



UNICAMP

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

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSO
NAS DIFERENTES ETAPAS DA EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA DE PRODUTOS NATURAIS:
*Artemisia annua, Cordia verbenacea,
Ocimum selloi e Foeniculum vulgare***

Sócrates Quispe Condori

Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles**

Co-Orientador: **Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de **DOCTOR
EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.**

Campinas – 2005

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

Q48d Quispe Condori, Sócrates
Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas da extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare* / Sócrates Quispe Condori. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
Co-orientador: Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. *Artemisia annua*.
3. *Cordia verbenacea*. 4. *Ocimum selloi*. 5. *Foeniculum vulgare*. I. Meireles, Maria Angela de Almeida. II. Rosa, Paulo de Tarso Vieira e. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Determination of process parameters in the various steps of the supercritical extraction of natural products: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare*

Palavras-chave em inglês (Keywords): Supercritical fluid extraction, *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi*, *Foeniculum vulgare*

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles
Vera Lúcia Garcia Rehder
Pedro Melillo de Magalhães
Fernando Antônio Cabral
Christianne Elisabete da Costa Rodrigues
Martin Aznar
Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Banca Examinadora

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

Dr. Pedro Melillo de Magalhães
CPQBA / UNICAMP
Membro Titular

Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder
CPQBA / UNICAMP
Membro Titular

Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral
DEA – FEA / UNICAMP
Membro Titular

Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues
DEA – FEA / UNICAMP
Membro Titular

Prof. Dr. Martin Aznar
DPQ – FEQ / UNICAMP
Membro Suplente

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
DEPAN – FEA / UNICAMP
Membro Suplente

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado de muitos anos de aprendizado e das contribuições de muitas pessoas e instituições. Eu não poderia ter feito isto sem eles.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles**, quem me deu a oportunidade de conhecer a Tecnologia dos Fluidos Supercríticos e permitiu que este trabalho pudesse ser realizado. Obrigado pela paciência e apoio, pelas inúmeras instruções e ensinamentos ao longo destes cinco anos e meio, e sobre tudo pelas oportunidades brindadas para meu desenvolvimento profissional.

Ao **Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa**, pela co-orientação e principalmente pelo senso crítico que, junto com seu apoio e confiança, me motivaram a elevar meu padrão de conhecimento em diferentes áreas. Obrigado também pelas discussões frutíferas e sugestões. Sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho foi essencial.

À **FAPESP**, pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto de pesquisa (02/01609-4) que possibilitaram a execução do presente trabalho.

À **Dra. Mary Ann Foglio**, da Divisão de Fitoquímica do CPQBA – UNICAMP, pelas informações em relação às plantas estudadas, bem como pela sempre amável resposta às nossas dúvidas e inquietudes.

À **Divisão de Farmacologia e Toxicologia** do CPQBA – UNICAMP, pela realização dos testes de atividade anticâncer.

À **Divisão de Agrotecnologia** do CPQBA – UNICAMP, pelo cultivo das plantas *Artemisia annua* e *Cordia verbenacea*.

À **Dra. Daisy Nakamura Sato**, do Instituto Adolfo Lutz – Ribeirão Preto, pela realização dos testes de atividade antibacteriana.

Agradeço também aos Membros da Banca Examinadora: **Dr. Pedro Melillo de Magalhães; Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder; Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral; Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues; Prof. Dr. Martin Aznar e Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso** pelas correções e valiosas sugestões para a redação final do presente trabalho.

Gostaria de dar um agradecimento muito especial ao **Ari**, técnico do LASEFI, pela ajuda na manutenção dos equipamentos. Obrigado também pela amizade.

Aos meus amigos **Raul e Lucinewton**, pelas muitas discussões e momentos de descontração. Obrigado também aos meus colegas do LASEFI **Mara, Camila, Patrícia, Alberto e Julian** que me auxiliaram com apoio e companheirismo.

Aos meus pais
Sócrates e Lidia

Aos meus irmãos **Líber**, **Ruth** e **Noemí**,
porque eles significam tudo para mim

À **Deise** pelo seu carinho e companheirismo
em todos os momentos

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIII
NOMENCLATURA	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XIX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.2.1. Objetivo Geral.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE).....	9
2.1.1. Etapas da SFE de Solutos de Matrizes Vegetais.....	16
2.1.2. Etapa de Extração	19
2.1.2.1. Rendimento global (X_0)	19
2.1.2.2. Cinética de Extração – Curvas Globais de Extração (OEC).....	22
2.1.2.3. Modelagem Matemática das Curvas Globais de Extração	27
2.1.2.4. Extração Fracionada	35
2.1.3. Etapa de Separação	36
2.1.3.1. Modelagem da Etapa de Separação – Estado da Arte	38
2.1.3.2. Separação Fracionada.....	40
2.2. AS MATRIZES VEGETAIS	43
2.2.1. <i>Artemisia annua</i> L.	43
2.2.2. <i>Cordia verbenacea</i> DC – Erva baleeira	49
2.2.3. <i>Ocimum selloi</i> Benth.....	53
2.2.4. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. – Funcho	57
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1. MATÉRIA-PRIMA	59
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	61
3.3. EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO.....	64
3.3.1. Unidade Experimental - Aparelho Schilcher	64
3.3.2. Procedimento Experimental.....	65
3.4. EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS	67
3.4.1. Unidade Experimental - Extrator Soxhlet.....	67
3.4.2. Procedimento Experimental.....	69
3.5. EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO	71
3.5.1. Unidades de Extração Supercrítica	71
3.5.1.1. Unidade Spe-ed SFE	71
3.5.1.2. Unidade LASEFI_TUHH.....	76
3.5.2. Estudo da Etapa de Extração.....	84
3.5.2.1. Determinação do Rendimento Global	84

3.5.2.2. Extração fracionada.....	85
3.5.2.3. Determinação das Curvas Globais de Extração (OEC).....	86
3.5.2.4. Cálculo dos Parâmetros Cinéticos das OEC.....	87
3.5.2.5. Modelagem Matemática das OEC.....	88
3.5.3. Estudo da Etapa de Separação.....	88
3.5.3.1. Solubilidade de Anetol e Ácido Oléico em CO ₂ Supercrítico.....	88
3.5.3.2. Determinação do Tempo de Operação do Processo.....	89
3.5.3.3. Estudo da Influência das Condições Operacionais.....	90
3.6. ANÁLISE QUÍMICA.....	90
3.6.1. Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (GC-MS).....	90
3.6.2. Cromatografia Gasosa - Detector de Ionização de Chama (GC-FID).....	91
3.6.3. Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	92
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
4.1. <i>ARTEMISIA ANNUA</i> L.....	97
4.1.1. Rendimento Global.....	97
4.1.2. Cinética de Extração e Modelagem Matemática.....	111
4.2. <i>CORDIA VERBENACEA</i> DC – ERVA BALEEIRA.....	127
4.2.1. Rendimento Global e Extração Fracionada.....	127
4.2.2. Estudo das Propriedades Funcionais dos Extratos de Erva Baleeira.....	137
4.2.3. Cinética de Extração e Modelagem Matemática.....	138
4.2.4. Efeito da Altura do Leito de Partículas na Cinética de Extração de Erva baleeira.....	143
4.3. <i>OCIMUM SELLOI</i> BENTH.....	153
4.3.1. Rendimento Global.....	153
4.3.2. Extração Fracionada.....	155
4.4. <i>FOENICULUM VULGARE</i> MILL. – FUNCHO.....	161
4.4.1. Solubilidade do anetol e ácido oléico em CO ₂ supercrítico.....	161
4.4.2. Rendimento Global.....	163
4.4.3. Determinação do Tempo de Operação do Processo.....	163
4.4.4. Estudo da Influência das Condições Operacionais na Etapa de Separação.....	169
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	173
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	177
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
ANEXO A – PRODUÇÃO TÉCNICA CIENTÍFICA DO PERÍODO.....	195
ANEXO B – TESTES PRELIMINARES E ESTUDOS ADICIONAIS.....	199
ANEXO C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	213
ANEXO D – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA SFE DE <i>A. ANNUA</i>.....	217
ANEXO E – TESTE DE ATIVIDADE ANTICÂNCER: <i>C. VERBENACEA</i>.....	221
ANEXO F – TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	231
ANEXO G – DADOS EXPERIMENTAIS.....	233

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Estudo sistemático da SFE para avaliação econômica do processo.....	9
Figura 2-2. Diagrama pressão - temperatura do dióxido de carbono [adaptado de Brogle, 1982]....	11
Figura 2-3. Diagrama do processo de Extração com Fluidos Supercríticos (SFE).	17
Figura 2-4. Isotermas de rendimento global para o sistema CO ₂ + dente-de-leão [Simándi et al., 2002].	21
Figura 2-5. Rendimento global em extrato do sistema manjeriço + CO ₂ com 1% H ₂ O (v/v) como cosolvente: 30 °C (— □ —) e 50 °C (- - ♦ - -) [Leal et al., 2004].....	22
Figura 2-6. Formas típicas das curvas globais de extração (OEC) [Adaptado de Brunner, 1994]....	23
Figura 2-7. Curva global de extração de cravo-da-índia mostrando os três períodos de taxa de extração [adaptado de Rodrigues et al., 2002].	26
Figura 2-8. Leito fixo de partículas para o balanço de massa diferencial.....	29
Figura 2-9. Diferentes processos de separação que podem ser implementados após a etapa de extração: (a) Descompressão, (b) Variação da temperatura; (c) Adsorção, (d) Adição antisolvente [adaptado de Reverchon, 1997].	37
Figura 2-10. Foto da planta <i>Artemisia annua</i> L cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP (Híbrido Ch x Viet 55, em estado de corte) [Divisão de Agrotecnologia / CPQBA-UNICAMP].	47
Figura 2-11. Foto da planta <i>Cordia verbenacea</i> DC cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP [Divisão de Agrotecnologia / CPQBA-UNICAMP].	51
Figura 2-12. Foto da planta <i>Ocimum selloi</i> Benth [The Herb Society of America]	55
Figura 3-1. Unidade experimental para determinação da umidade.	61
Figura 3-2. Unidade experimental para extração por Hidrodestilação (Aparelho Schilcher).....	65
Figura 3-3. Unidade experimental de extração com solvente orgânico (Aparelho Soxhlet).	67
Figura 3-4. Unidade de extração supercrítica Spe-ed SFE (Applied Separation, Allentown, E.U.A.).	71
Figura 3-5. Colunas de extração usadas na unidade de extração Spe-ed SFE: a) 5 ml (Thar Designs, CL 1165, Pittsburgh, E.U.A.) e b) 300 mL (Thar Designs, CL 1373, Pittsburgh, E.U.A.)	73
Figura 3-6. Unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH.	77
Figura 3-7. Diagrama da unidade de extração supercrítica LASEFI-TUHH [Adaptado de Zetzl et al., 2003].	81
Figura 4-1. Organograma dos experimentos realizados com <i>A. annua</i> , <i>C. verbenacea</i> , <i>O. Selloi</i> e <i>F. vulgare</i>	95
Figura 4-2. Cromatogramas do óleo volátil obtido por hidrodestilação e dos extratos obtidos com hexano e por SFE a 30 °C / 150 bar, a partir de <i>A. annua</i> (* Produto de degradação da artemisinina).	99
Figura 4-3. Isotermas de rendimento global em extrato de <i>A. annua</i> obtidas com CO ₂ pressurizado.	101
Figura 4-4. Isotermas de rendimento em artemisinina (□) e cânfora (◇) de <i>A. annua</i> , obtidas com CO ₂ pressurizado (— 30 °C, - - - - 50 °C).	103
Figura 4-5. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos de <i>A. annua</i> : Artemisinina (A); Hidrodestilação (B); Hexano (C); SFE: 30 °C / 75 bar (D); SFE: 30 °C / 150 bar (E); SFE: 50 °C / 300 bar (F). Fase móvel hexano e acetato de etila (95:5). Revelador: Solução de anisaldeído.....	107

Figura 4-6. Curvas globais de extração de artemisinina de <i>A. annua</i> a diferentes condições operacionais ($\blacktriangle, \triangle$) $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s; (\blacksquare, \square) $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s (símbolos cheios: 400 bar e símbolos vazios: 200 bar).....	113
Figura 4-7. Grau de extração (- - - \triangle - - -) versus pureza de artemisinina (— \square —) de <i>A. annua</i> a 400 bar, 50 °C e $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s.....	115
Figura 4-8. Comparação dos dados experimentais com as melhores curvas ajustadas a 200 bar, 50 °C e (\triangle) $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s; (\square) $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s (— Sovová [1994], - - - Empírico [Naik et al., 1989], - - - Martinez et al. [2003]).	121
Figura 4-9. Análise por CCD dos extratos de <i>C. verbenacea</i> : Hidrodestilação (A), Extração Fracionada por SFE a 60 °C: 80 bar (B), 200 bar (C), 300 bar (D); Rendimento global por SFE a 60 °C / 300 bar (E); Extração com etanol (F). Fase móvel hexano e acetato de etila (90:10). Revelador: Solução de anisaldeído.	133
Figura 4-10. Cromatogramas do óleo volátil obtido por hidrodestilação e do extrato obtido por extração fracionada a 60 °C / 80 bar, e com etanol a partir de <i>C. verbenacea</i> .	135
Figura 4-11. Curvas globais de extração de <i>C. verbenacea</i> a diferentes condições de temperatura e pressão, e vazão de solvente de $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s.	139
Figura 4-12. Comparação entre os dados experimentais e os modelos de Goto et al. [1993] e Empírico [Naik et al., 1989] a diferentes condições de temperatura e pressão. Vazão de solvente: $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s.	143
Figura 4-13. Curva global de extração da <i>C. verbenacea</i> a 200 bar / 40 °C / $6,49 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s, para diferentes alturas de leito.	145
Figura 4-14. Comparação entre os dados experimentais e os modelos de Crank [1975] (—), Sovová [1994] (— — —) e Goto et al. [1993] (— — —), a 200 bar / 40 °C / $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s.	151
Figura 4-15. Rendimento global em extrato de <i>O. selloi</i> usando CO ₂ pressurizado.	153
Figura 4-16. Cromatograma das frações de <i>O. selloi</i> obtidas por extração fracionada com CO ₂ pressurizado a 50 °C.	157
Figura 4-17. Porcentagem de extração do extrato e anetol na extração fracionada de solutos de <i>O. selloi</i> com CO ₂ supercrítico.	159
Figura 4-18. Pureza relativa do anetol nas diferentes frações de <i>O. selloi</i> obtidos por extração fracionada com CO ₂ pressurizado.	159
Figura 4-19. Solubilidade de anetol ($k_{ij} = 0,069447$ e $l_{ij} = -0,06825$) e ácido oléico ($k_{ij} = 0,121289$ e $l_{ij} = 0,0921$) em CO ₂ a 40 °C.	163
Figura 4-20. Curva global de extração de funcho por SFE a 250 bar / 40 °C / $6,8 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s.	165
Figura 4-21. Curva global de extração e pureza relativa de anetol na cinética de extração de funcho a 250 bar / 40 °C / $6,8 \times 10^{-5}$ kg CO ₂ /s (Experimento 1).	167

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2-1. Propriedades críticas de alguns fluidos [Clifford, 1999].	14
Tabela 2-2. Vantagens e desvantagens da SFE.	15
Tabela 2-3. Modelos matemáticos usados para representar as OEC	33
Tabela 2-4. Condições operacionais utilizadas na separação fracionada na SFE de diversas matrizes vegetais.	41
Tabela 3-1. Condições operacionais no estudo do rendimento global dos diferentes sistemas usando CO ₂ pressurizado.	84
Tabela 3-2. Condições operacionais na extração fracionada usando CO ₂ pressurizado.	85
Tabela 3-3. Condições operacionais no estudo da cinética do processo de extração com CO ₂ pressurizado.	86
Tabela 4-1. Comparação dos rendimentos em extrato, cânfora e artemisinina obtidos por hidrodestilação, com hexano e extração supercrítica a partir de <i>A. annua</i> .	109
Tabela 4-2. Parâmetros cinéticos para o período de taxa de extração constante (<i>CER</i>).	117
Tabela 4-3. Condições experimentais usadas para a modelagem matemática da SFE de <i>A. annua</i> .	119
Tabela 4-4. Parâmetros ajustados dos vários modelos usados na modelagem das OEC de <i>A. annua</i> .	121
Tabela 4-5. Desvios quadrados médios do ajuste dos dados experimentais.	121
Tabela 4-6. Coeficientes de transferência de massa na fase fluida e sólida, calculados a partir do modelo de Sovová [1994].	124
Tabela 4-7. Influência da temperatura e pressão sobre o rendimento global na extração de solúveis de <i>C. verbenacea</i> usando CO ₂ -SC.	127
Tabela 4-8. Comparação dos rendimentos em extrato e β-cariofileno de <i>C. verbenacea</i> obtidos pelos diferentes métodos de extração.	130
Tabela 4-9. Condições experimentais para a modelagem das OEC de <i>C. verbenacea</i> .	139
Tabela 4-10. Parâmetros cinéticos do período <i>CER</i> na extração de solutos de <i>C. verbenacea</i> .	141
Tabela 4-11. Desvios médios quadráticos e parâmetros ajustados na modelagem das OEC de <i>C. verbenacea</i> .	141
Tabela 4-12. Parâmetros cinéticos do período <i>CER</i> a 200 bar / 40 °C / 6,49 × 10 ⁻⁵ kg CO ₂ /s e diferentes alturas de leito na SFE de <i>C. verbenacea</i> .	147
Tabela 4-13. Desvios médios quadráticos dos modelos usados no ajuste das OEC para diferentes alturas do leito.	147
Tabela 4-14. Parâmetros ajustados dos modelos de Crank [1975], Goto et al. [1993] e Sovová [1994].	148
Tabela 4-15. Rendimento global em extrato e teor de anetol na SFE de <i>O. selloi</i> .	154
Tabela 4-16. Propriedades críticas do CO ₂ , anetol e ácido oléico.	162
Tabela 4-17. Parâmetros cinéticos do período <i>CER</i> na SFE de funcho com CO ₂ supercrítico.	167
Tabela 4-18. Rendimento em extrato, anetol e funchona (% b.s.) nos dois separadores (condições de extração: 250 bar / 40 °C / 6,8 × 10 ⁻⁵ kg CO ₂ /s). A coleta foi realizada a 1 bar / -5 °C.	169
Tabela 4-19. Efeito da vazão de solvente sobre a recuperação de extrato, anetol e funchona (% b.s.) no primeiro e segundo separador. Condição de extração: 250 bar / 40 °C; condição operacional do 1º separador: 80 bar / 40 °C.	171

NOMENCLATURA

$a = a_{ij}$: parâmetro do termo atrativo da equação de estado (EDE) [bar m ⁶ kg-mol ⁻²]
a_m	: parâmetro da mistura da EDE [bar cm ⁶ g-mol ⁻²]
$b = b_{ij}$: parâmetro do termo repulsivo da EDE [m ³ kg-mol]
b_m	: parâmetro da mistura da EDE [m ³ kg-mol]
b	: Parâmetro ajustável no modelo de Martinez et al. [s ⁻¹]
d_i	: Abertura nominal da i-ésima peneira [m]
d_m	: Diâmetro médio [m]
D	: Coeficiente de difusão – Parâmetro de ajuste do Modelo de Crank [m/s]
d_B	: Diâmetro do leito [m]
D_{aY}	: Coeficiente de dispersão axial na fase fluida [kg extrato / kg CO ₂ / s]
D_{aX}	: Coeficiente de difusão na fase sólida [kg extrato / kg CO ₂ / s]
F	: Massa de alimentação [kg]
H_B	: Altura do leito [m]
$J(X,Y)$: Taxa de transferência de massa na interface sólido - fluido
k	: Parâmetro de ajuste do modelo empírico [t]
K	: Constante de equilíbrio de adsorção do modelo de Goto et al. [-]
k_d	: Coeficiente de desorção do modelo de Tan & Liou [s ⁻¹]
k_{ij}	: Parâmetro de interação binária da EDE [-]
k_{Xa}	: Coeficiente de transferência de massa na fase sólida [s ⁻¹]
k_{Ya}	: Coeficiente de transferência de massa na fase fluida [s ⁻¹]
l_{ij}	: Parâmetro de interação binária da EDE [-]
m_i	: Massa de material retida na i-ésima peneira [kg]
$m_{extrato}$: Massa de extrato [kg]
m_{SI}	: Massa de sólido inerte [kg]
m_{SS}	: Massa de sólido seco [kg]
M_{CER}	: Taxa de transferência de massa do período CER [kg extrato / s]
P	: Pressão [bar]
P_c	: Pressão crítica [bar]
Q_{CO_2}	: Vazão mássica de solvente [kg CO ₂ / s]
R	: Constante do Gás Ideal [bar m ³ kg mol ⁻¹ K ⁻¹]
r	: Coordenada radial [-]
S	: Área transversal de transferência de massa [m ²]

T	: Temperatura [K]
t	: Tempo [s]
t_{CER}	: Duração do período <i>CER</i> [s]
t_m	: Parâmetro ajustável no modelo de Martinez et al. [s]
T_c	: Temperatura crítica [K]
u	: Velocidade superficial [m/s]
V	: Volume [m ³]
w	: Grau de extração [-]
X	: Razão mássica de soluto / massa de sólido livre de soluto [kg extrato / kg sólido livre soluto]
X_o	: Rendimento global [kg extrato / kg sólido livre de soluto]
X_P	: Razão mássica de soluto / massa de soluto de fácil acesso [kg extrato / kg extrato de fácil acesso]
X_K	: Razão mássica de soluto / massa de sólido não moído [kg extrato / kg sólido não moído]
Y	: Razão mássica de soluto / massa de solvente [kg extrato / kg CO ₂]
Y_{CER}	: Razão mássica de soluto na fase fluida na saída do extrator [kg extrato / kg CO ₂]
Y^*	: Solubilidade [kg extrato / kg CO ₂]
z	: Coordenada axial
Z_c	: Fator de compressibilidade [-]

Letras gregas

ε	: Porosidade [-]
ρ	: Densidade [kg/m ³]
ρ_s	: Densidade do sólido ou densidade real [kg/m ³]
ρ_{CO_2}	: Densidade do CO ₂ [kg/m ³]
ρ_{H_2O}	: Densidade da água [kg/m ³]
ϕ	: Parâmetro adimensional do modelo de Goto et al. [-]
β	: Porosidade das folhas [-]
ω	: Fator acêntrico [-]
τ	: Volume do leito/Fluxo volumétrico do solvente do modelo de Goto et al. [s]

TESE DE DOUTORADO

AUTOR : Sócrates Quispe Condori
TÍTULO : Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas da extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare*
ORIENTADOR : Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
CO-ORIENTADOR : Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) – Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) – UNICAMP

RESUMO

No presente trabalho é apresentado um estudo global do processo de extração de produtos naturais usando dióxido de carbono supercrítico como solvente. As duas etapas do processo foram estudadas usando diversas matrizes vegetais.

Na **Etapa de Extração** (*Artemisia annua*, *Cordia verbenacea* e *Ocimum selloi*) foram medidos dados de rendimento global para os três sistemas. Para os sistemas CO₂ + *A. annua* e CO₂ + *C. verbenacea* foram calculados os parâmetros cinéticos do processo de extração e um modelo matemático foi selecionado para representar as curvas globais de extração. A técnica de extração fracionada foi aplicada para os sistemas CO₂ + *C. verbenacea* e CO₂ + *Ocimum Selloi*.

A determinação do rendimento global permitiu visualizar o efeito da temperatura e pressão sobre a solubilidade do extrato, além de proporcionar informações necessárias para modelagem do processo de extração. A condição que maximizou o rendimento em extrato nos sistemas CO₂ + *A. annua* e CO₂ + *C. verbenacea* foi 300 bar / 50 °C. Entretanto, foi demonstrado que o extrato de *C. verbenacea* obtido nesta condição apresenta menor atividade anticâncer àquele obtido a 200 bar / 40 °C. Para o sistema CO₂ + *Ocimum Selloi* o maior rendimento foi obtido a 200 bar / 40 °C.

No estudo da cinética do processo de extração foi verificado que para o sistema CO₂ + *A. annua* a vazão do solvente foi o único fator significativo sobre os parâmetros cinéticos. No estudo do efeito da altura do leito para o sistema CO₂ + *C. verbenacea*, verificou-se que os parâmetros cinéticos aumentam com a altura do leito. Na modelagem matemática das curvas globais de extração (OEC) dos sistemas CO₂ + *A. annua* e CO₂ + *C. verbenacea* verificou-se que os modelos de **Naik et al. [1989]** (empírico), **Sovová [1994]** e **Goto et al. [1993]** apresentaram os melhores ajustes aos dados experimentais. Do estudo do efeito da altura do leito na SFE a partir de *C. verbenacea*, verificou-se que a seleção de um modelo para aumento de escala é difícil de ser realizada, uma vez que o modelo selecionado nem sempre é válido para todos os ensaios.

Na **Etapa de Separação** (*Foeniculum vulgare*) foi realizado o estudo da influência das condições operacionais (temperatura, pressão e vazão do solvente) na recuperação do extrato. As condições de temperatura e pressão de separação foram determinadas através de modelagem termodinâmica usando-se a equação de estado de Peng-Robinson.

A determinação do comportamento da solubilidade dos componentes majoritários do extrato de *F. vulgare* (anetol e ácido oléico) em CO₂ supercrítico permitiu obter uma aproximação das condições ótimas de separação. No estudo da influência das condições operacionais (temperatura e pressão) determinou-se que o aumento da pressão no primeiro separador permite a solubilização dos compostos de maior massa molecular, os quais são transferidos para o segundo separador. Entretanto, se o objetivo for o fracionamento do extrato de *F. vulgare*, observou-se que a melhor condição operacional para separação da fração rica em componentes de óleo volátil foi 80 bar / 40 °C no primeiro separador. Foi verificado também que o aumento da vazão de solvente diminui o rendimento em anetol e fenchona e, conseqüentemente, no rendimento global.

A otimização das condições de separação da mistura extrato + solvente é uma etapa importante do processo de extração de produtos naturais usando fluidos supercríticos, uma vez que permitirá uma ótima recuperação e/ou fracionamento do extrato.

Palavras-chave: extração supercrítica, óleo volátil, rendimento global, cinética, modelagem matemática, separação fracionada, *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi*, *Foeniculum vulgare*.

DOCTORAL THESIS

AUTHOR : Sócrates Quispe Condori
TITLE : Determination of process parameters in the various steps of the supercritical extraction of natural products: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi* and *Foeniculum vulgare*
MAJOR PROFESSOR : Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
CO-MAJOR PROFESSOR : Dr. Paulo de Tarso de Vieira e Rosa
Laboratory of Physical Separations (LASEFI) – Department of Food Engineering (DEA) – College of Food Engineering (FEA) – UNICAMP

ABSTRACT

In the present work a global study of the extraction of natural products using supercritical carbon dioxide as solvent is presented. The two steps of the SFE process were studied using several raw materials.

In the **Extraction Step** (*Artemisia annua*, *Cordia verbenacea* and *Ocimum selloi*), global yield data for the three plants were determined. Kinetic parameters of the extraction process were calculated for the CO₂ + *A. annua* and CO₂ + *C. verbenacea* systems and a mathematical model to represent the overall extraction curves was selected. The fractional extraction technique was applied for the CO₂ + *C. verbenacea* and CO₂ + *Ocimum Selloi* systems.

The determination of the global yield allowed to identify the effect of the temperature and pressure on the solubility of the extract, besides providing necessary information for the modeling of the extraction process. The operational condition that maximized the global yield in the systems CO₂ + *A. annua* and CO₂ + *C. verbenacea* was 300 bar / 50 °C. However, it was demonstrated that the *C. verbenacea* extract obtained at this condition shows a lower anticancer activity than that obtained at 200 bar / 40 °C. The higher global yield for the CO₂ + *Ocimum Selloi* system was obtained at 200 bar / 40 °C.

In the study of the kinetic of the extraction process for the $\text{CO}_2 + A. annua$ system, it was verified that the flow rate was the only significant factor on the kinetic parameters. In the study of the effect of the extraction bed height for the $\text{CO}_2 + C. verbenacea$ system, it was verified that the kinetic parameters increase with the bed height. The **Naik et al. [1989]** (empirical), **Sovová [1994]** and **Goto et al. [1993]** models presented the best fittings to the experimental overall extraction curves (OEC) for the $\text{CO}_2 + A. annua$ and $\text{CO}_2 + C. verbenacea$ systems. From the study of the effect of the height of the bed for the *C. verbenacea*, it was verified that the selection of a mathematical model to scale-up is difficult to be accomplished, because the selected model is not always valid for all experiments.

In the **Separation Step** (*Foeniculum vulgare*) the study of the influence of the operational conditions (temperature, pressure and flow rate) in the recovery of the extract was carried out. The temperature and pressure of the separation step was calculated through thermodynamic modeling using the equation of state of Peng-Robinson.

The determination of the solubility behavior of anethole and oleic acid (major compounds of the *F. vulgare* extract) with supercritical CO_2 allowed to obtain an approximation of the optimal condition of the separation step. In the study of the influence of temperature and pressure, it was determined that the increase of pressure in the first separator allows the solubilization of high molecular mass compounds that are transferred to the second separator. However, if the objective is the fractionation of the fennel extract, it was observed that the best operational condition to separate a rich fraction in volatile oil compounds was 80 bar / 40°C. Additionally, it was verified that the increase of flow rate diminishes the anethole and fenchone yields and, consequently, the global yield.

The optimization of the operational conditions in the separation of the mixture extract + solvent is an important step in the supercritical extraction of natural products, because it will allow an optimal recovery and/or fractionation of the extract.

Keywords: supercritical extraction, volatile oil, global yield, kinetic, mathematical modeling, fractional separation, *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi*, *Foeniculum vulgare*.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Durante as últimas décadas temos contemplado o crescente interesse pela utilização de substâncias de origem vegetal, considerando que muitas plantas produzem um amplo espectro de metabólitos que são de interesse para as indústrias farmacêutica, cosmética e/ou alimentícia [Cowan, 1999; Phillipson, 2001; Suffredini et al., 2004]. A extração de componentes ativos usando fluidos supercríticos (SFE – *Supercritical Fluid Extraction*), principalmente dióxido de carbono, é uma tecnologia com significativas vantagens em relação aos métodos de extração convencionais [Del Valle & Aguilera, 1999; Chen & Ling, 2000; Huie, 2002; Meireles, 2003]. O fluido supercrítico apresenta diferentes densidades (poder de solvatação) a diferentes condições de pressão e temperatura, sendo possível otimizar a seletividade da extração [Brunner, 1994].

Na otimização da SFE, diversas variáveis de processo devem ser consideradas (temperatura, pressão, vazão do solvente, características do leito de partículas) e a influência de cada uma delas deve ser estudada nas diferentes etapas do processo.

De forma geral, a SFE a partir de matrizes vegetais pode ser dividida em duas etapas: (i) etapa de extração, na qual o sistema é formado pela matriz celulósica + extrato + solvente; e (ii) etapa de separação do solvente, onde consideramos a interação extrato +

solvente. Na etapa de extração, a temperatura e pressão são selecionadas para maximizar o rendimento nos compostos de interesse, enquanto que na etapa de separação o nível de solubilidade é reduzido para assegurar a precipitação do extrato e a reciclagem do CO₂.

Na etapa de extração, duas informações experimentais são necessárias [Meireles, 2003]: (i) Rendimento global (X_o), e; (ii) Cinética das curvas globais de extração (OEC – *Overall Extraction Curves*). Na literatura são encontrados vários estudos abordando a etapa de extração, cujos trabalhos foram concentrados no estudo da influência das condições operacionais sobre a cinética do processo [Ferreira et al., 1999; Povh et al., 2001; Zancan et al., 2002; Braga et al., 2003; Rodrigues et al., 2003] e no desenvolvimento de modelos matemáticos que representem as curvas globais de extração [Naik et al., 1989; Tan & Liou, 1989; Goto et al., 1993; Sovová, 1994; Esquivel et al., 1999a; Fullana et al., 2000; Škerget & Knez, 2001; Martinez et al., 2003]. Medidas experimentais de rendimento global (X_o) foram recentemente reportadas na literatura [Gómez et al. 1996; Sass-Kiss et al., 1998; Began et al., 2000; Simándi et al., 2002; Leal et al., 2003; Rodrigues et al., 2003]. A obtenção destas informações é importante para a análise preliminar do custo de manufatura (COM) de extratos obtidos por SFE [Meireles, 2003; Rosa & Meireles, 2005].

Na etapa de separação do solvente as referências são limitadas [Sievers & Eggers, 1996; Sievers, 1998; Bravi et al., 2002]. A importância da otimização desta etapa está relacionada, principalmente, aos custos de recompressão do solvente, derivados da redução da pressão necessária para a recuperação do extrato. Embora tenham sido propostos métodos de recuperação sofisticados a fim de reduzir custos de recompressão e garantir a maior eficiência do processo [Sarrade et al., 1998; Spricigo et al., 2001], o

método de separação preferencialmente empregado tem sido a diminuição do poder de solvatação pela simples redução da pressão. Entretanto, o problema associado a este último é garantir a completa recuperação do extrato, porque mesmo que o equilíbrio seja favorável à separação, os solutos podem formar pequenas gotas ou ainda aerossóis e sua recuperação pode ser incompleta ou parcial [Clifford, 1999]. Esta dificuldade aumenta quando os solutos apresentam alta volatilidade, como é o caso dos componentes do óleo volátil, e que podem ser vaporizados junto com o CO₂ [Zancan et al., 2002; Rodrigues et al., 2003]. Conseqüentemente, o grau de separação e, portanto, de recuperação pela simples descompressão pode ser insatisfatório.

Para o estabelecimento das condições de temperatura e pressão de separação, o conhecimento do comportamento de equilíbrio de fases do sistema extrato (mistura complexa de compostos) + CO₂ é principalmente importante [Francisco & Sivik, 2002; Sousa et al., 2002; Souza et al., 2004]. Entretanto, Brunner [1994] afirma que, além deste dado, a vazão do solvente precisa ser considerada durante a separação. Com o aumento da vazão do solvente, a separação das fases pode ser incompleta e, conseqüentemente, aumentar a possibilidade de perda de produtos [Brunner, 1994].

Logo, é evidente que a descrição fenomenológica da etapa de separação é difícil de ser estabelecida, pois além do equilíbrio de fases, precisa ser considerada a hidrodinâmica do processo.

Portanto, considerando que a etapa de separação não tem sido estudada extensivamente e vários parâmetros podem ser considerados na sua interpretação, o presente trabalho pretende aprofundar os conhecimentos nesta etapa com o intuito de otimizar o processo global e servir como ferramenta para o projeto e avaliação econômica.

Entretanto, considerando o processo global, estudos do rendimento global e de cinética e modelagem na etapa de extração também foram realizados.

A etapa de extração foi estudada para três sistemas: *Artemisia annua* L (artemisia), *Cordia verbenacea* DC (Erva-baleeira) e *Ocimum selloi* Benth. Medidas experimentais de rendimento global (X_o) em função da temperatura e pressão foram realizadas para os três sistemas. Os resultados foram comparados àqueles obtidos por hidrodestilação e extração em sistema do tipo Soxhlet. A cinética e modelagem do processo de extração foram estudadas para a *A. annua* e *C. verbenacea*. Foram calculados os parâmetros cinéticos das curvas globais de extração e um modelo matemático foi selecionado para descrever a cinética da SFE. Devido à pequena quantidade de matéria-prima de *O. selloi* não foi possível estudar a cinética do processo.

Para o estudo da etapa de separação foi utilizado o sistema *Foeniculum vulgare* (funcho). O comportamento da solubilidade dos principais componentes (anetol e ácido oléico) foi determinado usando a EDE de Peng-Robinson. Dados da literatura foram usados para a determinação dos parâmetros de interação binária. A determinação experimental da influência das condições operacionais (pressão, temperatura e vazão do solvente) na etapa de separação do solvente foi realizada.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Estudar as diferentes etapas do processo de extração com dióxido de carbono supercrítico a partir de matrizes vegetais (*Artemisia annua* L, *Cordia verbenacea* DC, *Ocimum selloi* Benth, e *Foeniculum vulgare* Miller), dando especial atenção à etapa de separação da mistura extrato + solvente.

1.2.2. Objetivos Específicos

- i) Determinar as isotermas do rendimento global (X_o) e a variação da composição química dos extratos em função da temperatura e pressão do dióxido de carbono.
- ii) Comparar os resultados do rendimento global, obtidos por SFE, àqueles obtidos por métodos de extração convencionais (hidrodestilação e extração com solvente orgânico).
- iii) Construir as curvas globais de extração por SFE, calcular os parâmetros cinéticos do processo e selecionar os modelos matemáticos que melhor representem as curvas globais de extração.
- iv) Aplicar os conceitos de fracionamento por SFE (extração e separação fracionada) para obter diferentes classes de compostos presentes nos extratos.
- v) Estudar a influência das condições operacionais na etapa de separação da mistura extrato + solvente.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos.

Diversos métodos de extração podem ser aplicados na obtenção de componentes ativos a partir de matrizes vegetais [Huie et al., 2002]. Do ponto de vista de projeto de processos, os seguintes fatores devem ser considerados [Al-Jabari, 2002]: (i) Rendimento: extrair a maior quantidade de extrato e/ou do composto alvo; (ii) Produtividade: empregar o menor tempo de operação; e (iii) Seletividade: retirar preferencialmente a(s) substância(s) de interesse.

Os dois primeiros fatores têm fortes implicações econômicas e determinam a viabilidade industrial da maioria dos processos, enquanto que a seletividade está relacionada com a qualidade e pureza do produto.

Do ponto de vista da seletividade, a extração com fluidos supercríticos (SFE) pode ser considerada uma tecnologia com grande potencial para a extração de compostos ativos a partir de matrizes vegetais. A SFE tem importantes vantagens em relação aos métodos de extração convencionais. O fluido supercrítico apresenta diferentes densidades (poder de solvatação) a diferentes condições de pressão e temperatura, sendo possível otimizar a

seletividade da extração [Brunner, 1994]. Adicionalmente, uma vez finalizado o processo, não é necessária uma etapa adicional de eliminação do solvente, obtendo-se um produto com alta pureza relativa pela simples descompressão do sistema. O uso de solventes orgânicos em extrações, cria a necessidade de estabelecer etapas adicionais de remoção do solvente, principalmente se o produto é destinado ao consumo e higiene humana [Reverchon, 1997]. A eliminação de solventes constitui, algumas vezes, uma etapa crítica do projeto, pois pode encarecer o custo de manufatura, além de introduzir riscos de degradação e contaminação dos produtos. Normas internacionais de qualidade impõem limites muito exigentes neste último aspecto [Del Valle & Aguilera, 1999].

Entretanto, para afirmarmos se a SFE é superior aos métodos de extração convencionais (considerando também o aspecto econômico), é necessário o estudo do processo de extração de forma sistemática, desde a produção agrícola da matriz vegetal até a determinação da composição química e o estudo das propriedades funcionais dos extratos [Meireles, 2003]. A Figura 2-1 mostra um esquema do estudo sistemático do processo de extração com fluidos supercríticos.

O estudo dos aspectos agrônômicos (produção da matéria-prima) e do estudo de propriedades funcionais estão além de nosso trabalho. Porém, o trabalho integrado com outros grupos de pesquisa (IAC, CPQBA, Instituto Adolfo Lutz) tem nos permitido obter algumas conclusões interessantes. Uma vez que estes aspectos não são do nosso domínio, nos parágrafos seguintes serão discutidos aspectos referentes ao processo de extração supercrítica aplicado a matrizes vegetais. As diferentes etapas do processo serão consideradas. Na parte final desta seção, serão apresentadas as diferentes matérias-primas usadas no desenvolvimento do presente trabalho.

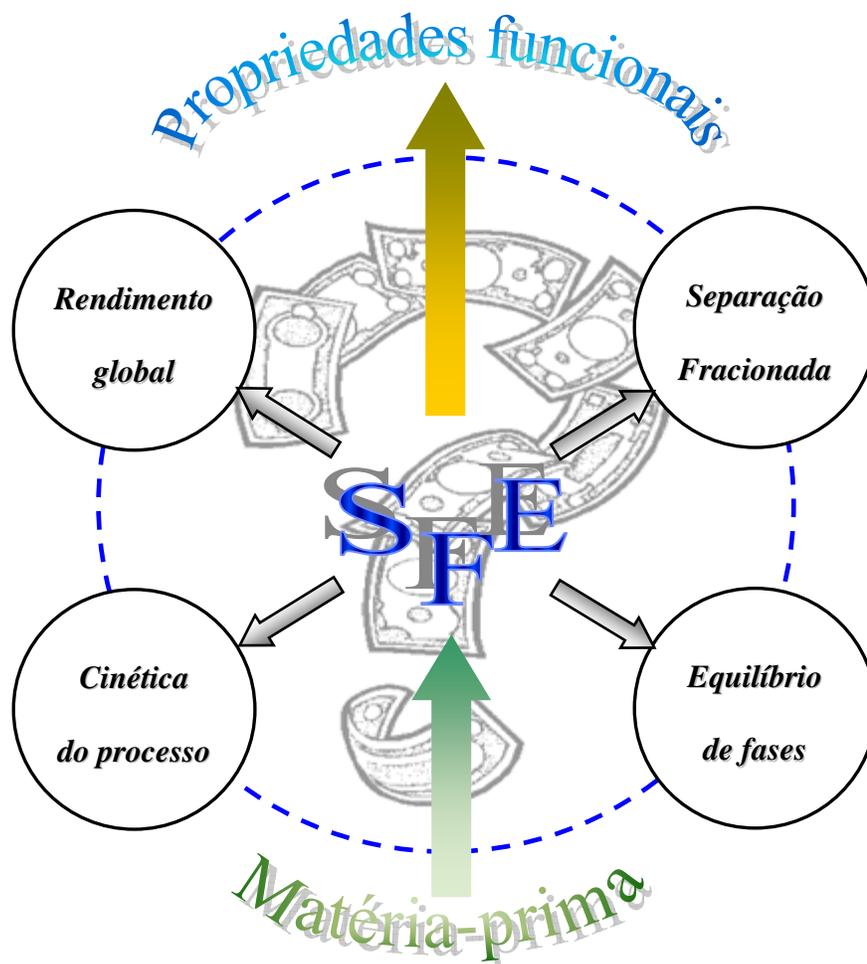


Figura 2-1. Estudo sistemático da SFE para avaliação econômica do processo.

2.1. Extração com Fluidos Supercríticos (SFE)

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

A Figura 2-2 apresenta o diagrama de fases pressão – temperatura de uma substância pura (dióxido de carbono - CO_2). A região crítica tem sua origem no ponto crítico, e acima desta temperatura (T_c) e pressão (P_c) críticas, o CO_2 é considerado *fluido*

supercrítico. Na região supercrítica, existe uma só fase que possui propriedades físico-químicas intermediárias entre gás e líquido [Taylor, 1996]. Existem diferentes trabalhos de revisão sobre as propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos [Rizvi et al., 1986; King & Catchpole, 1993; Brunner, 1994; Taylor, 1996; Clifford, 1999].

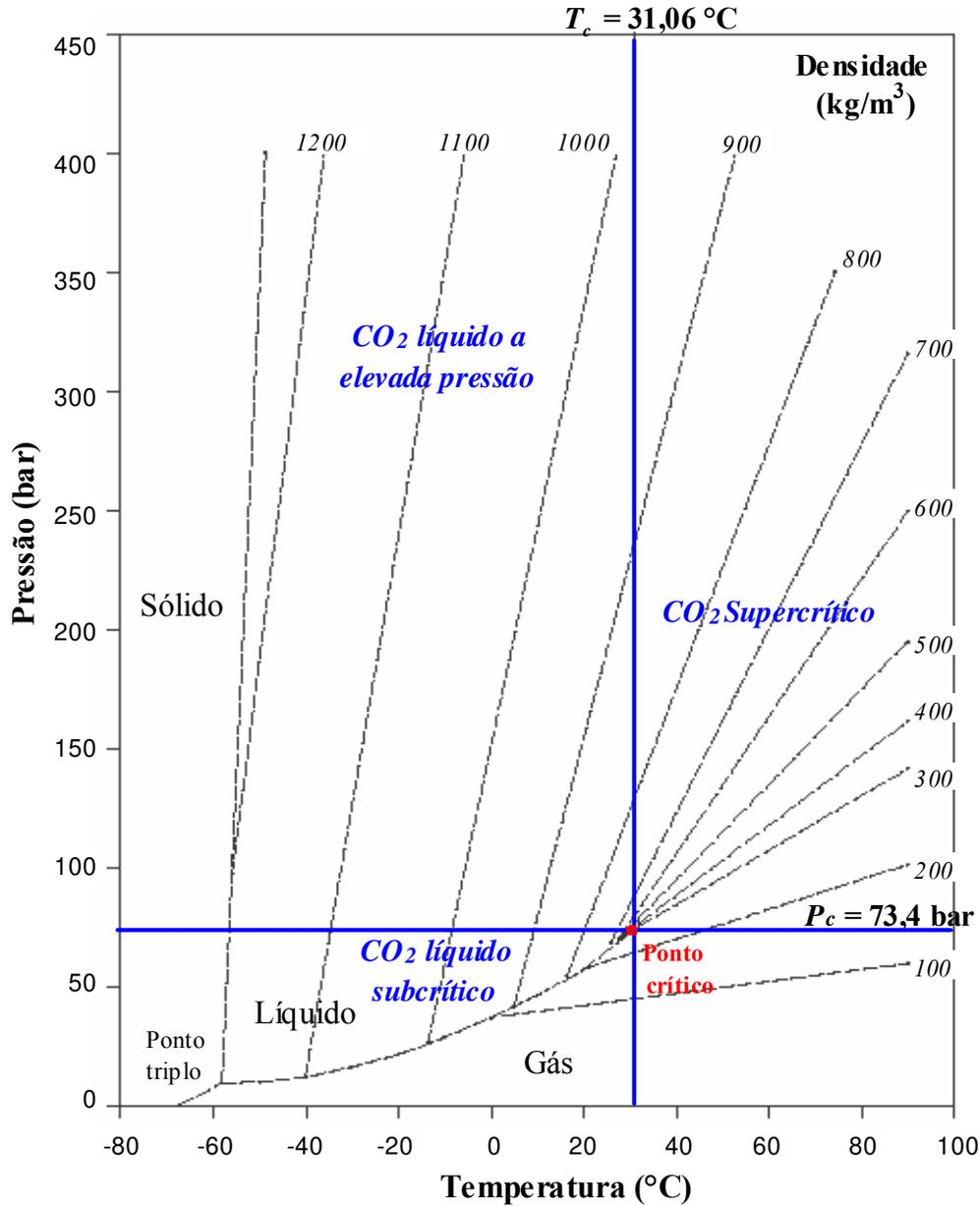


Figura 2-2. Diagrama pressão - temperatura do dióxido de carbono [adaptado de Brogle, 1982].

