $\times 10^3$ (kg)	Massa de extrato $\times 10^3$ (kg)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)	Massa de AF $\times 10^3$ (kg)	AF $\times 10^4$ (kg/kg)
EtOH -5%	7,1219	0,0791	1,23	-	-
	6,8677	0,0788	1,27	-	-
EtOH- 5%	12,0100	0,1199	1,10	0,0275	25,3
	12,1515	0,1379	1,26	0,0227	20,7

A.5.1.4: Resultados dos ensaios de Determinação do Rendimento Global com uso de diferentes co-solventes a 5, 10 e 15% (45 °C e 250 bar, MP2)

Co-solvente	Massa inicial $\times 10^3$ (kg)	Massa de extrato $\times 10^3$ (kg)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)	Massa de AF $\times 10^3$ (kg)	AF $\times 10^4$ (kg/kg)
EtOH_5%	12,1637	0,1822	1,66	0,0424	38,6
	12,1590	0,1489	1,35	0,0340	30,9
EtOH_10%	12,1583	0,1840	1,67	0,0424	38,6
	12,1511	0,1987	1,81	0,0314	28,6
	12,1632	0,2237	2,03	-	-
IsoC3_10%	12,1452	0,1534	1,40	-	-
	12,1484	0,1420	1,29	0,0173	15,8
	12,1566	0,1618	1,47	0,0173	15,7
EtOH + IsoC3 (1:1)_10%	12,1585	0,1489	1,35	0,0170	15,5
	12,1545	0,1765	1,61	0,0167	15,2
	12,1517	0,1594	1,45	0,0181	16,5
EtOH_15%	12,1611	0,2446	2,22	-	-
	12,1579	0,2509	2,28	0,0280	25,5
	12,1574	0,2691	2,45	0,0223	20,3
IsoC3_15%	12,1610	0,2120	1,93	-	-
	12,1550	0,1521	1,38	0,0041	3,7
	12,1550	0,1974	1,80	0,0090	8,2
EtOH-IsoC3 (1:1)_15%	12,1475	0,1762	1,60	0,0181	16,5
	12,1504	0,2210	2,01	0,0173	15,8
	12,1315	0,1833	1,67	-	-

A.5.1.5: Resultados utilizados para a construção das Isotermas de Rendimento Total

	Pressão (bar)	Massa inicial $\times 10^3$ (kg)	Massa de extrato $\times 10^3$ (kg)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)
T=35°C	150	12,1560	0,1172	1,07
		12,1528	0,1342	1,22
	200	12,158	0,1207	1,10
		12,1519	0,1435	1,31
	250	12,1550	0,1178	1,07
		12,1538	0,1406	1,28
	300	12,1538	0,1208	1,10
		12,1513	0,1225	1,12
	350	12,1568	0,1442	1,31
		12,1563	0,1415	1,29
T=45°C	150	12,1516	0,1367	1,24
		12,1548	0,1275	1,16
	200	12,1537	0,1275	1,16
		12,1547	0,1374	1,25
	250	12,1530	0,1321	1,20
		12,1524	0,1246	1,13
	300	12,1535	0,1387	1,26
		12,1560	0,1488	1,35
	350	12,1550	0,1697	1,544
		12,1529	0,1693	1,541

A.5.1.6: Resultados dos Ensaios Cinéticos realizados em diferentes condições de Temperatura (MP2, 5% etanol, 350 bar)

Ensaio 1: Ensaio efetuado com MP2 a 45 °C, 350 bar com 5% etanol

Tempo/60 (s)	Massa pontual $\times 10^3$ (kg)	Massa acumulada $\times 10^3$ (kg)	Rendimento (%)	Valor predito* $\times 10^3$ (kg)
0	0	0	0	0,0017
30	0,1784	0,1784	0,23	0,1925
60	0,2194	0,3978	0,52	0,3833
90	0,1966	0,5944	0,77	0,5742
120	0,1517	0,7461	0,97	0,7650
150	0,1107	0,8568	1,12	0,9381
180	0,0717	0,9285	1,21	0,9590
210	0,0619	0,9904	1,29	0,9799
240	0,0341	1,0245	1,33	1,0007
270	0,0256	1,0501	1,37	1,0216
300	0,0425	1,0926	1,42	1,0425
330	0,0032	1,0958	1,43	1,0842
360	0,0083	1,1041	1,44	1,1051
390	0,0151	1,1192	1,46	1,1259
420	0,0166	1,1358	1,48	1,1468
450	0,0134	1,1492	1,50	1,1678
480	0,005	1,1542	1,50	1,1885
510	0,0082	1,1624	1,51	1,1885
540	0,0065	1,1689	1,52	1,2094
570	0,0884	1,2573	1,64	
Total		1,2573	1,64	