A densidade do fluido supercrítico aumenta com a pressão à temperatura constante, e diminui com a temperatura à pressão constante. Nas proximidades da temperatura crítica, estas variações acontecem rapidamente em um pequeno intervalo de pressão (aproximadamente 0,7 – 2 vezes acima da pressão crítica) [Clifford, 1999]. A temperaturas muito maiores que a temperatura crítica, altas pressões são requeridas para alcançar densidades de líquido. A densidade do fluido está relacionada com o poder de solvatação. Assim, o poder de solvatação de um fluido supercrítico aumenta com a densidade à temperatura constante e aumenta com a temperatura à densidade constante.

De maneira similar à densidade, os valores da viscosidade e difusividade também são dependentes da temperatura e pressão. As mudanças na viscosidade e difusividade são mais pronunciadas na região próxima ao ponto crítico.

À pressão constante, a viscosidade do fluido supercrítico diminui com a temperatura até um mínimo, e após, aumenta com a temperatura. Às temperaturas abaixo do mínimo o fluido apresenta viscosidade similar à do líquido; e às temperaturas acima do mínimo, o fluido apresenta viscosidade similar aos gases [Brunner, 1994].

Para temperaturas reduzidas entre 0,97 e 1,09, a difusividade diminui com a pressão e aumenta com a temperatura [Clifford, 1999].

As condições de viscosidade e difusividade similares aos gases, juntamente com as densidades similares aos líquidos e, combinadas com a solubilidade dependente da pressão têm proporcionado a força para a utilização dos fluidos supercríticos nos processos de extração [Taylor, 1996].

Além das propriedades físico-químicas, para se ter vantagem diante dos processos convencionais, um fluido supercrítico deve possuir baixa temperatura crítica, pequena entalpia de vaporização, alta volatilidade relativa, deve ser inerte, não tóxico, não corrosivo e não inflamável. Dos vários gases e líquidos utilizados na SFE (ver Tabela 2-1), o CO₂ tem se tornado o solvente mais utilizado por possuir estas características, além de encontrar-se em forma abundante e ser relativamente barato.

Tabela 2-1. Propriedades críticas de alguns fluidos [Clifford, 1999].

Solvente	T _c (°C)	P _c (bar)	Z _c	ω
Dióxido de carbono	31	74	0,274	0,239
Água	374	221	0,235	0,344
Etano	32	49	0,285	0,099
Etileno	9	50	0,280	0,089
Propano	97	43	0,281	0,153
Xenon	17	58	0,287	0,008
Amônia	132	114	0,244	0,250
Óxido nitroso	37	72	0,274	0,165
Fluorofórmio	26	49	0,259	0,260

Pelo anteriormente mencionado, a aplicação industrial da SFE deveria ser muito mais difundida do que é na atualidade. A razão de não ser assim, é o fato de que no desenvolvimento do projeto ainda existem algumas lacunas científicas. Na Tabela 2-2 são apresentadas as principais vantagens e desvantagens da SFE.

Tabela 2-2. Vantagens e desvantagens da SFE.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Para solventes como o CO₂, o uso de temperaturas amenas evita a degradação térmica do extrato, obtendo-se produtos com características próximas ao natural [Reverchon, 1997]; ▪ Flexibilidade das variáveis do processo. A diferentes condições de pressão e temperatura o fluido apresenta diferentes densidades, o que permite otimizar a seletividade [Brunner, 1994]; ▪ A seletividade possibilita a extração de diferentes classes de compostos. ▪ Finalizado o processo não é necessária uma etapa adicional de eliminação do solvente. Ela é conseguida pela simples redução da pressão e/ou aumento da temperatura [Brunner, 1994]; ▪ Na separação, diferentes classes de compostos podem ser obtidas através da redução de densidade em cascata, usando vários separadores em série; ▪ É considerado como um processo GRAS (<i>Generally Recognized As Safety</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ É preciso dispor de dados de equilíbrio para determinar a distribuição do(s) componente(s) de interesse nas distintas fases e estimar a possível composição do produto extraído [Sousa et al., 2002]. ▪ Na modelagem da extração, não existe um único modelo que possa representar todas as matrizes. Cada matriz vegetal se comporta de uma maneira particular nas mesmas condições operacionais; ▪ Do ponto de vista industrial, os métodos comuns de aumento de escala não são facilmente aplicáveis a processos em alta pressão; ▪ Os extratos obtidos podem possuir características diferentes dos obtidos pelos métodos convencionais. Isto influi na preferência do mercado por um determinado produto ao invés do produzido por esta “nova tecnologia”. ▪ Se as condições de separação da mistura extrato + solvente não são otimizadas, existe a possibilidade de perda de produtos junto com a corrente de solvente [Clifford, 1999]. ▪ O investimento relativamente alto devido à operação a alta pressão.

Contudo, a SFE é uma área de interesse de inúmeros pesquisadores ao redor do mundo. Os estudos são concentrados tanto no campo experimental como no campo teórico. No campo experimental, o estudo da influência das condições operacionais sobre o rendimento, composição química e cinética da extração tem recebido especial atenção. Os resultados foram comparados àqueles obtidos por métodos de extração convencionais. Dados do comportamento de equilíbrio de fases de sistemas reais a elevada pressão foram reportados recentemente. No campo teórico, os estudos foram concentrados no desenvolvimento de modelos matemáticos que representem a cinética de extração, e de modelos termodinâmicos que permitam a predição do comportamento de fases a elevadas pressões. Revisões da literatura mais detalhadas foram apresentadas por **Reverchon [1997]**, **Hauthal [2001]** e **Meireles [2003]**.

2.1.1. Etapas da SFE de Solutos de Matrizes Vegetais.

O processo de SFE é, conceitualmente, muito simples e o diagrama de operação é apresentado na Figura 2-3.

De forma geral, a SFE opera como segue:

- a. No extrator (*E*), o leito fixo é formado por partículas da matriz vegetal (sementes, folhas, flores). A matéria-prima deve ter entre 10 a 18 % (b.u. – base úmida) de água **[Meireles, 2003]**;
- b. O solvente é alimentado no extrator por meio de um compressor ou bomba (*B*) para alcançar a pressão de extração **[Brunner, 1994]**. Logo, o solvente e o extrator são aquecidos até a temperatura de extração desejada. Um sistema para adição de co-solvente (não mostrado) pode ser incorporado;

- c. Atingidas as condições de processo, as válvulas de redução de pressão são abertas para permitir o fluxo do solvente ao longo do leito, com a conseqüente extração do extrato. Para evitar o congelamento das válvulas, devido ao efeito Joule-Thompson, um sistema de aquecimento é necessário;
- d. A separação da mistura extrato + CO₂ acontece no separador (S). Na temperatura e pressão reduzidas, o extrato precipita no separador, enquanto que o solvente livre ou com baixo teor de extrato é recirculado no sistema, com estágios prévios de resfriamento e compressão. Para extração em pequena escala, a coleta pode ser realizada a pressão atmosférica e o solvente pode ser descartado ao ambiente. Em um processo de escala maior, o fluido que deixa o dispositivo de coleta será resfriado para recirculação e a coleta deve ser realizada em condições que diminuam os custos de recompressão do solvente [Brunner, 1994].

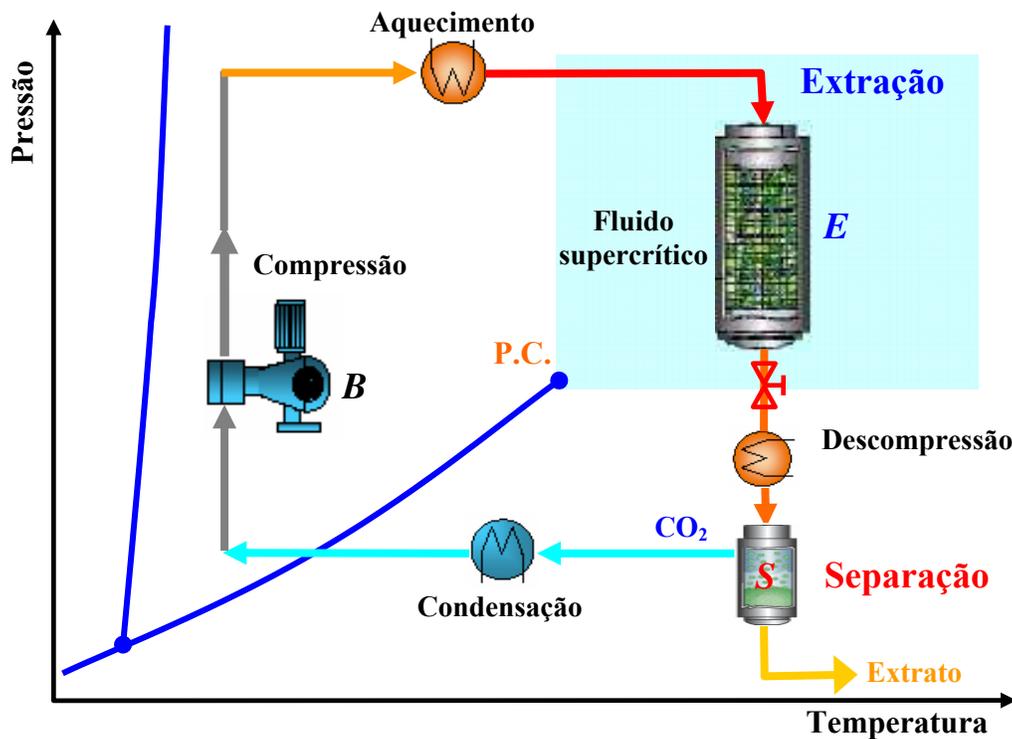


Figura 2-3. Diagrama do processo de Extração com Fluidos Supercríticos (SFE).

Se considerarmos os estágios nos quais a matriz vegetal (estrutura celulósica), extrato (mistura multicomponente) e solvente (CO₂) entram em contato, o processo pode ser dividido em duas etapas: (i) etapa de extração, na qual o sistema é formado pelo sistema ternário estrutura celulósica + extrato + CO₂ [Rodrigues et al., 2002], e (ii) etapa de remoção do solvente, onde consideramos a interação extrato + CO₂. Na etapa de extração, a temperatura e pressão são selecionadas para maximizar o rendimento nos compostos de interesse, enquanto que na etapa de separação o nível de solubilidade é reduzido para assegurar a precipitação do extrato e possibilitar a reciclagem do CO₂.

2.1.2. Etapa de Extração

O primeiro passo da SFE a partir de matrizes vegetais é otimizar as condições de temperatura e pressão para maximizar o rendimento nos compostos de interesse e minimizar a co-extração de compostos indesejáveis.

O estudo da etapa de extração permite realizar uma análise preliminar do custo de manufatura (COM). Para tal, duas informações experimentais são necessárias [Meireles, 2003]: (i) Rendimento global (X_o), e; (ii) Cinética de extração, determinada a partir das curvas globais de extração (OEC – *Overall Extraction Curves*).

2.1.2.1. Rendimento global (X_o)

O rendimento global (X_o) é definido como a máxima quantidade de material solúvel que pode ser extraído a uma determinada temperatura e pressão. Dados de rendimentos globais experimentais ou estimados, de diferentes matrizes vegetais, foram compilados recentemente por Meireles [2003].

O rendimento global é um parâmetro importante na modelagem matemática das OEC. Na maioria dos modelos, o rendimento global é um parâmetro de ajuste ou é estimado por extrapolação das curvas globais de extração. Por exemplo, na extração de óleo volátil¹ e oleoresina de camomila, o valor de X_0 foi considerando como sendo 10 % maior do que o rendimento obtido após 10 horas de processo [Povh et al., 2001].

Medidas experimentais de rendimento global são escassas na literatura. **Gómez et al. [1996]** estudaram os efeitos da temperatura e pressão sobre o rendimento global de óleo de sementes de uva. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada no estudo do rendimento global de extrato nos sistemas CO₂ + alho [Sass-Kiss et al., 1998] e CO₂ + cúrcuma [Began et al., 2000]. **Simándi et al. [2002]** aplicaram um planejamento fatorial completo na extração a partir de folhas de dente-de-leão usando dióxido de carbono. **Leal et al. [2003]** mediram o rendimento global do extrato do sistema CO₂ + alecrim nas pressões de 200 e 300 bar. **Rodrigues et al. [2003]** determinaram a influência da pressão sobre o rendimento global do sistema CO₂ + erva-doce na isoterma de 30 °C.

De forma geral, foi observado que o comportamento do rendimento global com a temperatura e pressão pode-se assemelhar ao da solubilidade de solutos em fluidos supercríticos. Na Figura 2-4 é apresentado um comportamento simples do rendimento global com a temperatura e pressão para o dente-de-leão [Simándi et al., 2002].

Na Figura 2-4 o rendimento global apresenta dois comportamentos. A pressões baixas é observado um fenômeno denominado de retrogradação, que consiste na diminuição da solubilidade com o aumento da temperatura a uma dada pressão. A elevadas

¹ Óleo volátil – Óleo de alta volatilidade extraído de plantas, principalmente um óleo essencial. Chamado também óleo etéreo (The American Heritage® Stedman's Medical Dictionary Copyright © 2002, 2001, 1995 by Houghton Mifflin Company <http://www.answers.com/topic/volatile-oil>, acessado em 23/02/05)

pressões, o efeito do aumento da pressão de vapor do extrato é mais importante do que o efeito da densidade do solvente. Assim, duas propriedades físico-químicas afetam o rendimento global do extrato em fluidos supercríticos: (i) Densidade do fluido supercrítico, e (ii) Pressão de vapor e / ou sublimação do extrato.

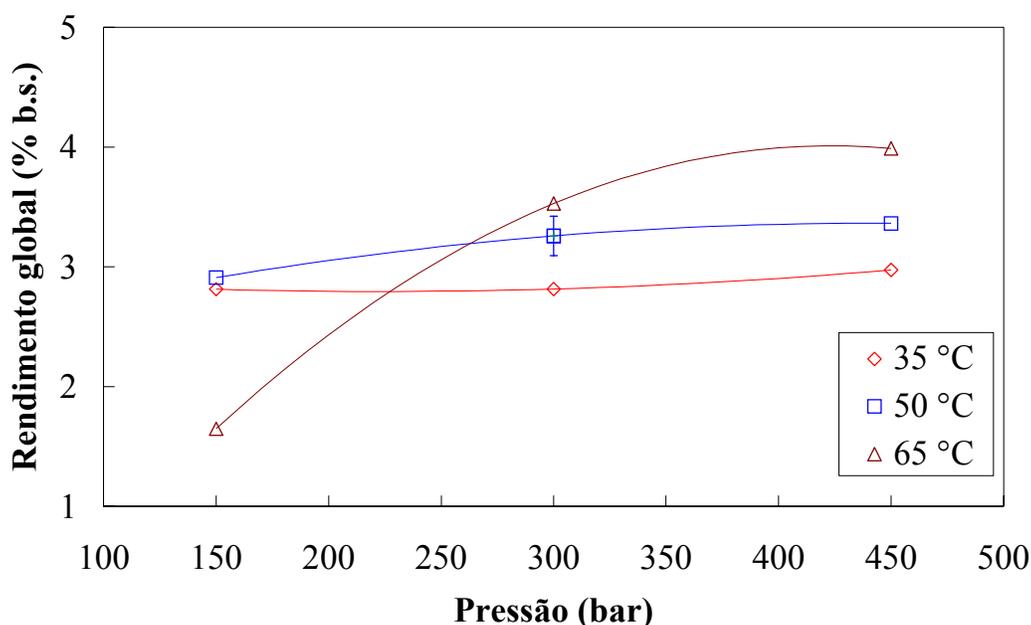


Figura 2-4. Isotermas de rendimento global para o sistema CO₂ + dente-de-leão [Simándi et al., 2002].

Entretanto, devido à complexidade da composição química dos extratos, comportamentos diferentes podem ser esperados, como o apresentado por **Leal et al. [2004]** para o sistema CO₂ + manjeriço (ver Figura 2-5). Na Figura 2-5 observa-se que entre 30 e 50 °C o rendimento global do extrato de manjeriço apresenta três pontos de inversão.

Portanto, o estudo do rendimento global permitirá visualizar o comportamento da solubilidade do extrato, indicando a temperatura e pressão na qual ocorre o ponto de inversão. Adicionalmente, proporcionará informações necessárias para a seleção das

condições operacionais de extração, e será usado como um dado experimental importante na aplicação dos diversos modelos matemáticos.

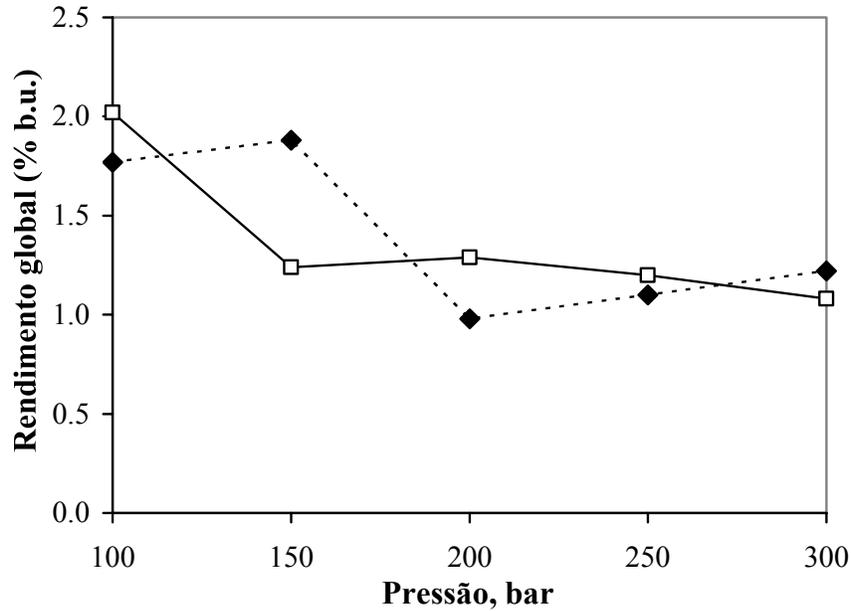


Figura 2-5. Rendimento global em extrato do sistema manjeriço + CO₂ com 1% H₂O (v/v) como cosolvente: 30 °C (— □ —) e 50 °C (- - ♦ - -) [Leal et al., 2004].

2.1.2.2. Cinética de Extração – Curvas Globais de Extração (OEC)

Ao longo do processo de extração, a taxa de obtenção de extrato não é uma função linear do tempo. Portanto, diversos comportamentos podem ser observados. Para classificá-los, é necessário visualizar as formas típicas da variação do grau de extração ($w(t)$) e da taxa de extração ($\Delta m_{extrato} / \Delta t$) com o tempo ou massa de solvente. O grau de extração é definido por:

$$w(t) = \frac{m_{extrato}(t)}{m_{extrato}(t \rightarrow \infty)} \quad (1)$$

Onde: $m_{extrato}(t)$ e $m_{extrato}(t \rightarrow \infty)$ são as massas totais extraídas no tempo $t = t$ e $t = \infty$, respectivamente.

A representação de $w(t)$ e $\Delta m_{extrato} / \Delta t$ em função do tempo ou massa de solvente utilizada na extração permite construir as conhecidas Curvas Globais de Extração (OEC – *Overall Extraction Curves*). De forma geral, dois tipos das OEC são observados na literatura, e estas são esquematizadas na Figura 2-6.

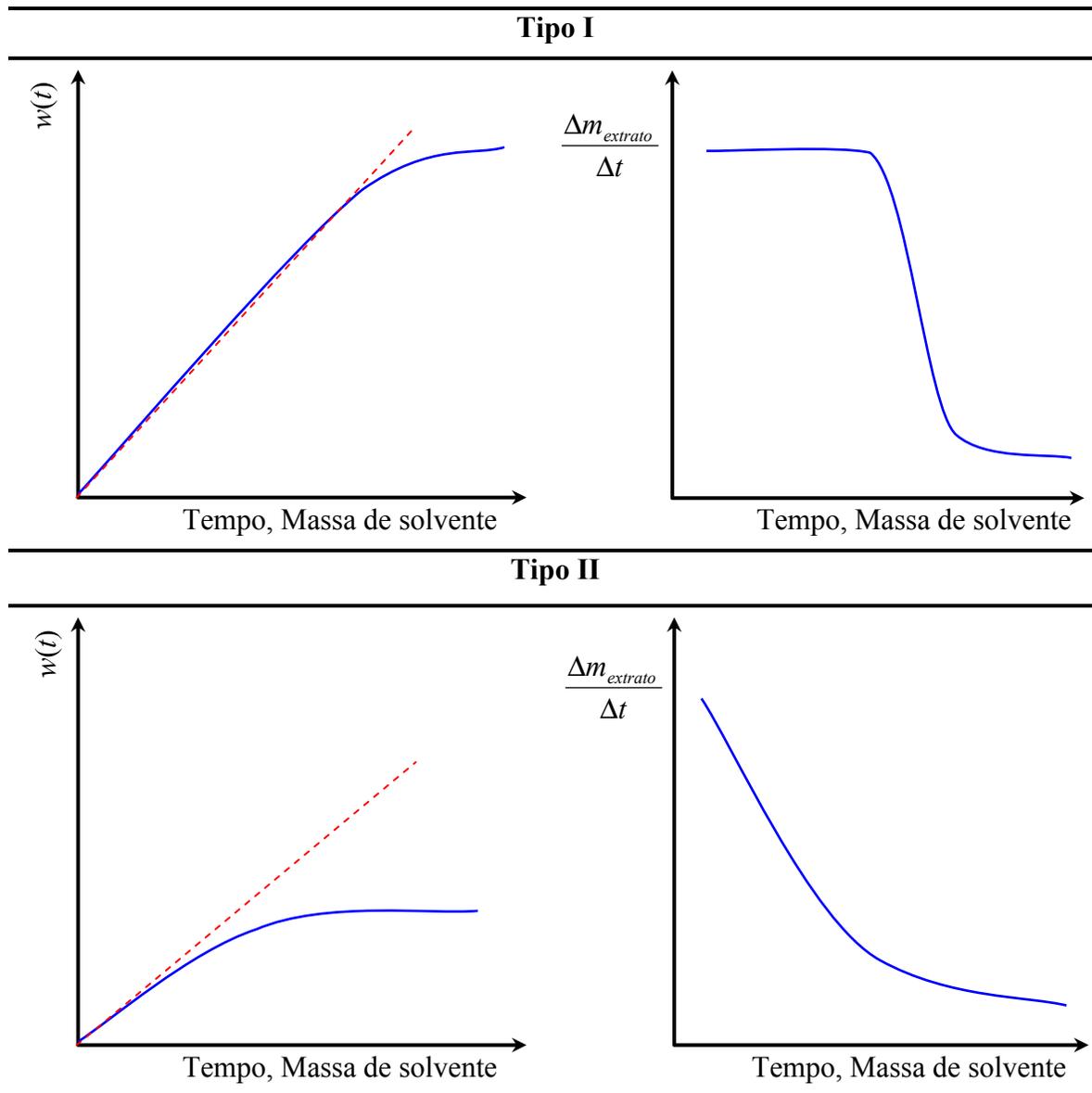


Figura 2-6. Formas típicas das curvas globais de extração (OEC) [Adaptado de Brunner, 1994].

As OEC do Tipo I representam a extração a partir de um substrato com alto teor inicial de extrato e / ou de fácil acesso ao solvente. Uma situação de regime permanente se desenvolve nos primeiros estágios, com valor constante de $\Delta m_{extrato} / \Delta t$, seguida por um período de regime transiente, na qual a taxa de extração diminui com o tempo. Exemplos deste tipo de OEC são: extração de óleos vegetais [Esquível et al. 1999a; Reverchon & Marrone, 2001] e extração de óleo volátil de cravo da Índia [Reverchon & Marrone, 1997; Rodrigues et al., 2002]. No segundo tipo, não existe um período inicial diferenciado da taxa de extração constante, prevalecendo o regime transiente desde o início da extração, com $\Delta m_{extrato} / \Delta t$ diminuindo progressivamente com o tempo. Este tipo de curva representa a extração de substratos com baixo teor de extrato e / ou que são de difícil acesso ao solvente. O Tipo II também corresponde à segunda parte da OEC Tipo I. Exemplos das OEC Tipo II são as extrações de cafeína de café [Brunner, 1994] e óleos voláteis de hortelã [Goto et al., 1993], pimenta-do-reino [Ferreira et al., 1999], camomila [Povh et al., 2001], gengibre [Zancan et al., 2002] e erva-doce [Rodrigues et al., 2003].

Para ambos tipos de OEC (embora não tão diferenciado na OEC Tipo II), a taxa de extração pode ser dividida em três períodos [Brunner, 1994; Ferreira et al., 1999]:

- a. Taxa de extração constante (*CER – Constant Extraction Rate*), onde a retirada de extrato da superfície externa da partícula ocorre a uma velocidade aproximadamente constante, por um fenômeno de convecção.
- b. Taxa de extração decrescente (*FER – Falling Extraction Rate*), onde começa a aparecer a resistência à transferência de massa na interface sólido – fluido. Neste período prevalecem tanto a transferência de massa por convecção como por difusão.

- c. Taxa de extração lenta, caracterizada pela retirada do extrato através do mecanismo de difusão.

Na Figura 2-7 é mostrada a curva global de extração de cravo-da-índia obtida por **Rodrigues et al. [2002]** representando os três períodos.

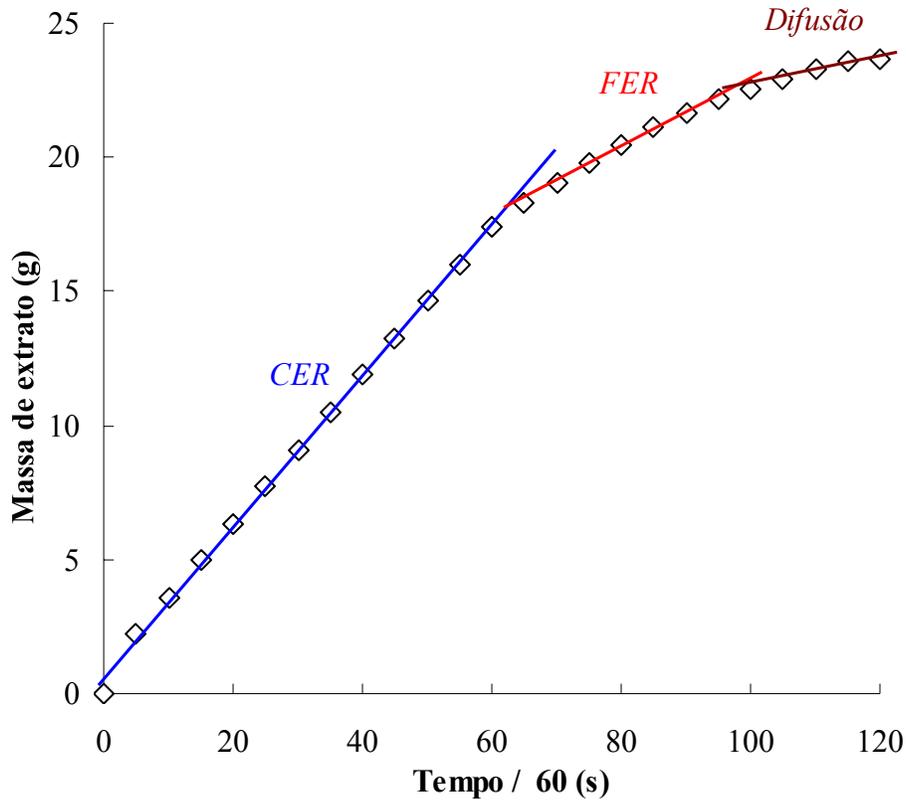


Figura 2-7. Curva global de extração de cravo-da-índia mostrando os três períodos de taxa de extração [adaptado de Rodrigues et al., 2002].

Uma vez que no período de taxa de extração constante (*CER*) consegue-se extrair entre 50 e 90 % do extrato total, a otimização do processo deveria ser focada neste período, e a modelagem poderia ser realizada considerando unicamente o fenômeno de convecção [Ferreira et al., 1999]. Povh et al. [2001], usando o modelo de Sovová [1994], propuseram uma metodologia para a modelagem das OEC a partir dos parâmetros cinéticos do período *CER* (ver Item 2.1.2.3)

Os parâmetros cinéticos do período *CER* são:

- a. Taxa de extração para o período *CER* (M_{CER});
- b. Duração do período *CER* (t_{CER}); e,
- c. Concentração de extrato na fase supercrítica na saída do leito (Y_{CER}), calculada como a razão entre M_{CER} e a vazão do solvente (Q_{CO_2}).

Os parâmetros cinéticos podem ser calculados através de um ajuste linear aos dados experimentais das OEC, segundo metodologia apresentada por **Rodrigues et al. [2002]**.

A determinação da duração do período *CER* (t_{CER}) é de fundamental importância na estimativa do custo de manufatura do processo. **Rosa & Meireles [2005]** demonstraram que após o t_{CER} , o custo de manufatura aumenta com o tempo.

A concentração de extrato na fase supercrítica na saída do leito (Y_{CER}) pode ser utilizada como uma estimativa da solubilidade (Y^*) do sistema ternário estrutura celulósica + extrato + CO_2 . Entretanto, a uma determinada condição de pressão e temperatura a verdadeira solubilidade poderia ser determinada na vazão crítica do solvente Q^* [**Rodrigues et al., 2002**].

2.1.2.3. Modelagem Matemática das Curvas Globais de Extração

A habilidade para prever as curvas globais de extração, conhecendo os parâmetros do processo, é de fundamental importância tanto no projeto como na otimização de uma planta industrial. A modelagem matemática é provavelmente a principal ferramenta de predição, que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo.

De forma geral, os modelos matemáticos reportados na literatura pertencem a uma das categorias: (i) modelos empíricos e (ii) modelos baseados no balanço de massa diferencial das fases fluida e sólida.

Na modelagem empírica as OEC podem ser representadas por equações do tipo exponencial [Barton et al., 1992]:

$$m_{extrato}(t) = F \cdot X_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{e^{k \cdot t}}\right) \quad (2)$$

ou Isoterma de Langmuir [Naik et al., 1989]:

$$m_{extrato}(t) = F \cdot X_0 \cdot \left(\frac{t}{k + t}\right) \quad (3)$$

Onde:

- $m_{extrato}(t)$: Massa de extrato no tempo t [kg]
 F : Massa de alimentação [kg]
 X_0 : Rendimento global [kg extrato / kg de material $\times 100$]
 t : Tempo [s]
 k : Parâmetro ajustável [s]

O modelo empírico representa bem as OEC com formato hiperbólico (Tipo II). Entretanto, nestes modelos, as relações de equilíbrio termodinâmico e de mecanismos de transferência de massa estão englobados no parâmetro k . Assim, a extensão do modelo para diferentes condições de extração, àquelas usadas no ajuste, não é aconselhável.

Nos modelos baseados no balanço de massa diferencial, a modelagem é realizada sobre uma seção do leito cilíndrico de diâmetro d_B e altura H_B . O leito é formado por partículas de matéria vegetal seca (umidade entre 10 a 18 % b.u. [Meireles, 2003]) por onde escoo o solvente, retirando o material solúvel.

Na Figura 2-8 é apresentado o esquema de um leito fixo de partículas. O balanço de massa é realizado nas duas fases do sistema [Brunner, 1994]: (i) na fase fluida, que envolve o solvente supercrítico e o extrato dissolvido e (ii) na fase sólida, que permanece dentro da coluna de extração e por onde escoo o fluido supercrítico.

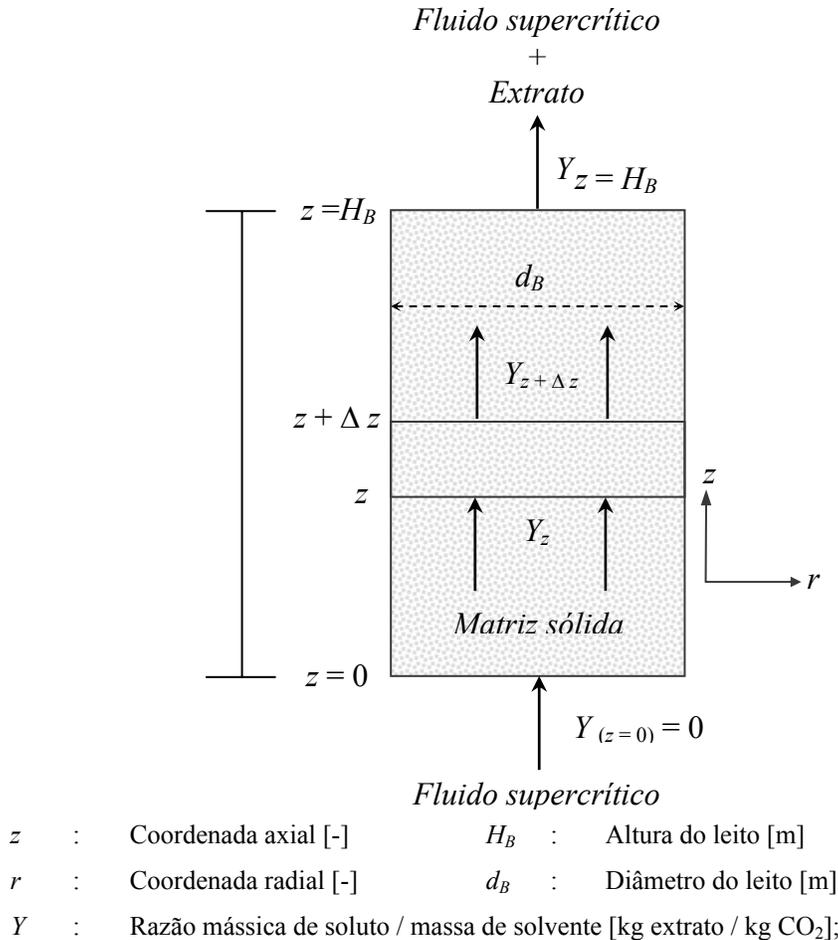


Figura 2-8. Leito fixo de partículas para o balanço de massa diferencial.

A transferência de massa acontece entre as duas fases, sendo o extrato transferido da fase sólida para a fase fluida pelos seguintes mecanismos: (a) Difusão na matriz sólida; (b) Transferência de massa pela interface sólido – fluido; (c) Convecção no fluido supercrítico; e, (d) Dispersão no fluido supercrítico.

Para este sistema, as equações de balanço de massa nas duas fases são [Meireles, 1999]:

$$\text{Fase Fluida:} \quad \frac{\partial Y}{\partial t} + \vec{u} \cdot \nabla Y = \nabla \cdot (D_{ay} \nabla Y) + \frac{J(X, Y)}{\varepsilon \cdot \rho_{CO_2}} \quad (4)$$

$$\text{Fase Sólida:} \quad \frac{\partial X}{\partial t} = \nabla \cdot (D_{ax} \nabla X) - \frac{J(X, Y)}{(1 - \varepsilon) \cdot \rho_s} \quad (5)$$

Onde:

X e Y : Razões mássicas (massa de extrato / massa de sólido livre de extrato para a fase sólida; e massa de extrato / massa de solvente para a fase fluida, respectivamente),

$\vec{u} \cdot \nabla Y$: Termo referente à convecção na fase fluida,

$\nabla \cdot (D_{ay} \nabla Y)$: Dispersão do extrato na fase fluida,

$\nabla \cdot (D_{ax} \nabla X)$: Difusão da mistura extrato + solvente ao interior da matriz sólida;

$J(X, Y)$: Termo referente à transferência de massa na interface sólido - fluido.

Em geral, se a razão entre o diâmetro do leito e o diâmetro das partículas é muito grande, os efeitos de transferência de massa axial predominam e, conseqüentemente, as transferências de massa radial e angular podem ser desprezadas [Brunner, 1994]. Com estas considerações, as equações de balanços de massa na fase fluida e sólida podem ser reduzidas a:

$$\text{Fase Fluida:} \quad \frac{\partial Y}{\partial t} + u \frac{\partial Y}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial z} \left(D_{ay} \frac{\partial Y}{\partial z} \right) + \frac{J(X, Y)}{\varepsilon \cdot \rho_{CO_2}} \quad (6)$$

$$\text{Fase Sólida:} \quad \frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[D_{ax} \frac{\partial X}{\partial z} \right] - \frac{J(X, Y)}{(1 - \varepsilon) \cdot \rho_s} \quad (7)$$

A diferença entre os diferentes modelos apresentados na literatura está na interpretação de cada fenômeno e a possibilidade de desprezar alguns deles. Dentre os modelos mais estudados estão os modelos de **Crank [1975]**, **Tan & Liou [1989]**, **Goto et al. [1993]**, e **Sovová [1994]**. Dentre eles, o modelo de **Sovová [1994]** tem o parâmetro termodinâmico (solubilidade) dissociado dos parâmetros de transferência de massa (k_{Ya} e k_{Xa}).

Povh et al. [2001], usando o modelo de **Sovová [1994]**, propuseram uma metodologia para a modelagem das OEC a partir dos parâmetros cinéticos do período *CER*. Os coeficientes de transferência de massa nas fases fluida (k_{Ya}) e sólida (k_{Xa}), puderam ser calculados utilizando as seguintes equações:

$$k_{Ya} = \frac{Z \cdot Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_S}{m_{SI} \cdot \rho_{CO_2}} \quad (8)$$

$$Z = -\ln \left[1 - \frac{M_{CER}}{Y^* \cdot Q_{CO_2}} \right] \quad (9)$$

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya} \cdot \rho_{CO_2} \cdot \Delta Y}{\rho_S \cdot \Delta X} \quad (10)$$

$$\Delta Y = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} \cdot S \cdot H_B \cdot k_{Ya}} \quad (11)$$

$$\Delta X = \frac{X_P + X_K}{2} \quad (12)$$

$$X_P = X_O - X_K \quad (13)$$

$$X_K = X_O - \frac{t_{CER} \cdot Y^* \cdot Z \cdot Q_{CO_2}}{m_{SI}} \quad (14)$$

$$m_{SI} = m_{SS} \cdot (1 - X_O) \quad (15)$$

Onde:

k_{Xa} : Coeficiente de transferência de massa na fase sólida [s^{-1}]

k_{Ya} : Coeficiente de transferência de massa na fase fluida [s^{-1}]

Q_{CO_2} : Vazão mássica de solvente [$kg\ CO_2 / s$]

ε : Porosidade [-]

ρ_s : Densidade do sólido ou densidade real [kg/m^3]

ρ_{CO_2} : Densidade do CO_2 [kg/m^3]

m_{SI} : Massa de sólido inerte [kg]

m_{SS} : Massa de sólido seco [kg]

M_{CER} : Taxa de transferência de massa do período *CER* [kg extrato / s]

t_{CER} : Duração do período *CER* [s]

Y^* : Solubilidade [kg extrato / kg CO_2]

S : Área transversal de transferência de massa [m^2]

H_B : Altura do leito [m]

X_P : Razão mássica de soluto / massa de soluto de fácil acesso [kg extrato / kg extrato de fácil acesso]

X_K : Razão mássica de soluto / massa de sólido não moído [kg extrato / kg sólido não moído]

X_O : Rendimento global [kg extrato / kg sólido livre de soluto]

Martinez et al. [2003] apresentaram um modelo para descrever sistemas multicomponentes, como os normalmente encontrados em extração supercrítica de extratos naturais. Entretanto, os parâmetros do modelo não estão relacionados com variáveis de processo, e sua aplicabilidade em outras condições operacionais ainda deve ser estudada.

Na Tabela 2-3 são apresentadas as equações dos diferentes modelos matemáticos usados para interpretar as OEC.

Tabela 2-3. Modelos matemáticos usados para representar as OEC

Modelo
<p>Crank [1975]</p> $m_{extrato}(t) = X_0 \cdot F \cdot \left(1 - \frac{X}{X_0}\right) \quad (16)$ $\frac{X}{X_0} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \cdot \pi \cdot D \cdot t}{r_p^2}\right)$
<p>Tan & Liou [1989]</p> $m_{extrato}(t) = \frac{A}{k_d} [1 - \exp(k_d \cdot B)] \cdot [\exp(-k_d \cdot t) - 1] \quad (17)$ $A = Q_{CO_2} \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho_{CO_2}} \quad (18)$ $B = \frac{\varepsilon \cdot H_B \cdot S \cdot \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2}} \quad (19)$
<p>Goto et al. [1993]</p> $m_{extrato}(t) = \frac{A \cdot [\beta / K + (1 - \beta)] X_0 \cdot \rho_s \cdot Q_{CO_2}}{\rho_{CO_2}} \times \left(\frac{\tau}{a_1} \left(\exp\left(a_1 \frac{t}{\tau}\right) - 1 \right) + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - \exp\left(a_2 \frac{t}{\tau}\right) \right] \right) \quad (20)$ $A = \frac{(1 - \varepsilon) \cdot \phi}{[\beta + (1 - \beta) \cdot K] \cdot \varepsilon \cdot (a_1 - a_2)} \quad (21)$ $a_1 = \frac{1}{2} \left(-b + \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (22)$ $a_2 = \frac{1}{2} \left(-b - \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (23)$ $b = \frac{\phi}{\beta + (1 - \beta) \cdot K} + \frac{1}{\varepsilon} + \frac{\phi \cdot (1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (24)$ $c = \frac{\phi}{[\beta + (1 - \beta) \cdot K] \cdot \varepsilon} \quad (25)$ $\phi = k_p \cdot a_p \cdot \tau \quad (26)$

continuação ...

Sovová [1994]

– $t \leq t_{CER}$

$$m_{extrato}(t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-Z)] \quad (27)$$

– $t_{CER} < t \leq t_{FER}$

$$m_{extrato}(t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - t_{CER} \exp(Z_w - Z)] \quad (28)$$

– $t > t_{FER}$

$$m_{extrato}(t) = m_{SI} \left\{ X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left[1 + \exp \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{m_{SI}} (t_{CER} - t) \right] \left(\frac{X_P}{X_0} \right) \right\} \quad (29)$$

$$Z = \frac{m_{SI} \cdot k_{Ya} \cdot \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s} \quad (30)$$

$$W = \frac{m_{SI} \cdot k_{Xa}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon)} \quad (31)$$

$$Z_w = \frac{Z \cdot Y^*}{W \cdot X_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp \left[\frac{W \cdot Q_{CO_2}}{m_{SI}} (t_{CER} - t) \right] - X_K}{X_0 - X_K} \right\} \quad (32)$$

$$t_{CER} = \frac{m_{SI} \cdot X_P}{Y^* \cdot Z \cdot Q_{CO_2}} \quad (33)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_{SI}}{Q_{CO_2} \cdot W} \ln \left[\frac{X_K + X_P \exp \left(\frac{W \cdot X_0}{Y^*} \right)}{X_0} \right] \quad (34)$$

Martinez et al. [2003]

$$m_{extrato}(t) = \frac{X_0 \cdot F}{\exp(b \cdot t_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(b \cdot t_m)}{1 + \exp[b \cdot (t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (35)$$

Onde:

- D : Coeficiente de difusão [m^2/s] - Parâmetro do modelo de **Crank [1975]**
- r_p : Raio da partícula [m]
- k_d : Constante de dessorção [s^{-1}] - Parâmetro do modelo de **Tan & Liou [1989]**
- S : Área transversal de transferência de massa [m^2]
- K : Constante de equilíbrio de adsorção do modelo de **Goto et al. [1993]**
- β : Porosidade das folhas [-]
- τ : Volume do leito / fluxo volumétrico do solvente [s]
- ϕ : Parâmetro relativo ao coeficiente de transferência de massa global [-] - Modelo de **Goto et al. [1993]**
- k_p : Coeficiente de transferência de massa global [s^{-1}]-Modelo de **Goto et al. [1993]**
- b : Parâmetro ajustável [s^{-1}] - Modelo de **Martinez et al. [2003]**
- t_m : Parâmetro ajustável [s] - Modelo de **Martinez et al. [2003]**.

2.1.2.4. Extração Fracionada

A coleta de extrato em vários intervalos de tempo pode ser considerada como um processo de fracionamento simples, uma vez que se obtêm frações de diferentes características. A pressões muito elevadas, a seletividade deste método diminui e a composição do extrato pode não variar com o tempo.

A extração fracionada é uma técnica alternativa que permite obter diferentes classes de compostos através de extrações sucessivas pelo aumento da densidade do CO_2 . **Reverchon [1997]** apresenta uma revisão de estudos referentes à extração fracionada. **Reverchon et al. [1999]** realizaram a extração fracionada de funcho em condições de 90 bar / 50 °C e 200 bar / 40 °C. **Simándi et al. [1999]** aplicaram esta técnica na extração de oleoresina de orégano a 40 °C, com pressões variando de 80, 120, 200, e 300 bar.

De forma geral, os extratos obtidos em temperaturas entre 40 e 50 °C e pressões menores que 100 bar foram similares àqueles obtidos por hidrodestilação. Os componentes de alta massa molecular foram extraídos com o aumento da densidade. As frações obtidas foram diferentes tanto em composição como aparência.

A desvantagem deste método é que requer mais que o dobro do tempo de extração e, conseqüentemente, da quantidade de solvente para obter um rendimento similar ao da separação fracionada [Simándi et al., 1999]. A separação fracionada é um outro método de fracionamento, onde a coleta é realizada usando separadores em série com redução da densidade em cascata. Detalhes sobre a separação fracionada são apresentados posteriormente no Item 2.1.3.2.

2.1.3. Etapa de Separação

Como mencionado anteriormente, a SFE a partir de matrizes vegetais ocorre em duas etapas: (i) a solubilização dos solutos pelo solvente supercrítico, no extrator; e (ii) a separação dos solutos do solvente supercrítico, no separador. Na etapa de extração, a temperatura e pressão são selecionadas para maximizar o rendimento nos compostos de interesse, enquanto que na etapa de separação a solubilidade é reduzida para assegurar a precipitação do extrato e a reciclagem do CO₂.

A importância da otimização da etapa de separação está relacionada, principalmente, aos custos de recompressão do solvente, derivados da redução de pressão necessária para a recuperação do extrato. Bravi et al. [2002] afirmam que quando se trabalha a pressões abaixo ou acima da pressão de separação “ótima”, o custo global do processo se eleva.

Diferentes esquemas de separação podem ser aplicados na SFE (ver Figura 2-9) [Reverchon, 1997]. Entretanto, os processos que devem ser preferencialmente utilizados devem ser aqueles que não introduzam substâncias adicionais ao extrato [Brunner, 1994].

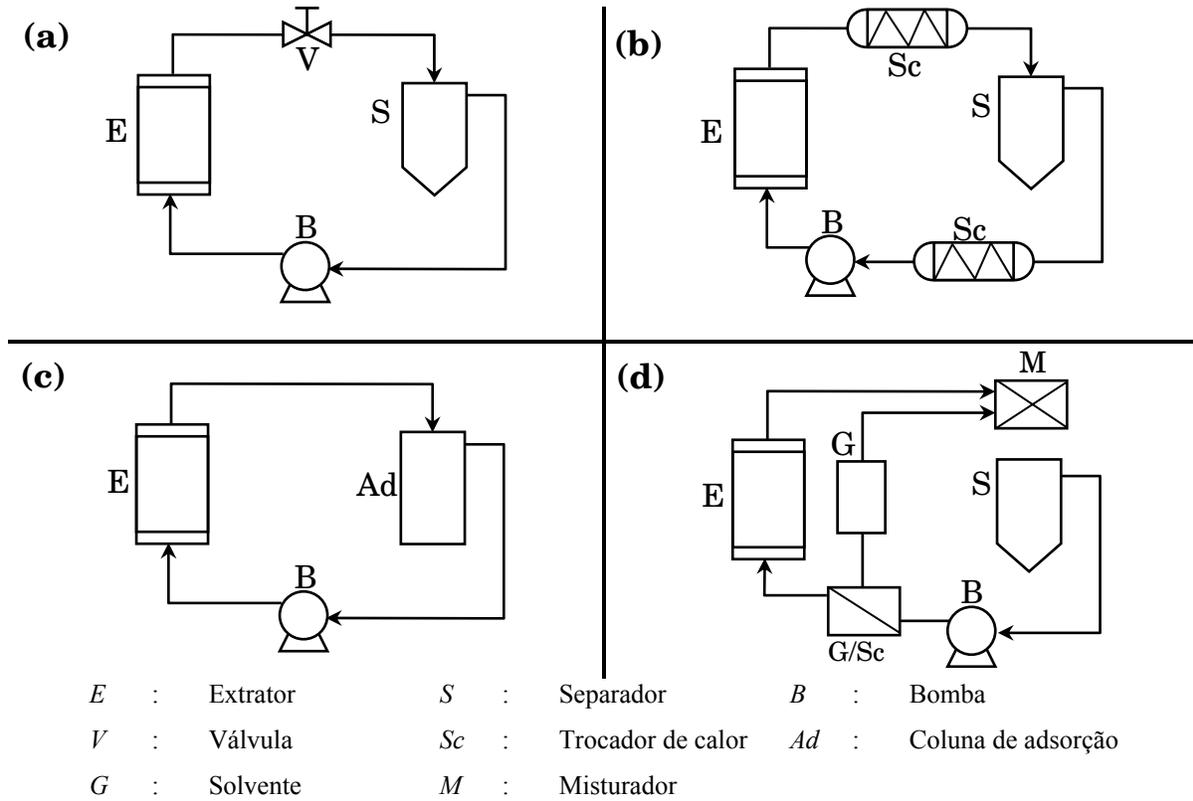


Figura 2-9. Diferentes processos de separação que podem ser implementados após a etapa de extração: (a) Descompressão , (b) Variação da temperatura; (c) Adsorção, (d) Adição antisolvente [adaptado de Reverchon, 1997].

O método de separação frequentemente empregado é a redução do poder de solvatação. Em geral, o poder de solvatação de um fluido aumenta com densidade e vice-versa. Densidades baixas podem ser conseguidas pela diminuição da pressão ou aumento da temperatura [Brunner, 1994]. Neste método, o fracionamento do extrato pode ser conseguido pela redução da densidade em cascata através de vários estágios de separação.

2.1.3.1. Modelagem da Etapa de Separação – Estado da Arte

Estudos sobre a etapa de extração são reportados amplamente na literatura, segundo recente revisão apresentada por **Meireles [2003]**. Entretanto, as referências relacionadas à etapa de separação são limitadas [**Sievers & Eggers, 1996; Sievers, 1998; Bravi, 2002**].

Embora tenham sido propostos métodos de recuperação sofisticados, tais como nanofiltração [**Sarrade et al., 1998**] e membranas de osmose reversa [**Spricigo et al., 2001**], a fim de reduzir custos de recompressão e garantir a maior eficiência do processo, o método freqüentemente empregado ainda é a simples redução da pressão e/ou aumento da temperatura.

Neste último, diferentes solubilidades a diferentes condições operacionais de temperatura e pressão podem ser usadas para separar o extrato dissolvido no CO₂. Entretanto, o problema associado é garantir a completa recuperação do extrato, pois, alguns componentes podem ser vaporizados junto com o CO₂. Uma quantidade apreciável de compostos foi recuperada da corrente de CO₂ que sai do separador nas extrações de oleoresina de gengibre [**Zancan et al., 2002**] e óleo volátil de erva-doce [**Rodrigues et al., 2003**].

De forma geral, a seleção das condições de separação é realizada de maneira arbitrária. Nos estudos em escala laboratorial, a separação é realizada em condições ambientais. Na desterpenação de óleo volátil de laranja foram usadas condições de 20 bar e 0 - 17 °C [**Espinosa et al., 2000**]. A pressão de 40 bar foi escolhida no estudo da avaliação econômica do processo de extração de óleo volátil de cravo-da-índia e gengibre, considerando que nesta condição é atingida uma completa separação de fases [**Rosa &**

Meireles, 2005]. A limitada informação sobre o comportamento de equilíbrio de fases para sistemas reais com CO₂ supercrítico [**Francisco & Sivik, 2002; Sousa et al., 2002; Souza et al., 2004]** pode ser identificada como uma das causas.

A discussão anterior se centra no equilíbrio termodinâmico, estabelecido pela temperatura e pressão. Entretanto, **Brunner [1994]** afirma que, além destes parâmetros, a vazão do solvente precisa ser considerada durante a separação. Com o aumento da vazão do solvente, a separação das fases pode ser incompleta e, conseqüentemente, aumentar a possibilidade de perda de produtos.

Logo, é evidente que a descrição fenomenológica da etapa de separação é difícil de ser estabelecida, pois além do equilíbrio de fases, determinado pela pressão e temperatura, precisa ser considerada a hidrodinâmica do processo, determinada pela vazão do solvente.

No campo da tecnologia de extração supercrítica aplicada a produtos naturais, a literatura não reporta referências sobre a modelagem dinâmica da etapa de separação [**Reverchon, 1997]**. Entretanto, **Camy & Condoret [2001]** apresentam dois modelos aplicados ao sistema formado por água + metanol + dimetilcarbonato + CO₂. No primeiro modelo, o separador é considerado como um único estágio teórico, onde a fase vapor que sai do separador e o soluto que permanece no separador estão em equilíbrio. No segundo, o equilíbrio é atingido imediatamente depois da válvula de expansão, e as fases vapor e líquida são completamente separadas. Os autores avaliaram ambos modelos e concluíram que, embora a modelagem não seja satisfatória, o segundo modelo parece descrever melhor o comportamento da mistura no separador.

2.1.3.2. Separação Fracionada

A separação fracionada consiste no fracionamento do extrato em dois ou mais separadores em série. Os separadores são operados a diferentes condições de temperatura e pressão, a fim de precipitar seletivamente os compostos extraídos.

A eficiência do processo de separação fracionada foi revisada por **Reverchon [1997]** e nos últimos anos tem recebido especial atenção por vários pesquisadores [**Simándi et al., 1998; Doneanu & Anitescu, 1998; Della-Porta et al., 1998; Rincón et al., 2000; Marongiu et al., 2001; Coelho et al., 2003; Marongiu et al., 2003**].

Na Tabela 2-4 são apresentados os diferentes sistemas que foram estudados utilizando a técnica de separação fracionada, assim como as condições operacionais em que foram realizados os experimentos.

De forma geral, um aumento na pressão do primeiro separador produz uma diminuição considerável da quantidade da fração coletada e, conseqüentemente, um aumento de rendimento no segundo separador. De fato, quando a fração volátil (óleo volátil) e pesada (ácidos graxos, cera, pigmentos) estão presentes na solução supercrítica, é possível usar dados de solubilidade para selecionar as melhores condições de separação.

Simándi et al. [1998] afirmam que a importância desta técnica está na possibilidade de obter produtos oleosos, que podem ser usados na indústria farmacêutica para melhorar a consistência dos produtos. A fração pesada do extrato serve como estabilizante do óleo essencial e retarda a volatilização das fragrâncias. Esta propriedade é muito útil no desenvolvimento de produtos de aromaterapia e cosméticos.

Tabela 2-4. Condições operacionais utilizadas na separação fracionada na SFE de diversas matrizes vegetais.

Matriz vegetal	Extrator		Separador 1		Separador 2		Referência
	P (bar)	T (°C)	P (bar)	T (°C)	P (bar)	T (°C)	
Alecrim – <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	100	40	80	10	25	0	Reverchon & Senatore [1992], <i>apud</i> Reverchon [1997]
Camomila – <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rausch	90	40	90	0	30	-5	Reverchon & Senatore [1994]
Lavanda – <i>Lavandula officinalis</i> Chaix & Kitt	90	48	80	-10	25	0	Reverchon et al. [1995]
Gengibre – <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	246	40	79 – 109	60	45	30	Yonei et al. [1995]
Orégano – <i>Origanum vulgare</i> L.	300	40	80	33 – 37	2	20 – 25	Simándi et al. [1998]
Angélica – <i>Angelica archangelica</i> L.	120	40	60	10	30	0	Doneanu & Anitescu [1998]
Cravo-da-índia – <i>Eugenia caryophyllata</i> Thun.	90	50	90	-10	15	10	Della-Porta et al. [1998]
Anis-estrelado – <i>Illicium verum</i> Hooker filius	90	50	90	-10	15	10	Della-Porta et al. [1998]
Segurelha – <i>Satureja hortensis</i> L.	120	40	80	0	15	-5	Esquível et al. [1999b]
Levístico – <i>Levisticum officinale</i> Koch.	250	40	80	50	50 – 55	20 – 30	Dauksas et al. [1999]
Funcho – <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	300	40	70 – 90	20 – 40	20	20	Simándi et al. [1999]
<i>Cistus ladanifer</i> L.	90	40	70	-10	20	-10	Rincón et al. [2000]
Alecrim – <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	350	50	200	50	20	25	Señoráns et al. [2000]
Menta – <i>Mentha spicata</i> ssp. insularis	90	50	90	-5	15 – 20	15 – 21	Marongiu et al. [2001]
Sálvia – <i>Salvia desoleana</i>	90	50	90	-5	15 – 20	15 – 21	Marongiu et al. [2001]
Funcho – <i>Foeniculum vulgare</i> ssp. piperitum	90	40	80	-10	20	-10	Coelho et al. [2003]
<i>Inula viscosa</i> L. Aiton e <i>I. graveolens</i> L. Desf	90	50	90	-5	15 – 20	15 – 21	Marongiu et al. [2003]

2.2. As Matrizes Vegetais

Durante as últimas décadas temos contemplado o crescente interesse pela utilização de substâncias de origem vegetal, considerando que muitas plantas produzem um amplo espectro de metabólitos que são de interesse para as indústrias farmacêutica, cosmética e/ou alimentícia [Cowan, 1999; Phillipson, 2001; Suffredini et al., 2004]. O Brasil tem um papel muito importante neste campo, já que possui a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 55000 espécies conhecidas, dentre um total de 350000 a 550000 aproximadamente [Nodari & Guerra, 2001].

No presente trabalho quatro matérias-primas foram estudadas: *Artemisia annua* L., *Cordia verbenacea* DC, *Ocimum selloi* Benth e *Foeniculum vulgare* Miller

2.2.1. *Artemisia annua* L.

A *Artemisia annua* é a principal fonte natural para produção de artemisinina, composto que demonstrou ser um antimalárico altamente efetivo contra cepas de *Plasmodium spp* [Newton & White, 1999].

Malária é uma doença parasitária, causada por uma das quatro espécies do protozoário intracelular: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*; que é transmitida pela picada do mosquito fêmea da espécie Anopheles. Esta doença está presente em aproximadamente 90 países, distribuídos na África, Ásia, Oceania, e América Central e do Sul [Bloland, 2001], infectando entre 300 a 500 milhões de pessoas por ano, com uma mortalidade de 0,7 a 2,7 milhões. Setenta e cinco por cento delas são crianças africanas, com uma média de uma morte a cada 12 segundos [Phillips, 2001]. Dados recentes

mencionam que aproximadamente 40 % da população mundial – principalmente pessoas que vivem em países pobres e em regiões tropicais e subtropicais – estão propensos a contrair esta doença [WHO, 2002].

No Brasil, durante a década de 50, os programas de controle desta doença conseguiram reduzir os cinco milhões de casos reportados anualmente em quase 100 vezes. Vinte anos depois, com o desenvolvimento da região Amazônica, trabalhadores rurais, garimpeiros e outros migraram para estas regiões, muitos deles sem nenhuma imunidade contra a malária, fizeram com que esta doença se espalhasse novamente [Marques, 1987]. Assim, no início da década de noventa foram reportados mais de 700 mil casos e o Brasil passou a ter a maior população exposta à infecção de malária em toda América [Phillips, 2001]. Atualmente, esta doença ocasiona no Brasil mais de 600 mil novos casos ao ano [PAHO, 2002].

Apesar dos inúmeros esforços para controlar esta doença, a malária continua sendo um problema de saúde pública. O desenvolvimento e espalhamento de cepas de parasitas resistentes a diversas drogas têm sido identificados como os principais fatores deste ressurgimento e são os principais desafios para seu controle e eliminação [Bloland, 2001]. Duas possibilidades são propostas para atacar este problema [Olliaro et al., 2001]: i) desenvolver drogas que tenham diferentes ou novos modos de ação (um processo longo), ou, ii) usar combinações de drogas que tenham modos independentes de ação, como, por exemplo: mefloquina + artemisinina.

A artemisinina, sintetizada pela planta *Artemisia annua* L., demonstrou ser um antimalárico altamente efetivo contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a diversas drogas [Newton & White, 1999; WHO, 1998]. Inúmeras rotas de síntese química

da artemisinina têm sido apresentadas na literatura [Webster & Lehnert, 1994]; porém, a demanda de trabalho intensiva e a falta de potencial para produção em escala maior fazem com que esta técnica seja economicamente inviável. Somado a isto, está o fato da falta de interesse por parte das indústrias para produzir drogas antimaláricas, uma vez que a população que sofre esta doença se encontra em países pobres [Ensenrik, 2000]. Da mesma forma, os métodos de cultura de tecidos, células e órgãos não parecem oferecer uma alternativa de produção viável [Dhingra et al., 1999; Delabays et al., 2001]. Assim, na atualidade, a planta de *A. annua* é a principal fonte viável para extração de artemisinina [Dhingra et al., 1999; Delabays et al., 2001]. Através de técnicas de melhoramento genético foi possível obter cepas de *A. annua* com alto rendimento em artemisinina [Magalhães et al., 1987; Delabays et al., 2001].

A *A. annua* é uma planta nativa da Ásia e leste da Europa, que nos últimos anos vem sendo cultivada em vários países da Europa, América do Norte, Central e Sul. Os primeiros cultivos no Brasil foram realizados pela Divisão de Agrotecnologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP [Magalhães et al., 1987]. Na Figura 2-10 pode ser observada uma foto da planta de *A. annua* cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP.

Com a descoberta de que a *A. annua* sintetiza a artemisinina, inúmeros trabalhos têm sido dedicados ao estudo da composição química e de outras aplicações funcionais dos extratos. Dentro dos estudos de aplicações funcionais, a literatura reporta que os extratos etanólicos de *A. annua* apresentam atividade antiulcerogênica [Dias et al., 2001; Foglio et al., 2002] e antitumoral [Zheng, 1994] e o óleo volátil obtido por hidrodestilação apresenta atividade repelente [Tripathi et al., 2000], antibacteriana e antioxidante [Juteau et al.,

2002]. Na indústria de alimentos, as folhas da *A. annua* têm sido empregadas como meio de crescimento do fungo *Aspergillus*, usado na fabricação de vinho [Plants for a Future, 2002]. O óleo volátil da *A. annua* é usado como saborizante de bebidas alcoólicas, i.e. vermouth [Plants for a Future, 2002]. Na indústria de cosméticos, o óleo volátil é usado como base para produção de perfumes e sabonetes, devido a seu odor agradável, refrescante e ligeiramente balsâmico [Plants for a Future, 2002].



Figura 2-10. Foto da planta *Artemisia annua* L cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP (Híbrido Ch x Viet 55, em estado de corte) [Divisão de Agrotecnologia / CPQBA-UNICAMP].

O método convencional de extração da artemisinina a partir da *A. annua* é por solventes orgânicos. A extração com fluidos supercríticos (SFE), principalmente usando CO₂, surge como uma alternativa de processo. Trabalhos sobre extração de artemisinina

com CO₂ supercrítico (CO₂-SC) são reportados na literatura, sendo a maioria estudos de comparação dos rendimentos com a extração com solventes orgânicos [Kohler et al., 1997a; Kohler et al., 1997b; Hao et al., 2002] e extração com solventes orgânicos auxiliada com microondas [Hao et al., 2002]. Um recente trabalho divulgou dados da solubilidade de artemisinina em CO₂-SC [Xing et al., 2003]. A importância da aplicação da tecnologia supercrítica foi demonstrada pelo melhoramento de velocidade de dissolução de preparados de dispersões sólidas de artemisinina obtida através do processo RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) [Van Nijlen et al., 2003].

2.2.2. *Cordia verbenacea* DC – Erva baleeira

A *Cordia verbenacea* DC é uma espécie que cresce de forma natural em quase todo o Brasil entre 500 a 1000 metros sobre o nível do mar [Angely, 1970, citado por Bayeux et al., 2002] e é conhecida popularmente como Erva baleeira [Lorenzi & Matos, 2002]. Um estudo sobre produção de mudas de *C. verbenacea* foi apresentado por Figueira et al. [2001]. Segundo Lorenzi & Matos [2002], esta planta foi erroneamente apresentada como *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. Na Figura 2-11 pode ser observada uma foto da planta de *C. verbenacea*.

Na medicina popular a *C. verbenacea* é usada como antiinflamatória, anti-artrítica, analgésica, tônica e anti-ulcerogênica [Panizza, 1998; citado por Lorenzi & Matos, 2002]. As infusões das folhas de *C. verbenacea* são tomadas para o tratamento do reumatismo, artrite reumatóide, gota, dores musculares e da coluna, prostatites, neuralgias e contusões [Panizza, 1998; citado por Lorenzi & Matos, 2002]. Estudos farmacológicos têm validado sua atividade antiinflamatória [Sertié et al., 1988; Sertié et al., 1990]. Um

recente trabalho mostrou que os extratos das folhas apresentam atividade antiedematogênica (antiinflamatória) e antinociceptiva (analgésica) [Bayeux et al., 2002].



Figura 2-11. Foto da planta *Cordia verbenacea* DC cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP [Divisão de Agrotecnologia / CPQBA-UNICAMP].

O óleo volátil de *C. verbenacea*, obtido por hidrodestilação, inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermitis*) e leveduras (*Candida albicans*, *C. dublinensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. Stellatoidea*, *C. tropicallis*, *Cryptococcus* sp.) [Carvalho Jr. et al., 2004].

Lins et al. [1980] identificaram os flavonóides sitosterol, 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (artemetina) e 5,6'-dihidroxi-3,3',4',6,7-pentametoxiflavona. O flavonoide artemetina tem sido identificado como o composto responsável da atividade antiinflamatória da *C. verbenacea* [Sertié et al., 1990]. Entretanto, Bayeux et al. [2002] demonstraram que esta atividade não pode ser atribuída somente a este flavonóide. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato bruto obtido das folhas de *C. verbenacea*.

Van de Velde [1982] revelaram a presença de dois triterpenos: Cordialina A e B. No óleo volátil de *C. verbenacea* foram citados três componentes majoritários: 1,8 cineol, β -cariofileno e α -humuleno [**Magalhães et al., 2002**]. Um recente trabalho mostrou que, além destes componentes, no óleo volátil são encontrados o α -pineno, β -felandreno, β -elemeno, β -gurjuneno, alo-aromadendreno, biciclo-germacreno, δ -cadineno, espatulenol e epoxi-cariofileno [**Carvalho Jr. et al., 2004**].

Os métodos empregados na extração de solutos de *C. verbenacea* têm sido a extração com etanol [**Lins et al., 1980; Sertié et al., 1988**], acetona [**Sertié et al., 1990**] e diclorometano [**Bayeux et al., 2002**]. Seu óleo volátil tem sido extraído por arraste a vapor [**Magalhães et al., 2002**] e hidrodestilação [**Carvalho Jr. et al., 2004**]. A literatura não reporta dados sobre extração de solutos de *C. verbenacea* por SFE.

2.2.3. *Ocimum selloi* Benth

O gênero *Ocimum* (Labiatae) é uma fonte de óleos essenciais das indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Dentre as espécies mais conhecidas temos: *O. americanum*, *O. basilicum*, *O. kilimandscharicum*, *O. suave*, e *O. selloi*. O *Ocimum selloi* Benth (= *O. sellowi* e *O. carnosum*) é uma planta nativa que cresce nas regiões sudeste e sul do Brasil. Os nomes comuns desta planta são “Pepper Basil”, “anis”, “alfavaquinha”, “atroveran”, “elixir paregórico”. Na Figura 2-12 é apresentada uma foto da planta de *O. selloi*.

Esta planta é usada na medicina tradicional como analgésico, antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatório [**Vanderlini et al., 1994**, citado por **Morais et al., 2002**].



Figura 2-12. Foto da planta *Ocimum selloi* Benth [The Herb Society of America]²

Seu óleo volátil é caracterizado pela presença majoritária de anetol [Morais et al., 2002]. Entretanto, Martins et al. [1997] indicaram a existência de outras variedades quimicamente distintas, ricas em estragol (metil chavicol) e metil eugenol. Adicionalmente o *O. selloi* pode ser considerado como uma fonte relativamente alta de vitamina B-6 (2,32 mg / 100g) [Leonard et al., 2001].

O método convencional de extração do seu óleo volátil é a hidrodestilação [Morais et al., 2002; Martins et al., 1997]. A literatura não reporta dados sobre a extração de solutos de *O. selloi* com CO₂ supercrítico.

² www.herbsociety.org, Acessado em 15 de março de 2005

2.2.4. *Foeniculum vulgare* Mill. – Funcho

O funcho é uma planta nativa do mediterrâneo e que na atualidade é cultivada na Inglaterra, Alemanha, China, Vietnã e América do Sul. Os extratos de funcho são usados na medicina popular como antiinflamatório, antiespasmódico, diurético, expectorante, laxativo, analgésico, estimulante da mobilidade gastro intestinal e para o tratamento de perturbações nervosas. Na indústria de alimentos é usado para dar sabor a várias comidas, como sopas, molhos, conservas, bolos, etc. [Farrell, 1985 e Hänsel et al., 1993, citados por Simándi et al., 1999].

Os principais componentes do óleo volátil obtido por hidrodestilação são anetol e fenchona [Moura et al., 2005].

Diversos estudos são reportados na literatura sobre a aplicação da tecnologia supercrítica na extração de solutos de funcho. A cinética e modelagem matemática do processo de extração foram reportadas por Reverchon et al. [1999]. Uma vez que o funcho é formado por dois grupos de compostos bem diferenciados (óleo volátil e ácidos graxos), vários estudos têm se concentrado no fracionamento do extrato utilizando as técnicas de extração fracionada [Reverchon et al., 1999] e separação fracionada [Simándi et al., 1999; Coelho et al., 2003].

No Brasil só existe uma referência sobre extração de solutos de funcho por extração supercrítica [Moura et al., 2005]. O autor se concentrou na etapa de extração do processo, através da determinação de isotermas de rendimento global e da influência da relação altura / diâmetro sobre a cinética de extração. Adicionalmente, um modelo matemático foi selecionado para representar as OEC.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-Prima

Quatro matérias-primas foram utilizadas no presente trabalho: *Artemisia annua* L, *Cordia verbenacea* DC (Erva baleeira), *Ocimum selloi* Benth e *Foeniculum vulgare* (funcho).

Folhas moídas de *A. annua* (híbrido Ch x Viet 55), cultivadas no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Biológicas, Químicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP (Campinas, São Paulo), foram usadas. As folhas foram secas em um secador de bandejas com circulação de ar (Fabbe-Primar, modelo 170, Piracicaba, São Paulo) a 40 °C e moídas em um moinho de facas (Stephan, modelo UM 140, São Paulo, São Paulo). As partículas foram colocadas em sacos de plástico e armazenadas em freezer doméstico (-10 °C) (Brastemp, modelo 7501, São Paulo, São Paulo). A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando um agitador de peneiras (Bertel, modelo 1868, Caieiras, São Paulo); peneiras de mesh padrão da série Tyler 24 a 100 (Mentor, E.U.A.), foram usadas. Para as extrações, partículas de 48 - 60 mesh foram selecionadas.

As folhas de *C. verbenacea*, cultivadas também no Campo Experimental do CPQBA - UNICAMP (Campinas, São Paulo), foram fornecidas em dois lotes. O primeiro lote, fornecido no mês de abril de 2002, foi acondicionado da mesma forma que a *A. annua*.

Partículas de 24 a 60 mesh foram selecionadas. Este lote foi usado para os estudos de rendimento global e extração por métodos convencionais (hidrodestilação e extração com etanol). O segundo lote, fornecido no mês de agosto, foi formado pela planta inteira sem a raiz. As condições de secagem foram as mesmas utilizadas para a *A. annua*. Para a realização dos experimentos as folhas foram separadas dos galhos manualmente. As folhas foram armazenadas em freezer doméstico (Metalfrio, modelo HC-4, São Paulo, São Paulo) a -10 °C. A moagem foi realizada em um moinho de facas (Marconi, modelo MA340, Piracicaba, São Paulo). A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando um agitador de peneiras (Bertel, modelo 1868, Caieiras, São Paulo); peneiras de mesh padrão da série Tyler 24 a 100 (Mentor, E.U.A.), foram usadas para os ensaios. Partículas de 48 - 60 mesh foram selecionadas. Este lote foi usado para o estudo da extração fracionada e cinética do processo.

Folhas secas de *O. selloi* provenientes da Fazenda Experimental de Lageado - Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP (Botucatu, São Paulo), foram usadas. As folhas foram colocadas em sacos de plástico e armazenadas em geladeira doméstica a -10 °C (Brastemp, modelo 7501, São Paulo, São Paulo). A moagem foi realizada em um moinho de facas (Tecnal, modelo TE-631/1, Piracicaba, São Paulo) a 20500 rpm por 15 segundos. A peneiragem foi realizada em um agitador de peneiras (Bertel, modelo 1868, Caieiras, São Paulo). A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando peneiras de 24 a 100 mesh (W.S. Tyler, Mentor, E.U.A.). Para os ensaios foram usadas partículas de 32 a 80 mesh.

Sementes de funcho, correspondente à classificação funcho seco, provenientes da Fazenda Experimental de Lageado - Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP

(Botucatu, São Paulo), foram usadas. As sementes foram colocadas em sacos de plástico e armazenadas ao ambiente. A moagem foi realizada em um moinho de facas (Marconi, modelo MA340, Piracicaba, São Paulo). A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando um agitador de peneiras (Bertel, modelo 1868, Caieiras, São Paulo); peneiras de mesh padrão da série Tyler 16 a 100 (Mentor, E.U.A.), foram usadas. Partículas de 32 a 60 mesh foram selecionadas para os ensaios.

3.2. Caracterização da Matéria-Prima

A umidade dos materiais foi determinada pelo método de destilação com solvente imiscível xilol [Jacobs, 1973]. Este método é recomendado para produtos que contem óleo volátil. Na Figura 3-1 é mostrada a unidade experimental para determinação da umidade.

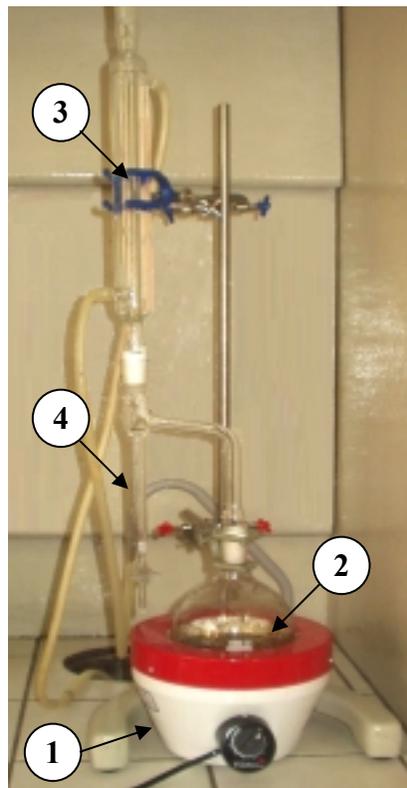


Figura 3-1. Unidade experimental para determinação da umidade.

O sistema é constituído por: (1) manta de aquecimento com controlador de voltagem (Fisaton, modelo 102, São Paulo, São Paulo); (2) balão de 250 mL; (3) condensador e (4) tubo coletor.

Para as determinações, 15×10^{-3} kg de material moído e 85 – 90 mL de xilol (P.A., Ecibra, São Paulo, São Paulo), foram colocadas no balão de 250 mL. O sistema foi levado à ebulição com auxílio da manta de aquecimento. O sistema foi deixado em refluxo por 5 horas. Após resfriamento, mediu-se o volume de água condensada no tubo coletor, assim como sua correspondente temperatura.

A umidade do material, expressada em percentagem (% base úmida) foi calculada por:

$$Umidade = \frac{V \cdot \rho_{H_2O}}{F} \times 100 \quad (36)$$

Onde: V = volume de água condensada (m^3); ρ_{H_2O} = densidade da água na correspondente temperatura (kg/m^3); F = massa de alimentação (kg).

O diâmetro médio de Sauter foi usado para caracterizar o tamanho das partículas:

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^n m_i \times d_i^3}{\sum_{i=1}^n m_i \times d_i^2} \quad (37)$$

Onde: d_m = diâmetro médio (m); m_i = massa de material retida na i -ésima peneira (kg); d_i = abertura nominal da i -ésima peneira (m).

A densidade aparente (ρ_{ap}) do leito foi calculada usando a massa de alimentação (F) e o volume do leito (V_B). A densidade real das partículas (ρ_s) foi determinada por picnometria com gás hélio pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. A porosidade (leito + partículas) foi calculada com as densidades aparente e real.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_s} \quad (38)$$

3.3. Extração por Hidrodestilação

3.3.1. Unidade Experimental - Aparelho Schilcher

Para a extração do óleo volátil foi utilizado o sistema mostrado na Figura 3-2. O sistema é formado por (1) manta de aquecimento (Fisaton, modelo 102, São Paulo, São Paulo); (2) balão de 2000 mL; (3) aparelho Schilcher.

A matéria-prima é colocada no balão **A**, junto com a água. A mistura é levada à ebulição com ajuda da manta de aquecimento. O vapor da água + óleo volátil sobe pelo tubo **B** e condensam no condensador **C**. A mistura cai no tubo coletor **D** e lentamente enche o tubo. Quando a mistura alcança o topo do tubo **E**, a água retorna para dentro do balão **A**. O óleo volátil possui menor densidade que a água e este fica na parte superior do tubo.

Após algumas horas de extração – considerando que o volume do óleo volátil não varia - o processo é interrompido e o óleo volátil é separado da água por diferença de densidade. Esta separação pode ser realizada com ajuda de uma centrífuga.

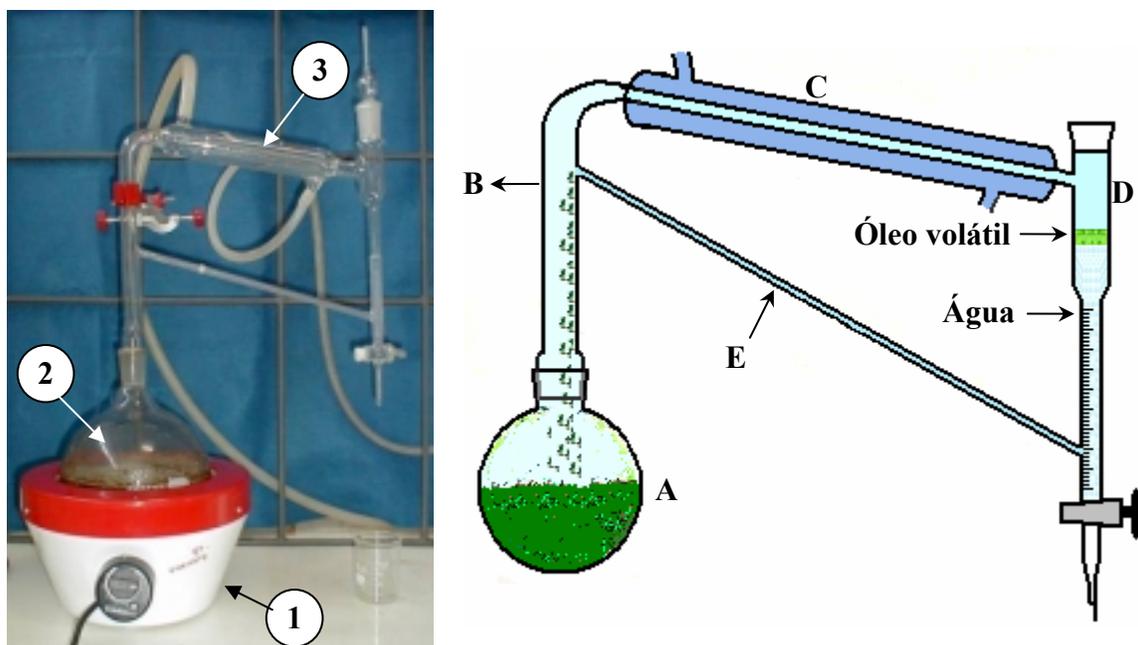


Figura 3-2. Unidade experimental para extração por Hidrodestilação (Aparelho Schilcher).

3.3.2. Procedimento Experimental

No balão de vidro de 2000 mL, foram adicionadas $80,3 \times 10^{-3}$ kg de material moído e 1500 mL de água destilada. O sistema foi levado à ebulição com auxílio da manta de aquecimento (Fisaton, modelo 102, São Paulo, São Paulo). Posteriormente, o vapor foi condensado. O tempo de refluxo foi de 3 horas para a *A. annua* e 4 horas para a *C. verbenacea*. O óleo volátil foi recolhido com uma pipeta Pasteur, depositado em tubo de centrífuga e submetido à centrifugação (Heraus Instruments, modelo Biofuge-haemo, Osterode, Alemanha), a 10000 rpm por 10 min, para garantir a completa separação de fases (óleo volátil + água). Finalmente, o óleo foi recolhido com ajuda da pipeta Pasteur e depositado em frasco âmbar, pesado e armazenado em geladeira para posterior análise.

3.4. Extração com Solventes Orgânicos

3.4.1. Unidade Experimental - Extrator Soxhlet

A unidade experimental para extração com solvente orgânico é apresentado na Figura 3-3. O sistema é constituído por (1) manta de aquecimento com controlador de voltagem (Fisaton, modelo 102, São Paulo, São Paulo); (2) balão de 500 mL (onde é colocado o solvente); (3) aparelho Soxhlet (onde é colocada a matéria-prima) e (4) condensador.

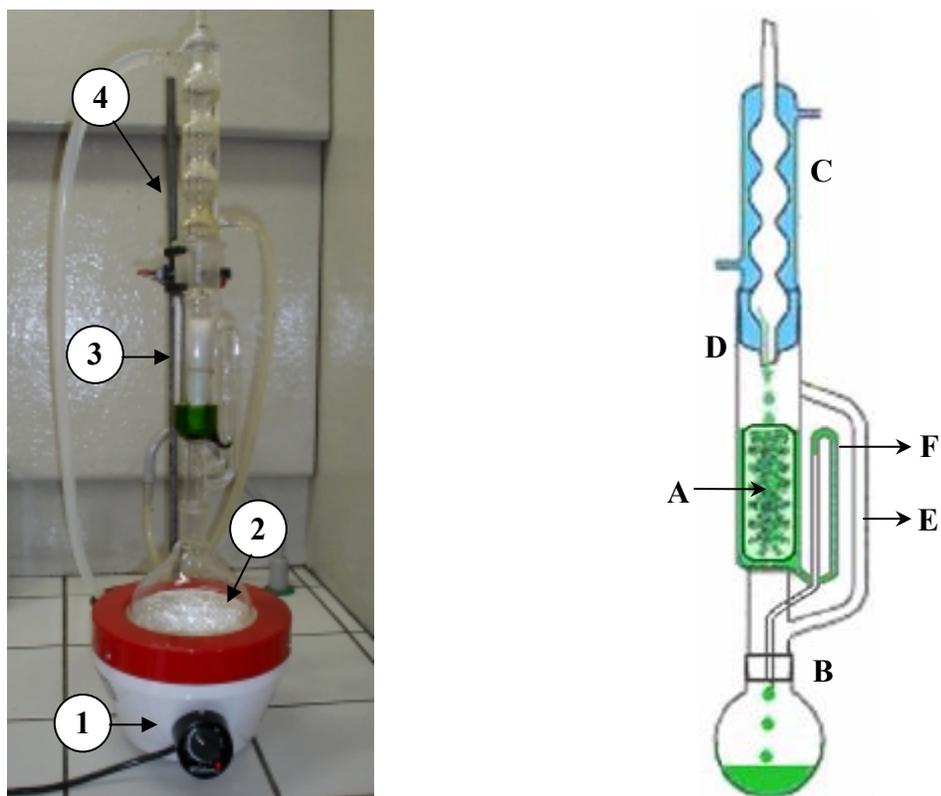


Figura 3-3. Unidade experimental de extração com solvente orgânico (Aparelho Soxhlet).

A amostra deve ser colocada em um cilindro de papel filtro **A** (confeccionado manualmente), e este, por sua vez, inserido no tubo interno (**D**) do aparelho Soxhlet. O extrator é ajustado ao balão **B** (contendo o solvente) e ao condensador de refluxo **C**. A solução é levada à fervura. O vapor do solvente sobe pelo tubo **E**, condensa no condensador **C**, o solvente condensado cai no cilindro **A** e lentamente enche o corpo do tubo **D**. Quando o solvente alcança o topo do tubo **F**, é sifonado para dentro do balão **B**. O processo é repetido automaticamente até que a extração se complete. Após algumas horas de extração, o processo é interrompido e o extrato é concentrado por evaporação do solvente utilizado.

3.4.2. Procedimento Experimental

A extração no sistema do tipo Soxhlet foi realizada usando hexano (grau HPLC, Lote 41123118, Merck, Jacarepaguá, Rio de Janeiro) ou etanol (PA, Lote K30916283231, Merck, Darsmtadt, Alemanha) como solventes. Oito gramas de material moído foram empacotadas em papel de filtro Qualy n° 42 (JProlab, Curitiba, Paraná) e acondicionado no aparelho Soxhlet. No balão foram colocados 200 mL de solvente. O solvente foi levado à ebulição com o auxílio da manta de aquecimento (Fisaton, modelo 102, São Paulo, São Paulo). O tempo de refluxo foi de 4 horas. Após o resfriamento, o solvente foi evaporado em um sistema de rotaevaporação (Heildoph Instruments, modelo Laborota 4001, Viertrieb, Alemanha) com controlador de vácuo (Heildoph Instruments, modelo Rotovac Control, Viertrieb, Alemanha). Finalmente, o extrato foi pesado (Sartorius, modelo A200S, Goettingen, Alemanha) e armazenado em geladeira para posterior análise.

3.5. Extração com Dióxido de Carbono Supercrítico

3.5.1. Unidades de Extração Supercrítica

3.5.1.1. Unidade Spe-ed SFE

Na Figura 3-4 é apresentada a unidade de extração supercrítica Spe-ed SFE (Applied Separation, Allentown, E.U.A.).

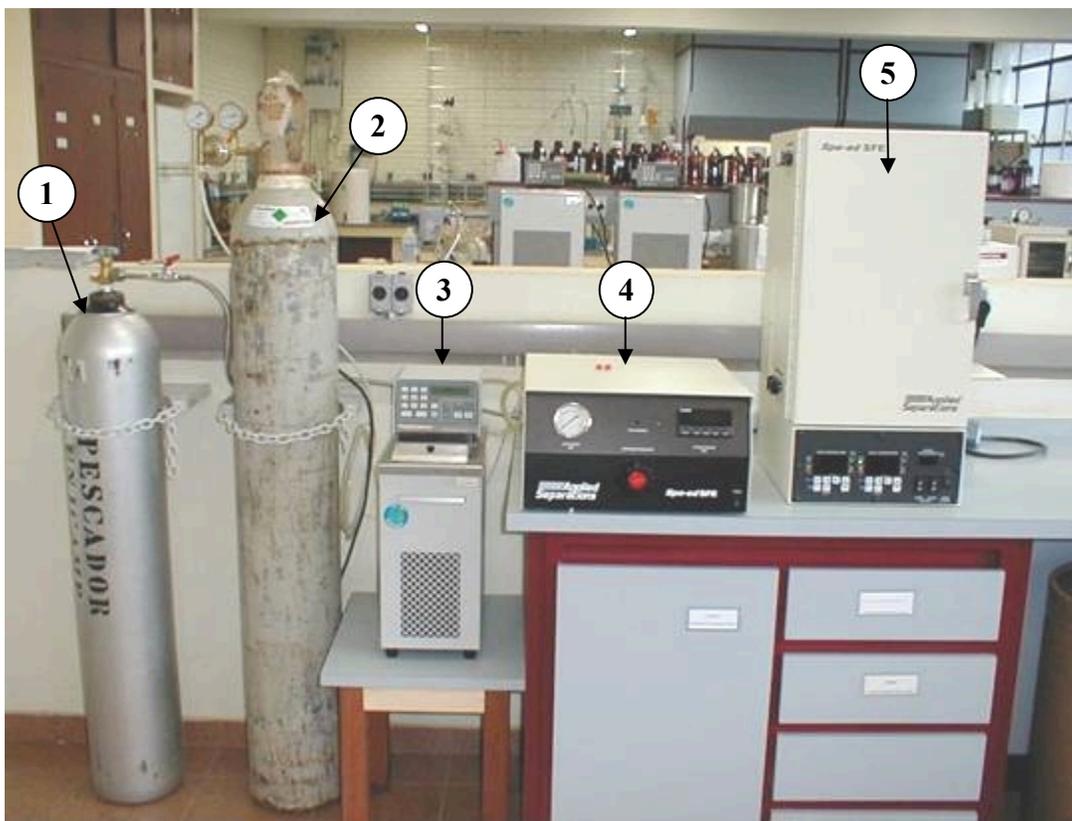


Figura 3-4. Unidade de extração supercrítica Spe-ed SFE (Applied Separation, Allentown, E.U.A.).

A unidade consta de: (1) cilindro de N_2 (Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo); (2) cilindro de CO_2 (99,0 % de pureza, Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo); (3) banho de resfriamento (PolyScience, modelo 9110, Niles, E.U.A.); (4) Unidade

de bombeamento (Applied Separation, Allentown, E.U.A.); e (5) Unidade de controle de temperatura (Applied Separation, Allentown, E.U.A.).

Para os ensaios, duas colunas de extração foram utilizadas: a) 5 ml (Thar Designs, CL 1165, Pittsburgh, E.U.A.) e b) 300 mL (Thar Designs, CL 1373, Pittsburgh, E.U.A.) (ver Figura 3-5).

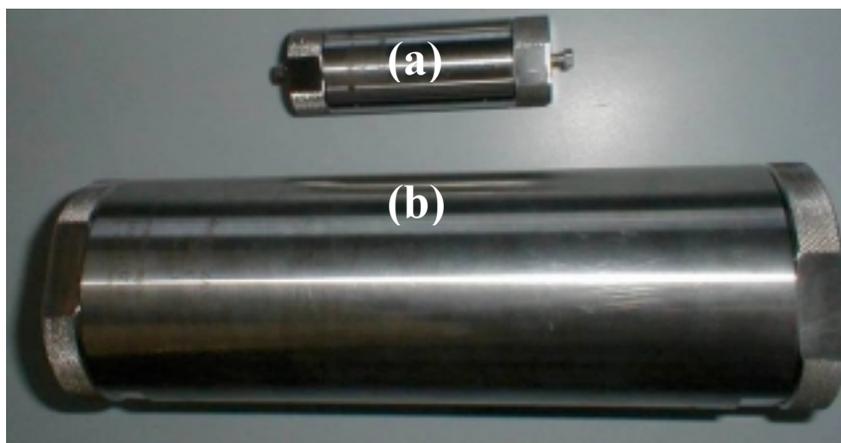


Figura 3-5. Colunas de extração usadas na unidade de extração Spe-ed SFE: a) 5 ml (Thar Designs, CL 1165, Pittsburgh, E.U.A.) e b) 300 mL (Thar Designs, CL 1373, Pittsburgh, E.U.A.).