* para massa acumulada

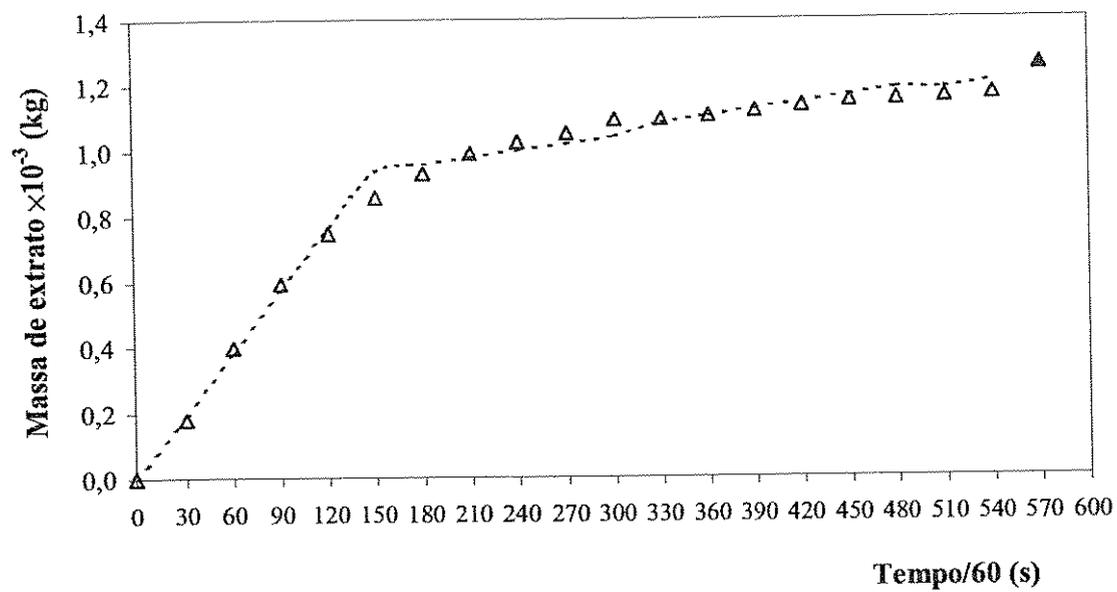


Figura A.9: Curva de extração do ensaio 1: 45 °C, 350 bar com 5% etanol: Δ (experimental); \blacktriangle (despressurização), ----- (predito_SAS).

Ensaio 2: Ensaio efetuado com MP2 a 45 °C, 350 bar com 5% etanol

Tempo/60 (s)	Massa pontual $\times 10^3$ (kg)	Massa acumulada $\times 10^3$ (kg)	Rendimento (%)	Valor predito* $\times 10^3$ (kg)
0	0	0	0	0,0100
30	0,1524	0,1524	0,20	0,1624
60	0,1821	0,3345	0,44	0,3148
90	0,1439	0,4784	0,62	0,4672
120	0,1491	0,6275	0,82	0,6196
150	0,1255	0,753	0,98	0,7720
180	0,0875	0,8405	1,09	0,8913
210	0,0518	0,8923	1,16	0,9102
240	0,0432	0,9355	1,22	0,9291
270	0,0281	0,9636	1,25	0,9481
300	0,0225	0,9861	1,28	0,9670
330	0,0296	1,0157	1,32	0,9859
360	0,0135	1,0292	1,34	1,0048
390	0,0094	1,0386	1,35	1,0238
420	0,0148	1,0534	1,37	1,0427
450	0,0124	1,0658	1,39	1,0616
480	0,008	1,0738	1,40	1,0805
510	0,0055	1,0793	1,40	1,0995
540	0,0098	1,0891	1,42	1,1184
570	0,1226	1,2117	1,58	
Total		1,2117	1,58	

* para massa acumulada

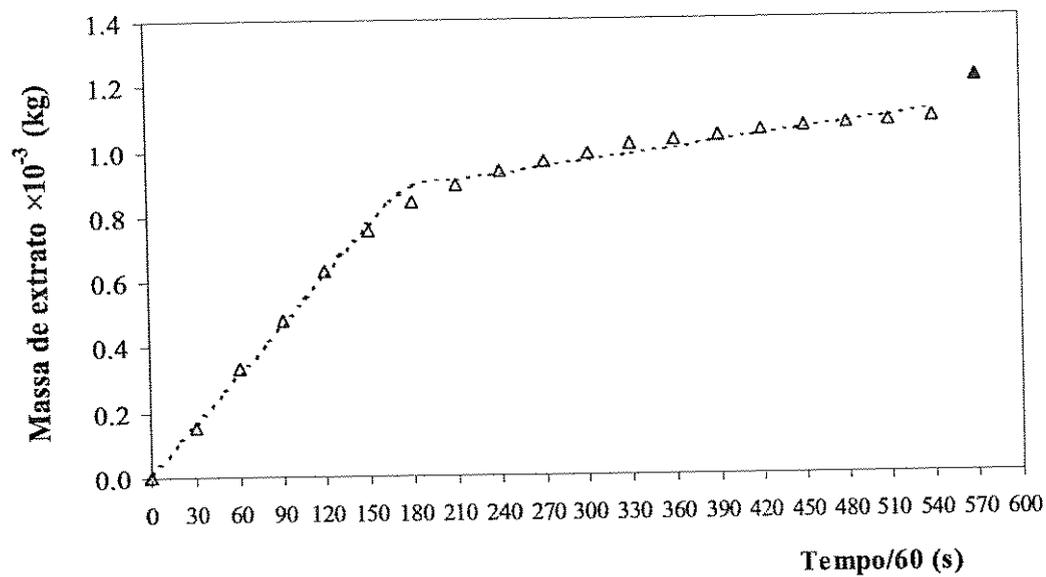


Figura A.10: Curva de extração do ensaio 2: 45 °C, 350 bar com 5% etanol: Δ (experimental); \blacktriangle (despressurização), ----- (predito_SAS).

Ensaio 3: Ensaio efetuado com MP2 a 35 °C, 350 bar com 5% etanol

Tempo/60 (s)	Massa pontual ×10³ (kg)	Massa acumulada ×10³ (kg)	Rendimento (%)	Valor predito* ×10³ (kg)
0	0	0	0	0,0000
30	0,1530	0,153	0,20	0,1642
60	0,1851	0,3381	0,44	0,3303
90	0,1683	0,5064	0,66	0,4965
120	0,1477	0,6541	0,85	0,6627
150	0,0761	0,7302	0,95	0,7657
180	0,0420	0,7722	1,00	0,7870
210	0,0398	0,8120	1,06	0,8082
240	0,0268	0,8388	1,09	0,8294
270	0,0300	0,8688	1,13	0,8507
300	0,0172	0,8860	1,15	0,8719
330	0,0138	0,8998	1,17	0,8931
360	0,0274	0,9272	1,21	0,9144
390	0,0158	0,9430	1,23	0,9356
420	0,0159	0,9589	1,25	0,9568
450	0,0411	1,0000	1,30	0,9781
480	0,0034	1,0034	1,31	0,9993
510	0,0013	1,0047	1,31	1,0205
540	0,0027	1,0074	1,31	1,0418
570	0,0939	1,1013	1,43	
Total		1,1013	1,43	

* para massa acumulada

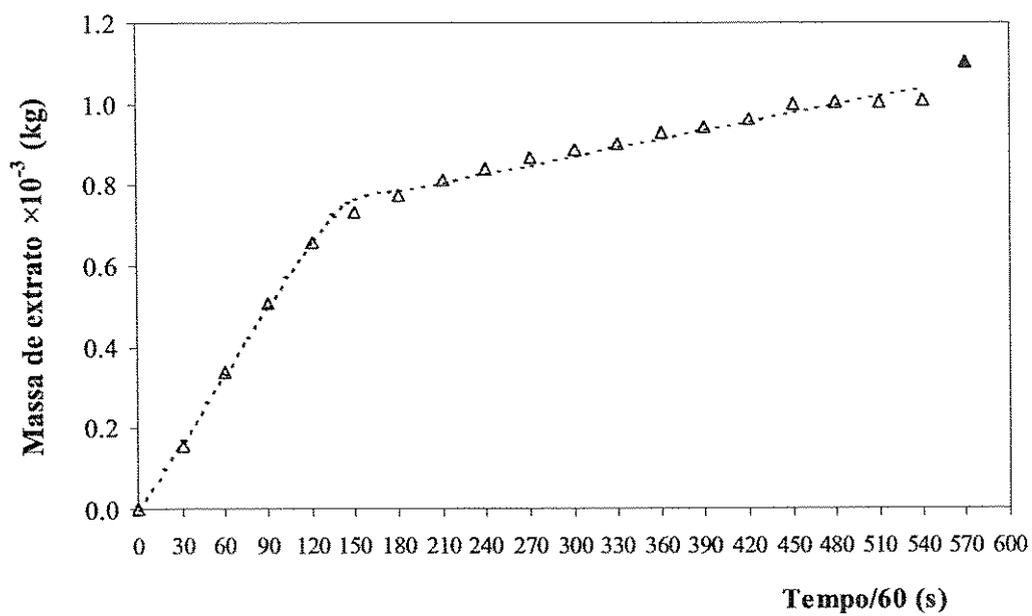


Figura A.11: Curva de extração do ensaio 3: 35 °C, 350 bar com 5% etanol: Δ (experimental); ▲ (despressurização), ----- (predito_SAS).

Ensaio 4: Ensaio efetuado com MP2 a 35 °C, 350 bar com 5% etanol

Tempo/60 (s)	Massa pontual $\times 10^3$ (kg)	Massa acumulada $\times 10^3$ (kg)	Rendimento (%)	Valor predito* $\times 10^3$ (kg)
0	0	0	0	0,0073
30	0,1742	0,1742	0,23	0,1746
60	0,1716	0,3458	0,45	0,3415
90	0,1863	0,5321	0,69	0,5084
120	0,1234	0,6555	0,85	0,6753
150	0,0633	0,7188	0,94	0,7788
180	0,0451	0,7639	0,99	0,7976
210	0,0364	0,8003	1,04	0,8165
240	0,0249	0,8252	1,07	0,8354
270	0,0410	0,8662	1,13	0,8543
300	0,0833	0,9495	1,24	0,8732
330	0,0020	0,9515	1,24	0,8921
360	0,0024	0,9539	1,24	0,9110
390	0,0018	0,9557	1,24	0,9298
420	0,0019	0,9576	1,25	0,9487
450	0,0029	0,9605	1,25	0,9676
480	0,0071	0,9676	1,26	0,9865
510	0,0058	0,9734	1,27	1,0054
540	0,0036	0,9770	1,27	1,0243
570	0,1286	1,1056	1,44	
Total		1,1056	1,44	