A seqüência de operação da unidade de extração é descrita a seguir:

- a. Ligar o banho de resfriamento de CO₂ duas horas antes do início do experimento. A máxima temperatura do banho deve ser -5 °C;
- b. Verificar se as válvulas de entrada, saída (micrométrica) e de ventilação estão fechadas;
- c. Abrir os cilindros de nitrogênio (N₂) e dióxido de carbono (CO₂). O nível da válvula reguladora do cilindro de N₂ deverá estar no máximo em 7 kgf/cm²;
- d. Ligar as unidades de controle de temperatura e de bombeamento;

- e. Conectar a coluna de extração devidamente preenchida com a matéria-prima na linha da unidade de controle de temperatura. O termopar deverá estar conectado junto à coluna de extração;
- f. Aumentar a pressão com o botão regulador da unidade de bombeamento até a pressão de operação;
- g. Abrir a válvula de alimentação de CO₂ para pressurizar a coluna e o sistema;
- h. Regular o set-point da unidade de controle de temperatura para a temperatura de operação;
- i. Atingidas as condições operacionais, regular o set-point da temperatura da válvula micrométrica para evitar o congelamento pelo efeito Joule-Thompson;
- j. Quando estas condições forem atingidas, abrir a unidade de controle de temperatura para verificar se não tem vazamento na coluna de extração ou na linha do sistema;
- k. Conectar o(s) frasco(s) coletor(es);
- l. Abrir a válvula de saída e micrométrica vagarosamente, até conseguir a vazão de solvente de operação;

Cabe mencionar que antes do início desta seqüência operacional a coluna de extração deverá estar corretamente preenchida com o material e os frascos de coleta deverão estar pesados.

Finalizado o experimento, o seguinte procedimento deve ser seguido:

- a. Fechar a válvula de alimentação de CO₂. As válvulas de saída e micrométrica deverão ficar abertas para despressurizar a coluna.

- b. Desligar os botões de aquecimento da unidade de controle de temperatura;
- c. Esperar resfriar o sistema e retirar a coluna de extração;
- d. Limpar a linha de saída com etanol e/ou acetato de etila;
- e. Desligar a bomba do banho de CO₂;
- f. Diminuir a pressão com o botão regulador da unidade de bombeamento até a pressão do cilindro;
- g. Desligar as unidades de bombeamento e controle de temperatura;
- h. Fechar os cilindros de CO₂ e de N₂.

3.5.1.2. Unidade LASEFI_TUHH

Na Figura 3-6 é apresentada a unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH. Este equipamento foi construído no âmbito do projeto de cooperação internacional “Supernat” (CNPq / Brasil e DLR / Alemanha), entre o Laboratório de Separações Físicas LASEFI / DEA / FEA - UNICAMP (Campinas, Brasil) e a Arbeitsbereich Thermische Verfahrenstechnik - Technical University Hamburg Harburg (TUHH) (Hamburgo, Alemanha). O equipamento foi descrito anteriormente por **Zetzi et al. [2003]**.

A unidade consta de: (1) cilindro de CO₂ (99,0 % de pureza, Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo); (2) cilindro de N₂ (Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo); (3) válvula reguladora da pressão V1; (4) banho de resfriamento (PolyScience, modelo 9510, Niles, E.U.A.); (5) coluna de extração; e (6) colunas de separação. Os banhos de refrigeração e de aquecimento se encontram na parte posterior do equipamento.

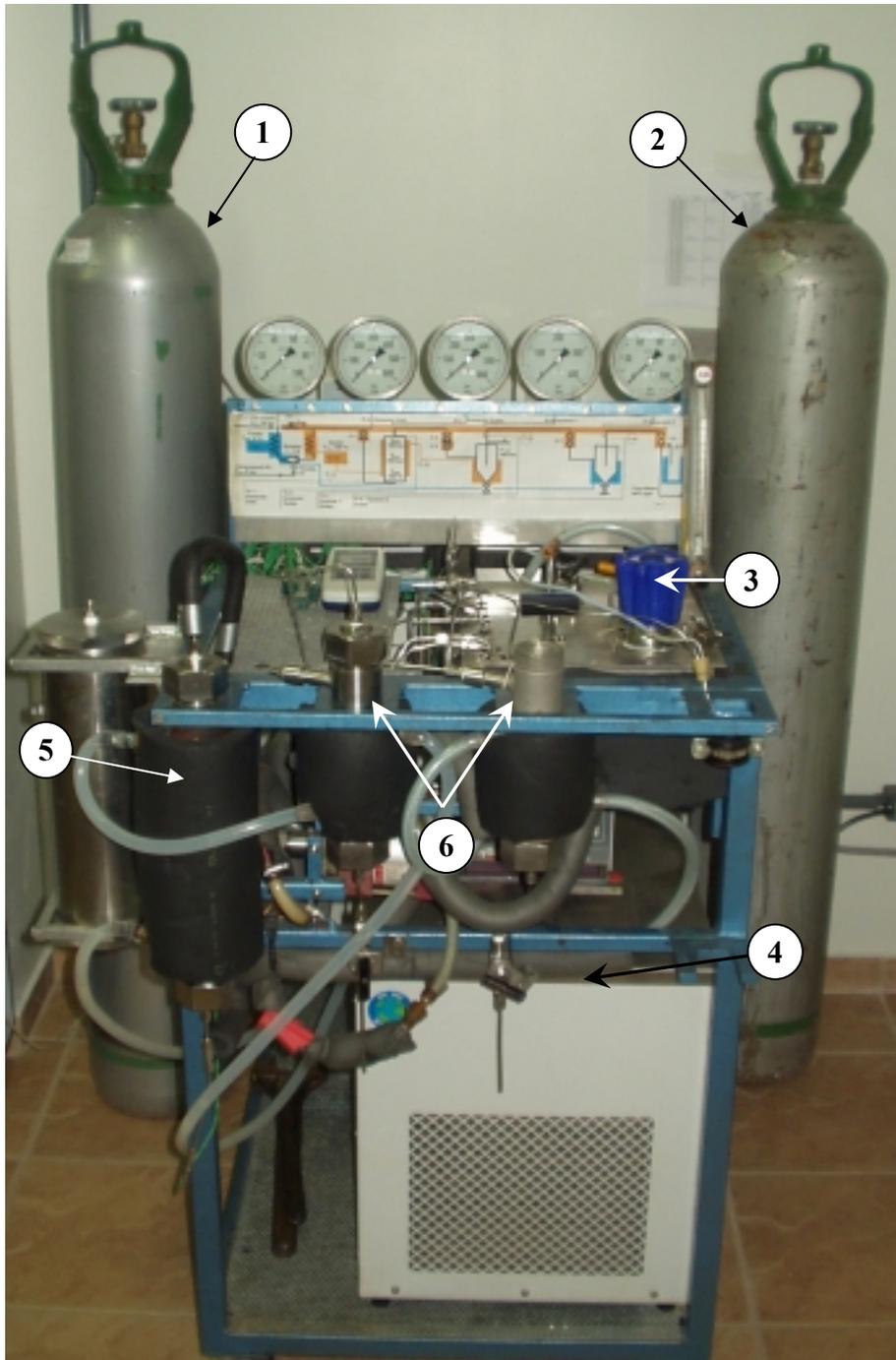
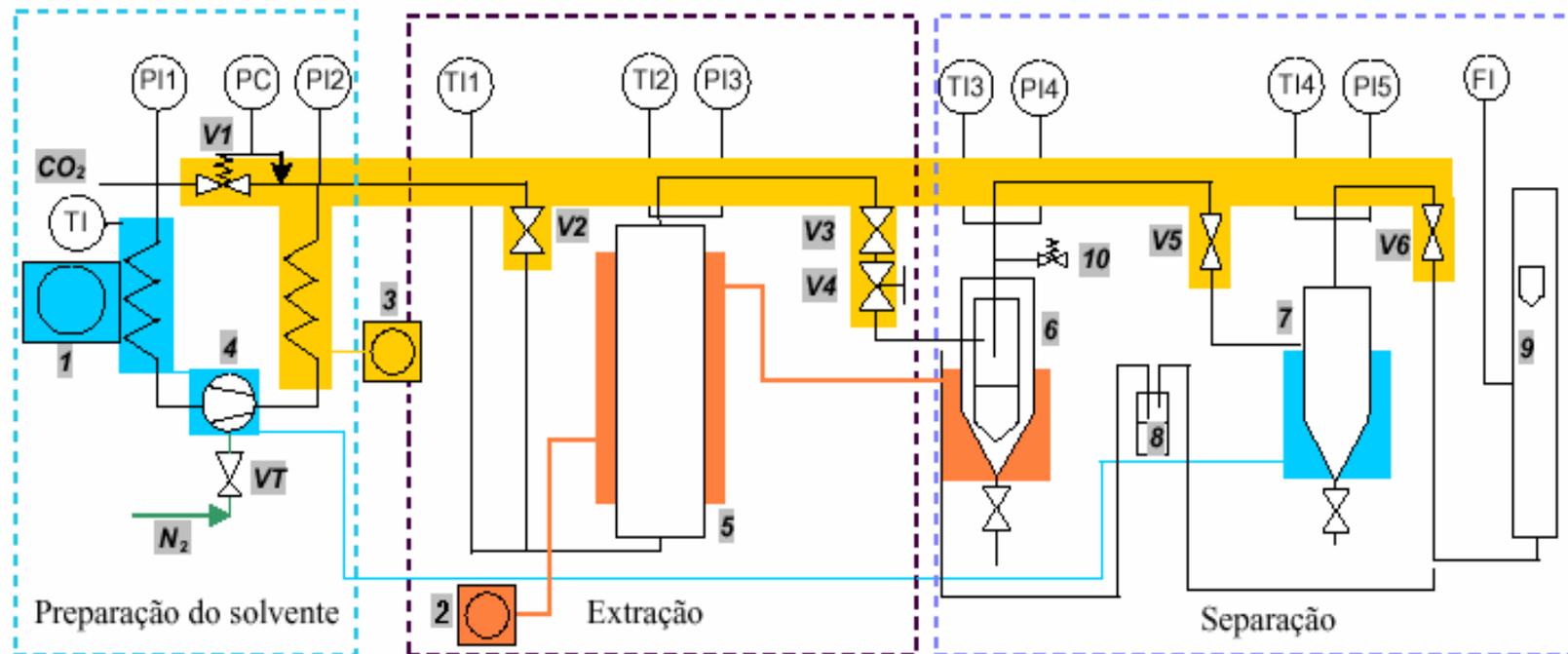


Figura 3-6. Unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH.

A Figura 3-7 mostra o diagrama da unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH. A unidade consta de três seções: preparação do solvente, extração e separação do solvente. Na seção de preparação do solvente, a unidade possui um cilindro de CO₂ pressurizado (99,0 % de pureza, Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo); um banho de refrigeração (Thermo Haake, modelo C10-K10, Rohrbach/Ilm, Alemanha), que usa uma mistura de água e etileno glicol mantida a -10 °C; e uma bomba Air Driven (Maximator, modelo M111D, Zorge, Alemanha), para pressurizar o sistema. Na seção de extração, a unidade tem uma coluna de extração encamisada, construída de aço inoxidável. A capacidade do extrator é de 100 cm³, tendo 2 cm de diâmetro e 32 cm de altura. O sistema de aquecimento original da coluna foi substituído por um banho termostaticado com controlador digital de temperatura (PolyScience, modelo 9510, Niles, E.U.A.). Na seção de separação, a unidade é formada por dois separadores colocados em série, sendo o primeiro um separador ciclônico. Adicionalmente, a unidade também inclui uma válvula micrométrica (Sitec, modelo 710.3012, Zurique, Suíça); válvulas sanitárias (Autoclave Engineers, modelo 10V2071, Erie, E.U.A.); válvulas de regulação (Swagelok, modelo SS-3 NR4, Sólton, E.U.A.); um medidor de vazão (ABB Automation Products, modelo 10A6131/41, Gottingen, Alemanha); e manômetros (Wika Technologies, Cat. 233.50.10, Velbert, Alemanha).



- 1 - Resfriamento de CO₂
- 2 - Sistema de aquecimento da coluna
- 3 - Sistema de aquecimento das válvulas de expansão
- 4 - Bomba de CO₂ - Air driven ("Booster") 1:110
- 5 - Extrator encamisada (100 mL)
- 6 - Ciclone encamisado
- 7 - Separador encamisado
- 8 - Linha de coleta alternativa
- 9 - Medidor de vazão (kg CO₂/ h)
- 10 - Válvula de segurança do ciclone e separador

- VT - Válvula de estrangulamento
- V1 - Regulador de pressão
- V2 - Válvula de entrada do extrator
- V3 - Válvula de saída do extrator
- V4 - Válvula de agulha
- V5 - Válvula de regulação → Pressão do ciclone
- V6 - Válvula de regulação → Pressão do separador

- TI 1 - Temperatura na entrada do extrator
- TI 2 - Temperatura na saída do extrator
- TI 3 - Temperatura na saída do ciclone
- TI 4 - Temperatura na saída do separador
- PI 1 - Pressão do cilindro de CO₂
- PI 2 - Pressão do ciclo de preparação do CO₂
- PI 3 - Pressão do extrator
- PI 4 - Pressão do ciclone
- PI 5 - Pressão do separador

Figura 3-7. Diagrama da unidade de extração supercrítica LASEFI-TUHH [Adaptado de Zetzi et al., 2003].

A seqüência de operação da unidade de extração é descrita a seguir:

- a. Ligar o banho de resfriamento de CO₂ duas horas antes do início do experimento;
- b. Meia hora antes do início do experimento ligar os sistemas de aquecimento das válvulas de expansão e da coluna de extração. Selecionar as temperaturas de operação;
- c. Empacotar o leito (Se esferas de vidro são usadas para completar o leito, coloque-as na entrada de alimentação de CO₂). Colocar lã de polipropileno ou lã de vidro nas extremidades do leito para evitar o arraste de partículas finas;
- d. Verificar se todas as válvulas estão fechadas;
- e. Abrir os cilindros de CO₂ e N₂. O nível da válvula reguladora do N₂ deverá estar no máximo em 4 kgf/cm²;
- f. Abrir a válvula de estrangulamento do N₂ (VT) e pressurizar a Seção de Preparação do Solvente com ajuda da válvula reguladora de pressão (V1) até a pressão de operação;
- g. Para pressurizar a Seção de Extração, abrir a válvula de entrada do extrator (V2). Atingida as condições de operação, escolha uma das duas alternativas seguintes;
- h. Se os ciclones não são usados, conecte a linha de saída do extrator diretamente á linha alternativa (8) – diretamente para o frasco coletor, abrir as válvulas V3 e micrométrica (V4) vagarosamente até atingir a vazão de solvente de operação;
- i. Caso contrário, conecte a linha de saída do extrator diretamente ao ciclone (6) e separador (7), abrir as válvulas V3 e V4 até atingir a pressão do ciclone (6), e na seqüência, abrir a válvula V5 e V6 para regular a vazão do solvente.

3.5.2. Estudo da Etapa de Extração

3.5.2.1. Determinação do Rendimento Global

Para determinação do rendimento global foram realizadas extrações exaustivas usando-se dióxido de carbono (99,0 % de pureza, Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo) como solvente. As condições operacionais para o estudo dos efeitos da pressão e temperatura sobre os rendimentos globais dos diferentes sistemas estão apresentadas na Tabela 3-1.

Tabela 3-1. Condições operacionais no estudo do rendimento global dos diferentes sistemas usando CO₂ pressurizado.

Sistema	Condições operacionais			
	Massa de alimentação (10 ⁻³ kg)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão (10 ⁻⁵ kg CO ₂ /s)
<i>A. annua</i> ^a	2,01	30 e 50	75 – 400	6,8
<i>C. verbenacea</i> ^b	3,37	30 – 50	100 – 300	6,8
<i>O. selloi</i> ^c	3,76	30 – 50	100 – 300	7,2

^a Isotermas

^b Superfície de resposta 2² (o ponto axial 59 bar / 26 °C, foi substituído por 78 bar / 26 °C)

^c Fatorial completo 2²

Os ensaios foram realizados no equipamento Spe-ed SFE (Applied Separations, modelo 7071, Allentown, E.U.A), usando-se a coluna de extração de 5 ml (Thar Designs, CL1165, Pittsburgh, E.U.A.). A formação do leito foi realizada pela adição e empacotamento manual do material moído. Um tampão de lã de vidro foi colocado em cada extremo do leito a fim de prevenir o arraste de partículas finas. O período estático foi de 5 minutos. As vazões do CO₂ são mostradas na Tabela 3-1. O extrato foi coletado em frasco de vidro imerso em banho de etileno glicol (-5 a 5 °C). A extração foi finalizada quando

não era mais observada saída de extrato do sistema. Em seguida, a linha de extração foi lavada com acetato de etila (PA, Merck, Darmstadt, Alemanha) e o solvente presente na solução resultante foi removido no sistema de rotaevaporação com controlador de vácuo. A massa do extrato foi determinada pela soma dos extratos de coleta e limpeza.

A Análise de Variância (ANOVA) foi realizada usando o programa STATISTICA 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, E.U.A.).

3.5.2.2. Extração fracionada

A técnica de extração fracionada foi aplicada a dois sistemas: *C. verbenacea* e *O. selloi*. As condições operacionais são apresentadas na Tabela 3-2.

Tabela 3-2. Condições operacionais na extração fracionada usando CO₂ pressurizado.

Sistema	Condição operacional			
	Massa de alimentação (10 ⁻³ kg)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão (10 ⁻⁵ kg CO ₂ /s)
<i>C. verbenacea</i>	50	60	80; 200; 300	6,8
<i>O. selloi</i>	50	50	95; 150; 200; 250	8,3

Os ensaios foram realizados no equipamento Spe-ed SFE, usando-se a coluna de extração de 300 mL (Thar Designs, CL1373, Pittsburgh, E.U.A). Parte da coluna de extração foi empacotada com 50 × 10⁻³ kg de material moído. O volume livre da coluna de extração, localizado na entrada de CO₂, foi preenchido com esferas de vidro (mesh 12). Um período estático de 20 minutos foi usado. O extrato foi coletado em frasco de vidro imerso em banho de etileno glicol (-5 a 5 °C). Para cada fração, a extração foi finalizada quando

não era observada mais saída de extrato do sistema. A massa de extrato foi determinada pela pesagem do frasco de coleta no início e fim de cada extração.

3.5.2.3. Determinação das Curvas Globais de Extração (OEC)

Os experimentos cinéticos foram realizados nas duas unidades de extração supercrítica.

Na unidade Spe-ed SFE, a coluna de 300 ml (Thar Designs, CL1373, Pittsburgh, E.U.A.) foi usada. Dois sistemas foram estudados: *A. annua* e *C. verbenacea*. As condições operacionais são apresentadas na Tabela 3-3.

Tabela 3-3. Condições operacionais no estudo da cinética do processo de extração com CO₂ pressurizado.

Condição operacional	Sistema	
	<i>A. annua</i> ^a	<i>C. verbenacea</i> ^b
Temperatura (°C)	30 - 50	40 e 50
Pressão (bar)	200 - 400	200 e 300
Vazão do solvente (10 ⁻⁵ kg CO ₂ /s)	5,5 - 11,1	7,63
Massa de alimentação (10 ⁻³ kg)	50	50
Altura do leito (10 ⁻² m)	7	5,3
Diâmetro do leito (10 ⁻² m)	5,45	5,45
Densidade real (kg/m ³)	950,9	1360
Diâmetro das partículas (10 ⁻⁴ m)	4,92	4,21
Porosidade do leito - ε (-)	0,68	0,71

^a Fatorial completo 2³

^b Melhores condições de rendimento global e de atividade anticâncer (ensaios replicados)

Parte da coluna de extração foi preenchida com 50×10^{-3} kg de material moído. O volume livre da coluna de extração, localizado na entrada de CO₂, foi preenchida com

esferas de vidro (mesh 12). Um período estático de 20 minutos foi usado. O tempo de coleta variou de 5 a 20 minutos, dependendo da taxa de extração. As dimensões do leito empacotado foram medidas com um paquímetro (Mitutoyo, Suzano, São Paulo).

O estudo do efeito da altura do leito sobre a cinética de extração foi estudado para o sistema *C. verbenacea*. A unidade de extração supercrítica LASEFI-TUHH foi usada. Leitos com alturas de 8; 16; e 24×10^{-2} m foram usados. O diâmetro da coluna de extração foi 2×10^{-2} m. A densidade aparente do leito ($\epsilon = 0,71$) e a vazão do solvente ($7,63 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s) foram mantidas constantes para todos os ensaios. Os experimentos foram realizados na condição operacional de 200 bar e 40 °C (melhor condição no teste de atividade anticâncer).

3.5.2.4. Cálculo dos Parâmetros Cinéticos das OEC

Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com o procedimento descrito por **Rodrigues et al. [2002]**. Os dados experimentais das curvas globais de extração (OEC) foram ajustados a um spline usando duas linhas retas. O ajuste foi realizado usando os procedimentos PROC REG e PROC NLIN do programa SAS 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, E.U.A.). A primeira linha foi identificada como o período de taxa de extração constante (*CER*). Do Spline, a taxa de extração para o período *CER* (M_{CER}) foi calculada, assim como o tempo correspondente à intersecção das duas linhas (t_{CER}). A concentração de extrato na fase supercrítica na saída do leito (Y_{CER}), foi calculada como a razão entre o M_{CER} e a vazão do solvente (Q_{CO_2}). A Análise de Variância (ANOVA) foi realizada usando o programa STATISTICA 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, E.U.A.).

3.5.2.5. Modelagem Matemática das OEC

Vários modelos matemáticos podem ser usados para descrever o comportamento cinético da etapa de extração com fluidos supercríticos. Dentre eles, os seguintes modelos foram testados no ajuste das curvas globais de extração (OEC): Difusional [Crank, 1975], Tan & Liou [1989], Empírico [Naik et al., 1989], Desorção [Goto et al., 1993], Sovová [1994] e Martinez et al. [2003]. O ajuste dos modelos às curvas de extração foi realizado com ajuda do software Tecanalysis, desenvolvido pelo LASEFI-DEA/FEA-UNICAMP.

3.5.3. Estudo da Etapa de Separação

Para este estudo o sistema funcho foi selecionado. A unidade de extração supercrítica LASEFI-TUHH foi usada.

3.5.3.1. Solubilidade de Anetol e Ácido Oléico em CO₂ Supercrítico

A predição do comportamento de equilíbrio de fases para o anetol e ácido oléico em CO₂ supercrítico foi realizada a partir de dados experimentais apresentados por Reverchon [1997] e Yu et al. [1992], *apud* Araújo & Meireles [2000]. Os dados foram modelados usando-se a equação de estado de Peng – Robinson [1976]:

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a(T)}{V(V+b)+b(V-b)} \quad (39)$$

Com a regra de mistura de van der Waals:

$$a_m = \sum_i \sum_j x_i x_j a_{ij} \quad (40)$$

$$b_m = \sum_i \sum_j x_i x_j b_{ij} \quad (41)$$

com as seguintes regras de combinação:

$$a_{ij} = a_{ji} = (a_{ii} a_{jj})^{0,5} (1 - k_{ij}) \quad (42)$$

$$b_{ij} = b_{ji} = \left(\frac{b_{ii} + b_{jj}}{2} \right) (1 - l_{ij}) \quad (43)$$

Os parâmetros de interação binária (k_{ij} e l_{ij}) foram ajustados usando-se o software EDEFflash [Araújo & Meireles, 2000]. As propriedades dos componentes puros foram obtidas de dados da literatura [Rodrigues, 2001; Araújo & Meireles, 2000].

3.5.3.2. Determinação do Tempo de Operação do Processo

O tempo de operação do processo, definido como a duração do período da taxa de extração constante, foi calculado a partir da OEC. A densidade aparente para formação do leite de partículas foi 497 kg/m^3 , reportada por Moura et al. [2005]. A altura e diâmetro do leite foram 16×10^{-2} e 2×10^{-2} m, respectivamente. O espaço vazio da célula de extração foi preenchido com esferas de vidro de 12 mesh. As esferas de vidro ficaram na região de alimentação do CO_2 . Um período estático de 15 minutos foi usado. As condições operacionais de pressão e temperatura foram 250 bar e $40 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Esta condição de extração foi selecionada de estudos prévios de rendimento global [Moura et al., 2005]. A vazão do CO_2 foi $6,8 \times 10^{-5} \text{ kg de CO}_2 / \text{s}$. As amostras foram coletadas a cada 5, 10 e 20 minutos. Os extratos foram coletados em frasco de vidro imerso em banho a -5°C , a fim de reduzir as perdas dos componentes mais voláteis. O ensaio foi replicado. Usando os dados experimentais, as OEC foram ajustadas a um spline linear segundo metodologia descrita no Item 3.5.2.4, e o tempo de operação do processo foi determinado (t_{CER}).

3.5.3.3. Estudo da Influência das Condições Operacionais

Devido às limitações do equipamento o estudo da influência das condições de temperatura e pressão na etapa da separação foi realizado só para a isoterma de 40 °C no primeiro separador, com pressões variando de 20 a 120 bar. O segundo separador foi mantido a 1 bar e -5 °C. A condição de extração foi a mesma que para o rendimento global (250 bar / 40 °C / $6,8 \times 10^{-5}$ kg de CO₂ / s).

As amostras foram coletadas ao final do tempo de operação (t_{CER}). Para remoção dos solutos aderidos às paredes do ciclone, foi usado hexano (Merck, Darmstadt, Alemanha). A eliminação do hexano foi realizada no sistema de rotaevaporação com controlador de vácuo.

3.6. Análise química

3.6.1. Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (GC-MS)

A composição química dos extratos de *C. verbenacea* foi determinada em um sistema de GC-MS (GC-HP5890 / MS-HP5971, Böblingen, Alemanha), equipado com coluna capilar de sílica fundida WCOT DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Chrompack, Middelburg, Holanda). A coluna foi aquecida a 110 °C por 2 min e programada a 5 °C / min até 270 °C, e aquecida por 2 min. A identificação dos componentes foi realizada pela comparação dos espectros de massas com os da base de dados do equipamento – NIST.

3.6.2. Cromatografia Gasosa - Detector de Ionização de Chama (GC-FID)

A análise dos extratos de *A. annua*, *C. verbenacea*, *O. selloi* e *F. vulgare* foi realizada em um sistema de GC-FID (Shimadzu, modelo 17A, Kyoto, Japão), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m × 0,25mm × 0,25 μm, J&W Scientific, Folsom, E.U.A.). Gás hélio (99,9 % pureza, White Martins Gases Industriais, Campinas, São Paulo) foi usado como gás de arraste. As temperaturas do injetor e detector foram 240 °C e 280 °C, respectivamente. A coluna foi aquecida a 50 °C por 5 min e programada a 5 °C / min até 280 °C, e aquecida por 5 min. Um microlitro das amostras foi injetado (5×10^{-6} kg de extrato diluído em 1×10^{-6} m³ de acetato de etila).

A identificação dos componentes majoritários de cada matéria-prima foi realizada pela comparação dos tempos de retenção com os dos seguintes padrões: artemisinina (98%, CPQBA-UNICAMP, Campinas, São Paulo); cânfora (Lote 73H3697, Sigma, St. Louis, E.U.A.); α-pineno (98 %, Lote 00523MX, Aldrich, St. Louis, E.U.A.); mirceno (98 %, Lote 54H1129, Sigma, St. Louis, E.U.A.); 1,8-cineol (99 %, Lote 2817K, Aldrich, St. Louis, E.U.A.); linalool (95-97 %, Lote 68H3489, Sigma, St. Louis, E.U.A.); borneol (98 %, Lote 03519ES, Aldrich, St. Louis, E.U.A.); anetol (PA, Lote 06605HR, Aldrich, St. Louis, E.U.A.); β-cariofileno (PA, Lote 38H2503, Sigma, St. Louis, E.U.A.); funchona (PA, Lote 04416TS, Aldrich, St. Louis, E.U.A.).

A quantificação dos principais componentes foi realizada pelo método de padronização externa [Collins et al., 1997]. Neste ponto é importante mencionar que devido à instabilidade térmica da artemisinina, a sua quantificação foi realizada pelo método indireto [Sipahilamani et al., 1991], que considera um dos produtos de degradação

(para maiores detalhes ver **Anexo C**). As curvas de calibração dos diferentes compostos se encontram no **Anexo C**.

3.6.3. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A análise por CCD foi realizada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Lote 940378601, Merck, Darmstadt, Alemanha). Três microlitros das diferentes amostras preparadas para análise por GC-FID (5×10^{-6} kg de extrato diluído em 1×10^{-6} m³ de acetato de etila) foram aplicadas com ajuda de uma microseringa. A fase móvel foi composta de hexano : acetato de etila nas proporções de 95:5 (*A. annua*) ou 90:10 (*C. verbenacea*). A placa foi revelada usando-se uma solução de anisaldeído : ácido acético glacial : ácido sulfúrico (0.5:50:1), seguido de aquecimento a 100 °C até a visualização das substâncias [**Kritchevsky et al., 1963**].

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de SFE de solutos a partir de matrizes vegetais pode ser dividido em duas etapas: (i) extração e (ii) separação. Para a otimização das condições operacionais em ambas etapas é necessária a determinação experimental de diferentes variáveis de processo. Na etapa de extração, dados de rendimento global e da cinética de transferência de massa são principalmente importantes, enquanto que na etapa de separação é necessário o conhecimento de dados de solubilidade dos compostos a serem extraídos, assim como, da influência das condições operacionais na separação do extrato. No presente trabalho as duas etapas foram estudadas. O estudo da etapa de extração foi realizado para os sistemas $\text{CO}_2 + \textit{Artemisia annua}$, $\text{CO}_2 + \textit{Cordia verbenacea}$ e $\text{CO}_2 + \textit{Ocimum selloi}$. Dados de rendimento global foram reportados para os três sistemas. A cinética de transferência de massa foi estudada para a *A. annua* e *C. verbenacea*. Devido à pequena quantidade de *O. selloi* não foi possível o estudo da cinética para este sistema. O estudo da etapa de separação foi realizado no sistema $\text{CO}_2 + \textit{Foeniculum vulgare}$. A predição do comportamento de equilíbrio de fases dos principais componentes (anetol e ácido oléico) foi realizada em base aos dados reportados na literatura e foi estudada a influência das condições operacionais na separação fracionada por SFE. Para uma melhor discussão dos resultados, a apresentação dos dados foi organizada individualmente para cada matéria-prima (ver Figura 4-1).

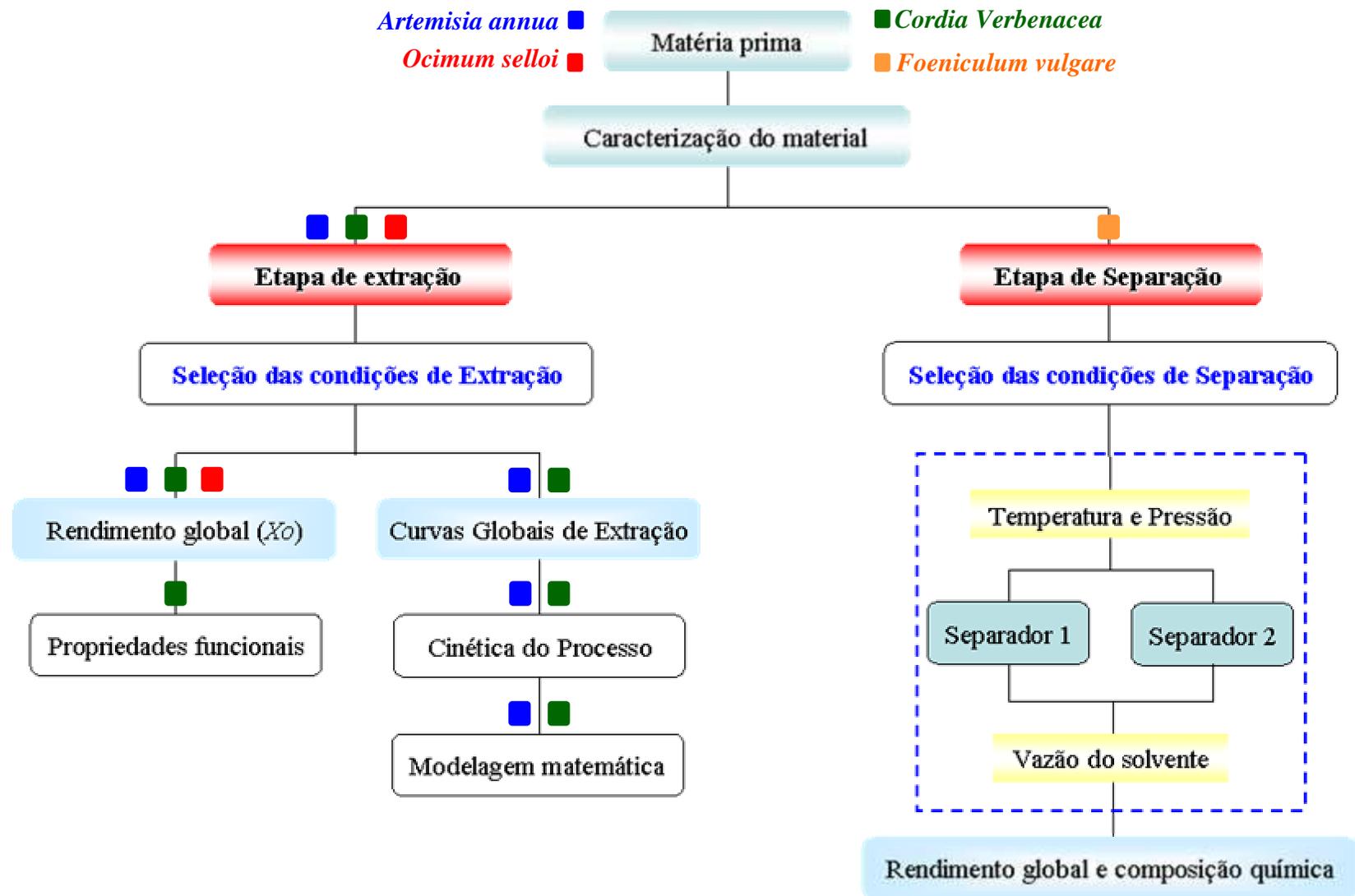


Figura 4-1. Organograma dos experimentos realizados com *A. annua*, *C. verbenacea*, *O. Selloi* e *F. vulgare*.

4.1. *Artemisia annua* L.

4.1.1. Rendimento Global

O rendimento em óleo volátil obtido por hidrodestilação foi de 0,49 % (base seca - b.s.) (Tabela 4-1); este resultado é comparável com dados da literatura que reportam rendimentos entre 0,24 % e 0,5 % (b.u.) [Tellez et al., 1999; Juteau et al., 2002]. O óleo volátil foi caracterizado pela presença dos seguintes componentes majoritários (porcentagem em massa em relação ao extrato): cânfora (28,3 %), β -cariofileno (11,46 %), borneol (1,02 %) e 1,8 cineol (0,52 %). A composição química da *A. annua* varia de acordo com a origem, condições edafoclimáticas, e nas várias partes da planta. A cânfora é citada como componente majoritário [Juteau et al., 2002], porém outras referências citam o α -pineno [Tellez et al., 1999] e a artemisia cetona [Jain et al., 2002; Simon et al., 1990] como sendo majoritários. Na análise por cromatografia gasosa (GC), o α -pineno foi identificado, porém em proporção inferior a 1 %. Por outro lado, considerando o tempo de retenção da artemisia cetona reportada na literatura (9,12 min) [Tellez et al., 1999], não foi observada a presença deste composto nos extratos.

O rendimento da extração com hexano foi de 7,28 % (b.s.). Este resultado é comparável ao rendimento de 3,37 a 28,3 % (b.u) obtido com vários solventes [Hao et al., 2002]. Para tempos de retenção menores foi observada a presença da cânfora (5,35 %), β -cariofileno (1,29 %) e o 1,8-cineol (0,23 %). Porém, quando comparado com o óleo volátil, foi observado um maior espectro de compostos em tempos de retenção maiores. Os cromatogramas do óleo volátil obtido por hidrodestilação e do extrato obtido com hexano

podem ser observados na Figura 4-2. Nesta mesma figura é mostrado o cromatograma do extrato obtido por SFE a 30 °C / 150 bar.

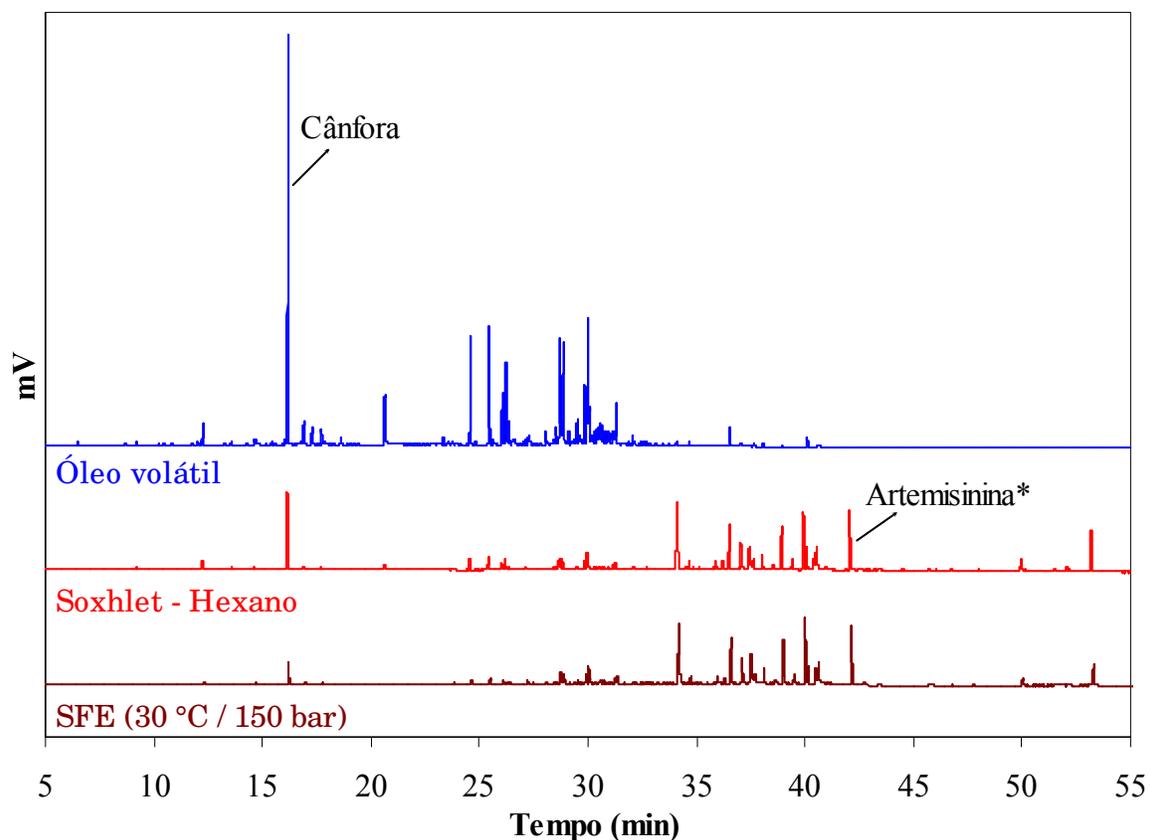


Figura 4-2. Cromatogramas do óleo volátil obtido por hidrodestilação e dos extratos obtidos com hexano e por SFE a 30 °C / 150 bar, a partir de *A. annua* (* Produto de degradação da artemisinina).

O comportamento do rendimento global em extrato, obtido por SFE nas temperaturas de 30 e 50 °C, pode ser observado na Figura 4-3. Na isoterma de 50 °C houve um aumento de rendimento em extrato de doze vezes quando a pressão foi aumentada de 75 a 100 bar; posteriores aumentos de pressão também tiveram um efeito positivo sobre o rendimento, mas não significativo como a baixas pressões. A 30 °C, o rendimento aumenta consideravelmente com o aumento da pressão até 150 bar, e depois o rendimento permanece aproximadamente constante. A elevadas pressões, o rendimento global aumenta

com a temperatura. Entretanto, um comportamento oposto é observado para baixas pressões. Nas proximidades de 250 bar, existe uma convergência das duas isotermas. Neste valor, não há influência da temperatura sobre o rendimento global. Para pressões menores que 250 bar é observado um comportamento similar ao da condensação retrógrada em fluidos supercríticos. Nestas condições, a densidade diminui consideravelmente com o aumento da temperatura, resultando em uma diminuição do poder de solvatação e, conseqüentemente, em uma diminuição do rendimento global. Para pressões superiores a 250 bar, o rendimento global aumenta com a temperatura, devido ao aumento da pressão de vapor do soluto com a temperatura.

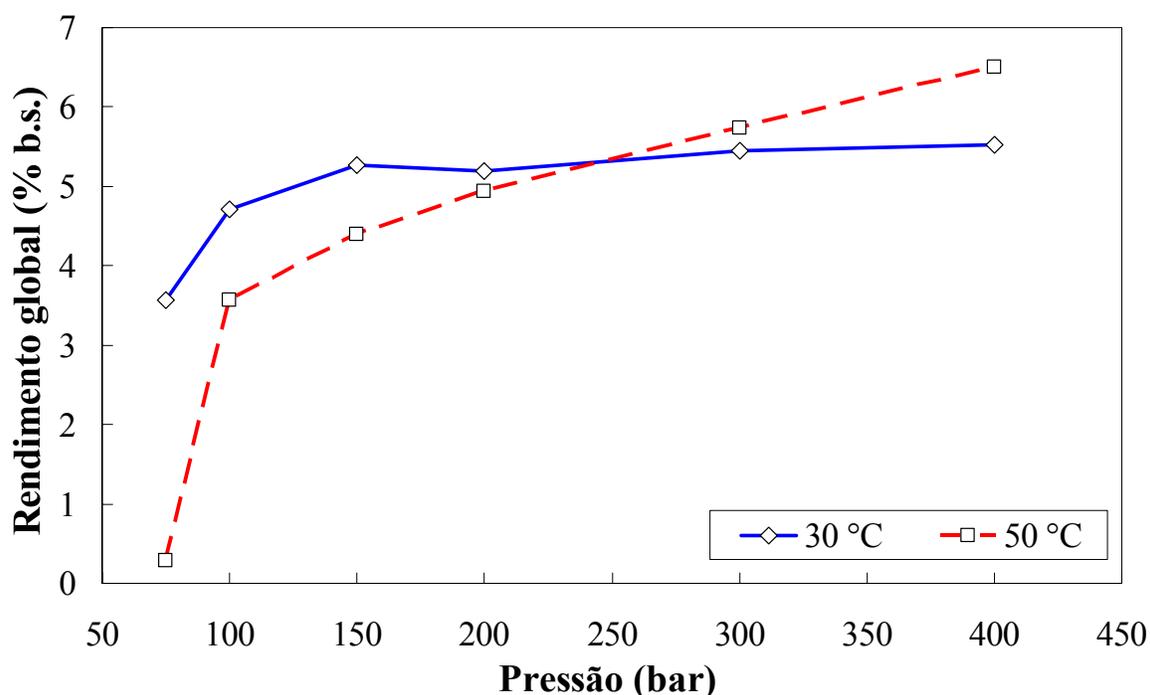


Figura 4-3. Isotermas de rendimento global em extrato de *A. annua* obtidas com CO₂ pressurizado.

Comportamentos similares foram apresentados na SFE de sementes de uva [Gómez et al., 1996] e dente-de-leão [Simándi et al., 2002]. Entretanto, as pressões de inversão variaram para os diferentes sistemas.

Os rendimentos globais em artemisinina e cânfora são apresentados na Figura 4-4. A variação do rendimento de artemisinina com a pressão é similar ao rendimento global para 50 °C. Para 30 °C, o rendimento de artemisinina é praticamente constante com a pressão. No intervalo de 200 a 250 bar, provavelmente exista uma pressão de inversão. Dados de solubilidade de artemisinina pura em CO₂, mostram que o ponto de inversão acontece a 190 bar aproximadamente [Xing et al., 2003]. Logo, para o sistema *A. annua* + CO₂ ocorre um deslocamento na pressão de inversão. No caso da cânfora, o rendimento global aumenta ligeiramente a pressões menores que 300 bar, tendo um significativo aumento a 400 bar. O ponto de inversão da cânfora não é observado. A pressão de inversão da solubilidade para o sistema cânfora + CO₂ ocorre a 75 bar [Akgün et al., 1999].