* para massa acumulada

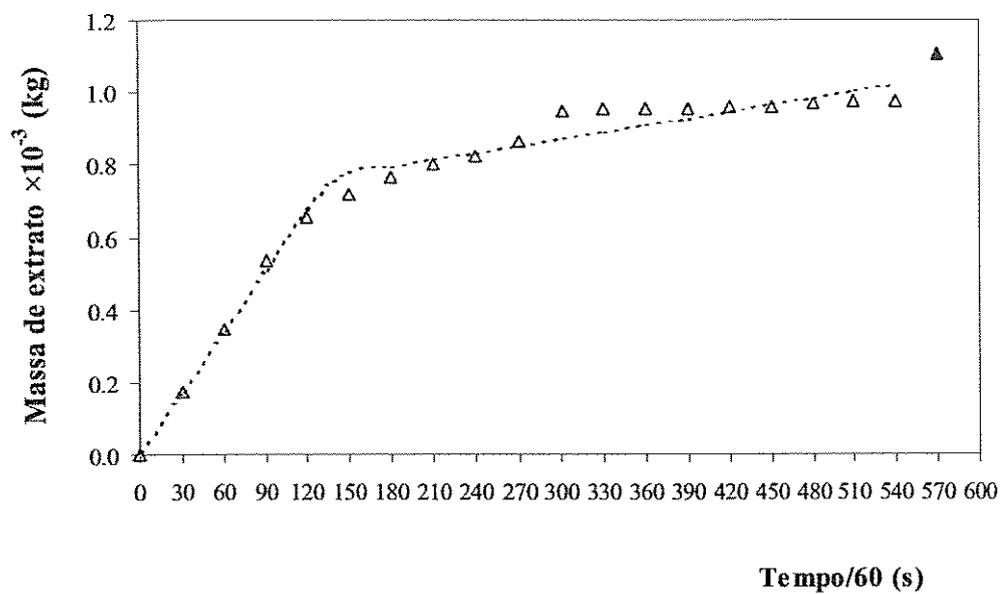


Figura A.12: Curva de extração do ensaio 4: 35 °C, 350 bar com 5% etanol: Δ (experimental); \blacktriangle (despressurização), ----- (predito_SAS).

A.5.2. *Aloysia triphylla*

T (°C)	P (bar)	Massa inicial $\times 10^3$ (kg)	Massa de extrato $\times 10^3$ (kg)	$X_0 \times 10^2$ (kg/kg)
35	100	2,02	0,0141	0,73
		2,02	0,0170	0,88
		2,02	0,0162	0,84
	150	2,02	0,0234	1,22
		2,02	0,0188	0,97
		2,02	0,0192	1,00
	200	2,02	0,0218	1,13
		2,02	0,0218	1,13
	250	2,02	0,0206	1,07
		2,03	0,0248	1,28
		2,02	0,0307	1,59
	300	2,02	0,02	1,14
		2,02	0,0238	1,24
	350	2,02	0,0244	1,27
		2,02	0,0257	1,33
45	100	2,02	0,0121	0,63
		2,02	0,0091	0,47
		2,01	0,0121	0,63
	150	2,02	0,0190	0,98
		2,02	0,0212	1,10
	200	2,03	0,0233	1,20
		2,02	0,0236	1,23
	250	2,03	0,0242	1,25
		2,03	0,0219	1,13
		2,03	0,0286	1,48
	300	2,03	0,0262	1,35
		2,02	0,0263	1,36
	350	2,03	0,0280	1,45
		2,03	0,0296	1,53

Anexo 6: Cromatogramas obtidos nas análises em Cromatografia a Gás com Espectro de Massas (CG-EM)

A.6.1: *Aloysia triphylla*

A Figura A.13 apresenta o cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de *Aloysia triphylla*. A identificação dos compostos, realizada por CG-EM, com seus tempos de retenção é apresentado na Tabela A.8.

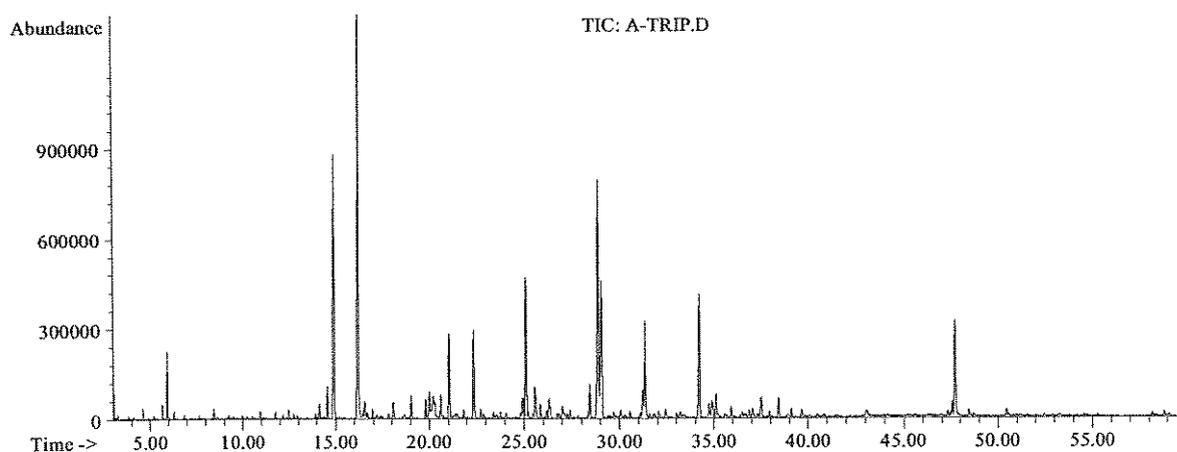


Figura A.13: Cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de *Aloysia triphylla* na condição de 250 bar e 35 °C, utilizando CG-EM com coluna HP5 (30 m × 0,2 mm × 0,33 μm), e programação: 60 °C (3 °C /min) - 240 °C (7 min).

Tabela A.8: Compostos presentes nos extratos de *Aloysia triphylla* obtidos por SFE a 250 bar/ 35 °C, onde IR: índice de retenção, t_r: tempo de retenção e ni: não identificado

IR	t _r (min)	Compostos
-	5,67	ni
1006	5,93	ni
1230	14,14	trans-carveol
1240	14,57	cis-carveol
1248	14,92	neral (or Z-citral)
1279	16,22	geranial (or E-citral)
1287	16,56	ni
1323	18,09	ni
1346	19,05	ni
1364	19,82	eugenol
1368	20,62	ni
1373	20,21	acetato de nernila
1383	21,06	acetato de geranila
1393	22,37	trans- cariofieno
1424	24,94	germacreno D
1486	25,12	<AR> curcumeno
1491	25,59	biciclogermacreno
1502	25,87	ni
1509	26,31	gamma-cadineno
1520	27,03	ni
1538	28,44	nerolidol
1574	28,90	espatulenol
1585	29,07	oxido de cariofileno
1589	31,24	ni
1646	31,35	EPI- alfa-cadinol
1649	34,23	PM=220
1726	34,75	ni
1740	34,85	ni
1744	35,12	PM=220
1750	37,52	ni
1818	38,43	ni
1845	47,56	ni
-	47,73	ni

A.6.2: *Mangifera indica*

A Figura A.14 apresenta o cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de *Mangifera indica*. A identificação dos compostos, realizada por CG-EM, com seus tempos de retenção é apresentado na Tabela A.9.

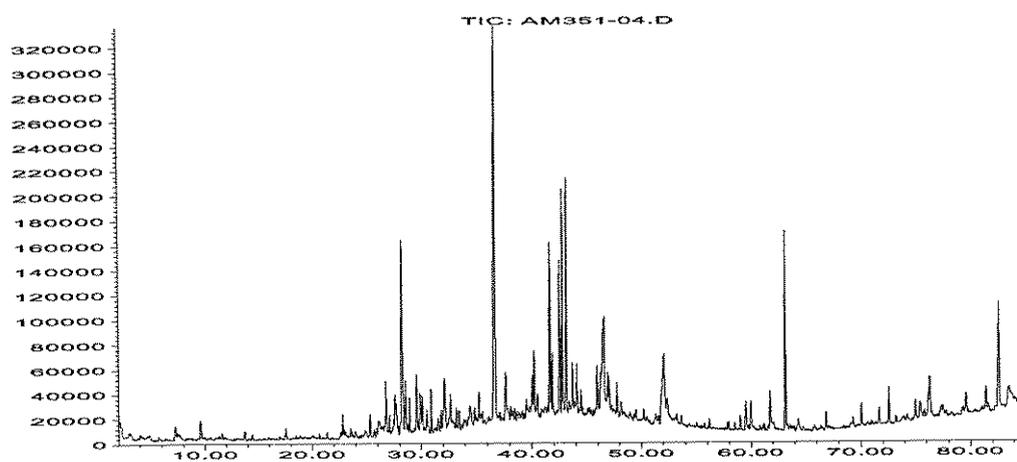


Figura A.14: Cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de *Mangifera indica* na condição de 250 bar e 45 °C, utilizando CG-EM com coluna HP-Ultra 2 column (25 m × 0,2 mm × 0,33 μm), e programação: 60 °C (3 °C /min) - 300 °C (5 min).

Tabela A.9: Possíveis compostos* presentes nos extratos de *M. indica* obtidos por SFE a 250 bar/ 45 °C, onde IR^t: índice de retenção teórico (ADAMS, 2001) e ni: não identificado.

IR ^t	tr (min)	Compostos
1274	9,62	formato de citronelila
1359	22,81	Eugenol
1491	25,34	b-cariofileno
-	26,78	Z-b ocimeno
-	27,58	1,2,3,4 tetrahydro-1-naftaleno
1478	27,71	b chamigreno
1490	28,24	β-selineno
1498	28,58	α selineno
-	28,95	n.i
-	29,58	n.i
-	29,88	n.i
1523	29,95	acetato de eugenila
-	30,12	2 (4H)- benzofuranona
1546	30,56	α calacoreno
1578	32,02	(+)- spatulenol
-	32,14	n.i
-	32,68	n.i
-	34,48	valenceno
-	36,73	n.i
1677	37,65	1,6-dimetil-4-(1-metiletil) naftaleno
-	39,51	ciclopenta (ef) heptaleno
-	40,07	N-butil-benzenesulfonamida
-	40,21	n.i.
2000	40,53	eicosano
-	41,66	n.i
-	41,88	n.i
-	42,54	n.i
-	42,83	1,2 ácido benzeno dicarboxílico
-	43,19	n.i
-	43,72	n.i.
-	44,09	n.i
-	45,96	n.i
-	46,28	n.i
-	46,60	acido palmítico
-	46,92	cloropreno
-	47,06	n.i
-	52,10	n.i
-	52,40	n.i
-	59,54	n.i

* necessita confirmação através do uso de padrões ou outras técnicas analíticas

Anexo 7: Saída do Programa de Ajuste Linear - SAS 6.12

A.7.1. Ensaio 1: cinética efetuada a 45 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Analysis of Variance						
Source	DF	Squares	Sum of Square	Mean F Value		Prob>F
Model	2	2.22354		1.11177	1395.579	0.0001
Error	16	0.01275		0.00080		
C Total	18	2.23629				
Root MSE		0.02822	R-square	0.9943		
Dep Mean		0.89206	Adj R-sq	0.9936		
C.V.		3.16399				

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	0.020550	0.01915593	1.073	0.2993
TMIN	1	0.005889	0.00015949	36.926	0.0001
AL1	1	-0.005298	0.00020034	-26.446	0.0001