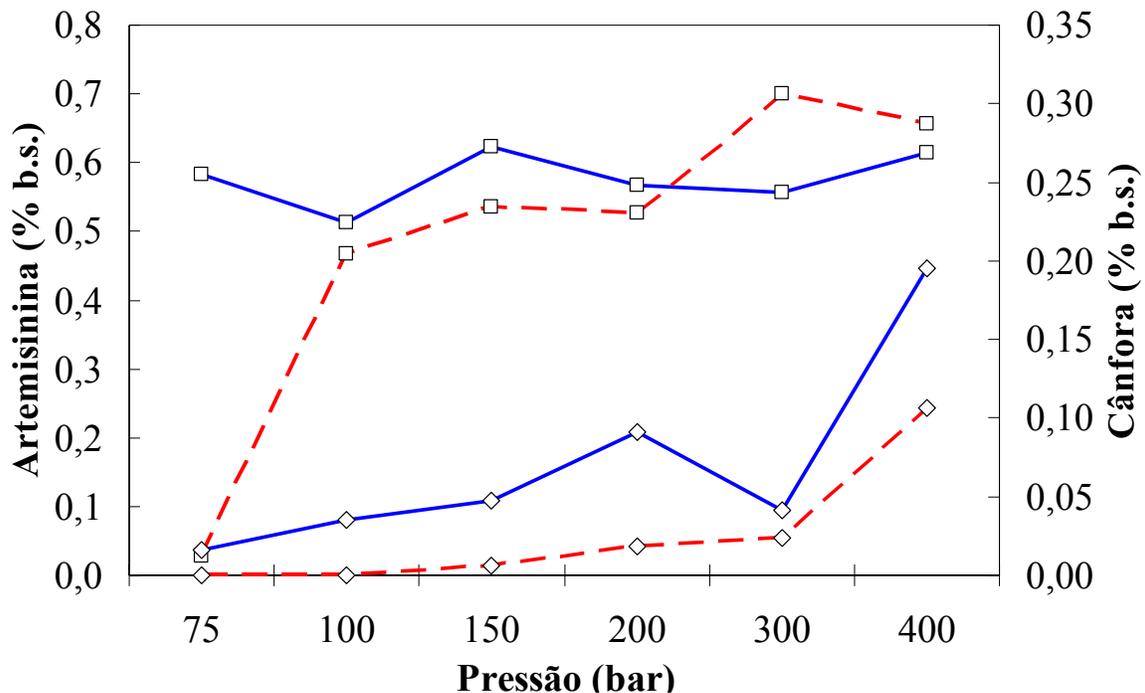


Figura 4-4. Isotermas de rendimento em artemisinina (□) e cânfora (◇) de *A. annua*, obtidas com CO₂ pressurizado (— 30 °C, - - - - 50 °C).

Do ponto de vista qualitativo pode-se afirmar que o óleo volátil obtido por hidrodestilação apresentou uma coloração verde clara. Por outro lado, o extrato obtido com hexano pode ser considerado um concreto, apresentando uma coloração verde escura, provavelmente devido à presença de altos teores de clorofila. O aspecto do extrato obtido com CO₂ pressurizado varia em função da condição operacional usada na extração. Na menor densidade (50 °C / 75 bar), o extrato apresentou uma coloração amarela clara, mas a medida que se aumentou a densidade, os extratos tornaram-se mais escuros. Mesmo na maior densidade (30 °C / 400 bar), o extrato foi menos escuro àquele obtido por extração com hexano. O escurecimento pode ser o resultado da co-extração de componentes de alta massa molecular.

Na análise por cromatografia em camada delgada (Figura 4-5) observou-se a presença de artemisinina em todos os extratos, exceto no *B*, obtido por hidrodestilação. Este resultado não é surpreendente, considerando que na hidrodestilação somente as substâncias voláteis são extraídas, o que não se aplica a artemisinina. **Tellez et al. [1999]** afirmam que a artemisinina se decompõe nas condições da hidrodestilação (altas temperaturas) e que estes produtos de degradação não são destilados.

Do ponto de vista quantitativo a explicação pode ser dada com auxílio da Tabela 4-1, onde são apresentados os rendimentos em extrato, cânfora e artemisinina, obtidos na extração por hidrodestilação, com hexano, e CO₂ a 30 °C / 75 bar, 30 °C / 150 bar e 50 °C / 300 bar.

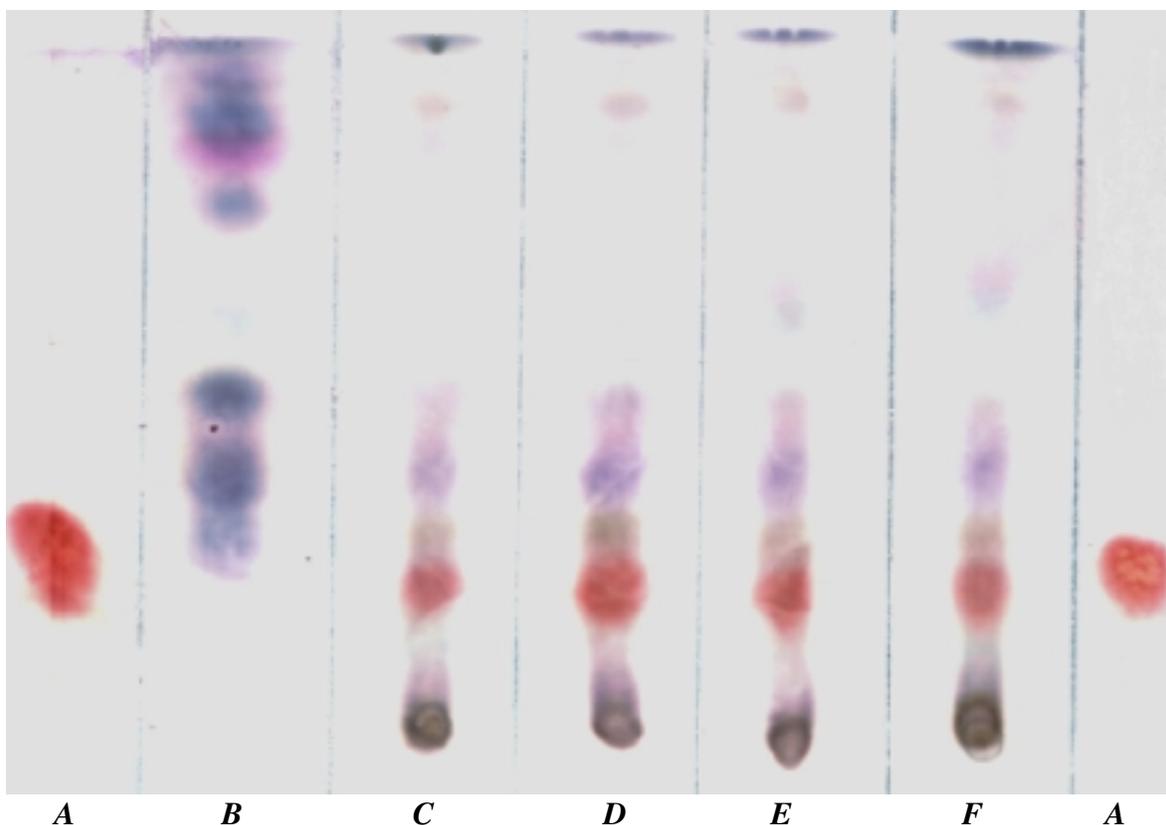


Figura 4-5. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos de *A. annua*: Artemisinina (A); Hidrodestilação (B); Hexano (C); SFE: 30 °C / 75 bar (D); SFE: 30 °C / 150 bar (E); SFE: 50 °C / 300 bar (F). Fase móvel hexano e acetato de etila (95:5). Revelador: Solução de anisaldeído.

Os maiores rendimentos tanto em extrato, cânfora e artemisinina foram conseguidos pela extração com hexano. Isto é devido ao fato de que o hexano, a diferença do dióxido de carbono, não é seletivo, extraíndo ácidos graxos livres, fosfolipídios, pigmentos, e substâncias insaponificáveis junto com os triglicerídios. Conseqüentemente, a quantidade de extrato obtida usando hexano foi maior àquela obtida por SFE e hidrodestilação. No caso da SFE, a extração a 50 °C / 300 bar resultou em rendimentos maiores em extrato e artemisinina do que as extrações a 30 °C / 75 bar e 30 °C / 150 bar. O aumento da densidade do solvente favorece a solubilidade de compostos de elevada massa molecular, como os triglicerídios e ácidos graxos.

Tabela 4-1. Comparação dos rendimentos em extrato, cânfora e artemisinina obtidos por hidrodestilação, com hexano e extração supercrítica a partir de *A. annua*.

Método de extração	Rendimento (% b.s.)		
	Extrato	Cânfora	Artemisinina
Hidrodestilação	0,49	0,14	0,00
Extração com Hexano	7,28	0,39	0,77
SFE: 30 °C / 75 bar	3,56	0,02	0,58
SFE: 30 °C / 150 bar	5,27	0,05	0,62
SFE: 50 °C / 300 bar	5,73	0,02	0,70

Por outro lado, podemos afirmar que, embora o maior rendimento em artemisinina na extração com hexano (0,77 % b.s.), sua pureza relativa³ (10,6 %) é menor do que nos extratos obtidos por SFE (i.e. 16,3 % para o extrato obtido a 30 °C / 75 bar). Teoricamente, um extrato com um maior teor de artemisinina pode ser mais facilmente purificado. No entanto, a escolha do melhor processo de obtenção de artemisinina deveria levar em conta o custo global do processo (extração + purificação), assim como das propriedades funcionais dos extratos.

Reverchon [1997] afirma que para obter classes de compostos diferenciadas usando fluidos supercríticos, duas técnicas podem ser aplicadas: extração fracionada e separação fracionada (ver Item 2.1.2.4 e 2.1.3.2). No caso da *A. annua*, ambas técnicas poderiam ser aplicadas na otimização de extração de artemisinina por SFE. Por um lado, a extração fracionada, na qual a extração de artemisinina poderia ser realizada primeiramente a 30 °C / 75 bar seguida por uma maior pressão; ou, a extração poderia ser realizada a 50 °C / 300 bar, seguida por uma separação fracionada, com o primeiro separador operando a

³ A pureza relativa será definida como a porcentagem máxima a ser obtida em condições ótimas de purificação (Pureza relativa = massa de artemisinina / massa de extrato × 100).

50 °C / 100 bar. A aplicação destas técnicas também permitiria a obtenção de frações com propriedades funcionais diferenciadas, tal como demonstrado para o extrato de alecrim [Ibáñez et al., 1999]. Através da técnica de separação fracionada foi possível obter duas frações do extrato de alecrim com atividade antioxidante diferenciada.

A SFE foi comparada extensivamente com os métodos de extração convencionais, segundo revisão apresentada por Reverchon [1997] e Luque de Castro et al. [1999]. Segundo os autores, a SFE oferece significativas vantagens em relação aos métodos de extração convencionais. A SFE evita a degradação e hidrólise de compostos termolábeis, produzindo produtos de superior qualidade, sem a presença de compostos indesejáveis e com sabor e odor próximos ao da matriz vegetal [Reverchon, 1997]. Adicionalmente, o aumento da densidade do solvente permite extrair compostos diferentes aos do óleo volátil, que poderiam apresentar propriedades funcionais interessantes. O extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obtido por SFE a 40 °C e 300 bar, apresentou maior atividade antioxidante do que os obtidos por hidrodestilação e com etanol [Carvalho-Junior et al., 2005]. As maiores quantidades de ácido carnosólico e ácido rosmarínico foram obtidas a 40 °C e 300 bar. Entretanto, para outros sistemas, como a cúrcuma (*Curcuma longa*) [Braga et al., 2003], foi observado que os extratos obtidos por métodos convencionais (hidrodestilação, extração com solvente a baixa pressão e em sistema do tipo Soxhlet), apresentam maior atividade antioxidante do que os obtidos por SFE.

4.1.2. Cinética de Extração e Modelagem Matemática

A extração de solutos a partir de matrizes vegetais com fluidos supercríticos não é uma função linear do tempo de extração. De forma geral, as curvas típicas de extração apresentam três períodos [Ferreira et al., 1999]: (i) taxa de extração constante (*CER*), onde o principal mecanismo de transferência de massa é a convecção na fase fluida; (ii) taxa de extração decrescente (*FER*), onde a difusão na matriz vegetal e a convecção na fase fluida são importantes para a transferência de massa; e (iii) período difusional, onde a transferência de massa é limitada pela difusão ao interior das partículas. Em geral, no período de taxa de extração constante (*CER*) consegue-se extrair entre 50 a 90 % do extrato total e a otimização do processo deveria ser focalizado neste período. As curvas globais de extração (OEC) de artemisinina por SFE estão apresentadas na Figura 4-6. Nesta figura, os três períodos da taxa extração são mostrados para a isoterma de 30 °C. Segundo a classificação de Brunner [1994], as curvas de extração de artemisinina podem ser consideradas de tipo II, típico da extração a partir de matrizes vegetais com baixo teor de solutos. A artemisinina se encontra na *A. annua* em concentrações baixas (ver Tabela 4-1).

Pode ser observado na Figura 4-6 que, para a extração a 50 °C, a vazão de CO₂ teve pequena influência sobre a concentração de artemisinina na saída do extrator durante o período CER, enquanto que esta concentração variou consideravelmente para 30 °C. O mesmo pode ser observado para a pressão. Para 50 °C pequena influência é observada, enquanto que para 30 °C e alta vazão de CO₂ houve influência.

A massa total de artemisinina obtida no período *CER* foi praticamente constante para cada vazão de solvente, com valores de $(0,22 \pm 0,01) \times 10^{-7}$ e $(0,44 \pm 0,02) \times 10^{-7}$ kg de artemisinina, para $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s e $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s, respectivamente.

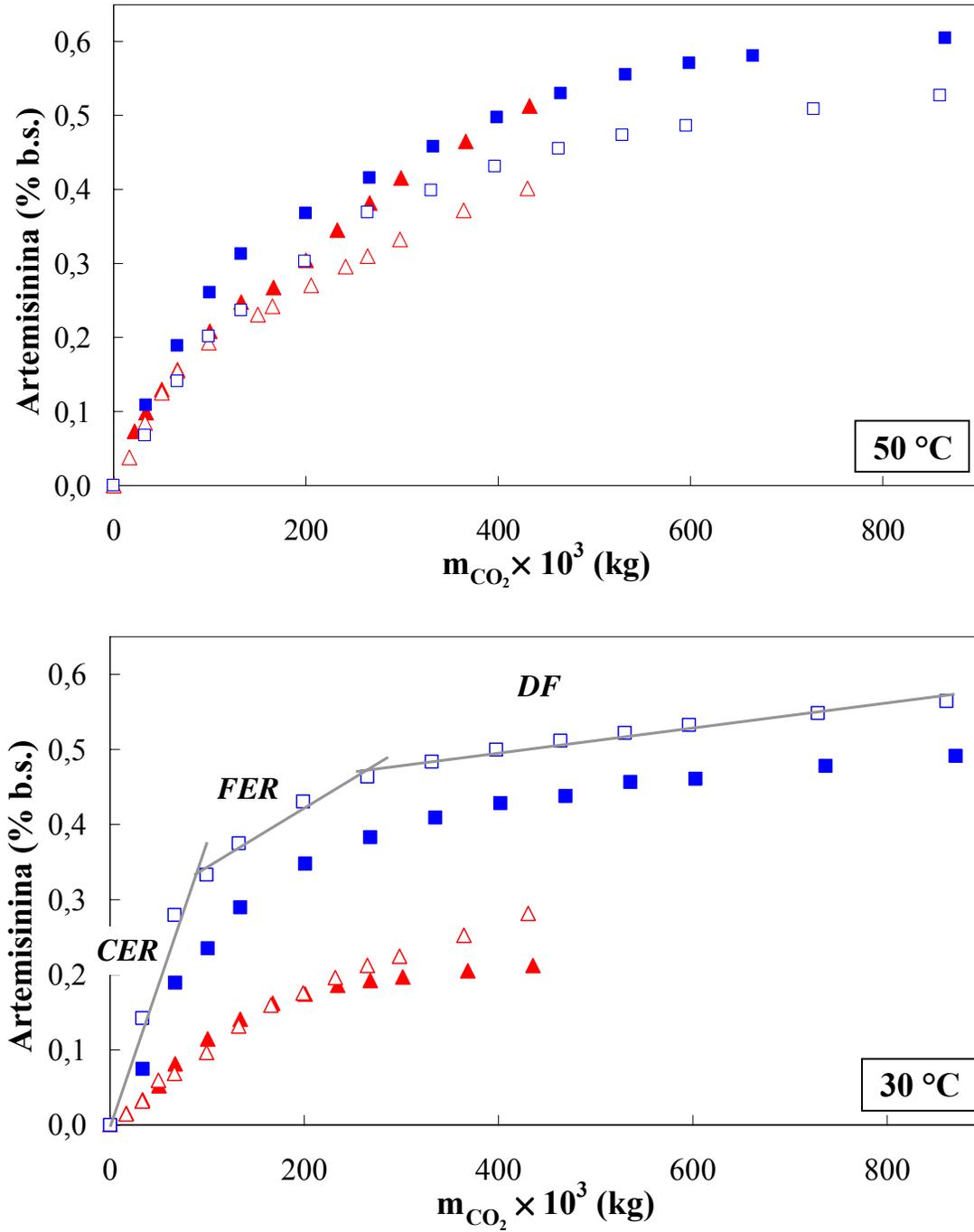


Figura 4-6. Curvas globais de extração de artemisinina de *A. annua* a diferentes condições operacionais ($\blacktriangle, \triangle$) $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO_2/s ; (\blacksquare, \square) $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO_2/s (símbolos cheios: 400 bar e símbolos vazios: 200 bar).

Durante o processo de extração, a pureza relativa de artemisinina (kg artemisinina / kg extrato \times 100) diminui com o tempo, como pode ser observado na Figura 4-7 para o experimento a 400 bar, 50 °C e $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s. Para todos os experimentos o mesmo comportamento foi observado. A maior pureza relativa foi 17,9 % no intervalo de tempo de 0 – 6,5 min, a 200 bar, 50 °C e $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s; e a menor pureza foi 4,1 % no intervalo de 70 – 80 min a 400 bar, 30 °C e $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

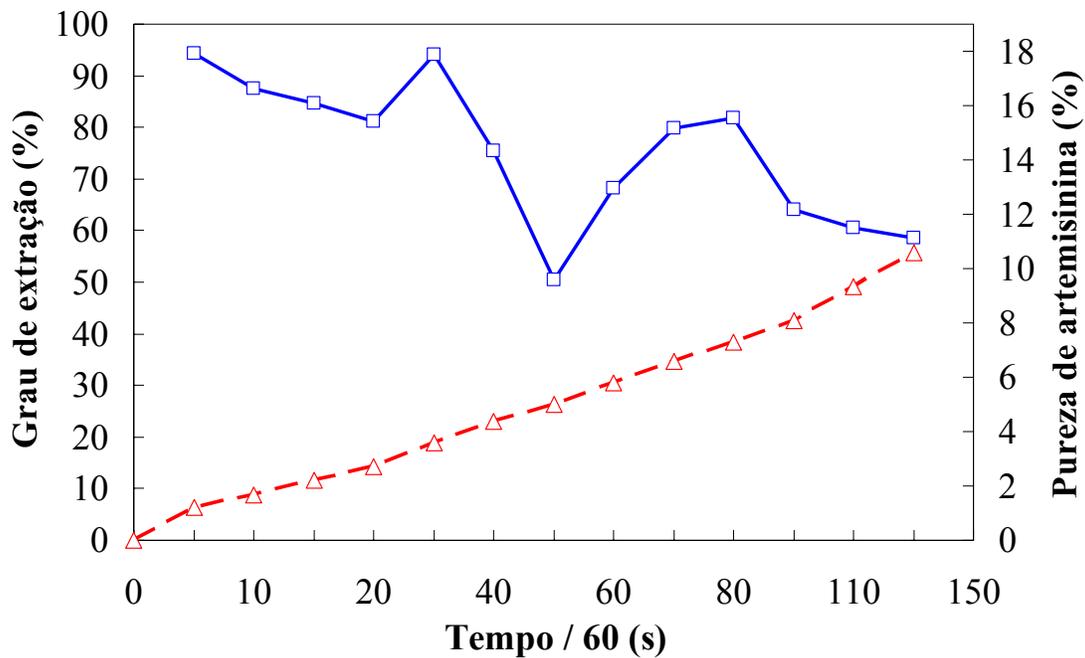


Figura 4-7. Grau de extração (--- Δ ---) versus pureza de artemisinina (— \square —) de *A. annua* a 400 bar, 50 °C e $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

A Tabela 4-2 apresenta os parâmetros cinéticos calculados para o período CER: taxa de extração (M_{CER}), razão mássica de extrato na fase supercrítica na saída do extrator (Y_{CER}), duração do período CER (t_{CER}), e rendimento do processo de extração (R_T). Da Tabela 4-2, podemos observar que a taxa de extração no período de taxa de extração constante (M_{CER}) aumenta com a vazão do solvente para todos os ensaios. As maiores taxas

de extração foram obtidas a 30 °C / 200 ou 400 bar, 50 °C / 400 bar, com vazão de solvente de $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s. Na mesma tabela, podemos observar que a razão de soluto na fase fluida na saída do extrator (Y_{CER}) também aumenta com a vazão do solvente. O maior valor de Y_{CER} foi obtido a 30 °C, 200 bar e vazão de solvente de $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tabela 4-2. Parâmetros cinéticos para o período de taxa de extração constante (CER).

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	$Q_{CO_2} \times 10^5$ (kg CO ₂ / s)	$M_{CER} \times 10^7$ (kg Extrato / s)	$Y_{CER} \times 10^3$ (kg Extrato / kg CO ₂)	$t_{CER}/60$ (s)	R_T (% b.s.)
400	50	5,5	2,63	4,78	32	3,62
400	50	11,1	8,75	7,88	26	6,30
200	50	5,5	3,75	6,81	24	2,97
200	50	11,1	7,73	6,96	28	4,80
400	30	5,5	4,09	7,43	49	3,56
400	30	11,1	8,67	7,81	26	4,43
200	30	5,5	2,10	3,82	50	2,50
200	30	11,1	9,54	8,59	22	4,54

A influência da temperatura, pressão e vazão de solvente sobre a velocidade de transferência de massa na SFE de matrizes vegetais apresenta comportamentos diferentes. Na SFE de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) a influência de temperatura e pressão dependeu da origem da matéria-prima [Ferreira et al., 1999]. Os efeitos da pressão e vazão de solvente sobre M_{CER} e Y_{CER} foram significantes na SFE de camomila (*Chamomila recutita*) [Povh et al., 2001]. Na extração de oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale*) a interação pressão – vazão de solvente foi significativa na velocidade de transferência de massa [Zancan et al. [2002].

Da análise do gráfico dos efeitos normalizados (ver **Anexo D**), a vazão do solvente resultou ser o único fator significativo sobre os parâmetros cinéticos (M_{CER} e Y_{CER}). Assim, para aumentar a taxa de transferência de massa não seria necessário aumentar a temperatura ou a pressão, dentro das condições operacionais estudadas. Estes resultados confirmam os resultados do rendimento global (X_0), onde os efeitos da temperatura e pressão não aumentaram o rendimento de forma significativa. Assim, pode-se concluir que, nas condições em que foram realizados os experimentos, as melhores condições para extração de artemisinina seriam 200 bar, 30 °C e 11,1 kg CO₂/s.

A habilidade para prever as OEC é de fundamental importância na otimização de uma planta industrial. A modelagem matemática é provavelmente a principal ferramenta de predição, que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo. Dependendo do modelo selecionado, diferentes informações experimentais são necessárias.

Na Tabela 4-3 são apresentadas as condições operacionais, vazão de solvente, rendimento global (X_0), solubilidade (Y^*), densidade do CO₂, e as características do leite, usadas no ajuste das OEC. O maior valor de Y_{CER} (ver Tabela 4-2) aumentada em 10 % foi considerado como uma estimativa da solubilidade do extrato no solvente supercrítico (Y^*). A solubilidade é um dado experimental necessário no modelo de **Sovová [1994]**. A densidade do CO₂ foi obtida de **Angus et al. [1976]**. A porosidade das partículas foi similar ao reportado para folhas por **Goto et al. [1993]**. Os parâmetros ajustados dos modelos testados estão apresentados na Tabela 4-4. Os desvios médios quadráticos médios (S^2) para cada modelo se encontram na Tabela 4-5. Como pode ser observado nesta tabela, os modelos de **Sovová [1994]**, Empírico [**Naik et al., 1989**], e **Martinez et al. [2003]** são os que melhor representam as curvas globais de extração.

Tabela 4-3. Condições experimentais usadas para a modelagem matemática da SFE de *A. annua*.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	$Q_{CO_2} \times 10^5$ (kg CO ₂ /s)	X_0 (kg extrato / kg ss)	Solubilidade (Y^*) ^a (kg extrato / kg CO ₂)	ρ_{CO_2} ^b (kg/m ³)
400	50	5,5	0,06496	0,00867	923,32
400	50	11,1			
200	50	5,5	0,04934	0,00749	784,29
200	50	11,1			
400	30	5,5	0,05529	0,00859	988,31
400	30	11,1			
200	30	5,5	0,05195	0,00945	890,50
200	30	11,1			

Características do leito de partículas	
Diâmetro médio das partículas (m)	$4,92 \times 10^{-4}$
Massa de alimentação (kg)	0,050
Volume do leito (m ³)	$1,63 \times 10^{-4}$
Altura do leito (m)	0,07
Diâmetro do leito (m)	0,0545
Densidade real (kg/m ³)	950,9
Densidade aparente (kg/m ³)	306,19
Porosidade de leito (ϵ)	0,678
Porosidade das partículas (β)	0,54

^aValor máximo de Y_{CER} aumentado em 10 %, ^b Angus et al. [1976]

Tabela 4-4. Parâmetros ajustados dos vários modelos usados na modelagem das OEC de *A. annua*.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	$Q_{CO_2} \times 10^5$ (kg CO ₂ /s)	Crank	Tan & Liou	Goto et al.		Sovová		Naik et al.	Martinez et al.	
			[1975]	[1989]	[1993]	[1994]	[1989]	[2003]			
			$D \times 10^{12}$ (m ² /s)	$k_d / 60$ (s ⁻¹)	ϕ	K	$t_{CER} / 60$ (s)	k (-)	$k/60$ (s)	b/60 (s)	$t_{mi} \times 60$ (s ⁻¹)
400	50	5,5	0,16	0,0051	1,4153	1,771	34,9	0,096	141,22	0,0056	-3130,59
400	50	11,1	1,01	0,0149	0,7642	0,729	9,1	0,135	30,629	0,0183	-1730,74
200	50	5,5	0,24	0,0062	2,8303	1,921	7,9	0,095	107,14	0,0069	-4477,28
200	50	11,1	1,09	0,0160	0,6237	0,709	8,88	0,123	28,318	0,0200	-1094,89
400	30	5,5	0,39	0,0078	4,0953	1,174	23,5	0,053	71,461	0,0092	-3345,11
400	30	11,1	0,80	0,0127	2,9355	1,003	10,5	0,046	36,223	0,0127	-2480,19
200	30	5,5	0,12	0,0045	1,8692	2,457	38,1	0,061	167,02	0,0048	-3650,47
200	30	11,1	1,21	0,0161	12,433	0,872	10,3	0,049	22,934	0,0232	-969,76

Tabela 4-5. Desvios quadrados médios do ajuste dos dados experimentais.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	$Q_{CO_2} \times 10^5$ (kg CO ₂ /s)	Crank [1975]	Tan & Liou [1989]	Goto et al. [1993]	Sovová [1994]	Naik et al. [1989]	Martinez et al. [2003]
400	50	5,5	0,2890	0,0379	0,1462	0,0527	0,0306	0,0028
400	50	11,1	0,3969	0,3467	0,5219	0,1686	0,2302	0,0118
200	50	5,5	0,1020	0,0917	0,0982	0,0042	0,0165	0,0069
200	50	11,1	0,2658	0,2123	0,1670	0,0146	0,1199	0,0063
400	30	5,5	0,2850	0,2617	0,0131	0,0158	0,0309	0,0159
400	30	11,1	0,1439	1,0108	0,0836	0,0467	0,0776	0,0923
200	30	5,5	0,1700	0,0206	0,0195	0,0016	0,0028	0,0015
200	30	11,1	0,2041	1,7631	0,1120	0,3767	0,1746	0,0983

A Figura 4-8 apresenta a comparação dos dados experimentais e o ajuste dos modelos de Sovová [1994], Empírico [Naik et al., 1989], e Martinez et al. [2003], para as extrações realizadas a 200 bar, 50 °C, e $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s e $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

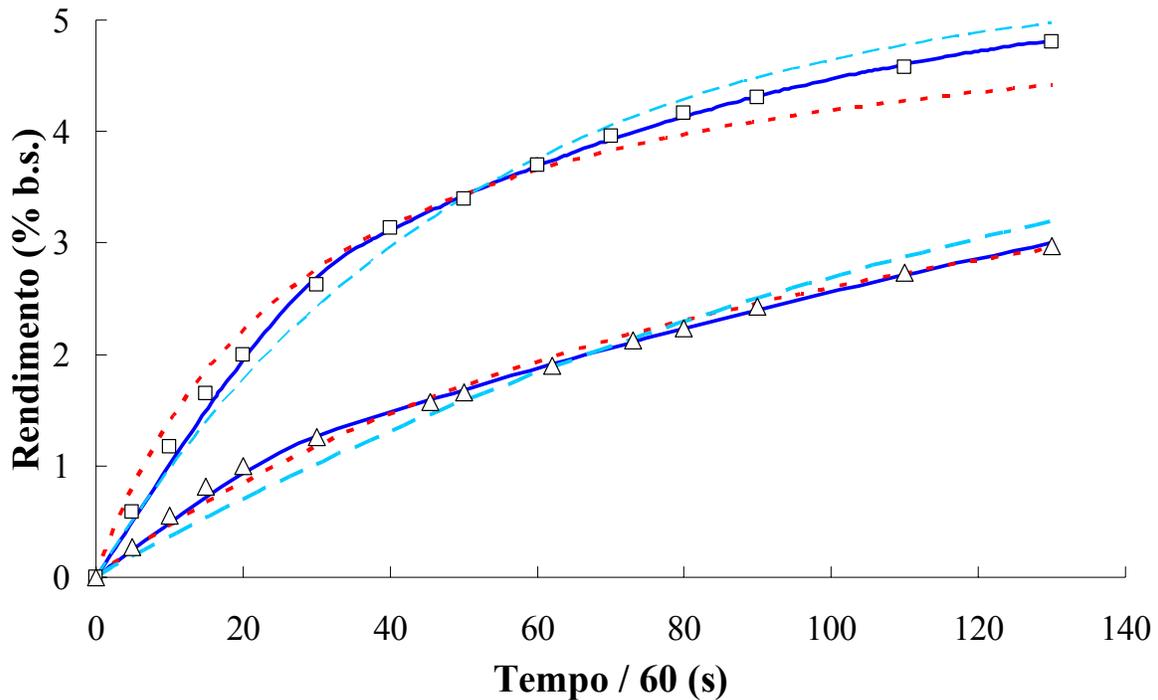


Figura 4-8. Comparação dos dados experimentais com as melhores curvas ajustadas a 200 bar, 50 °C e (Δ) $5,5 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s; (□) $11,1 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s (— Sovová [1994], - - - Empírico [Naik et al., 1989], - - - Martinez et al. [2003]).

O modelo empírico [Naik et al., 1989] representou bem os dados experimentais devido ao formato hiperbólico das OEC, principalmente na menor vazão do solvente. Neste modelo, os efeitos termodinâmicos e de transferência de massa estão englobados no parâmetro k . Assim, a extensão do modelo para condições de extração diferentes àquelas usadas no ajuste não é aconselhável. O modelo empírico foi aplicado satisfatoriamente na modelagem das OEC de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*), *Elettaria cardamum*, gengibre (*Zingiber officinale* Linn.) e vetiver (*Vernonia zizanioides*) [Naik et al., 1989]. Esquivel et al. [1999a] usaram a equação empírica para modelar as OEC na SFE a partir de

polpa de azeitona seca, concluindo que o parâmetro k diminui com a vazão do solvente a uma dada temperatura e pressão. Este comportamento é verificado por uma simples inspeção da Tabela 4-4.

Da mesma maneira que o modelo empírico, os parâmetros do modelo de **Martinez et al. [2003]** não têm significado físico, e sua relação com outras variáveis de processo ainda deve ser estudada. Os autores modelaram dados de extração de oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale*) comparando-o com o modelo de **Sovová [1994]**, afirmando que o modelo apresentado (logístico) proporciona menores desvios médios quadráticos que o modelo de **Sovová [1994]**, e, portanto, representa melhor as OEC.

Por outro lado, o modelo de **Sovová [1994]** tem o parâmetro termodinâmico (solubilidade) dissociado dos parâmetros de transferência de massa (k_{y_a} e k_{x_a}) e foi obtido a partir do balanço de massa diferencial. Este modelo é adequado para representar curvas de extração com um período *CER* bem definido. A Tabela 4-6 apresenta os valores dos coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{y_a}) e na fase sólida (k_{x_a}). O coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{y_a}) foi calculado segundo procedimento apresentado por **Povh et al. [2001]** usando as Eqs. (8) e (9). O coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{x_a}) foi obtido da relação:

$$k = \frac{k_{x_a} \cdot \rho_S \cdot X_K}{k_{y_a} \cdot \rho_{CO_2} \cdot Y^*} \quad (44)$$

Onde k é o parâmetro ajustado no modelo de **Sovová [1994]** e X_K é definido pela Eq. (14).

Os valores obtidos estão em concordância com os coeficientes de transferência de massa apresentados na SFE de camomila [Povh et al., 2001] e gengibre [Zancan et al., 2002; Martinez et al., 2003].

Podemos observar da Tabela 4-6 que o parâmetro de transferência de massa na fase fluida (k_{y_a}) é de duas a três ordens de magnitude maior que o parâmetro na fase sólida (k_{x_a}). Na SFE a partir de *Hippophaë rhamnoides*, o coeficiente de transferência de massa na fase fluida foi três ordens de magnitude maior que o coeficiente de transferência de massa na fase sólida [Štastová et al., 1996].

Tabela 4-6. Coeficientes de transferência de massa na fase fluida e sólida, calculados a partir do modelo de Sovová [1994].

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	$Q_{CO_2} \times 10^5$ (kg CO ₂ / s)	$k_{y_a} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$k_{x_a} \times 10^5$ (s ⁻¹)
400	50	5,5	0,34	0,59
400	50	11,1	2,06	6,57
200	50	5,5	1,18	1,80
200	50	11,1	2,39	7,66
400	30	5,5	0,82	1,68
400	30	11,1	1,90	3,55
200	30	5,5	0,22	0,32
200	30	11,1	2,10	5,58

O coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{y_a}) é uma função das condições de processo e das características do leito. Como as características do leito (tamanho da partícula e densidade do leito) foram mantidas constantes, deveria se esperar que as condições de processo (temperatura, pressão e vazão de solvente) influenciassem no

coeficiente de transferência de massa. Da análise do gráfico dos efeitos normalizados (**Anexo D**), observamos que a vazão é o único fator cujo efeito é significativo, como seria de se esperar no caso de transferência de massa convectiva. Na SFE a partir de *Hippophaë rhamnoides* o coeficiente foi aproximadamente proporcional à raiz quadrada da velocidade intersticial do solvente [Štastová et al., 1996]. De forma geral, a temperatura e pressão não tem efeito significativo sobre o k_{y_a} , tal como reportado na SFE de pimenta do reino [Ferreira et al., 1999], camomila [Povh et al., 2001] e gengibre [Zancan et al., 2002].

Por outro lado, o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{x_a}) não deveria depender da vazão do solvente, porém, da análise do gráfico dos efeitos normalizados (**Anexo D**), observamos que existe uma dependência de k_{x_a} com a vazão. Similares resultados foram apresentados na SFE de camomila [Povh et al., 2001]. De fato, observando na Figura 4-8, vemos que apesar de termos alguma relação aproximadamente linear entre a massa de extrato com o tempo no final do experimento, ainda devemos ter alguma influência da convecção no processo de extração, uma vez que k_{x_a} não deveria ser função da vazão do solvente. De maneira similar para o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{y_a}), a temperatura e pressão não apresentaram efeitos significantes sobre o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{x_a}). Štastová et al. [1996] observaram incrementos significativos do coeficiente de transferência de massa na fase sólida com a temperatura.

No aumento de escala do processo de extração é desejável obter valores confiáveis do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{y_a}), uma vez que a taxa de extração no período *CER* (M_{CER}) pode ser calculada a partir deste valor e

conseqüentemente o tempo de operação. A determinação do tempo de operação é de fundamental importância na estimativa do custo de manufatura, pois o tempo está relacionado com o número de ciclos de extração que uma unidade de extração pode executar por período [**Rosa & Meireles, 2005**].

Dos resultados anteriores podemos concluir que o modelo de **Sovová [1994]** é o que melhor representa as OEC, permitindo obter os parâmetros necessários para projetos de aumento de escala. Porém, é preciso salientar que os métodos comuns de aumento de escala não são facilmente aplicáveis a processos de alta pressão. **Fullana et al. [2000]** afirmam que o coeficiente de transferência de massa na fase fluida não pode ser usado de forma direta no aumento de escala, sendo necessária alguma correção.

4.2. *Cordia verbenacea* DC – Erva baleeira

4.2.1. Rendimento Global e Extração Fracionada

Os rendimentos globais em extrato para o sistema CO₂ + *Cordia verbenacea* são apresentados na Tabela 4-7. A análise de variância (ANOVA) indicou que o modelo estatístico se ajusta bem aos dados experimentais. O coeficiente de correlação foi $R^2 = 0,9712$.

Tabela 4-7. Influência da temperatura e pressão sobre o rendimento global na extração de solúveis de *C. verbenacea* usando CO₂-SC.

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento global (X_o) em extrato (% base seca)
1	300	30	2,87
2	300	50	4,25
3	100	30	1,60
4	100	50	0,47
5	341	40	3,36
6	200	54	3,90
7	78	40	0,11
8	200	26	2,35
9	200	40	3,36
10	200	40	3,35
11	200	40	3,32

X_o = kg extrato / kg matéria-prima seca

O modelo estatístico indicou que a contribuição de cada variável pode ser ordenada da seguinte maneira: termo linear da pressão (p -valor = 0,000106), termo quadrático da pressão (p -valor = 0,001402), interação pressão / temperatura (p -valor =

0,01194), e termo linear da temperatura (p -valor = 0,046091), para um nível de significância de 95 %.

Os efeitos da pressão e temperatura (nos intervalos de 150 – 450 bar e 35 – 65 °C) foram estudados na SFE de dente-de-leão usando um planejamento fatorial completo 3^2 . A ANOVA mostrou que o termo linear da pressão e a interação da pressão e temperatura foram altamente significativos, para um nível de confiança de 95 % [Simándi et al., 2002].

Da Tabela 4-7 observamos que o máximo e mínimo rendimento foram obtidos a 300 bar / 50 °C (4,25 % b.s.) e 78 bar / 40 °C (0,11 % b.s.), respectivamente. Na pressão de 100 bar, o rendimento global diminuiu de 1,60 % b.s. para 0,47 % b.s., nas temperaturas de 30 e 50 °C, respectivamente. A 300 bar o rendimento global aumenta de 2,87 % b.s. para 4,25 % b.s., nas mesmas temperaturas. Estes comportamentos correspondem às mudanças das propriedades físicas do CO₂, principalmente da densidade, que está relacionada com seu poder de solvatação. Na pressão de 100 bar, a densidade do CO₂ diminuiu consideravelmente com o aumento da temperatura (de 771,5 kg/m³ a 30 °C para 384,33 kg/m³ a 50 °C), resultando em uma diminuição do poder de solvatação do CO₂ e, conseqüentemente, na diminuição do rendimento global. Por outro lado, um efeito contrário é observado para a pressão de 300 bar. Embora se tenha um aumento da densidade nestas condições (de 870,43 para 947,98 kg/m³, a 50 °C e 30 °C, respectivamente), o efeito do aumento da pressão de vapor do soluto é mais importante que o efeito do aumento da densidade. Estudos referentes aos efeitos da temperatura e pressão sobre o rendimento global de óleo de sementes de uva [Gómez et al., 1996] e dente-de-leão [Simándi et al., 2002] mostraram comportamentos similares.

O modelo estatístico prediz que para cada isoterma existe uma pressão na qual se obtém um máximo de rendimento global e, acima deste valor, ocorre um decréscimo. Comportamento similar foi predito nos estudos dos rendimentos globais de cúrcuma [Began et al., 2000] e alho [Sass-Kiss et al., 1998]. Entretanto, os dados experimentais para as isotermas de 30 °C (ensaios 1 e 3), 50 °C (ensaios 2 e 4) e 40 °C (ensaios 5, 7 e 9-11), mostram que ocorre um aumento do rendimento global com a pressão, o que era esperado, pois segundo Brunner [1994], o aumento da pressão resulta em um aumento do poder de solvatação do CO₂.

A fim de se obter uma identificação diferenciada da composição química do extrato obtido por SFE, foi realizada uma extração seletiva através da técnica de extração fracionada. A temperatura selecionada foi 60 °C, nas pressões de 80, 200 e 300 bar. Estas condições foram selecionadas considerando que a 60 °C e 80 bar consegue-se obter um extrato com composição similar ao óleo volátil obtido por hidrodestilação [Reverchon, 1997]. A medida que se aumenta a pressão consegue-se solubilizar componentes de elevada massa molecular.

Na Tabela 4-8 é apresentada a comparação dos rendimentos da extração fracionada por SFE, àqueles obtidos pelos métodos convencionais (extração com etanol e hidrodestilação) e do rendimento global por SFE a 60 °C / 300 bar.

Os rendimentos da extração com etanol e hidrodestilação foram $8,13 \pm 0,01$ % (b.s.) e $0,55 \pm 0,06$ % (b.s.), respectivamente. Na SFE os rendimentos foram de $3,1 \pm 0,4$ e $3,6 \pm 0,4$ % (b.s.), na extração fracionada e no rendimento global, respectivamente. Na extração fracionada, as maiores porcentagens em extrato foram obtidas a 200 e 300 bar, com 48,4 % do rendimento total para cada condição de pressão.

Tabela 4-8. Comparação dos rendimentos em extrato e β -cariofileno de *C. verbenacea* obtidos pelos diferentes métodos de extração.

Método de extração	X_o (% b.s.)		Pureza (%)*
	Extrato	β -cariofileno	
Hidrodestilação	0,55 \pm 0,06	0,12 \pm 0,01	21,8
SFE fracionada (60 °C)	3,1 \pm 0,4	0,077 \pm 0,007	2,48
- 80 bar	0,096 \pm 0,004	0,032 \pm 0,001	33,3
- 200 bar	1,5 \pm 0,2	0,045 \pm 0,006	3,0
- 300 bar	1,5 \pm 0,2	-	-
SFE (60 °C / 300 bar)	3,6 \pm 0,4	0,043 \pm 0,005	1,19
Extração com Etanol	8,13 \pm 0,01	0,0894 \pm 0,0001	1,09

* Pureza = (kg β -cariofileno / kg extrato) \times 100

Da análise química foi observada que a composição química dos extratos obtidos pelos diferentes métodos variou apreciavelmente. Em todos os extratos foi observada a presença majoritária do β -cariofileno, exceto na fração obtida a 60 °C / 300 bar. Para cada extrato ou fração só foram identificados os componentes com maior porcentagem em área. O extrato obtido com etanol apresentou os compostos α -santaleno e β -cariofileno. No óleo volátil extraído por hidrodestilação foram identificados os compostos α -pineno, δ -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno e (+)-aromadendreno. No extrato obtido por SFE a 60 °C / 300 bar foi observada a presença do careno, santalol e 6,10-dimetil-5,9-undecadien-1-ino. Nos extratos obtidos por SFE fracionada, as composições variaram de acordo com a condição operacional. A maior quantidade de componentes foi observada na fração obtida a 60 °C / 200 bar. Na fração obtida a 60°C / 80 bar, foram identificados, além dos compostos presentes no óleo volátil (exceto o α -pineno), o β -elemeno, longiciclono, germacreno D, e

β -bisaboleno. Na fração obtida a 60 °C / 200 bar, foram identificados os compostos β -farneseno, germacreno D, δ -cadineno, espatulenol, e cis- α -santalol, assim como os compostos do óleo volátil, exceto o δ -elemeno e α -pineno. A fração obtida a 60 °C / 300 bar, apresentou uma composição completamente diferente, e só foi observada a presença de compostos de massa molecular elevada, como o clionasterol. Destes resultados, é evidente que na extração fracionada o teor de componentes de alta massa molecular aumenta significativamente com a pressão de extração. A variação da composição química com a pressão (densidade) é amplamente reportada na literatura, segundo revisão apresentada por **Reverchon [1997]**.

Para fins de comparação entre os diferentes métodos, o teor de β -cariofileno foi quantificado e os resultados também são apresentados na Tabela 4-8. Muito embora o maior rendimento tenha sido observado na extração com etanol ($8,13 \pm 0,01$ % b.s.), o óleo volátil obtido por hidrodestilação apresentou o maior teor de β -cariofileno ($0,12 \pm 0,01$ % b.s.). Quando comparado com a extração fracionada por SFE, o óleo volátil apresentou uma menor pureza relativa de β -cariofileno do que a fração obtida a 60 °C / 80 bar; sendo 21,8 e 33,3 %, respectivamente. A pureza relativa foi definida como a massa de β -cariofileno dividida pela massa de extrato. Na extração fracionada, o teor de β -cariofileno diminuiu com o aumento da pressão. Na fração de 60 °C / 300 bar não foi observada a presença de β -cariofileno. Do ponto de vista qualitativo, o extrato obtido com etanol apresentou uma cor verde escura. Por outro lado, o óleo volátil obtido por hidrodestilação foi verde claro. Na extração fracionada por SFE, a cor dos extratos variou desde uma cor amarela clara a 80 bar até uma cor verde escura a 300 bar. A placa da CCD dos extratos de *C. verbenacea* pode ser observada na Figura 4-9.

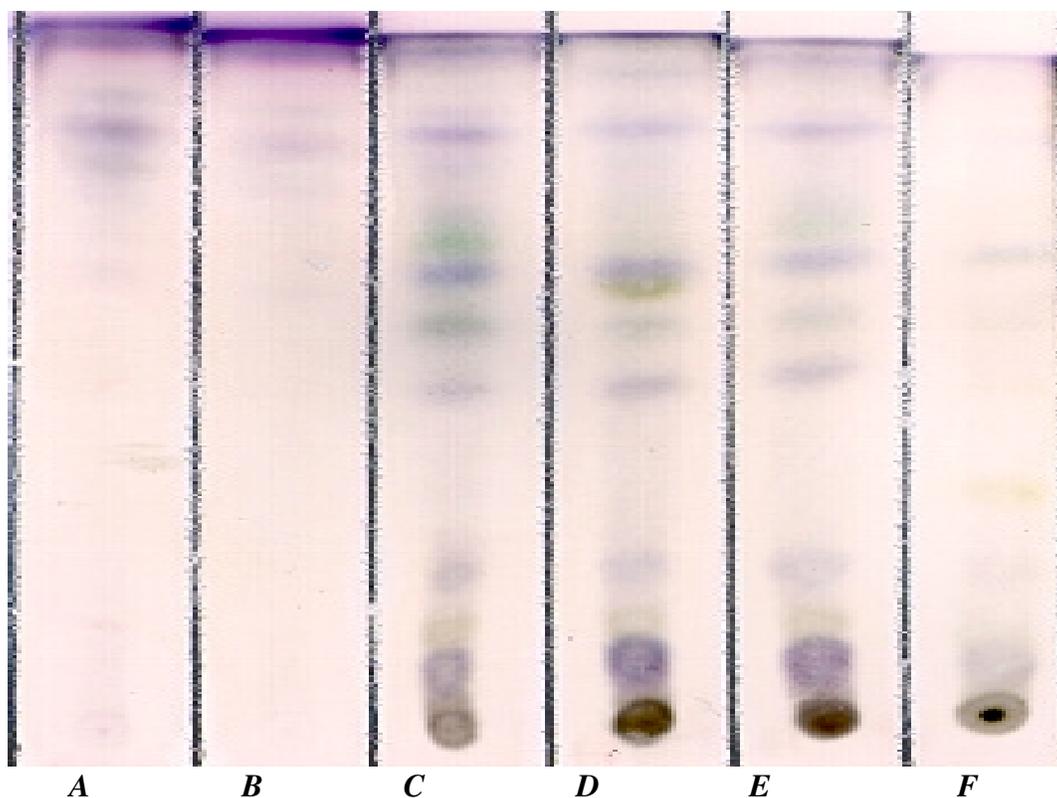


Figura 4-9. Análise por CCD dos extratos de *C. verbenacea*: Hidrodestilação (A), Extração Fracionada por SFE a 60 °C: 80 bar (B), 200 bar (C), 300 bar (D); Rendimento global por SFE a 60 °C / 300 bar (E); Extração com etanol (F). Fase móvel hexano e acetato de etila (90:10). Revelador: Solução de anisaldeído.

O óleo volátil produzido por hidrodestilação (A) e a fração obtida com CO₂-SC a 60 °C / 80 bar (B) apresentam a menor quantidade de compostos (menor quantidade de bandas), com, praticamente, o mesmo perfil cromatográfico (ver Figura 4-10). Esta similaridade sugere que, na fração obtida a 60 °C / 80 bar (B), são extraídos vários componentes presentes no óleo volátil. Cabe mencionar que uma classe de compostos (como por exemplo o α -pineno) não está presente no extrato supercrítico, os quais, provavelmente, foram perdidos devido ao arraste com a corrente de CO₂ na depressurização. Muitos pesquisadores têm recomendado temperaturas entre 40 e 60 °C e pressões de extração menores que 100 bar para obter um extrato com composição similar

ao óleo volátil a partir de matrizes vegetais [Reverchon, 1997]. No estudo da composição dos extratos das raízes de angélica [Nykänen et al., 1991] e folhas de orégano, manjeriço e menta [Díaz-Maroto et al., 2002], a percentagem de várias classes de compostos do óleo volátil obtido por hidrodestilação foi similar aos extratos obtidos por SFE.

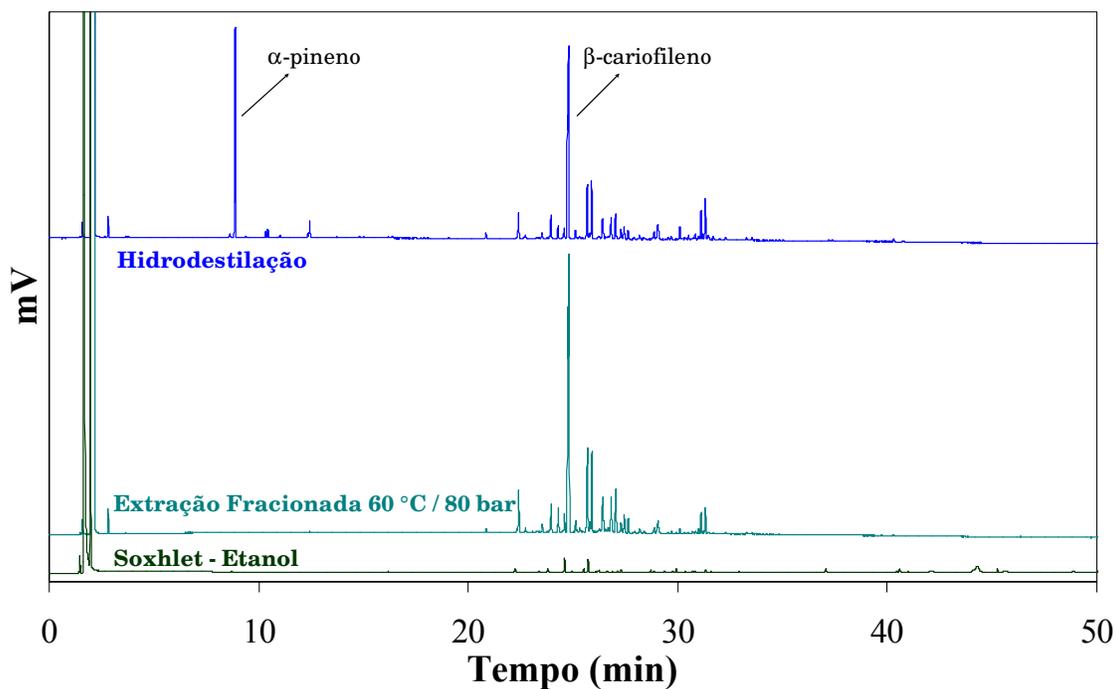


Figura 4-10. Cromatogramas do óleo volátil obtido por hidrodestilação e do extrato obtido por extração fracionada a 60 °C / 80 bar, e com etanol a partir de *C. verbenacea*.

Por outro lado, nas frações obtidas a 60 °C / 200 bar (*C*) e 60 °C / 300 bar (*E*), existem uma maior quantidade de compostos (grande número de bandas). A altas densidades de CO₂ a extração de compostos de massa molecular elevada é possível. No extrato obtido com etanol (*F*) não é observada a presença de muitas bandas. Como o etanol é um solvente mais hidrofílico, ocorre a extração preferencial de compostos hidrofílicos, o que pode ser observado pela grande quantidade de material retido no ponto de aplicação da CCD.

4.2.2. Estudo das Propriedades Funcionais dos Extratos de Erva Baleeira

Segundo **Meireles [2003]**, todo estudo sobre aplicação da tecnologia de fluidos supercríticos deve incluir, além da determinação da composição química, algum estudo de uma propriedade funcional. Estes estudos podem mostrar se a SFE é mais atrativa do que os métodos convencionais. Nesse sentido, a atividade anticâncer dos diferentes extratos de *Cordia verbenacea* foi avaliada. Os testes foram realizados pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-UNICAMP. A descrição da metodologia foi apresentada por **Braga et al. [2003]**. Os resultados são apresentados no **Anexo E**. Da análise dos resultados foi possível concluir que o extrato obtido a 40 °C / 200 bar apresentou o melhor resultado de atividade anticâncer. Para o estudo da cinética do processo por SFE esta condição foi usada.

Uma outra propriedade funcional estudada foi a atividade antibacteriana dos extratos obtidos por SFE. Estes ensaios foram realizados pela Dra. Daisy Sato, do Instituto Adolfo Lutz – Ribeirão Preto. A descrição da metodologia foi apresentada por **Leal et al. [2003]**. Os resultados são apresentados no **Anexo F**. A atividade antibacteriana, considerando as concentrações mínimas inibitórias (MIC) contra *Mycobacterium tuberculosis*, mostrou que as condições de extração usadas na SFE, não afetam sua atividade antibacteriana (MIC = 128 µg / mL). Similar valor foi reportado para o extrato de alecrim [**Leal et al. 2003**] e cravo-da-índia [**Quispe-Condori et al., 2004**]. Estes valores são maiores aos reportados para os extratos de gengibre e cúrcuma (31,25 µg / mL) [**Leal et al. 2003**]. Portanto, o extrato de *C. verbenacea* apresenta baixa atividade antibacteriana contra *M. tuberculosis*.

4.2.3. Cinética de Extração e Modelagem Matemática

A determinação do rendimento global e a avaliação da composição química e das propriedades funcionais, em função da temperatura e pressão de extração, não são suficientes para o projeto de processos por SFE. Outros parâmetros de processo, tais como vazão de solvente (ou tempo de residência para uma dada altura de leito), e tamanho das partículas, dentre outras, podem afetar a velocidade de extração do processo [Brunner, 1994]. O estudo da influência destes parâmetros permite selecionar modelos confiáveis para interpretar a cinética da etapa da extração e executar procedimentos de aumento de escala [Reverchon, 1997].

Para o estudo da cinética do processo de extração, as condições de maior rendimento (300 bar / 50 °C) e melhor resultado de teste de atividade anticâncer (200 bar / 40 °C) foram selecionadas. A Tabela 4-9 apresenta as condições operacionais, rendimento global, densidade do CO₂, e as características do leito de partículas usadas nestes experimentos. Os dados de densidade do CO₂ foram obtidos de Angus et al. [1976]. A porosidade das partículas foi similar ao reportado para folhas por Goto et al. [1993]. Estes dados foram usados no ajuste dos diversos modelos matemáticos às curvas globais de extração.

Na Figura 4-11 são apresentadas as curvas globais de extração para ambas condições operacionais. As OEC apresentam uma etapa inicial em que a taxa de extração cresce lentamente até atingir o regime pseudo-estacionário. De acordo com a classificação de Brunner [1994], a OEC da *C. verbenacea* pode ser considerada do tipo II.

Tabela 4-9. Condições experimentais para a modelagem das OEC de *C. verbenacea*.

Bed porosity (ε)	0,71
Rendimento global (X_o) (kg extrato / kg matéria-prima)	300 bar / 50 °C = 0,0377 200 bar / 40 °C = 0,0304
Densidade real (kg/m ³)	1360
Densidade do CO ₂ (kg/m ³)	300 bar / 50 °C = 870,43 200 bar / 40 °C = 839,81
Vazão do solvente (kg CO ₂ /s)	$7,63 \times 10^{-5}$
Altura do leito (m)	0,053
Diâmetro do leito (m)	0,0545
Diâmetro das partículas (m)	$4,21 \times 10^{-4}$
Massa de alimentação (kg)	0,050
Porosidade das partículas (-) [§]	0,54

[§]Goto et al. [1993]

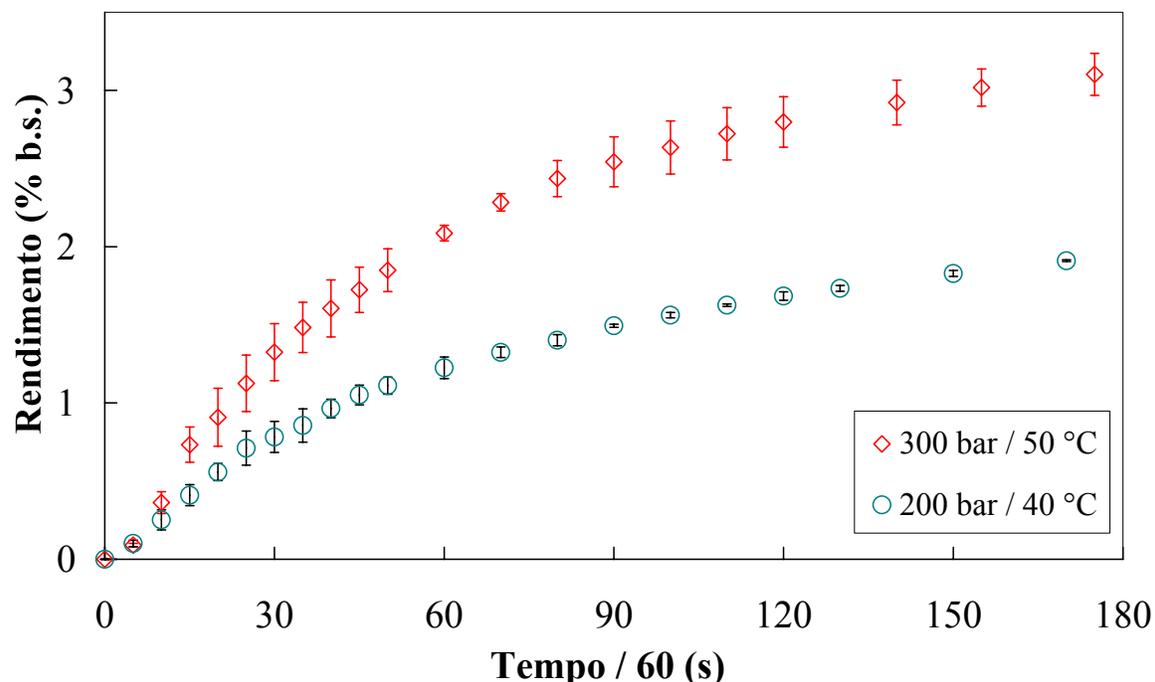


Figura 4-11. Curvas globais de extração de *C. verbenacea* a diferentes condições de temperatura e pressão, e vazão de solvente de $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Os parâmetros cinéticos do período *CER* estão apresentados na Tabela 4-10. Os maiores valores são obtidos a 300 bar / 50 °C. Nesta condição, os parâmetros são 73 a 82 % maiores àqueles obtidos a 200 bar / 40 °C. Este comportamento pode ser explicado pelo baixo rendimento obtido a 200 bar / 40 °C. Nesta condição, o R_{CER} representa 49,34 % do rendimento global (X_0).

Tabela 4-10. Parâmetros cinéticos do período *CER* na extração de solutos de *C. verbenacea*.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	$M_{CER} \times 10^7$ (kg Extrato / s)	$Y_{CER} \times 10^3$ (kg Extrato / kg CO ₂)	$t_{CER} / 60$ (s)	R_{CER} (% b.s.)
200	40	1,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2	50 ± 5	1,15 ± 0,04
300	50	3,1 ± 0,3	4,4 ± 0,4	53 ± 7	2,10 ± 0,07

Usando os dados da Tabela 4-9, os modelos de **Crank [1975]**, **Tan & Liou [1989]**, **Goto et al. [1993]**, e Empírico [**Naik et al., 1989**] foram ajustados às curvas globais de extração. Os modelos que apresentaram os menores desvios médios quadráticos (S^2) foram os modelos de **Goto et al. [1993]** e Empírico [**Naik et al., 1989**]. Na Tabela 4-11 são apresentados os desvios médios quadráticos (S^2) e os parâmetros obtidos para ambos modelos.

Tabela 4-11. Desvios médios quadráticos e parâmetros ajustados na modelagem das OEC de *C. verbenacea*.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Goto et al. [1993]			Empírico [Naik et al., 1989]	
		$S^2 \times 10^{-2}$	ϕ	K	$S^2 \times 10^{-2}$	$k / 60$ (s)
200	40	2,44	0,8	1,6	1,65	105
300	50	4,66	0,6	0,89	5,42	58

Da Tabela 4-11 observamos que os parâmetros relativos à transferência de massa (ϕ) e à adsorção (K) diminuem com o aumento das condições operacionais. De forma geral, o parâmetro relativo à transferência de massa (ϕ) diminui com a densidade do solvente [Goto et al., 1993; Škerget & Knez, 2001]. Por outro lado, Škerget & Knez [2001] afirmam que, a pressão constante, K diminui com a temperatura e, a temperatura constante, K diminui com a pressão. Quando usamos o modelo de Goto et al. [1993] é desejável que o processo de extração seja realizado a valores baixos de K , onde a desorção é maior. Peker et al. [1992] afirmam que para valores de $K \ll 1$, o extrato é totalmente desorvido nos poros e, conseqüentemente, de fácil acesso ao solvente.

O modelo de Goto et al. [1993] foi aplicado na SFE de cacau, páprica, pimenta e *Silibum marianum*, tendo como único parâmetro ajustável a constante de equilíbrio de adsorção (K), com valores variando entre 5,70 e 453,53 [Škerget & Knez, 2001]. Entretanto, os desvios relativos médios do modelo foram relativamente altos. Os autores atribuíram estes resultados ao fato de usarem propriedades dos componentes ativos na estimativa do coeficiente de difusão binária e de transferência de massa externa. De fato, esta suposição não pode ser válida na SFE a partir de matrizes vegetais, considerando que o extrato é uma mistura complexa de compostos.

No modelo empírico o valor de k aumenta com as condições operacionais. Mas como mencionado anteriormente (ver Item 4.1.2), este modelo engloba os efeitos termodinâmicos e de transferência de massa no parâmetro k , e sua extensão para condições de extração diferentes àquelas usadas no ajuste não é aconselhável. O modelo empírico foi aplicado satisfatoriamente na modelagem das OEC de cravo-da-índia, gengibre e vetiver [Naik et al., 1989].

A Figura 4-12 mostra as curvas globais de extração de *C. verbenacea*, incluindo aquelas obtidas pelos modelos de **Goto et al. [1993]** e Empírico [**Naik et al., 1989**].

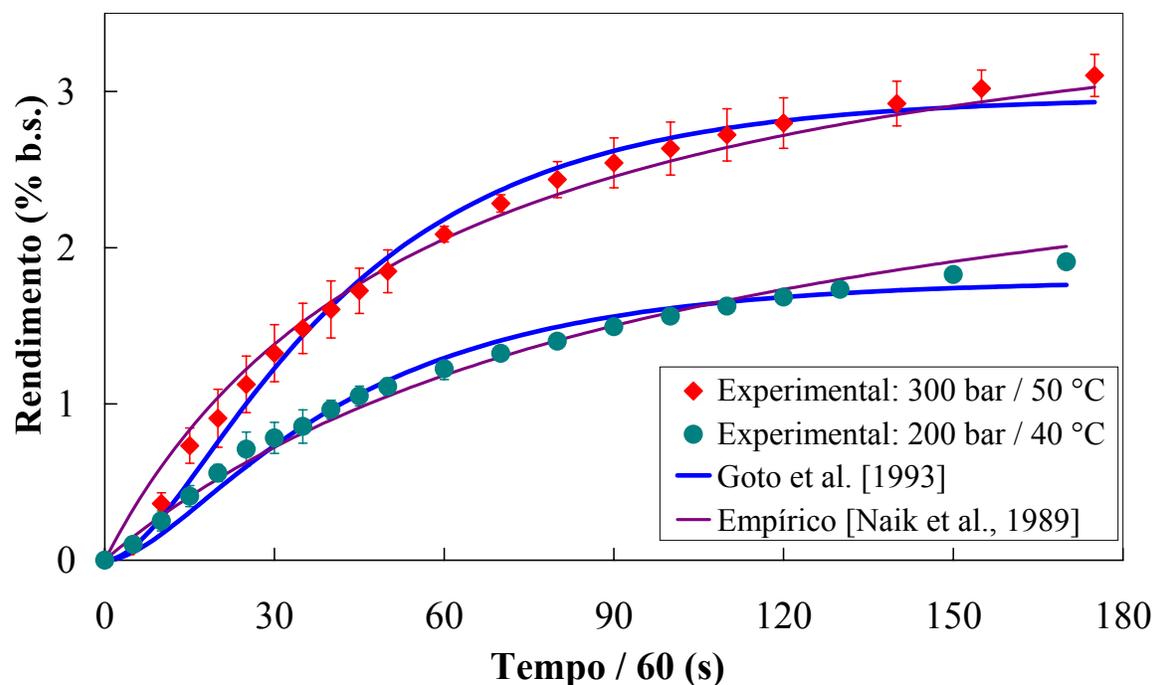


Figura 4-12. Comparação entre os dados experimentais e os modelos de Goto et al. [1993] e Empírico [Naik et al., 1989] a diferentes condições de temperatura e pressão. Vazão de solvente: $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

4.2.4. Efeito da Altura do Leito de Partículas na Cinética de Extração de Erva baleeira

O estudo do efeito da altura do leito de partículas na cinética de extração de *C. verbenacea* foi realizado nas condições de extração para os quais obteve-se o melhor resultado do teste de atividade anticâncer (200 bar / 40 °C). A vazão do solvente foi $6,49 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s. Para todos os ensaios, o diâmetro (0,02 m) e porosidade do leito (0,71) foram mantidos constantes. Os experimentos foram realizados usando alturas de leito de 0,08; 0,16 e 0,24 m, correspondentes a $10,05$; $20,11$ e $30,16 \times 10^3$ kg de massa de

alimentação, respectivamente. As OEC para as diferentes alturas de leito são apresentadas na Figura 4-13. Desta figura podemos observar que todas as curvas têm comportamentos similares.

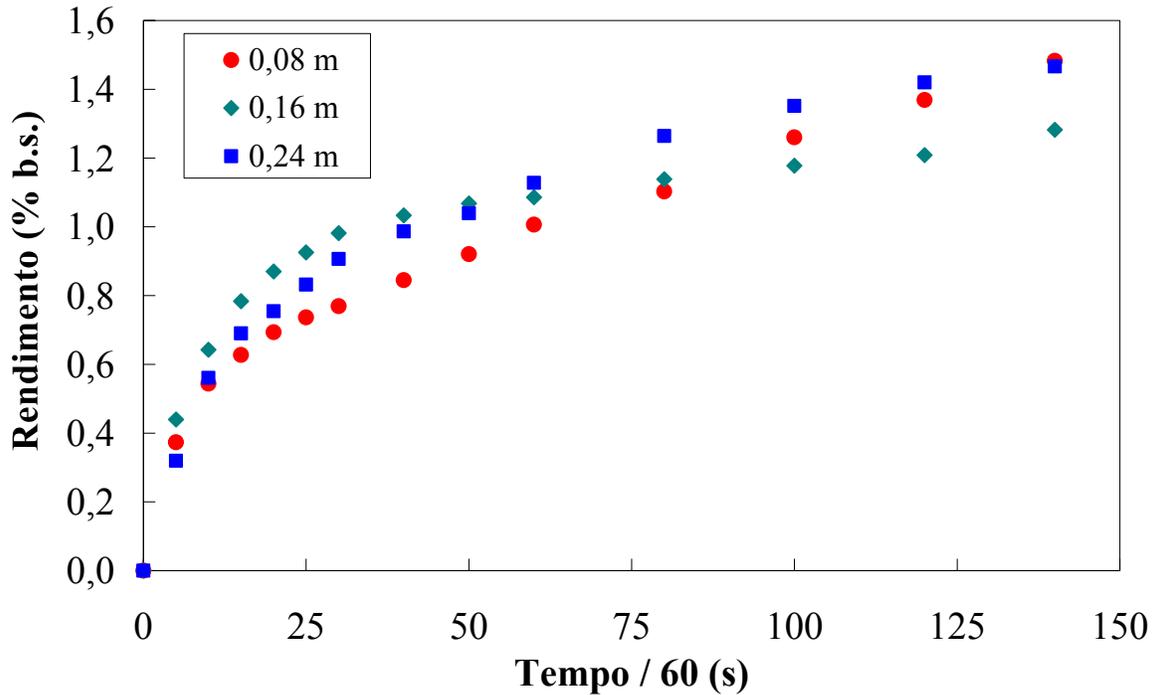


Figura 4-13. Curva global de extração da *C. verbenacea* a 200 bar / 40 °C / $6,49 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s, para diferentes alturas de leito.

Na Tabela 4-12 são apresentados os parâmetros cinéticos do período *CER* para as diferentes alturas de leito. A taxa de transferência de massa (M_{CER}) aumenta com a altura do leito, com valor constante para leitos de 0,16 e 0,24 m; similares tendências são observadas para os outros parâmetros (Y_{CER} e R_{CER}). A duração do período *CER* aumenta com a altura do leito.

Tabela 4-12. Parâmetros cinéticos do período CER a 200 bar / 40 °C / $6,49 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s e diferentes alturas de leito na SFE de *C. verbenacea*.

$F \times 10^3$ (kg)	H_B / D_B	$M_{CER} \times 10^7$ (kg Extrato / s)	$Y_{CER} \times 10^3$ (kg Extrato / kg CO ₂)	$t_{CER} / 60$ (s)	R_{CER} (% b.s.)
10,05	0,02	1,17	1,68	8,10	0,57
20,11	0,08	2,76	3,96	9,44	0,78
30,16	0,12	2,64	3,78	13,65	0,72

Usando os dados da Tabela 4-9 e Tabela 4-12, os modelos de Crank [1975], Tan & Liou [1989], Goto et al. [1993], Sovová [1994] e Empírico [Naik et al., 1989] foram ajustados às curvas globais de extração. No modelo de Sovová [1994] o máximo valor de Y_{CER} aumentado em 10 % foi usado como uma estimativa da solubilidade Y^* . Na Tabela 4-13 são apresentados os desvios médios quadráticos (S^2) dos diferentes modelos matemáticos. Os modelos que apresentaram os menores desvios médios quadráticos (S^2) foram os modelos de Crank [1975], Goto et al. [1993] e Sovová [1994].

Tabela 4-13. Desvios médios quadráticos dos modelos usados no ajuste das OEC para diferentes alturas do leito.

Modelo	Desvio médio quadrático $\times 10^3$		
	0,08 m	0,16 m	0,24 m
Crank [1975]	0,320	14,605	5,622
Tan & Liou [1989]	7,508	72,494	92,295
Goto et al. [1993]	2,251	1,785	50,081
Empírico [Naik et al., 1989]	4,504	49,715	11,257
Sovová [1994]	0,042	1,821	1,772

Na Tabela 4-14 são apresentados os parâmetros ajustados para os modelos de **Crank [1975]**, **Goto et al. [1993]** e **Sovová [1994]** em função da altura do leito.

Tabela 4-14. Parâmetros ajustados dos modelos de Crank [1975], Goto et al. [1993] e Sovová [1994].

$H_B \times 10^{-2} \text{ m}$	Crank [1975]	Goto et al. [1993]		Sovová [1994]	
	$D \times 10^{12} \text{ (m}^2\text{/s)}$	ϕ	K	t_{CER}	k
0,08	0,131	0,4390	5,108	5,94	0,008
0,16	0,142	9071,4	9,827	2,11	0,008
0,24	0,156	9,7189	5,532	4,35	0,022

No modelo de **Crank [1975]**, pode ser considerado que a altura do leito teve uma ligeira influência sobre o coeficiente de difusão (D). Entretanto, por ser um modelo que interpreta a SFE como unicamente devido à transferência de massa na fase sólida, esta variação não deveria ser esperada, pois as características do leito foram mantidas constantes. **Taylor [1996]** afirma que durante a extração dinâmica, a difusão no leito de partículas não acontece idealmente, como é de se esperar para um processo convectivo. A difusão é um fenômeno predominante apenas na etapa final da extração, na qual resta apenas extrato no interior das partículas.

No modelo de **Goto et al. [1993]**, o parâmetro relativo à transferência de massa (ϕ) apresenta um valor máximo a 0,16 m. Entretanto, a constante de equilíbrio de desorção (K) é aproximadamente constante para 0,08 e 0,24 m, com um valor máximo a 0,16 m.

Berna et al. [2000], a partir do modelo de **Sovová [1994]**, propuseram uma relação da variação do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) com a altura do leito (H_B) e massa de alimentação (F):

$$k_{Ya} = \frac{10}{t_{res} \cdot Q_{CO_2} \cdot F^{0,04}} \quad (45)$$

Onde:

$$t_{res} = \frac{\pi \cdot d_B^2 \cdot H_B \cdot \varepsilon \cdot \rho_{CO_2}}{4 \cdot Q_{CO_2}} \quad (46)$$

- K_{YA} : Coeficiente de transferência de massa na fase fluida [s^{-1}]
 t_{res} : Tempo de residência [s]
 Q_{CO_2} : Vazão mássica de solvente [kg CO₂ / s]
 F : Massa de alimentação [kg]
 d_B : Diâmetro do leito [m]
 H_B : Altura do leito [m]
 ε : Porosidade [-]
 ρ_{CO_2} : Densidade do CO₂ [kg/m³]

Segundo esta relação o coeficiente de transferência de massa na fase fluida diminui com a altura do leito. Entretanto, os valores do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) apresentados pelos mesmos autores não têm uma relação inversamente proporcional com a altura do leito.

Assim, os parâmetros obtidos na modelagem parecem não seguir um comportamento definido com a altura do leito. Conseqüentemente, a seleção de um modelo para aumento de escala é complicada, pois todos os modelos nem sempre são válidos para todos os ensaios.

A Figura 4-14 mostra as curvas globais de extração relacionando a razão da massa de solvente / massa de alimentação (m_{CO_2} / F) com o rendimento para as diferentes alturas de leito, incluindo àquelas obtidas pelos modelos de Crank [1975], Goto et al. [1993] e Sovová [1994].

As curvas globais de extração mostram que mantendo constante a relação m_{CO_2} / F , o máximo rendimento pode ser obtido usando leitos com alturas entre 0,16 e 0,24 m.

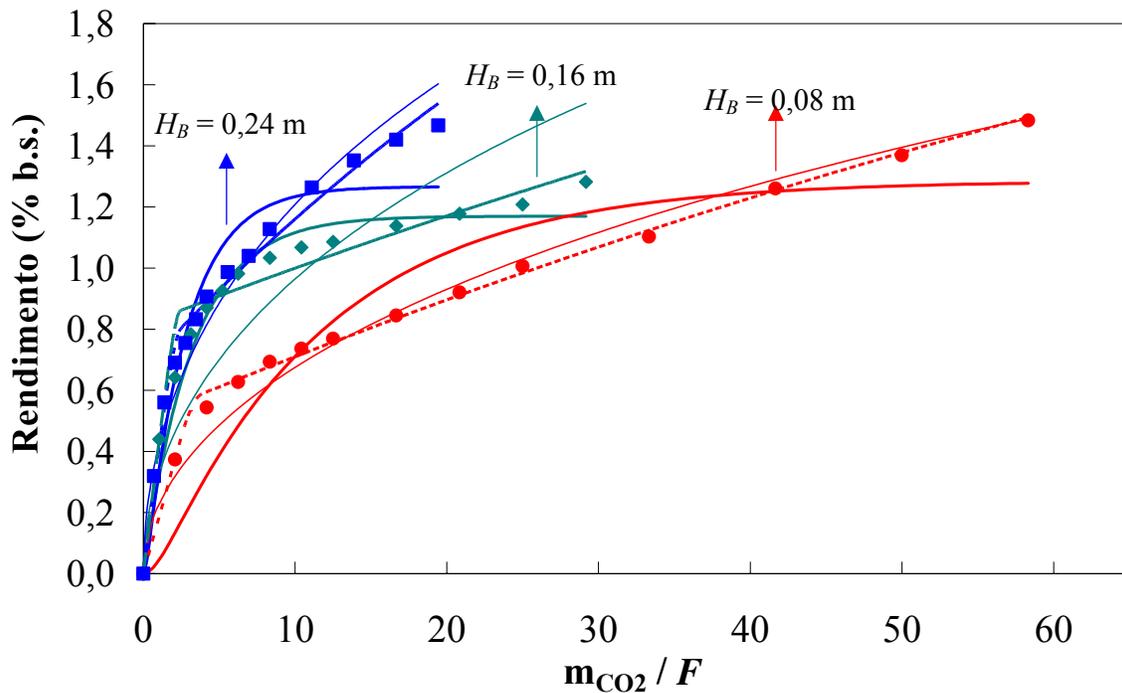


Figura 4-14. Comparação entre os dados experimentais e os modelos de Crank [1975] (—), Sovová [1994] (---) e Goto et al. [1993] (—•—), a 200 bar / 40 °C / $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

4.3. *Ocimum selloi* Benth

4.3.1. Rendimento Global

O primeiro passo na SFE de óleos voláteis é otimizar a temperatura e pressão de operação para maximizar o rendimento do composto alvo e evitar a co-extração de compostos de alta massa molecular. O estudo do rendimento global do *O. selloi* foi realizado usando um planejamento fatorial completo 2^2 , com pressões de 100 e 300 bar e temperaturas de 30 e 50 °C.

O comportamento do rendimento global do *O. selloi* em função da temperatura e pressão é apresentado na Figura 4-15. O rendimento foi expresso em base úmida devido à pequena quantidade de matéria-prima disponível para determinação da umidade.

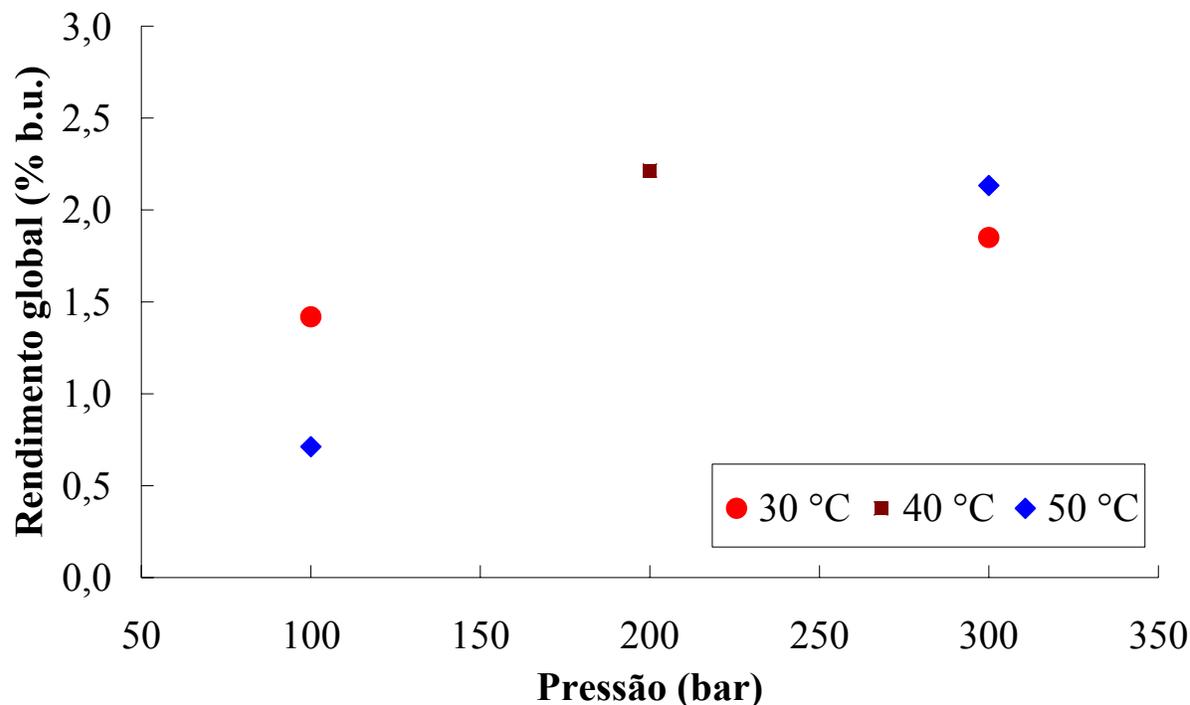


Figura 4-15. Rendimento global em extrato de *O. selloi* usando CO₂ pressurizado.

O máximo rendimento foi obtido a 200 bar / 40 °C (2,21 % b.u.). Uma significativa diminuição do rendimento é observada na pressão de 100 bar. O rendimento global diminuiu de 1,42 % (b.u.) a 30 °C para 0,71 % (b.u.) a 50 °C. Entretanto, na pressão de 300 bar é observado um ligeiro aumento com a temperatura. O rendimento global aumenta de 1,85 % (b.u.) a 30 °C para 2,13 % (b.u.) a 50 °C. Este comportamento é similar ao reportado para *A. annua* e *C. verbenacea*. A 100 bar, a densidade do solvente diminui consideravelmente com o aumento da temperatura, resultando em uma diminuição do poder de solvatação e, conseqüentemente, na diminuição do rendimento global. Por outro lado, na pressão de 300 bar, mesmo com o aumento da densidade do solvente com a temperatura, pressão de vapor do soluto é predominante.

O teor de anetol foi quantificado pelo método de padronização externa [Collins et al., 1997] e os resultados são apresentados na Tabela 4-15.

Tabela 4-15. Rendimento global em extrato e teor de anetol na SFE de *O. selloi*.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	X_o (%) (kg Extrato / kg Material)	Teor de anetol (%) (kg Anetol / kg Extrato)
30	100	1,42	n.q.
30	300	1,85	0,33
50	100	0,71	0,50
50	300	2,13	0,23
40	200	2,21	0,73

n.q. = não quantificado

Embora os rendimentos sejam superiores aos apresentados para o óleo volátil (0,20 a 0,60 % b.u.) [Morais et al., 2002], o teor de anetol não excede o 1 %. Dados da

literatura reportam que o teor de anetol no óleo volátil está entre 41,34 e 58,29 % (porcentagem em área) [Morais et al., 2002].

4.3.2. Extração Fracionada

Para separar diferentes frações de compostos de *O. selloi* por SFE, a técnica de extração fracionada foi aplicada. Os ensaios foram realizados a 50 °C em um processo de quatro passos, a pressões de 95, 150, 200 e 250 bar. Os rendimentos de cada fração foram 0,23; 0,45; 0,45 e 1,13 % (b.u.). O rendimento global do processo foi de 2,33 % (b.u.).

Do ponto de vista qualitativo, cada fração variou de aspecto com a condição operacional, sendo um extrato amarelo claro a 95 bar e verde escuro a 250 bar. Na Figura 4-16 pode ser observada a variação da composição química entre as frações obtidas a 95 e 250 bar. Os teores de anetol e metil chavicol variam significativamente nas diferentes frações obtidas por SFE. Estes componentes foram principalmente concentrados na primeira fração (95 bar).

Todas as frações foram analisadas em relação ao teor de anetol, e os resultados são mostrados na Figura 4-17. O rendimento em extrato a 95 bar foi baixo (0,23 %), entretanto, a maior quantidade do anetol foi eficientemente extraída nesta fração (66,76 % do anetol total). A medida que se aumentou a pressão, a porcentagem de anetol extraída diminuiu drasticamente. A pressões elevadas são extraídos componentes de alta massa molecular.

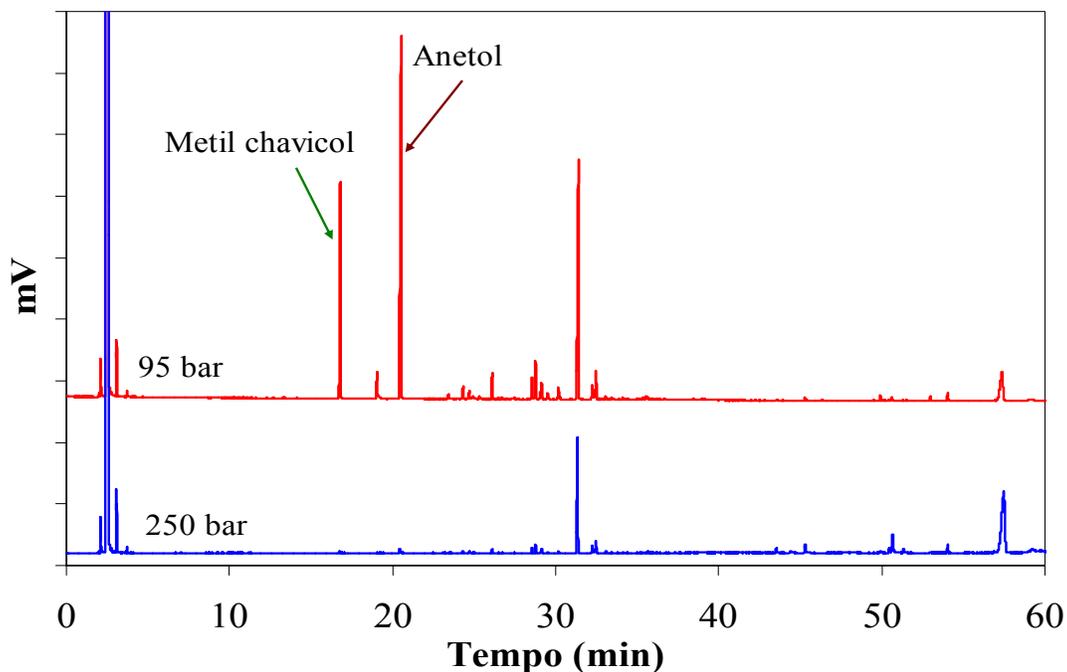


Figura 4-16. Cromatograma das frações de *O. selloi* obtidas por extração fracionada com CO₂ pressurizado a 50 °C.

Na Figura 4-18 é apresentada a variação da pureza relativa do anetol nas diferentes frações. Foi observado que a pureza relativa de anetol varia para cada condição operacional, sendo 37,09 % para 95 bar e 0,33 % para 250 bar. A pureza relativa do anetol a 95 bar é menor ao obtido para o óleo volátil.

O rendimento global do anetol foi 0,13 % b.u. Este valor está dentro do intervalo do rendimento de anetol para óleo volátil (0,11 e 0,25 % b.u.) [Morais et al., 2002].

Assim, pela simples mudança das condições operacionais, a extração fracionada permitiu obter frações ricas em óleo volátil e em compostos de elevada massa molecular. Para o sistema *O. selloi* + CO₂, a 50 °C e 95 bar pode-se obter uma fração rica em óleo volátil, especificamente rica em anetol.

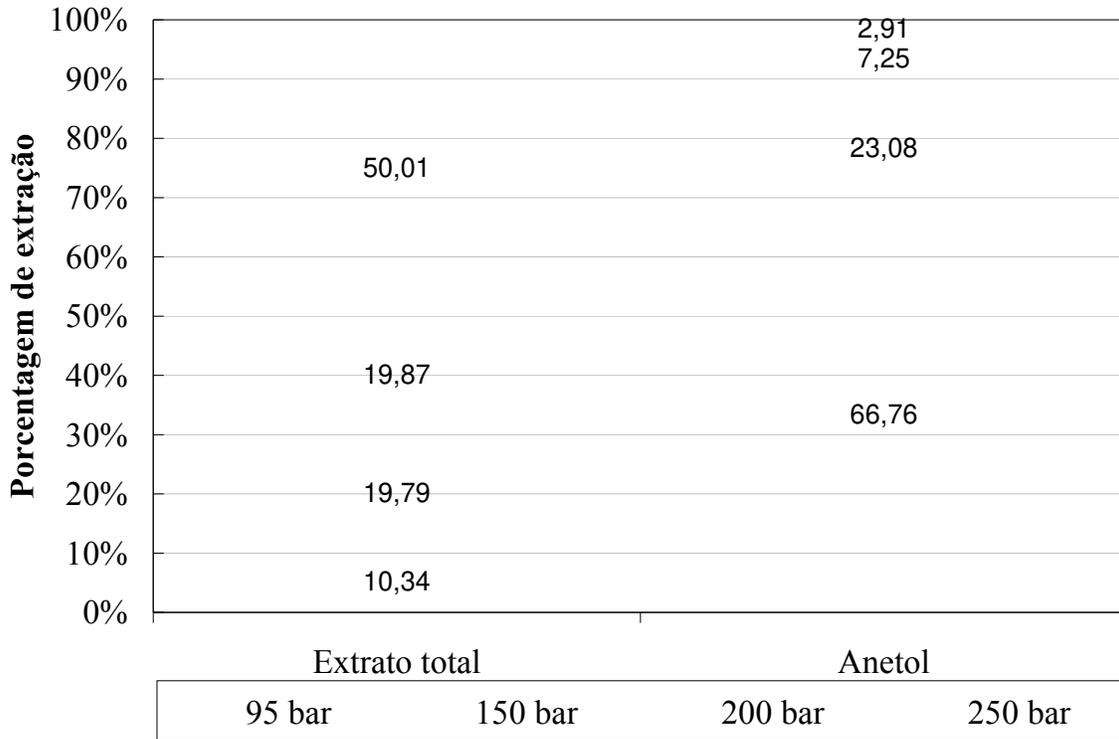


Figura 4-17. Porcentagem de extração do extrato e anetol na extração fracionada de solutos de *O. selloi* com CO₂ supercrítico.

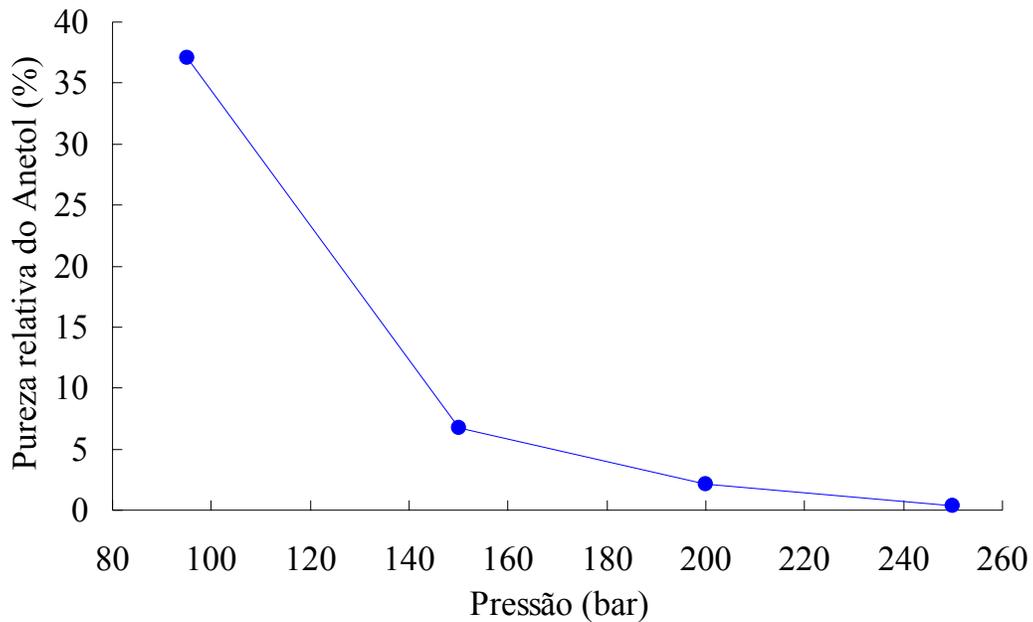


Figura 4-18. Pureza relativa do anetol nas diferentes frações de *O. selloi* obtidos por extração fracionada com CO₂ pressurizado.