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0.00	0.02055	-0.020550
2	30	0.1784	0.00	0.19723	-0.018832
3	60	0.3978	0.00	0.37391	0.023886
4	90	0.5944	0.00	0.55060	0.043805
5	120	0.7461	0.00	0.72728	0.018823
6	150	0.8568	0.00	0.90396	-0.047159
7	180	0.9285	18.24	0.98400	-0.055503
8	210	0.9904	48.24	1.00174	-0.011342
9	240	1.0245	78.24	1.01948	0.005019
10	270	1.0501	108.24	1.03722	0.012880
11	300	1.0926	138.24	1.05496	0.037641
12	330	1.0958	168.24	1.07270	0.023103
13	360	1.1041	198.24	1.09044	0.013664
14	390	1.1192	228.24	1.10818	0.011025
15	420	1.1358	258.24	1.12591	0.009886
16	450	1.1492	288.24	1.14365	0.005547
17	480	1.1542	318.24	1.16139	-0.007192
18	510	1.1624	348.24	1.17913	-0.016731
19	540	1.1689	378.24	1.19687	-0.027970

A.7.2. Ensaio 2: cinética efetuada a 45 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	2.01867	1.00934	2063.212	0.0001
Error	16	0.00783	0.00049		
C Total	18	2.02650			
Root MSE		0.02212	R-square	0.9961	
Dep Mean		0.81098	Adj R-sq	0.9957	
C.V.		2.72730			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	0.009947	0.01467599	0.678	0.5076
TMIN	1	0.005080	0.00011573	43.899	0.0001
AL1	1	-0.004450	0.00014935	-29.793	0.0001

Ensaio 2 45 350 bar camila 2
11:11 Friday, August 1, 2003

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	0	0.0000	0.00	0.00995	-0.009947
2	30	0.1524	0.00	0.16236	-0.009956
3	60	0.3345	0.00	0.31477	0.019735
4	90	0.4784	0.00	0.46717	0.011225
5	120	0.6275	0.00	0.61958	0.007916
6	150	0.7530	0.00	0.77199	-0.018993
7	180	0.8405	7.44	0.89130	-0.050798
8	210	0.8923	37.44	0.91022	-0.017921
9	240	0.9355	67.44	0.92914	0.006356
10	270	0.9636	97.44	0.94807	0.015533
11	300	0.9861	127.44	0.96699	0.019109
12	330	1.0157	157.44	0.98591	0.029786
13	360	1.0292	187.44	1.00484	0.024363
14	390	1.0386	217.44	1.02376	0.014840
15	420	1.0534	247.44	1.04268	0.010717
16	450	1.0658	277.44	1.06161	0.004193
17	480	1.0738	307.44	1.08053	-0.006730
18	510	1.0793	337.44	1.09945	-0.020153
19	540	1.0891	367.44	1.11838	-0.029276

A.7.3. Ensaio 3: cinética efetuada a 35 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	1.59008	0.79504	2724.659	0.0001
Error	16	0.00467	0.00029		
C Total	18	1.59475			
Root MSE		0.01708	R-square	0.9971	
Dep Mean		0.75284	Adj R-sq	0.9967	
C.V.		2.26900			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.002006	0.01224843	-0.164	0.8720
TMIN	1	0.005539	0.00011715	47.278	0.0001
AL1	1	-0.004831	0.00013903	-34.747	0.0001

Ensaio 3 35 350 bar camila 2
11:14 Friday, August 1, 2003

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0.00	-0.00201	0.002006
2	30	0.1530	0.00	0.16416	-0.011159
3	60	0.3381	0.00	0.33032	0.007776
4	90	0.5064	0.00	0.49649	0.009912
5	120	0.6541	0.00	0.66265	-0.008553
6	150	0.7302	13.06	0.76572	-0.035524
7	180	0.7722	43.06	0.78696	-0.014757
8	210	0.8120	73.06	0.80819	0.003809
9	240	0.8388	103.06	0.82942	0.009376
10	270	0.8688	133.06	0.85066	0.018142
11	300	0.8860	163.06	0.87189	0.014109
12	330	0.8998	193.06	0.89312	0.006675
13	360	0.9272	223.06	0.91436	0.012842
14	390	0.9430	253.06	0.93559	0.007408
15	420	0.9589	283.06	0.95683	0.002075
16	450	1.0000	313.06	0.97806	0.021941
17	480	1.0034	343.06	0.99929	0.004108
18	510	1.0047	373.06	1.02053	-0.015826
19	540	1.0074	403.06	1.04176	-0.034359

A.7.4. Ensaio 4: cinética efetuada a 35 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	1.51496	0.75748	553.741	0.0001
Error	16	0.02189	0.00137		
C Total	18	1.53685			
Root MSE		0.03699	R-square	0.9858	
Dep Mean		0.75414	Adj R-sq	0.9840	
C.V.		4.90432			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for HO: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	0.007734	0.02650706	0.292	0.7742
TMIN	1	0.005563	0.00025322	21.970	0.0001
AL1	1	-0.004934	0.00030064	-16.411	0.0001

Ensaio 4 35 350 bar camila 2
11:27 Friday, August 1, 2003

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0.00	0.00773	-0.007734
2	30	0.1742	0.00	0.17463	-0.000429
3	60	0.3458	0.00	0.34152	0.004276
4	90	0.5321	0.00	0.50842	0.023682
5	120	0.6555	0.00	0.67531	-0.019813
6	150	0.7188	12.86	0.77876	-0.059961
7	180	0.7639	42.86	0.79764	-0.033745
8	210	0.8003	72.86	0.81653	-0.016228
9	240	0.8252	102.86	0.83541	-0.010212
10	270	0.8662	132.86	0.85430	0.011904
11	300	0.9495	162.86	0.87318	0.076320
12	330	0.9515	192.86	0.89206	0.059436
13	360	0.9539	222.86	0.91095	0.042952
14	390	0.9557	252.86	0.92983	0.025868
15	420	0.9576	282.86	0.94872	0.008885
16	450	0.9605	312.86	0.96760	-0.007099
17	480	0.9676	342.86	0.98648	-0.018883
18	510	0.9734	372.86	1.00537	-0.031967
19	540	0.9770	402.86	1.02425	-0.047251