4.4. *Foeniculum vulgare* Mill. – Funcho

Os experimentos realizados com o funcho se referem ao estudo da etapa de separação da mistura extrato + solvente. **Moura et al. [2005]** estudaram a etapa de extração do funcho, determinando as isotermas de rendimento global e calculando os parâmetros da cinética da extração.

Com o objetivo de otimizar a etapa de separação, primeiramente foi realizada a determinação da solubilidade dos principais componentes do extrato de funcho (anetol e ácido oléico) na temperatura de 40 °C. A seguir foi determinado o rendimento global na condição de 250 bar / 40 °C. Esta condição foi selecionada considerando o máximo rendimento em extrato obtido por **Moura et al. [2005]**. O tempo de operação do processo foi determinado a partir da OEC, segundo critério apresentado por **Rosa & Meireles [2005]**: após o período da taxa de extração constante o custo específico de manufatura aumenta significativamente. Assim, a duração do período CER (t_{CER}) foi escolhida como o tempo de operação do processo. Na seqüência, foi realizado o estudo da influência das condições operacionais (temperatura, pressão e vazão do solvente) na etapa de separação do solvente.

4.4.1. Solubilidade do anetol e ácido oléico em CO₂ supercrítico

Os parâmetros de interação binária (k_{ij} e l_{ij}) da equação de estado de Peng-Robinson (PR-EOS) foram determinados usando os dados experimentais apresentados por **Reverchon [1997]** e **Yu et al. [1992]**, *apud* **Araújo & Meireles [2000]**, para o anetol e ácido oléico, respectivamente. A Tabela 4-16 mostra as propriedades dos componentes puros. Os dados foram ajustados usando o software EDEFflash [**Araújo & Meireles, 2000**].

Tabela 4-16. Propriedades críticas do CO₂, anetol e ácido oléico.

Componente	Massa molecular (g/mol)	T _c (K)	P _c (bar)	ω	Referência
CO ₂	44,01	304,1	73,75	0,2250	Clifford [1998]
Anetol	148,20	723,0	29,00	0,4846	Rodrigues [2001]
Á. Oléico	282,47	796,34	12,42	0,9245	Araújo & Meireles [2000]

O comportamento da solubilidade em função da pressão, na temperatura de 40 °C, é mostrado na Figura 4-19. A menor solubilidade de anetol ocorre a 20 bar, podendo ser considerada como a condição mínima para recuperação de anetol na etapa de separação da mistura extrato + CO₂. Da Figura 4-19 também observamos que o aumento da pressão de 60 para 80 bar resulta em um aumento da solubilidade de 5,8 e 28 vezes para o anetol e ácido oléico, respectivamente. Quando aumentamos a pressão para 100 bar as solubilidades do anetol e ácido oléico aumentam em 39,91 e 84,94 vezes, respectivamente. Assim, o efeito do aumento da pressão sobre a solubilidade é maior para o ácido oléico do que para o anetol.

Para um isolamento efetivo de uma determinada fração do extrato, as solubilidades dos componentes a serem separados devem ser muito diferentes. Componentes da fração de óleo volátil são solúveis em CO₂-SC a pressões relativamente baixas (menores que 100 bar). De fato, nestas condições as solubilidades dos componentes de elevada massa molecular são praticamente desprezíveis [Reverchon, 1997].

Extratos que contêm óleos voláteis e ácidos graxos, como o do funcho, podem ser parcialmente separados através da técnica de separação fracionada. Dependendo das condições operacionais, no primeiro separador, os ácidos graxos são enriquecidos, enquanto que no segundo, um extrato concentrado de óleo volátil é obtido.

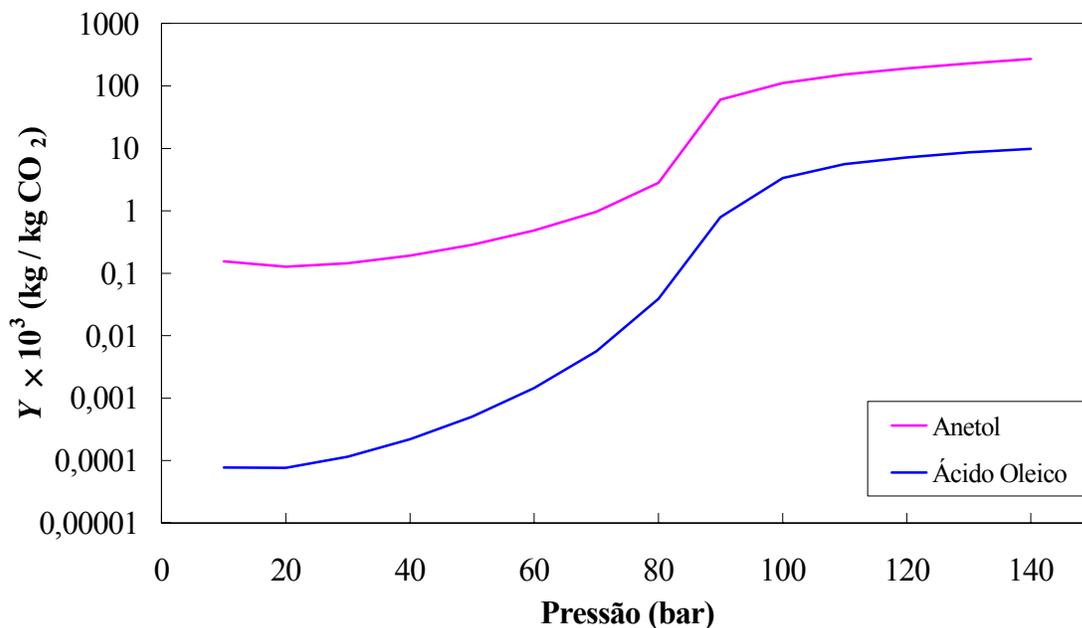


Figura 4-19. Solubilidade de anetol ($k_{ij} = 0,069447$ e $l_{ij} = -0,06825$) e ácido oléico ($k_{ij} = 0,121289$ e $l_{ij} = 0,0921$) em CO₂ a 40 °C.

4.4.2. Rendimento Global

A determinação do rendimento global de funcho foi realizada a 250 bar / 40 °C e os teores de anetol e funchona foram calculados pelo método de padronização externa.

Os rendimentos globais em extrato (X_o), anetol e funchona foram $10,07 \pm 0,02$; $0,9 \pm 0,1$; e $0,033 \pm 0,003$ % (b.s.), respectivamente. As purezas relativas do anetol e funchona representam $9,6 \pm 0,9$ e $0,34 \pm 0,04$ % (m/m), respectivamente. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por **Moura et al. [2005]**.

4.4.3. Determinação do Tempo de Operação do Processo

O tempo de operação de todo processo de extração está relacionado com dois aspectos fundamentais: qualidade (propriedades funcionais e composição química) e economia (rendimento em extrato ou composto alvo, e consumo de CO₂).

Na SFE, se considerarmos um tempo de operação curto, embora a qualidade e composição química se assemelhem ao do óleo volátil, o rendimento pode ser baixo. Por outro lado, se a extração é realizada por um tempo longo, existe a possibilidade de co-extrair compostos que podem não ser de interesse, além de aumentar o consumo de solvente. Na SFE a partir de *A. annua* foi demonstrado que o extrato obtido no intervalo de 5–10 min apresenta maior atividade antibacteriana (MIC = 64 mg/mL) do que o extrato obtido no intervalo de 110–113 min (MIC = 128 mg/mL) [Quispe-Condori et al., 2004].

No aspecto da qualidade, Simándi et al. [1999] indicaram que, dependendo do tempo de extração da SFE, o sabor e composição química do extrato de funcho podem ser comparados com os do óleo volátil obtido por hidrodestilação. No aspecto da economia, Rosa & Meireles [2005] demonstraram que o tempo de operação é de fundamental importância para a avaliação econômica do processo, concluindo que o custo específico de produção aumenta consideravelmente após o período de taxa constante de extração (t_{CER}). Assim, quando o período de extração é selecionado, deveriam ser equilibrados os aspectos de qualidade do produto e economia do processo.

No presente trabalho a determinação do tempo de operação do processo foi determinada a partir do conceito de Rosa & Meireles [2005]. Para tal determinação são necessários dados das OEC.

A OEC de funcho é mostrada na Figura 4-20. O comportamento da OEC assemelha-se ao tipo I. O funcho apresenta um alto teor de solutos, que são liberados na moagem e que são de fácil acesso ao solvente durante a extração. Comportamento similar foi observado por Moura et al. [2005].

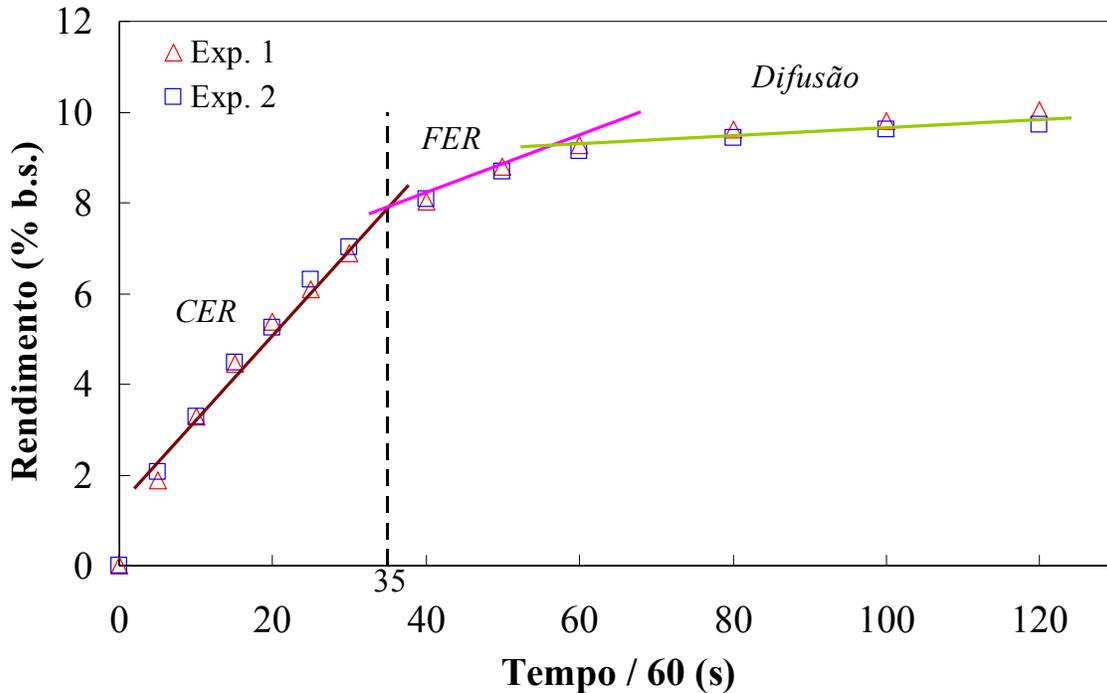


Figura 4-20. Curva global de extração de funcho por SFE a 250 bar / 40 °C / 6.8×10^{-5} kg CO₂/s.

Usando os dados experimentais, a OEC foi ajustada a um spline usando duas linhas retas, de acordo com a metodologia apresentada por **Rodrigues et al. [2002]** (ver Item 3.5.2.4). A primeira linha foi identificada como o período de taxa de extração constante (*CER*). Os parâmetros cinéticos para este período são apresentados na Tabela 4-17. O tempo de duração do período *CER* (t_{CER}) foi identificado como o tempo de operação do processo.

Na Figura 4-21 são apresentadas a curva global de extração e de pureza relativa do anetol em função do tempo. A linha vermelha indica o tempo de operação selecionado para a realização dos experimentos.

Tabela 4-17. Parâmetros cinéticos do período CER na SFE de funcho com CO₂ supercrítico.

Parâmetros cinéticos	
M_{CER} (kg Extrato/s) $\times 10^8$	$8,6 \pm 0,6$
$t_{CER} / 60$ (s)	35 ± 2
Y_{CER} (kg extrato / kg CO ₂) $\times 10^3$	12 ± 1
R_{CER} (% d.b.)	$7,70 \pm 0,03$
R_{Total} (% d.b.)	$9,9 \pm 0,2$

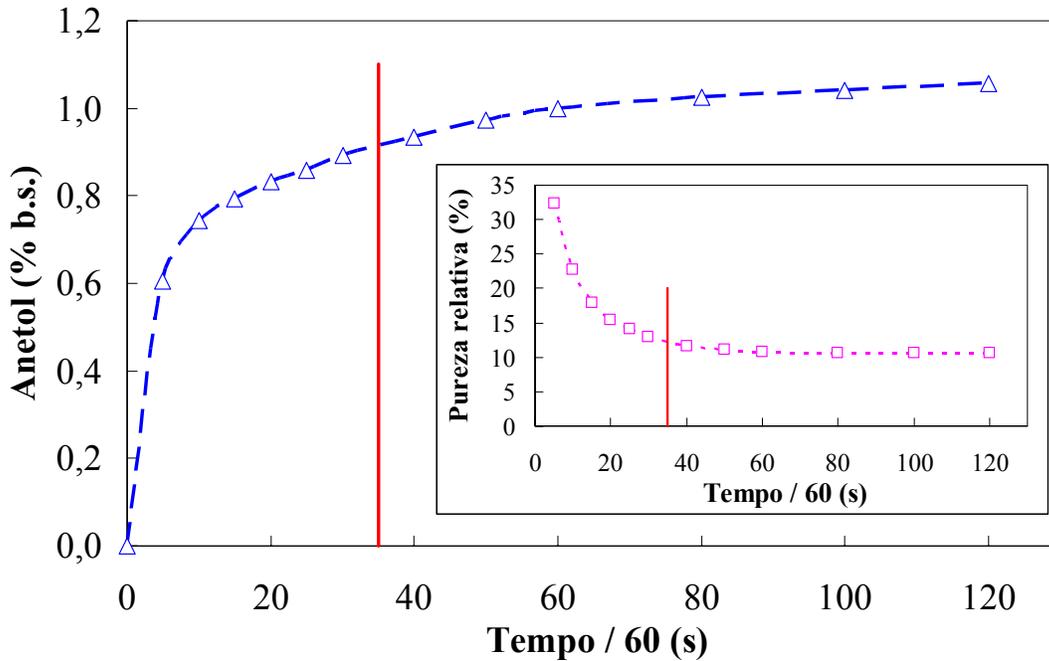


Figura 4-21. Curva global de extração e pureza relativa de anetol na cinética de extração de funcho a 250 bar / 40 °C / 6.8×10^{-5} kg CO₂/s (Experimento 1).

Da Figura 4-21 observamos que o tempo selecionado de 35 min é adequado se o composto alvo for o anetol. Neste período consegue-se extrair entre 84 e 88 % do anetol. O anetol é o componente majoritário do óleo volátil obtido por hidrodestilação [Moura et al., 2005].

Assim, para o estudo da influência das condições operacionais na etapa de separação este tempo de operação pode ser adequado, pois foram considerados aspectos econômicos e de qualidade do produto.

4.4.4. Estudo da Influência das Condições Operacionais na Etapa de Separação

Na Tabela 4-18 são apresentados os rendimentos globais de extrato, anetol e funchona para diferentes condições operacionais do primeiro separador. O segundo separador foi operado a pressão ambiente e -5 °C.

Tabela 4-18. Rendimento em extrato, anetol e funchona (% b.s.) nos dois separadores (condições de extração: 250 bar / 40 °C / $6,8 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s). A coleta foi realizada a 1 bar / -5 °C.

Condição operacional do primeiro separador	Rendimento (% b.s.)					
	1ro separador			2do Separador (Coleta)		
	Extrato	Anetol	Funchona	Extrato	Anetol	Funchona
20 bar / 40 °C	7,554	0,677	0,0781	0,019	0,010	0,0003
80 bar / 40 °C	7,303	0,435	0,0469	0,232	0,195	0,0095
100 bar / 40 °C	7,541	0,313	0,0013	0,173	0,153	0,0153
120 bar / 40 °C	6,137	0,262	0,0009	1,386	0,259	0,0096
80 bar / - 10 °C	7,535	0,449	0,0520	0,106	0,102	0,0214

Pode ser observado da Tabela 4-18 que o rendimento total em extrato (soma dos dois separadores) é mantido aproximadamente constante ($7,60 \pm 0,08$ % b.s.), e está em concordância com o rendimento no período *CER* (Tabela 4-17). Como pode ser observado nesta tabela, a fração de óleo volátil (segundo separador) e a fração rica em ácidos graxos (primeiro separador), dependem dos parâmetros de separação.

Na pressão de separação de 20 bar observa-se que não foi possível a completa recuperação do anetol. O anetol foi recuperado no segundo separador (0,019 % b.s.) com uma pureza relativa de 52,63 %. A perda de compostos de alta volatilidade com a corrente de CO₂ que sai do separador foi observada nas extrações de oleoresina de gengibre [Zancan et al., 2002] e óleo volátil de erva-doce [Rodrigues et al., 2003].

Como era de se esperar, o aumento da pressão de 20 a 120 bar diminuiu o rendimento do primeiro separador em 18,8 %. Entretanto, o rendimento do segundo separador aumentou 72 vezes. O aumento da densidade, e conseqüentemente o aumento do poder de solvatação permitiram a solubilização dos compostos de alta massa molecular que foram transferidos do primeiro para o segundo separador.

Similares tendências foram observadas nos rendimentos em anetol e funchona. No primeiro separador, os rendimentos tanto em anetol como em funchona diminuíram com a pressão. No segundo separador, por outro lado, o rendimento do anetol aumentou com a pressão do primeiro separador. A funchona apresentou um rendimento máximo a 100 bar / 40 °C. Quando aumentamos a pressão para 120 bar observamos um aumento do rendimento no segundo separador, entretanto, foi verificado que existe uma diminuição da pureza relativa do anetol de 88,4 % (m/m) (100 bar / 40 °C) para 18,7 % (120 bar / 40 °C).

Na pressão de 80 bar, a diminuição da temperatura no primeiro separador resultou em uma diminuição do rendimento no segundo separador. A 80 bar / -10 °C obteve-se a maior pureza relativa de anetol (96 %) no segundo separador.

Simándi et al. [1999] concluíram que as melhores condições operacionais para o fracionamento do extrato de funcho foi 80 e 84 bar e temperaturas entre 31 a 35 °C no

primeiro separador. Assim, se o objetivo for o fracionamento do extrato de funcho por SFE o primeiro separador poderia ser operado a 80 bar / 40 °C.

Nesta condição de separação foi realizado o estudo do efeito da vazão do solvente sobre a recuperação de extrato, anetol e funchona. Os resultados são apresentados na Tabela 4-19. Desta tabela observamos uma diminuição do rendimento com a vazão do solvente. Com o aumento da vazão a recuperação de solutos pode ser incompleta e, conseqüentemente, aumentar a possibilidade de perda de produtos [Brunner, 1994].

Tabela 4-19. Efeito da vazão de solvente sobre a recuperação de extrato, anetol e funchona (% b.s.) no primeiro e segundo separador. Condição de extração: 250 bar / 40 °C; condição operacional do 1ro separador: 80 bar / 40 °C.

Vazão de solvente $\times 10^5$ kg CO ₂ /s	Separador	Rendimento (% b.s.)		
		Extrato Total	Anetol	Funchona
6,94	1ro	7,303	0,435	0,0469
	2do	0,232	0,195	0,0095
13,89	1ro	6,964	0,244	0,0178
	2do	0,054	0,036	0,0002
20,83	1ro	7,957	0,270	0,0207
	2do	0,016	0,014	0,0001

Destes resultados pode-se concluir que a descrição do fenômeno de separação deve levar em consideração tanto o equilíbrio de fases como a hidrodinâmica do processo.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

O rendimento global é uma variável de processo importante para o projeto do processo por SFE. Para o sistema CO₂ + *Artemisia annua* foi possível determinar a pressão de inversão do rendimento global (250 bar aproximadamente). O maior rendimento em extrato e artemisinina foi obtido a 300 bar e 50°C. Os resultados do rendimento global do sistema CO₂ + *Cordia verbenacea* indicaram que a contribuição da pressão é principalmente importante na obtenção de altos rendimentos em extrato. Os maiores rendimentos foram obtidos a 300 bar e 50 °C. Para o sistema CO₂ + *Ocimum selloi* a máxima condição de pressão e temperatura estudada (300 bar e 50 °C) não representou o maior rendimento. A condição operacional que maximizou o rendimento global foi 200 bar e 40 °C. Assim, o estudo do rendimento global permitiu visualizar o comportamento da solubilidade do extrato em função da temperatura e pressão do solvente, além de proporcionar informações necessárias para a modelagem das curvas globais de extração. A composição química dos extratos variou em função da condição operacional. Em geral, componentes do óleo volátil foram extraídos a pressões entre 80 e 100 bar, nas temperaturas de 50 e 60 °C.

De maneira geral, verificou-se que os maiores rendimentos foram conseguidos pela extração com solventes orgânicos (hexano ou etanol), porém com uma menor pureza

relativa dos componentes considerados alvo. Conseqüentemente, a purificação do extrato obtido por solventes orgânicos pode resultar em um processo mais laborioso. Do ponto de vista de purificação, duas técnicas alternativas poderiam ser aplicadas na SFE: a extração fracionada e a separação fracionada.

A extração fracionada foi estudada nos sistemas $\text{CO}_2 + C. verbenacea$ e $\text{CO}_2 + O. selloi$. Os resultados permitiram obter classes de compostos diferenciados. Para o sistema $\text{CO}_2 + C. verbenacea$, a fração obtida a 60 °C e 80 bar apresentou uma composição química similar ao do óleo volátil obtido por hidrodestilação, porém com uma maior pureza relativa do componente alvo (β -cariofileno). O aumento da pressão permitiu a extração de componentes de elevada massa molecular, como o clionasterol. Para o sistema $\text{CO}_2 + O. selloi$ a maior quantidade dos componentes alvo (anetol e metil chavicol) foi extraída na fração de 95 bar e 50 °C, com uma pureza relativa de anetol de 37,09 %. Assim, pela simples mudança das condições operacionais, foi possível obter frações ricas em óleo volátil e em compostos de elevada massa molecular, o que permitiria reduzir os custos de purificação do extrato.

No estudo da cinética de extração do sistema $\text{CO}_2 + A. annua$, os resultados mostraram que a vazão do solvente resultou ser o único fator significativo sobre os parâmetros cinéticos. Assim, para aumentar a taxa de transferência de massa não seria necessário aumentar a temperatura ou a pressão. Estes resultados confirmaram os resultados do rendimento global (X_0). Dentro do intervalo das condições operacionais estudadas, os efeitos da temperatura e pressão não aumentaram o rendimento de forma significativa. Na cinética de extração do sistema $\text{CO}_2 + C. verbenacea$ os maiores valores dos parâmetros cinéticos foram obtidos na condição que maximiza o rendimento global (300 bar e 50 °C).

Porém, esta condição não representa o melhor resultado do teste de atividade anticâncer. No estudo do efeito da altura do leito de partículas sobre a cinética de transferência de massa, na condição de melhor atividade anticâncer (200 bar e 40°C), verificou-se que os parâmetros cinéticos aumentam com a altura do leito, com valor aproximadamente constante para leitos de 0,16 e 0,24 m de altura.

Na modelagem matemática das curvas globais de extração (OEC) dos sistemas *A. annua* e *C. verbenacea* verificou-se que os modelos de **Naik et al. [1989]** (empírico), **Sovová [1994]** e **Goto et al. [1993]** apresentaram os melhores ajustes aos dados experimentais. O modelo de **Sovová [1994]** foi satisfatoriamente aplicado no ajuste das OEC de *A. annua*, enquanto que o modelo de **Goto et al. [1993]** representou bem os dados experimentais das OEC de *C. verbenacea*. O modelo empírico [**Naik et al., 1989**] representou bem os dados experimentais para ambos sistemas. Entretanto, devido ao fato de os efeitos termodinâmicos e de transferência de massa estarem englobados no parâmetro k , sua extensão para condições de extração diferentes àquelas usadas no ajuste não é aconselhável.

No estudo do efeito da altura do leito na SFE a partir de *C. verbenacea*, verificou-se que os parâmetros obtidos na modelagem não seguem um comportamento definido com a altura do leito. Conseqüentemente, a seleção de um modelo para aumento de escala é complicada, pois todos os modelos nem sempre são válidos para todos os ensaios.

No estudo da etapa de separação, a determinação do comportamento da solubilidade dos componentes majoritários do extrato de *F. vulgare* (anetol e ácido oléico) em CO₂ supercrítico permitiu obter uma aproximação das condições ótimas de separação. O conceito apresentado por **Rosa & Meireles [2005]**, utilizado na determinação do tempo

de operação do processo, resultou ser adequado também para manter a qualidade do produto. Neste período ($t_{\text{CER}} = 35$ min) foi extraído entre 84 e 88 % do anetol. No estudo da influência das condições operacionais (temperatura e pressão) determinou-se que o aumento da pressão no separador permite a solubilização dos compostos de maior massa molecular, os quais são transferidos para o segundo separador. Entretanto, se o objetivo for o fracionamento do extrato de funcho, observou-se que as melhores condições de separação da fração rica em óleo volátil foram 80 bar e 40 °C. A separação fracionada confirmou ser um método de purificação efetivo, verificando-se a obtenção de frações ricas em componentes de elevada massa molecular e em óleo volátil através da mudança das condições operacionais. O efeito da vazão do solvente é um parâmetro muito importante que também deve ser considerada na etapa de recuperação do extrato. Foi verificado que o aumento da vazão de solvente diminui o rendimento em anetol e funchona e, conseqüentemente, no rendimento global. Neste ponto, o presente trabalho concorda com **Taylor [1996]**, que afirma que a etapa crítica do processo SFE é a separação do solvente ou recuperação do extrato.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- i) Realizar um estudo da etapa de separação do sistema CO_2 + *Artemisia annua*, com o objetivo de obter uma fração de extrato rica em artemisinina.
- ii) Aplicar a técnica de extração ou separação fracionada no sistema CO_2 + *Cordia verbenacea* para obter frações diferenciadas em composição e avaliar suas propriedades funcionais, visto que na fração obtida a 60 °C / 80 bar foi possível extrair uma maior proporção de β -elemeno, composto que foi identificado como inibidor do crescimento de células de leucemia.
- iii) Para futuros trabalhos sobre aplicação da tecnologia supercrítica em produtos naturais se recomenda primeiramente otimizar a etapa de separação de solvente a fim de diminuir a perda de compostos. Sugere-se o estudo de novos métodos de recuperação de extrato, tais como o uso de membranas.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akgün, M.; Akgün, N.A.; Dinçer, S. Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide, **Journal of Supercritical Fluids**, v.15, p.117-125, 1999.
- Al-Jabari, M. Kinetic models of supercritical fluid extraction, **Journal of Separation Science**, v.25, p.477-489, 2002
- Angus, S.; Armstrong, B.; Reuck, K.M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State Carbon Dioxide**, Pergamon Press: New York, E.U.A., 1976.
- Araújo, M.E. & Meireles, M.A.A. Improving phase equilibrium calculation with Peng-Robinson EOS for fats and oils related compounds / supercritical CO₂ systems, **Fluid Phase Equilibria**, v.169, p.49-64, 2000.
- Barton, P.; Hughes, R.E.; Hussein, M.M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint, **Journal of Supercritical Fluids**, v.5, p.157-162, 1992.
- Bayeux, M.C.; Fernandes, A.T.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1229-1232, 2002.
- Began, G.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose T. Response surfaces of total yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide, **Food Research International**, v.33, p.341-345, 2000.
- Berna, A.; Tárrega, A.; Blasco, M.; Subirats, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed, **Journal of Supercritical Fluids**, v.18, p.227-237, 2000.
- Boland, P.B. **Drug Resistance in Malaria**, World Health Organization, 2001.

- Braga, M.E.M.; Leal, P.F.; Carvalho, J.E.; Meireles, M.A.A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 6604-6611, 2003.
- Bravi, M.; Bubbico, R.; Manna, F.; Verdone, N. Process optimization in sunflower oil extraction by supercritical CO₂, **Chemical Engineering Science**, v.57, p.2753-2764, 2002.
- Brogie, H. CO₂ as a solvent: Its properties and applications, **Chemistry and Industry**, v.12, p.385-390, 1982.
- Brunner, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. Ed. Springer: Hamburgo, Alemanha, 1994, 386p.
- Camy, S.; Condoret, J.S. Dynamic modeling of a fractionation process for a liquid mixture using supercritical carbon dioxide, **Chemical Engineering and Processing**, v.40, p.499-509, 2001.
- 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, **Journal of Supercritical Fluids**, In Press, 2005.
- Carvalho Jr., P.M.; Rodrigues, R.F.O.; Sawaya, A.C.H.F.; Marques, M.O.M.; Shimizu, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C., **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.297-301, 2004.
- Chen, Y.T & Ling, Y.C. An overview of supercritical fluid extraction in Chinese Herbal Medicine: from preparation to analysis, **Journal of Food and Drug Analysis**, v.8, p.235-247, 2000.
- Clifford, T. **Fundamentals of Supercritical Fluids**, Oxford University Press: New York, E.U.A. 1999, 210p.
- Coelho, J.A.P.; Pereira, A.P.; Mendes, R.L.; Palavra, A.M.F. Supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* volatile oil, **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, p.316-319, 2003.

- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 7a Edição, Editora da Unicamp: Campinas, 1997, 229p.
- Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents, **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.564-582, 1999.
- Crank, J. **The Mathematics of Diffusion**, 2nd Ed, Clarendon Press: Oxford, E.U.A., 1975, 414p.
- Dauksas, E.; Venskutonis, P.R.; Sivik, B. Supercritical CO₂ extraction of the main constituents of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) essential oil in model systems and overground botanical parts of the plant, **Journal of Supercritical Fluids**, v.15, p.51-62, 1999.
- Del Valle, J.M. & Aguilera, J.M. Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry, **Food Science and Technology International**, v.5, p.1-24, 1999.
- Delabays, N.; Simonnet, X.; Gaudin, M. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars, **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.1795-1801, 2001.
- Della-Porta, G.; Taddeo, R.; Urso, E. D.; Reverchon, E. Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO₂ extraction, **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, p.454-460, 1998.
- Dhingra, V.; Rao, K.V.; Narasu, M.L. Artemisinin: present status and perspectives, **Biochemical Education**, v.27, p.105-109, 1999.
- Dias, L.P.C.; Foglio, M.A.; Possenti, A.; Nogueira, D.C.F.; Carvalho, J.E. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua*, **Phytotherapy Research**, v.15, p.670-675, 2001.
- Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S.; Cabezudo, M.D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: Comparison with simultaneous distillation–extraction, **Journal of Chromatography A**, v.947, p.23-29, 2002.

- Doneanu, C. & Anitescu, G. Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil, **Journal of Supercritical Fluids**, v.12, p.59-67, 1998.
- Ensenrik, M. Malaria researchers wait for industry to join fight, **Science**, v.287, p.1956-1958, 2000.
- Espinosa, S.; Diaz, S.; Brignole, E.A. Optimal design of supercritical fluid processes, **Computers and Chemical Engineering**, v.24, p.1301-1307, 2000.
- Esquível, M.M.; Bernardo-Gil, M.G.; King, M.B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil, **Journal of Supercritical Fluids**, v.16, p. 43-58, 1999a.
- Esquível, M.M.; Ribeiro, M.A.; Bernardo-Gil, M.G. Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization, **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.129-138, 1999b.
- Ferreira, S.R.S.; Nikolov, Z.L.; Doraiswamy, L.K.; Meireles, M.A.A.; Petenate, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil, **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.235-245, 1999.
- Figueira, G.M.; Pereira, B.; Magalhães, P.M. Aspectos da produção de mudas de Erva-baleeira (*Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult.), **Proceedings of the V Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, Botucatu, São Paulo, 2001.
- Foglio, M.A.; Dias, P.C.; Antonio, M.A.; Possenti, A.; Rodrigues, R.A.; Silva, E.F.; Rehder, V.L.; Carvalho, J.E. Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua*, **Planta Medica**, v.68, p.515-518, 2002.
- Francisco, J.C.; Sivik, B. Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide, **Journal of Supercritical Fluids**, v.23, p.11-19, 2002.
- Fullana, M.; Trabelsi, F.; Recasens, F. Use of neural net computing for statistical and kinetic modelling and simulation of supercritical fluid extractors, **Chemical Engineering Science**, v.55, p.79-95, 2000.
- Gómez, A.M.; Lopez, C.P.; de la Ossa, E.M. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction, **Chemical Engineering Journal**, v.61, p.227-231, 1996.

- 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.
- Hao, J.; Han, W.; Huang, S.; Xue, B.; Deng, X. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L, **Separation and Purification Technology**, v.28, p.191-196, 2002.
- Hauthal, H.W. Advances with supercritical fluids [review], **Chemosphere**, v.43, p.123-135, 2001.
- Huie, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.373, p.23-30, 2002.
- Ibáñez, E.; Oca, A.; Murga, G.; López-Sebastián, S.; Tabera, J.; Reglero, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed Rosemary plants, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1400-1404, 1999.
- Jacobs, B.M. **The Chemical Analysis of Foods and Food Products**, 3rd Ed. Van Nostrand Reinhold Co.: New York, E.U.A., 1973, pp.22-23.
- Jain, N.; Srivastava, S.K.; Aggarwal, K.K.; Kumar, S. Essential oil composition of *Artemisia annua* L. 'Asha' from the plains of Northern Asia, **Journal of Essential Oil Research**, v.14, p.305-307, 2002.
- Juteau, F.; Masotti, V.; Bessière, J.M.; Dherbomez, M.; Viano, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil, **Fitoterapia**, v.73, p.532-535, 2002.
- King, M.B. & Catchpole, O. Physico-chemical data required for the design of near-critical fluid extraction. Em: King, M.B. & Bott, T.R. (eds.), **Extraction of natural products using near-critical solvents**, Blackie Academic and Professional: Londres, Inglaterra, 1993, pp. 184-231.
- Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J.L. Supercritical fluid extraction and chromatography of artemisinin and artemisinic acid. An improved method for the analysis of *Artemisia annua* L samples, **Phytochemical Analysis**, v.8, p.223-227, 1997a.

- Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J.L. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide, **Journal of Chromatography A**, v.785, p.353-360, 1997b.
- Kritchevsky, D.; Martak, D.S.; Rothblat, G.H. Detection of Bile acids in Thin Layer Chromatography, **Analytical Biochemistry**, v.5, p.388-392, 1963.
- Leal, P.F.; Braga, M.E.M.; Sato, D.N.; Carvalho, J.E.; Marques, M.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.
- Leal, P.F.; Maia, M.B.; Carmello, Q.A.C.; Meireles, M.A.A. Supercritical extraction from *Ocimum basilicum* using CO₂ and CO₂ + H₂O: global yields, chemical composition and antioxidant activity of the extracts. Proceedings of the **V Brazilian Meeting on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Florianópolis, 21 a 23 de Abril de 2004.
- Leonard, S.W.; Hardin, K.; Leklem, J.E. Vitamin B-6 Content of Spices, **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.163-167, 2001.
- Lins, A.P.; Alvarenga, M.A.; Gottlieb, O.R.; Oliveira, F. Flavonóides de *Cordia verbenacea*, **Suplemento de Ciência e Cultura**, v.32, p.457, 1980.
- Lorenzi, H.; Matos, J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, São Paulo, 2002, 511p.
- Luque de Castro, M.D.; Jiménez-Carmona, M.M.; Fernández-Pérez, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants, **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.708-716, 1999.
- Magalhães, P.M. de; Delabays, N.; Sartoratto, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil, **Journal of the Association for the Advancement of Science**, v.49, p.413-415, 1987.
- Magalhães, P.M. de; Figueira, G.M.; Rehder, V.L.G.; Santos, A.S.; Pianowski, L.F. Variação sazonal dos rendimentos do óleo essencial de Erva baleeira, *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult, Anais do **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, CD-Rom, Cuiabá, 19 a 22 de Novembro de 2002.

- Marongiu, B.; Porcedda, S.; Della-Porta, G.; Reverchon, E. Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp insularis essential oils by supercritical CO₂, **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, p.384-388, 2001.
- Marongiu, B.; Piras, A.; Pani, F.; Porcedda, S.; Ballero, M. Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO₂, **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, p.505-509, 2003.
- Marques, A.C. Human migration and the spread of malaria in Brazil, **Parasitology Today**, v.3. p.166-170, 1987.
- Martinez, J.; Monteiro, A.R.; Rosa, P.T.V.; Marques, M.O.M.; Meireles, M.A.A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide, **Industrial and Engineering Chemistry Research** v.42, p.1057-1063, 2003.
- Martins, E.R.; Casali, V.W.D, Barbosa, L.C.A.; Carazza, F. Essential oil in the taxonomy of *Ocimum selloi* Benth, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.8, p.29-32, 1997.
- Meireles, M.A.A. **Tecnologia Supercrítica Aplicada ao Processamento de Produtos Naturais em Leito Fixo**, Campinas, 1999. Monografia – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Meireles, M.A.A. Supercritical Extraction from Solid: process design data (2001-2003), **Current Opinion in Solid State Material Science**, v.7, p.321-330, 2003.
- Morais, L.A.S.; Facanali, R.; Marques, M.O.M.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Phtytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.74, p.183-186, 2002.
- Moura, L.S.; Carvalho-Junior, R.N.; Stefanini, M.B.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yield, composition and kinetic data, **Journal of Supercritical Fluids**, In Press, 2005.
- Naik, S.N.; Lentz, H.; Maheshawari, R.C. Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium, **Fluid Phase Equilibria**, v.49, p.115-126, 1989.

- Newton, P. & White, N. MALARIA: New developments in Treatment and Prevention, **Annual Reviews Medicine**, v.50, p.79-192, 1999.
- Nykänen, I.; Nykänen, L.; Alkio, M. Composition of angelica root oils obtained by supercritical CO₂ extraction and steam distillation, **Journal of Essential Oil Research**, v.3, p.229-236, 1991.
- Nodari, R.O. & Guerra, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. Eds.; Ed. Universidade - UFRGS: Porto Alegre, Brasil, 2001, p. 833.
- Olliaro, P.; Taylor, W.R.J.; Rigal, J.; Controlling malaria: Challenges and solutions, **Tropical Medicine and International Health**, v.6, p.922-927, 2001.
- Pan American Health Organization (PAHO). **Basic Country Health Profiles for the Americas**, disponível em <http://www.paho.org/>, Acessado em 25/09/03.
- Peker, H.; Srinivasan, M.P.; Smith, J.M.; McCoy, B.J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide, **American Institute of Chemical Engineering Journal (AIChE Journal)**, v.38, p.761-770, 1992.
- Peng, D.Y. & Robinson, D.B. A new two constant equation of state, **Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals**, v.15, p.59-64, 1976.
- Phillips, R.S. Current Status of Malaria and Potential for Control, **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p 208-226, 2001.
- Phillipson, J.D. Phytochemistry and medicinal plants, **Phytochemistry**, v.56, p.237- 243, 2001.
- Plants For a Future 1996 - 2002, **Artemisia annua L**, Plants For a Future: Database <http://www.scs.leeds.ac.uk/pfaf/> Accesado em 11/12/2002.
- Povh, N.P.; Marques, M.O.M.; Meireles, M.A.A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert), **Journal of Supercritical Fluids**, v.21, p.245-256, 2001.

- Quispe-Condori, S.; Sato, D.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Antimycobacterial activities of clove buds, *Cordia curassavica* and *Artemisia annua* extracts obtained using supercritical CO₂ as solvent. Proceedings of the **11th International Symposium & Exhibition on Supercritical Fluid Chromatography, Extraction and Processing**, Supercritical Conferences, Cincinnati/E.U.A., 2004, p.223.
- Reverchon, E. & Senatore, F. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.154-158, 1994.
- Reverchon, E.; Della Porta, G.; Senatore, F. Supercritical CO₂ extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1654-1658, 1995.
- Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, **Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p.1-37, 1997.
- Reverchon, E. & Marrone C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling, **Chemical Engineering Science**, v.52, p. 3421-3428, 1997.
- 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 and Engineering Chemistry Research**, v.38, p.3069-3075, 1999.
- Reverchon, E. & Marrone C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils, **Journal of Supercritical Fluids**, v.19, p.161-175, 2001.
- Rincón, J.; De Lucas, A.; Garcia, I. Isolation of rock rose essential oil using supercritical CO₂ extraction, **Separation Science and Technology**, v.35, p.2745-2763, 2000.
- Rizvi, S.S.H.; Benado, A.L.; Zollweg, J.A.; Daniels, J.A. Supercritical fluid extraction: Fundamental principles and mathematical modeling, **Food Technology**, v.40, p.55-65, 1986.
- Rodrigues, V.M. **Determinação da solubilidade em sistemas pseudo-ternários: cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) + CO₂, gengibre (*Zingiber officinali*) + CO₂, e erva-doce (*Pimpinella anisum*) + CO₂**, Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2001, 319p.

- Rodrigues, V.M.; Sousa, E.M.B.D; Monteiro, A.R.; Chiavone-Filho, O.; Marques, M.O.; Meireles, M.A.A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw materials in pressurized CO₂: a pseudo ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent, **Journal of Supercritical Fluids**, v.22, p.21-36, 2002.
- Rodrigues, V.M.; Rosa, P.T.V.; Marques, M.O.M.; Petenate, A.J.; Meireles, M.A.A. Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1518-1523, 2003.
- 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.
- Sarrade, S.J.; Rios, G.M.; Carlès, M. Supercritical CO₂ extraction coupled with nanofiltration separation: Applications to natural products, **Separation and Purification Technology**, v.14, p.19-25, 1998.
- Sass-Kiss, A.; Czukor, B.; Gao, Y.; Stefanovits, P.; Boross, F. Supercritical carbon dioxide extraction of onion oleoresin, **Journal of Science of Food and Agricultural**, v.76, p.189-194, 1998.
- Señoráns, F.J.; Ibañez, E.; Cavero, S.; Tabera, J.; Reglero, G. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plant, **Journal of Chromatography A**, v.870, p.491-499, 2000.
- Sertié, J.A.A.; Basile A.C.; Panizza, S.; Matida, A.K.; Zelnik, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves, **Planta Medica**, v.54, p.7-10, 1988.
- Sertié, J.A.A.; Basile A.C.; Panizza, S.; Matida, A.K.; Zelnik, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, v.56, p.36-40, 1990.
- Sievers, U. & Eggers, R. Heat recovery in supercritical fluid extraction process with separation at subcritical pressure, **Chemical Engineering and Processing**, v.35, p.239-246, 1996.

- Sievers, U. Energy optimization of supercritical fluid extraction processes with separation at supercritical pressure, **Chemical Engineering and Processing**, v.37, p.451-460, 1998.
- Simándi, B.; Oszagyan, M.; Lemberkovics, É.; Kéry, Á.; Kaszacs, J.; Thyron, F.; Mátyás, T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin, **Food Research International**, v.31, p.723-728, 1998.
- Simándi, B.; Deák, A.; Rónyai, E. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of fennel oil, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1635-1640, 1999.
- Simándi, B.; Kristo, Sz.T.; Kéry, Á.; Selmeczi, L.K.; Kmecz, I.; Kemény, S. Supercritical fluid extraction of dandelion leaves, **Journal of Supercritical Fluids**, v.23, p.135-142, 2002.
- Simon, J.E.; Charles, D.; Cebert, E.; Grant, L.; Janick, J.; Whipkey, A. *Artemisia annua* L.: A promising aromatic and medicinal. Em J. Janick & J.E. **Advances in New Crops**, Timber Press, 1990, p.522-526.
- Sipahimalani, A.T.; Fulzele, D.P.; Heble, M.R. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography, **Journal of Chromatography**, v.538, p.452-455, 1991.
- Škerget, M. & Knez, Ž. Modelling high pressure extraction process, **Computers and Chemical Engineering**, v.25, p.879-886, 2001.
- Sousa, E.M.B.D.; Toussaint, V.A.; Chiavone-Filho, O.; Meireles, M.A.A.; Peters, C.J. Fluid phase behavior of systems of carbon dioxide with eucalyptus and alecrim oil, **VI EQUIFASE** (Iberoamerican Conference on Phase Equilibria for Process Design), Foz de Iguaçu, 12 a 16 Outubro de 2002.
- Souza, A.T.; Corazza, M.L.; Cardozo-Filho, L.; Guirardello, R.; Meireles, M.A.A. Phase equilibrium measurements for the system clove (*Eugenia caryophyllus*) oil + CO₂, **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.49, p.352-356, 2004.
- Sovová, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – modeling of extraction curves, **Chemical Engineering Science**, v.49, p.409-414, 1994.