Anexo 8: Saída do Programa de Ajuste Não Linear - SAS 6.12

A.8.1. Ensaio 1: cinética efetuada a 45 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

```

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton
Iter   BO      B1      B2      KNOT1    Sum of Squares
  0    0.020557  0.005889 -0.005298 161.760000 0.012746
  1    0.020557  0.005889 -0.005298 161.764915 0.012746
  2    0.020557  0.005889 -0.005298 161.764915 0.012746
NOTE: Convergence criterion met.

```

```

Non-Linear Least Squares Summary Statistics      Dependent Variable MEXT
Source                DF Sum of Squares      Mean Square
Regression             4  17.343301400      4.335825350
Residual               15  0.012746220      0.000849748
Uncorrected Total      19  17.356047620
(Corrected Total)      18  2.236290744

```

```

Parameter      Estimate      Asymptotic      Asymptotic 95 %
                Std. Error      Confidence Interval
                Lower      Upper
BO              0.0205571  0.0210975377  -0.02441102  0.06552531
B1              0.0058892  0.0002322762  0.00539415  0.00638432
B2             -0.0052980  0.0002431871 -0.00581631 -0.00477964
KNOT1          161.7649153  5.3951639748 150.26543925 173.26439142

```

Asymptotic Correlation Matrix

```

Corr          BO          B1          B2          KNOT1
//////////
BO              1          -0.825722824  0.7886758329  0.3473442336
B1          -0.825722824  1          -0.955133866  -0.705073584
B2          0.7886758329  -0.955133866  1          0.5254941706
KNOT1       0.3473442336  -0.705073584  0.5254941706  1

```

A.8.2. Ensaio 2: cinética efetuada a 45 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT			Method: Gauss-Newton		
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.009947	0.005080	-0.004450	172.560000	0.007828
1	0.009952	0.005080	-0.004449	172.564598	0.007827
2	0.009952	0.005080	-0.004449	172.564598	0.007827

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics				Dependent Variable MEXT
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	
Regression	4	14.514882519	3.628720630	
Residual	15	0.007827291	0.000521819	
Uncorrected Total	19	14.522709810		
(Corrected Total)	18	2.026497405		

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
			B0	0.0099524
B1	0.0050802	0.0001820203	0.00469222	0.00546816
B2	-0.0044494	0.0001905705	-0.00485563	-0.00404325
KNOT1	172.5645984	5.2918499035	161.28533022	183.84386661

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
1	1	-0.825722824	0.7886758329	0.3993649597
B0		1	-0.955133866	-0.754222125
B1			1	0.587310221
B2				1
KNOT1				

A.8.3. Ensaio 3: cinética efetuada a 35 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.002006	0.005539	-0.004831	136.940000	0.004669
1	-0.002000	0.005539	-0.004831	136.944169	0.004669
2	-0.002000	0.005539	-0.004831	136.944169	0.004669

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	12.358729941	3.089682485
Residual	15	0.004668699	0.000311247
Uncorrected Total	19	12.363398640	

(Corrected Total) 18 1.594745166

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0020000	0.0136655758	-0.03112737	0.02712737
B1	0.0055387	0.0001859649	0.00514229	0.00593504
B2	-0.0048309	0.0001900081	-0.00523589	-0.00442591
KNOT1	136.9441689	3.9003491671	128.63080305	145.25753476

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
1	1	-0.816496581	0.7991223256	0.3782992201
B0		1	-0.97872097	-0.75940794
B1	-0.816496581		1	0.6549085958
B2	0.7991223256	-0.97872097		1
KNOT1	0.3782992201	-0.75940794	0.6549085958	

A.8.4. Ensaio 4: cinética efetuada a 35 °C, 350 bar, 5% etanol com *T. catharinensis* (MP2)

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT			Method: Gauss-Newton		
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.007463	0.005563	-0.004934	137.140000	0.021889
1	0.007740	0.005563	-0.004934	137.144308	0.021887
2	0.007740	0.005563	-0.004934	137.144308	0.021887

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	12.320835772	3.080208943
Residual	15	0.021886918	0.001459128
Uncorrected Total	19	12.342722690	
(Corrected Total)	18	1.536846706	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.0077400	0.0295884557	-0.05532606	0.07080606
B1	0.0055630	0.0004026479	0.00470478	0.00642122
B2	-0.0049336	0.0004114021	-0.00581044	-0.00405668
KNOT1	137.1443081	8.2801847508	119.49557921	154.79303706

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.816496581	0.7991223256	0.3794101097
B1	-0.816496581	1	-0.97872097	-0.760377312
B2	0.7991223256	-0.97872097	1	0.6560589193
KNOT1	0.3794101097	-0.760377312	0.6560589193	1

Anexo 9: Determinação de X_0 para outras espécies:

A.9.1- *Attalea excels* e *Pterodon emarginatus*

Foi desenvolvido um trabalho em conjunto com a pesquisadora Dulcinéia F. Teixeira do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico da Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz. O trabalho consistia em se utilizar a extração supercrítica para se obter extratos ricos em compostos com atividades inseticidas e repelentes a partir das plantas *Attalea excels* (urucuri) e *Pterodon emarginatus* (sucupira). Os ensaios foram desenvolvidos no Lasefi-FEA/ UNICAMP, na unidade de extração SFE_I, conforme procedimento descrito por PEREIRA *et al* (2004). Para a Sucupira, o processo foi realizado a 150 e 250 bar, a 35°C, sem uso de co-solvente, utilizando uma massa de matéria prima de $20,8 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ kg (equivalente a 3,5% do volume da célula). Para a urucuri, o processo foi realizado a 100 bar e 20 °C, e a 300 bar a 70 °C, com uso de 10 % de etanol como co-solvente, utilizando uma massa de $10,4 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ kg (equivalente a 4 % do volume da célula). As condições de processo foram escolhidas de acordo com os compostos de interesse: para a sucupira o óleo essencial mais alguns diterpenos furânicos e para a urucuri, substâncias apolares. A Tabela A.10 apresenta os resultados obtidos em cada extração. A análise dos extratos foi realizada pela FIOCRUZ.

Tabela A.10: Rendimento obtido nas extrações de *Attalea excels* (urucuri) e *Pterodon emarginatus* (sucupira) utilizando o processo supercrítico.

Matéria Prima	P (bar)	T (°C)	Co-Solvente	Rendimento* (%)
Sucupira	150	35	-	29,3
Sucupira	250	35	-	26,3
Urucuri	100	20	etanol 10 %	1,0
Urucuri	300	70	etanol 10 %	1,2

* com relação à massa de alimentação

A.9.2- Laranja Murcote e Pera

Este trabalho foi desenvolvido no Lasefi-FEA/ UNICAMP, em conjunto com a doutoranda Mara E.M. Braga do Lasefi e a Dr. Marilda M.F.B.S. Mendes, do Instituto Agrônomo de Campinas –IAC/Campinas (SP). Foram utilizadas duas espécies de laranja (murcote e pêra) e uso de diferentes partes da laranja (casca e polpa). Em cada ensaio foram utilizadas $10,00 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ kg de matéria prima. A extração foi realizada na unidade de extração SFE_I nas seguintes condições: 300 bar, 50 °C, 10% de H₂O, vazão na bomba de 5 mL/ min, por 3 horas.

Observações:

- foram contabilizadas na massa de extrato obtida durante o processo, na depressurização e na limpeza do extrator (com o mesmo solvente = água destilada).
- como o volume de água na limpeza não é exato, as massas reais dos extratos somente serão contabilizadas após evaporação da água.

Os resultados são mostrados na Tabela A.11 abaixo.

Tabela A.11: Massas de extrato + água obtidos em cada extração das diferentes partes e variedades da laranja

Variedade	Parte utilizada	Massa de extrato + H ₂ O $\times 10^4$ (kg)	Vazão de saída $\times 10^{-5}$ (kg/s)
Murcote	Casca	$15,8 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,5$
Murcote	Polpa	$15,6 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,8$
Pêra	Casca	$10,5 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,3$
Pêra	Polpa	$10,4 \pm 0,6$	$6,8 \pm 0,5$

Anexo 10: Nova Metodologia de Análise dos extratos obtidos na SFE

Foram realizados dois grupos de ensaios: 1) Fracionamento os extratos pelo método que tem sido utilizado desde o início do trabalho (DELORENZI,1998), sendo adicionado ao final deste a etapa de fracionamento em micro-colunas, que seria mais propriamente a separação dos alcalóides por diferença de afinidade ou melhor dizendo, separando os alcalóides de polaridades mais próximas; 2) Fracionamento utilizando a nova metodologia (CARDOSO, 2000). As análises foram realizadas em amostras retiradas durante um ensaio realizado a 250 bar, 45° C, 5,1% m/m etanol.

Foi verificado (em todos os casos utilizando a metodologia de CARDOSO, 2000) que na 1ª etapa de fracionamento do extrato bruto, onde ocorre a dissolução do extrato em água + H₂SO₄ 0,1 mol/L até ph 3,0, nenhuma precipitação ocorreu, ou seja, essa etapa utilizada para fracionar extratos brutos, poderia ser desprezada no caso de extratos obtidos por extração supercrítica.

Foi verificado que nas duas metodologias a presença da voacangina e traços da coronaridina encontravam-se na fração FI. Nas frações FII, quando feitas com a nova metodologia, foi observada a presença de V, entretanto o pico deste alcalóide em FII não teve boa resolução, ou melhor dizendo este não apresentou boa separação.

A Tabela A.12 apresenta as massas dos extratos brutos (CE) e frações de alcalóides totais (AF) e voacangina (V), obtidos em cada metodologia analítica. Pode ser verificado que a relação V/AF foi maior para primeira metodologia (DELORENZI, 1998), isso se deve provavelmente à perda ou má separação de V nas duas frações FI e FII quando feitas pela nova metodologia. Pelo exposto acima, essa nova metodologia (CARDOSO, 2000) não apresentou melhorias na separação de alcalóides.

Tabela A.12: Massa dos extratos brutos (EB), fração de alcalóides totais (AF), e voacangina (V) de amostras obtidas por extração supercrítica a 250 bar, 45 °C, 5% etanol (v/v).

Metodologia	EB $\times 10^2$ kg/kg	AF $\times 10^4$ kg/kg	V/AF (%)
Primeira (DELORENZI, 1998)	0,52	3,58	11,6
	0,09	3,10	3,2
	0,14	2,37	4,2
	0,04	1,21	4,1
Segunda (CARDOSO, 2000)	0,09	8,65	-
	0,06	5,68	2,1
	0,04	4,13	2,3