- Spricigo, C.B.; Bolzan, A.; Machado, R.A.F.; Carlson, L.H.C.; Petrus, J.C.C. Separation of nutmeg essential oil and dense CO₂ with a cellulose acetate reverse osmosis membrane, **Journal of Membrane Science**, v.188, p.173-179, 2001.
- Štastová, J.; Jež, J.; Bártlová, M.; Sovová, H. Rate of vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – III. Extraction from sea buckthorn, **Chemical Engineering Science**, v.51, p.4347-4352, 1996.
- Suffredini, I.B.; Sader, H.S.; Gonçalves, A.G.; Reis, A.O.; Gales, A.C.; Varella, A.D.; Younes, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.379-384, 2004.
- Tan, C. & Liou, D. Modeling of desorption at supercritical conditions, **American Institute of Chemical Engineering Journal (AIChE Journal)**, v.35, p.1029-1031, 1989.
- Taylor, L.T. **Supercritical Fluid Extraction**. John Wiley & Sons: New York, E.U.A, 1996, 181p.
- Tellez, M.R. Canel, C. Rimando, A.M. Duke, S.O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L, **Phytochemistry**, v.52, p.1035-1040, 1999.
- Tripathi, A.K.; Prajapati, V.; Aggarwal, K.K.; Khanuja, S.P.S.; Kumar, S. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles, **Journal of Economic Entomology**, v.93, p.43-47, 2000.
- Van de Velde, V. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC., **Journal of Chemical Society Perkin Transactions**, v.1, p.2697-2700, 1982.
- Van Nijlen, T.; Brennan, K.; Van den Mooter, G.; Bleton, N.; Kinget, R.; Augustijns, P. Improvement of the dissolution rate of artemisinin by means of supercritical fluid technology and solid dispersions, **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, p.173-181, 2003.
- Webster, H.K. & Lehnert, E.K. Chemistry of artemisinin: an overview, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88 Suppl. 1, p.27-29, 1994.

- World Wealth Organization (WHO) - **Roll Back Malaria - A Global Partnership**, World Health Organization, Geneva, 1996.
- World Wealth Organization (WHO), **The Use of Artemisinin & its Derivatives as Anti-Malarial Drugs**, Malaria Unit, Division of Control of Tropical Diseases, WHO, Genova, 1998.
- World Wealth Organization (WHO), **What is Malaria**, Roll Back Malaria, Março, 2002.
- Xing, H.; Yang, Y.; Su, B.; Huang, M.; Ren, Q. Solubility of artemisinin in supercritical carbon dioxide, **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.48, p.330-332, 2003.
- Yonei , Y.; Ohinata, H.; Yoshida , R.; Shimizu, Y.; Yokoyama, C. Extraction of ginger flavor with liquid or supercritical carbon dioxide, **Journal of Supercritical Fluids**, v.8, p.156-161, 1995.
- Zancan; K.C.; Marques, 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, **Journal of Supercritical Fluids**, v.24 p.57-76, 2002.
- Zapata-Noreña, C. & Meireles, MA.A. The effective diffusivity of clove essential oil in pressurized CO₂, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.393-398, 1997.
- Zetzl, C.; Brunner, G.; Meireles, M.A.A. Standardized low-cost batch SFE – units for university education and comparative research, **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Versailles/França, 28 a 30 de Abril de 2003.
- Zheng, G.Q. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*, **Planta Medica**, v.60, p.54-57, 1994.

ANEXOS

Anexo A – Produção Técnica Científica do Período

A.1. Artigos Submetidos para Publicação

Quispe-Condori, S.; Sánchez, D.D.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Zetzl, K.; Brunner, G.; Meireles, M.A.A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, **Journal of Supercritical Fluids**, In Press, 2005.

Quispe-Condori, S.; Sato, D.N.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Supercritical CO₂ extraction from *Cordia verbenacea* DC: global yield, chemical composition, and anticancer and antimycobacterial activities, A ser submetido.

A.2. Trabalhos Completos Publicados em Anais de Eventos

Quispe-Condori, S.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Supercritical extraction of essential oil from *Cordia curassavica* (Jacq.) Roemer & Schultes. In **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Versailles / França, 28-30 de abril de 2003.

Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Foglio, M.A.; Meireles, M.A.A. Fractional extraction of solutes from *Cordia curassavica* (Jacques) Roemer & Schultes using supercritical CO₂. In **Proceedings of the V Brazilian Meeting on Supercritical Fluids**, CD-rom, Florianópolis, 21-23 de abril de 2004.

A.3. Trabalhos Resumidos Publicados em Anais de Eventos

Quispe-Condori, S.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Otimização da extração de artemisinina de *Artemisia annua* L. usando dióxido de carbono supercrítico. In **IV Congresso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos**, Livro de Resumos, Valparaíso / Chile, 5-8 de outubro de 2003.

Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction from *Ocimum selloi* Benth. In **2003 American Institute of Chemical Engineering (AIChE) Annual Meeting**, San Francisco / California / E.U.A., de 16 a 21 de novembro de 2003.

Quispe-Condori, S.; Moura, L.S.; Carvalho-Junior, R.N.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Seleção das condições operacionais na extração de solutos de cravo-da-índia, funcho, artemisia e alecrim usando CO₂ supercrítico como solvente: determinação do ponto de inversão do rendimento global. In **Proceedings of the 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas / São Paulo, de 03 a 06 de novembro de 2003.

Quispe-Condori, S.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Kinetic of the supercritical CO₂ extraction from *Cordia curassavica* leaves. **11th International Symposium & Exhibition on Supercritical Fluid Chromatography, Extraction and Processing**, Pittsburg / E.U.A., de 01 a 05 de agosto de 2004.

Quispe-Condori, S.; Sato, D.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Antimycobacterial activities of clove buds, *Cordia curassavica* and *Artemisia annua* extracts obtained using supercritical CO₂ as solvent. **11th International Symposium & Exhibition on Supercritical Fluid Chromatography, Extraction and Processing**, Pittsburg / E.U.A., de 01 a 05 de agosto de 2004.

Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Optimization of the fractional separation of fennel (*Foeniculum vulgare*) extracts during supercritical CO₂ extraction. In **Proceedings of the 7th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Orlando, Florida / E.U.A., de 01 a 04 de maio de 2005.

Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Foglio, M.A.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L: seasonal study. In **Proceedings of the 7th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Orlando, Florida / E.U.A., de 01 a 04 de maio de 2005.

A.4. Produção em Co-Autoria

A.4.1. Trabalhos Completos Publicados em Anais de Eventos

Moura, L.S.; Carvalho-Junior, R.N.; Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Determination of the global yield for the system fennel (*Foeniculum vulgare*) + CO₂. In **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Versailles / França, 28-30 de abril de 2003.

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 officinalis*) + CO₂. In **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Versailles / França, 28-30 de abril de 2003.

Sánchez, D.; Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A.; Zetzl, C.; Brunner, G. Extraction of the antimalarial artemisinin from *Artemisia annua* L leaves with supercritical CO₂. In **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Versailles / França, 28-30 de abril de 2003.

Zetzi, C.; Barros, R.; Sánchez, D.; Quispe-Condori, S.; Foglio, M.A.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A.; Brunner, G. Fractionation of *Artemisia annua* and preparative isolation of artemisinin. In **Proceedings of the V Brazilian Meeting on Supercritical Fluids**, CD-Rom, Florianópolis, 21-23 de abril de 2004.

A.4.2. Trabalhos Resumidos Publicados em Anais de Eventos

Sánchez, D.; Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Zetzi, C.; Brunner, G.; Meireles, M.A.A. Extraction and purification of artemisinin from *Artemisia annua* L. **VII SHEB (Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass)** - Maringá / Brasil. 2002.

Carvalho-Junior, R.N.; Moura, L.S.; Quispe-Condori, S.; Rosa, P.T.V.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Cinética da extração supercrítica do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) usando dióxido de carbono supercrítico. In **Proceedings of the 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, CD-Rom, Campinas / São Paulo, de 03 a 06 de novembro de 2003.

A.5. Atividade Supervisionada de Docência Plena (PED)

TA834 – Operações Unitárias III - Transferência de Massa Aplicada à Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Agosto – Dezembro, 2002.

TA433 – Fundamentos de Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Agosto – Dezembro, 2003.

Anexo B – Testes preliminares e Estudos adicionais

B.1. Extração Supercrítica de Óleo Volátil de Cravo-da-índia

De forma geral, o teor de óleo de cravo-da-índia varia entre 14 e 24 % (m/m). O eugenol, acetato de eugenila, β -cariofileno e α -humuleno são os componentes que determinam o sabor característico do seu óleo volátil. O eugenol é o componente majoritário (70 %).

Na indústria farmacêutica o eugenol é usado como anti-séptico e antiinflamatório. O óleo volátil extraído por hidrodestilação tem propriedades antioxidante [Madsen & Bertelsen, 1995], antimicrobiana [Hammer et al., 1999; Ponce et al., 2003] e acaricida [Kim et al., 2004]. Na indústria de alimentos é usado como ingrediente de diferentes produtos. Estudos recentes têm demonstrado que o óleo volátil de cravo-da-índia pode ser usado contra o crescimento da *Listeria monocytogenes*, na produção de salsichas [Singh et al., 2003], *Fusarium graminearum*, no processamento pós-colheita de milho [Marin et al., 2004] e *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *C. musae* e *Fusarium proliferatum* no processamento pós-colheita de banana [Ranasinghe et al., 2002].

A extração de solutos por extração supercrítica tem sido amplamente estudada para este sistema. A comparação dos rendimentos e das composições químicas dos extratos, obtidos com CO₂ sub e supercrítico, foi realizada por Gopalakrishnan et al. [1990]. Zapata-Noreña & Meireles [1997] determinaram experimentalmente o coeficiente de difusão efetivo do óleo volátil de cravo-da-índia em CO₂ supercrítico. A cinética e modelagem matemática da etapa de extração foi estudada por Reverchon & Marrone [1997]. Diferentes grupos de compostos (óleo volátil e corantes) foram obtidos pela técnica

de separação fracionada [Della-Porta et al., 1998]. Rodrigues et al. [2002] mediram a solubilidade do óleo volátil de cravo-da-índia, considerando o sistema ternário formado pela matéria-prima (estrutura celulósica + soluto) e o CO₂ supercrítico. Quispe-Condori [2002] utilizou o cravo-da-índia na avaliação de metodologias para determinação do coeficiente de difusão efetivo em CO₂ supercrítico. Dados do comportamento de equilíbrio de fases do sistema óleo volátil de cravo da índia + CO₂ foram reportados por Souza et al. [2004]. Na literatura não existem estudos da influência da temperatura e pressão sobre o rendimento global.

No presente trabalho os ensaios com o cravo-da-índia foram divididos em: (i) determinação das isotermas de rendimento global (X_0); e, (ii) estudo da cinética de transferência de massa.

B.1.1. Material e Métodos

Brotos de cravo-da-índia foram comprados no Mercado Municipal de Campinas, em Julho de 2002. As condições de tratamento da colheita até a compra final não são conhecidas. Com o objetivo de retirar materiais estranhos, foi realizada uma seleção e limpeza manual com ajuda de peneiras de mesh 8 e 10 (W.S. Tyler, Mentor, E.U.A.). O material selecionado foi armazenado em geladeira doméstica (Metalfrio, modelo HC-4, São Paulo, São Paulo) a -10 °C. A moagem foi realizada em um moinho de facas (Tecnal, modelo TE-631/1, Piracicaba, São Paulo) a 20500 rpm por 15 segundos. A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando um agitador de peneiras (Bertel, modelo 1868, Caieiras, São Paulo); peneiras de mesh padrão da série Tyler 16 a 80 (Mentor, E.U.A.), foram usadas. Partículas de 32 a 60 mesh foram selecionadas para os ensaios.

Os experimentos de rendimento global foram realizados na unidade Spe-ed SFE (Applied Separations, modelo 7071, Allentown, E.U.A), usando-se a coluna de extração de 5 ml (Thar Designs, CL1165, Pittsburgh, E.U.A.). A metodologia foi apresentada no Item 3.5.2.1. Estes ensaios foram realizados como parte do treinamento nesta unidade e de testes preliminares do estudo de rendimento global.

O estudo da cinética de transferência de massa do sistema CO₂ + cravo-da-índia foi realizado na unidade de extração supercrítica LASEFI-TUHH. Estes ensaios correspondem aos testes preliminares de treinamento e verificação da performance desta unidade. A condição operacional foi 100 bar / 35 °C. Esta condição foi selecionada de **Rodrigues et al. [2002]**. Na Tabela B-1 são apresentadas as condições operacionais e as características do leito de partículas usadas na construção das curvas globais de extração (OEC).

Tabela B-1. Condições operacionais da cinética de extração de cravo-da-índia.

Temperatura (°C)	35 [£]
Pressão (bar)	100 [£]
Vazão do solvente (10 ⁻⁵ kg CO ₂ /s)	7,63
Massa de alimentação (10 ⁻³ kg)	21,7
Altura do leito (m)	0,08
Diâmetro do leito (m)	0,02
Densidade real (kg/m ³)	1345 [§]
Diâmetro médio das partículas (10 ⁻⁴ m)	5,6
Porosidade do leito (-)	0,358

[£]Rodrigues et al. [2002]; [§]Quispe-Condori [2002]

B.1.2. Resultados

B.1.2.1. Isotermas de Rendimento Global (X_0)

As isotermas de rendimento global (X_0) do cravo-da-índia obtidas por SFE a 30 e 50 °C, são apresentados na Figura B.1.

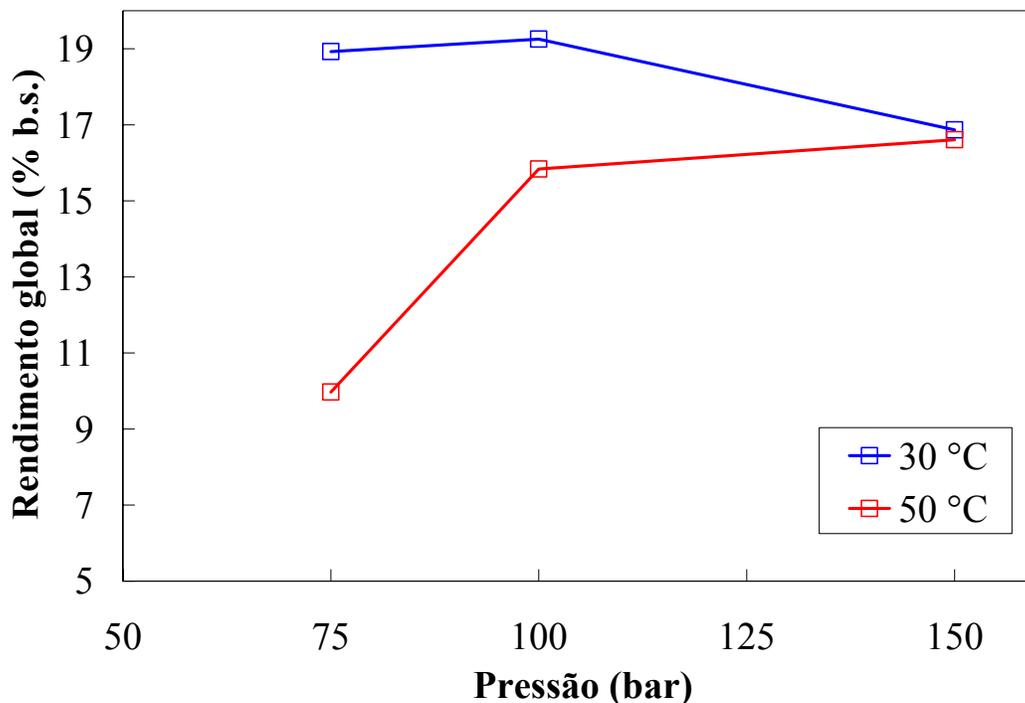


Figura B-1. Isotermas de rendimento global do sistema CO₂ + cravo-da-índia.

Da Figura B-1 observamos que a 50 °C ocorre um aumento do rendimento com a pressão. A 30 °C, por outro lado, o rendimento permanece aproximadamente constante até 100 bar e diminui com o aumento a 150 bar. O máximo e mínimo rendimento foram obtidos a 100 bar / 30 °C (19,25 % base seca – b.s.) e 75 bar / 50 °C (9,97 % b.s.).

Gopalakrishnan et al. [1990] estudaram a influência da pressão, temperatura, tempo de contato e teor de umidade na SFE de cravo-da-índia. Os autores concluíram que os maiores rendimentos foram obtidos no estado de líquido subcrítico.

Reverchon & Marrone [1997], baseados no trabalho de Gopalakrishnan et al. [1990], mencionam que a melhor condição para extração de óleo volátil de cravo-da-índia é 90 bar e 50 °C, obtendo um rendimento de 20,8 % (base úmida).

B.1.2.2. Cinética de Extração e Modelagem Matemática

Na Figura B-2 é apresentada a curva global de extração (OEC) do cravo-da-índia obtido por SFE. Os parâmetros cinéticos calculados para o período de taxa de extração constante (CER) foram: taxa de transferência de massa (M_{CER}) = $(4,9 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ kg extrato/s; razão mássica do soluto na fase supercrítica (Y_{CER}) = $(65 \pm 6) \times 10^{-3}$ kg extrato / kg CO₂; duração do período CER (t_{CER}) = 9 ± 1 min.

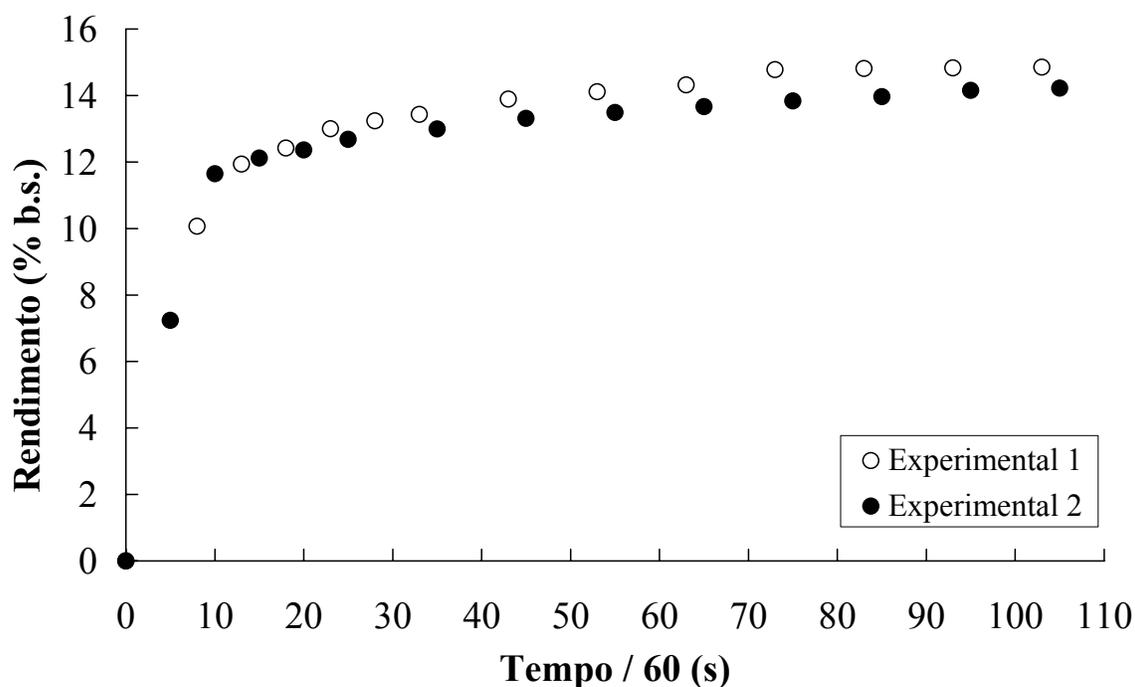


Figura B-2. Curva global de extração de cravo-da-índia a 100 bar / 35 °C / $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s.

A solubilidade do extrato de cravo-da-índia (Y^*) foi obtida de [Rodrigues et al., 2002]. A solubilidade é um dado importante para a modelagem matemática com o modelo de Sovová [1994]. A Tabela B-2 apresenta o rendimento global, densidade do CO₂, porosidade das partículas, a taxa de extração constante e a solubilidade. Estes dados foram usados no ajuste das curvas de extração aos diversos modelos matemáticos.

Tabela B-2. Condições experimentais para a modelagem da extração de solutos de cravo-da-índia na condição de 100 bar e 35 °C

Rendimento global (X_o) (kg extrato / kg matéria-prima) [§]	0,217
Densidade do CO ₂ (kg/m ³) [¶]	707,92
Porosidade das partículas (-) [‡]	0,54
M_{CER} (kg extrato / s)	$4,9 \times 10^{-6}$
Solubilidade (kg extrato / kg CO ₂) [£]	0,23

[§] Quispe-Condori [2002]; [¶] Angus et al. [1976]; [‡] Goto et al. [1993]; [£] Rodrigues et al. [2002]

Os modelos que melhor representaram os dados experimentais foram os modelos de Goto et al. [1993] e Sovová [1994]. Reverchon & Marrone [1997] concluíram que o processo de extração de óleo volátil de cravo-da-índia é controlado tanto pela desorção como pela transferência de massa na fase fluida. Rodrigues et al. [2002] utilizaram o modelo de Sovová [1994] para a modelagem das OEC de cravo-da-índia.

Na Tabela B-3 são apresentados os desvios médios quadráticos dos diferentes modelos assim como seus correspondentes parâmetros ajustados.

Tabela B-3. Desvio médio quadrático e parâmetros ajustados dos diferentes modelos

Modelo	Desvio médio quadrático (S^2)	Parâmetro Ajustado
Crank [1975]	$3,6 \pm 0,6$	$D \text{ (m}^2\text{/s)} = (1,5 \pm 0,2) \times 10^{-12}$
Tan & Liou [1989]	11 ± 1	$k_d / 60 \text{ (s)} = 0,022 \pm 0,002$
Goto et al. [1993]	$0,16 \pm 0,03$	$\phi \text{ (-)} = 0,18 \pm 0,03; K \text{ (-)} = 0,41 \pm 0,02$
Sovová [1994]	$0,04 \pm 0,02$	$t_{CER} / 60 \text{ (s)} = 8 \pm 1; k \text{ (-)} = 0,013 \pm 0,003$
Naik et al. [1989]	4 ± 1	$k / 60 \text{ (s)} = 21 \pm 2$

A Figura B-3 apresenta a comparação dos dados experimentais e o ajuste pelos modelos de Goto et al. [1993] e Sovová [1994].

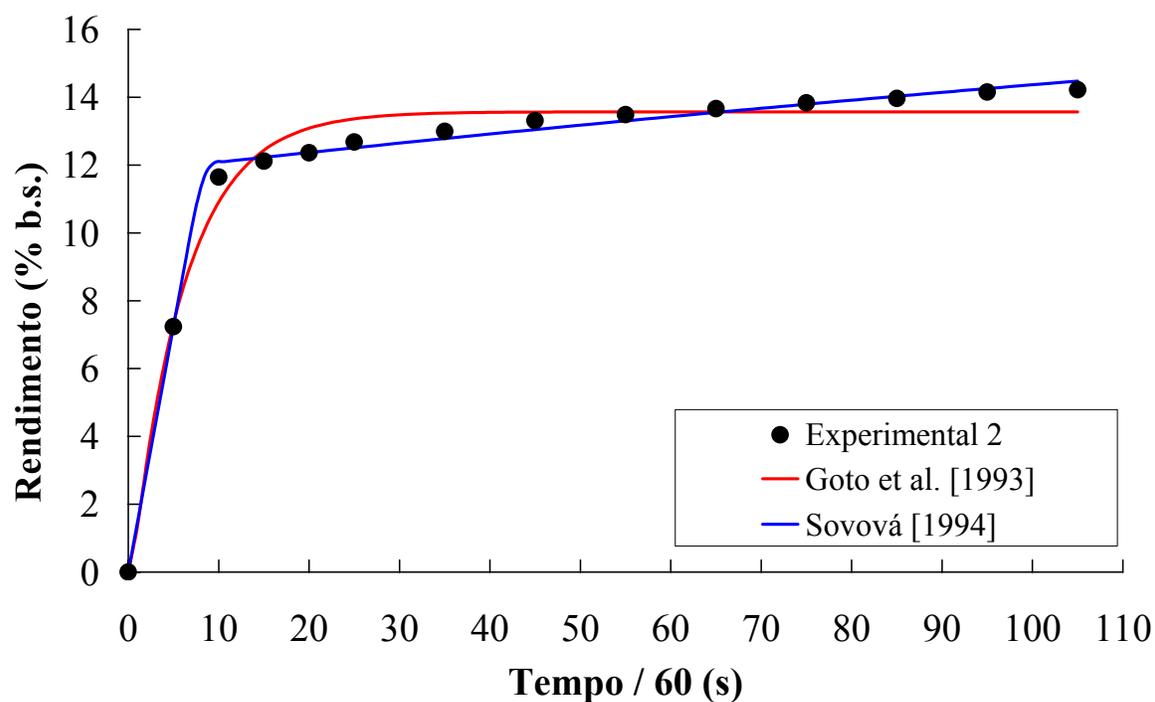


Figura B-3. Comparação entre os dados experimentais e os modelos de Goto et al. [1993] e Sovová [1994] na SFE de cravo-da-índia (100 bar / 35 °C / $7,63 \times 10^{-5}$ kg CO₂/s).

Referências bibliográficas

- Angus, S.; Armstrong, B.; Reuck, K.M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State Carbon Dioxide**, Pergamon Press: New York, E.U.A., 1976.
- Crank, J. **The Mathematics of Diffusion**, 2nd Ed, Clarendon Press: Oxford, E.U.A., 1975, 414p.
- Della-Porta, G.; Taddeo, R.; Urso, E. D.; Reverchon, E. Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO₂ extraction, **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, p.454-460, 1998.
- Gopalakrishnan, N.; Shanti, P.P.; Narayanan, C.S. Composition of clove (*Syzygium aromaticum*) bud oil extracted using carbon dioxide, **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.50, p.111-117, 1990.
- 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.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.
- Kim, S.I.; Yi, J.H.; Tak, J.; Ahn, Y.J. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), **Veterinary Parasitology**, v.120, p.297-304, 2004.
- Madsen, H.L. & Bertelsen, G. Spices as antioxidants, **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.271-277, 1995.
- Marín, S.; Velluti, A.; Ramos, A.J.; Sanchis, V. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain, **Food Microbiology**, v.21, p.313-318, 2004.
- Naik, S.N.; Lentz, H.; Maheshawari, R.C. Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium, **Fluid Phase Equilibria**, v.49, p.115-126, 1989.
- Ponce, A.G.; Fritz, R.; del Valle, C.; Roura, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.36, p.679-684, 2003.
- Quispe-Condori, S. **Avaliação de metodologias experimentais para a determinação do coeficiente de difusão efetivo na extração de óleos essenciais com fluidos supercríticos**. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2002, 144p.
- Ranasinghe, L.; Jayawardena, B.; Abeywickrama, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana, **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.208-211, 2002.

- Reverchon, E. & Marrone C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling, **Chemical Engineering Science**, v.52, p. 3421-3428, 1997.
- Rodrigues, V.M. **Determinação da solubilidade em sistemas pseudo-ternários: cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) + CO₂, gengibre (*Zingiber officinali*) + CO₂, e erva-doce (*Pimpinella anisum*) + CO₂**, Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2001, 319p.
- Rodrigues, V.M.; Sousa, E.M.B.D; Monteiro, A.R.; Chiavone-Filho, O.; Marques, M.O.; Meireles, M.A.A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw materials in pressurized CO₂: a pseudo ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent, **Journal of Supercritical Fluids**, v.22, p.21-36, 2002.
- Singh, A.; Singh, R.K.; Bhunia, A.K.; Singh, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs, **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.36, p.787-794, 2003.
- Souza, A.T.; Corazza, M.L.; Cardozo-Filho, L.; Guirardello, R.; Meireles, M.A.A. Phase equilibrium measurements for the system clove (*Eugenia caryophyllus*) oil + CO₂, **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.49, p.352-356, 2004.
- Sovová, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – modeling of extraction curves, **Chemical Engineering Science**, v.49, p.409-414, 1994.
- Tan, C. & Liou, D. Modeling of desorption at supercritical conditions, **AIChE Journal**, v.35, p.1029-1031, 1989.
- Zapata-Noreña, C. & Meireles, M.A.A. The effective diffusivity of clove essential oil in pressurized CO₂, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.393-398, 1997.

B.2. Estudo da sazonalidade de artemisinina de *Artemisia annua*

O método convencional de extração da artemisinina a partir da *A. annua* é por solventes orgânicos. Entretanto, este método pode ser laborioso e demandar bastante tempo, criando demora no fluxo de informação desde o laboratório [Christen & Veuthey, 2001]. A extração usando fluidos supercríticos (SFE) é um método alternativo para extrair artemisinina a partir de *A. annua* devido a sua melhor recuperação e curto tempo de extração.

O presente trabalho teve como principal objetivo usar a SFE como uma ferramenta analítica para estudar a variação sazonal do teor de extrato, artemisinina e cânfora a partir de plantas de *A. annua* cultivadas em Brazil [Magalhães et al., 1987].

B.2.1. Material e métodos

Folhas moídas de *A. annua* (hybrid Ch x Viet 55), correspondentes a diferentes datas de colheita, entre fevereiro e março de 2003, foram fornecidas pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA - UNICAMP (Campinas, Brasil). Extrações exaustivas foram realizadas usando a unidade Spe-ed SFE (Applied Separations, model 7071, Allentown, E.U.A), com uma coluna de extração de 5 mL (Thar Designs, CL 1165, Pittsburgh, E.U.A). O leito fixo de partículas foi formado com $2,01 \times 10^{-3}$ kg de material moído (umidade de 8,27 %). As condições de extração foram 300 bar e 40 °C. A vazão do solvente foi de 6.8×10^{-5} kg CO₂ / s. Um período estático de 5 minutos foi usado. O extrato foi coletado em frasco de vidro imerso em banho de etileno glicol (-5 °C). O tempo de operação foi de 2,5 horas. Após despressurizar o sistema, a linha que fica após a coluna de extração foi lavada com acetato de etila (PA, Merck, Darmstadt, Alemanha) e o solvente presente na solução

resultante foi removido num sistema de rotaevaporação com controlador de vácuo. A massa do extrato foi determinada pela soma dos extratos de coleta e limpeza.

Os extratos foram analisados em um sistema de GC-FID (Shimadzu, modelo 17A, Kyoto, Japão). A quantificação de artemisinina e cânfora foi realizada pelo método de padronização externa [Collins et al., 1997]. O teor de artemisinina foi determinado pelo método indireto [Sipahimalani et al., 1991].

B.2.2. Resultados e Discussão

A variação sazonal do extrato, artemisinina e cânfora é apresentada na Figura A-4. Os rendimentos em extrato, artemisinina e cânfora variaram de 5,67 a 6,73; 0,451 a 0,972; e 0,008 a 0,321 % base seca (b.s.), respectivamente.

Da Figura B-4 podemos observar que os rendimentos em extrato e artemisinina têm um comportamento irregular ao longo do período de colheita. Estes resultados mostram que o teor de extrato e artemisinina variam dentro da planta nos diferentes estágios de crescimento. A produção de artemisinina é influenciada pelas condições edafoclimáticas [Chen & Zhang, 1987; Weathers et al., 1994].

Por outro lado, o teor da cânfora aumenta com o tempo de colheita. A cânfora é o componente majoritário do óleo essencial de *A. annua*. A *A. annua* apresenta baixo teor de óleo essencial (0,2 % b.s.) no estágio vegetativo, enquanto que no estágio de completo florescimento, aumenta significativamente (1,2 % b.s) [Chalchat et al., 1991].

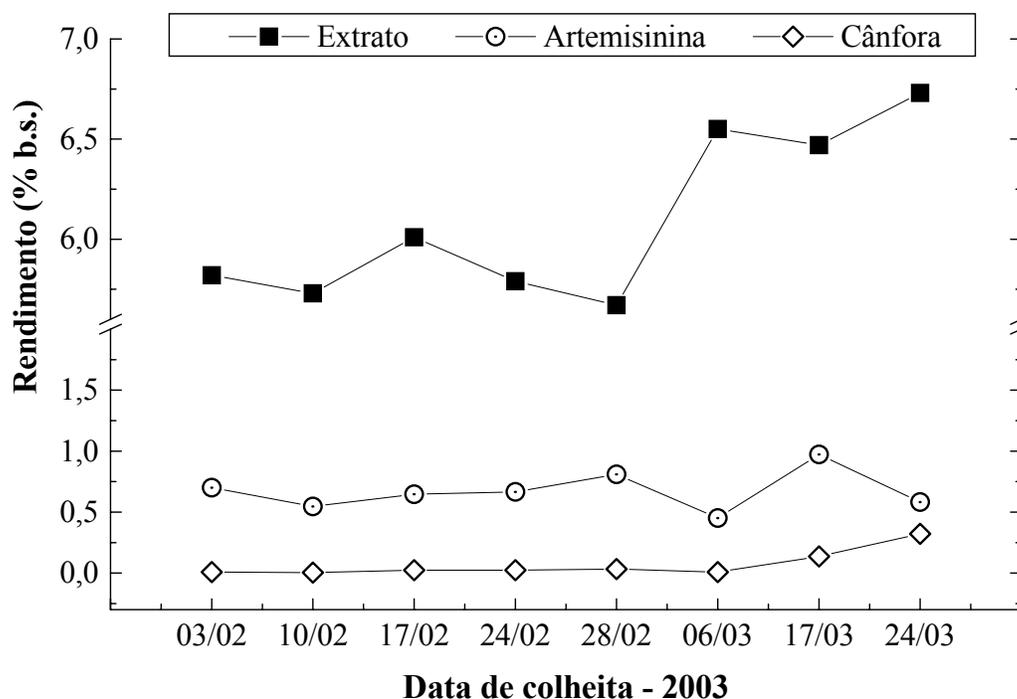


Figura B-4. Variação sazonal de extrato, artemisinina e cânfora de *Artemisia annua*.

Referências bibliográficas

- Chalchat, J.C.; Garry, R.P.; Michet, A.; Gorunovic, M.; Stosic, D. A contribution to chemotaxonomy of *Artemisia annua* L. Asteraceae, **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v.41, p.233-236,1991.
- Chen, F.T. & Zhang, G.H. Studies on several physiological factors on artemisinin synthesis in *Artemisia annua* L., **Plant Physiology**, v.5, p.26-30, 1987.
- Christen, P. & Veuthey, J.L. New trends in Extraction, Identification and Quantification of Artemisinin and its Derivates, **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.1827-1839, 2001.
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 7a Edição, Editora da Unicamp: Campinas, 1997, 229p
- Magalhães, P.M.; Delabays, N.; Sartoratto, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil, **Journal of the Association for the Advancement of Science**, v.49, p.413-415, 1987.
- Sipahimalani, A.T.; Fulzele, D.P.; Heble, M.R. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography, **Journal of Chromatography** v.538, p.452-455, 1991.
- Weathers, P.J.; Cheetham, R.D.; Follansbee, E.; Theoharides, K. Artemisinin production by transformed root of *Artemisia annua*, **Biotechnology Letters**, v.16, p.1281-1286, 1994.

Anexo C – Curvas de Calibração

As curvas de calibração foram construídas de acordo com o procedimento apresentado por **Collins et al. [1997]**.

Devido à instabilidade térmica da artemisinina, a sua quantificação foi realizada segundo metodologia apresentada por **Sipahimalani et al. [1991]**, que considera as áreas dos picos dos seus produtos de degradação. O cromatograma da artemisinina e seus produtos de degradação é apresentado na Figura C-2. Uma relação linear foi observada entre a concentração de artemisinina e as áreas dos picos A e B. Assim, segundo **Sipahimalani et al. [1991]**, qualquer um dos dois picos poderia ser usado para detecção e quantificação de artemisinina. Entretanto, se os extratos de *Artemisia annua* contêm o composto arteanuina-B, que tem o mesmo tempo de retenção que o produto de degradação A, a quantificação da artemisinina pode ser determinada usando-se somente a curva de calibração do pico B.

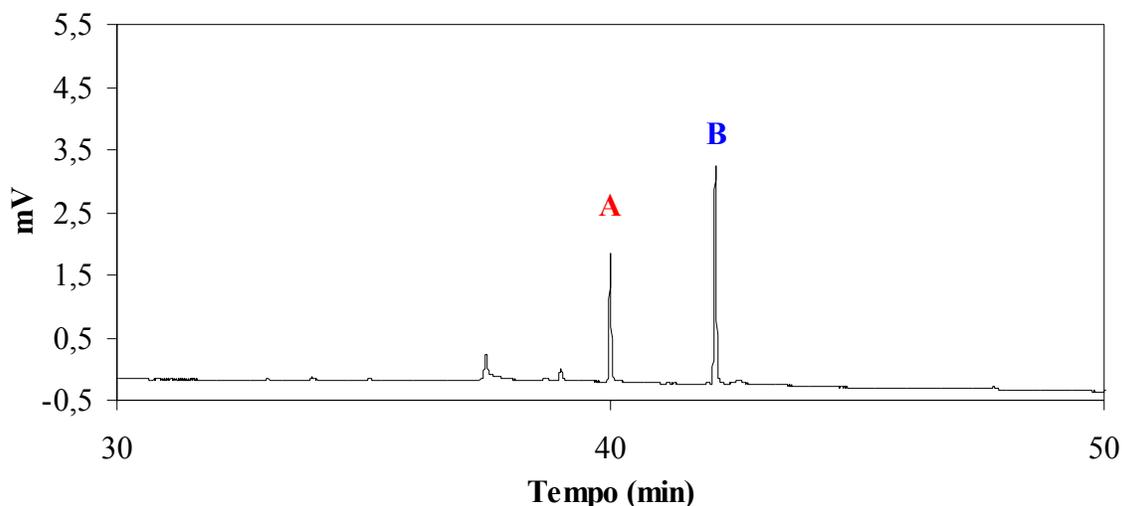


Figura C-1. Cromatograma GC-FID de artemisinina mostrando os dois produtos de degradação.

Detalhes sobre os produtos de degradação foram descritos por **Christen e Veuthey [2001]**. Segundo os autores, a termólise da artemisinina produz um produto de decomposição e dois produtos de rearranjo, segundo o esquema apresentado na Figura C-2.

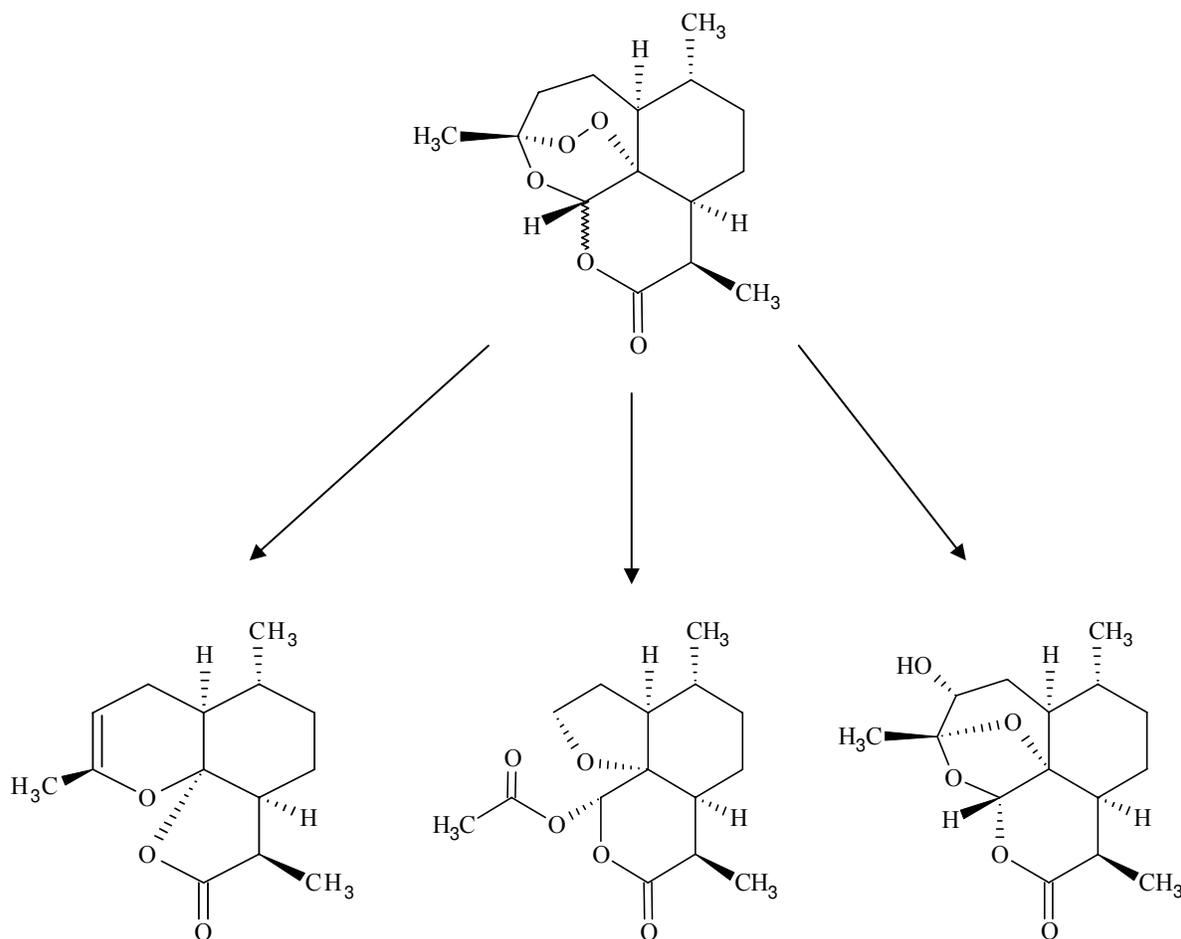
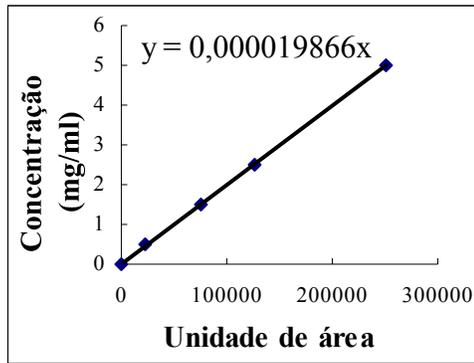


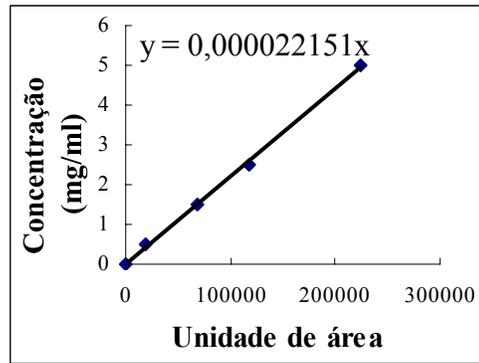
Figura C-2. Produtos de degradação da artemisinina [Christen e Veuthey, 2001]

Na Figura C-3 são apresentadas as curvas de calibração de diferentes compostos.

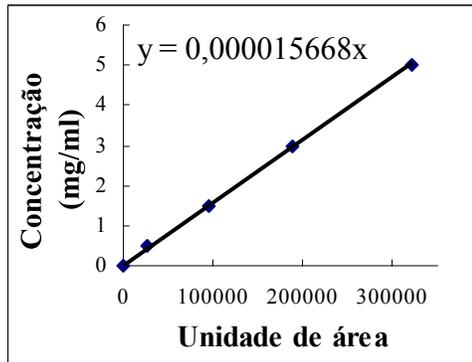
α-Pineno



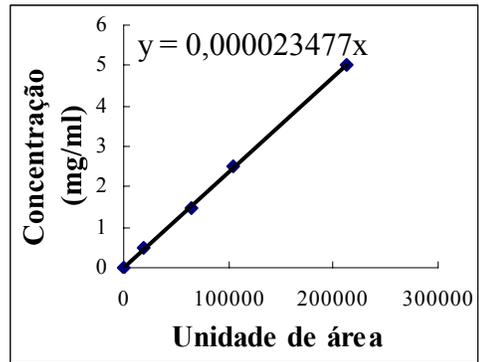
Mirceno



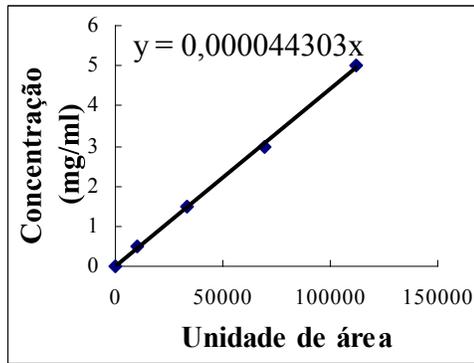
1,8 Cineol



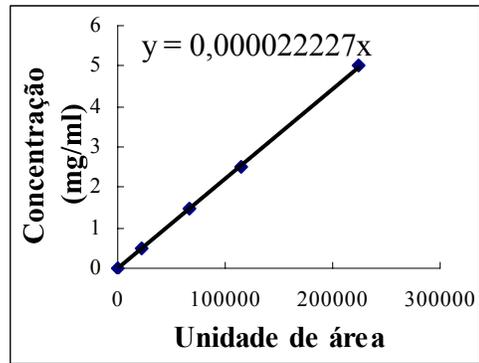
Linalool



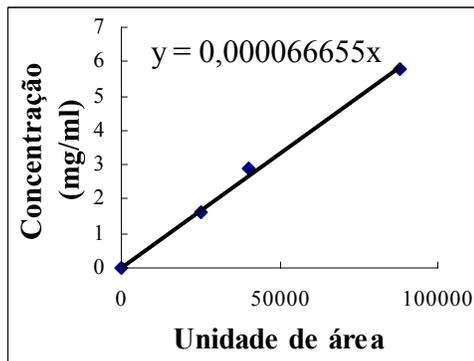
Cânfora



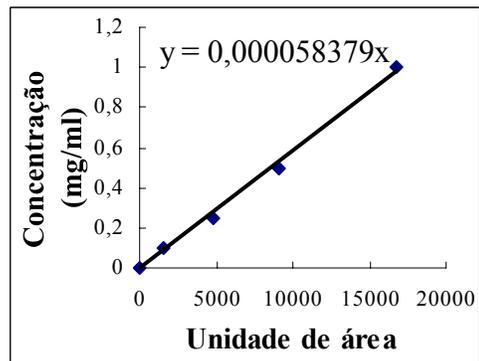
Borneol



Cariofileno



Artemisinina



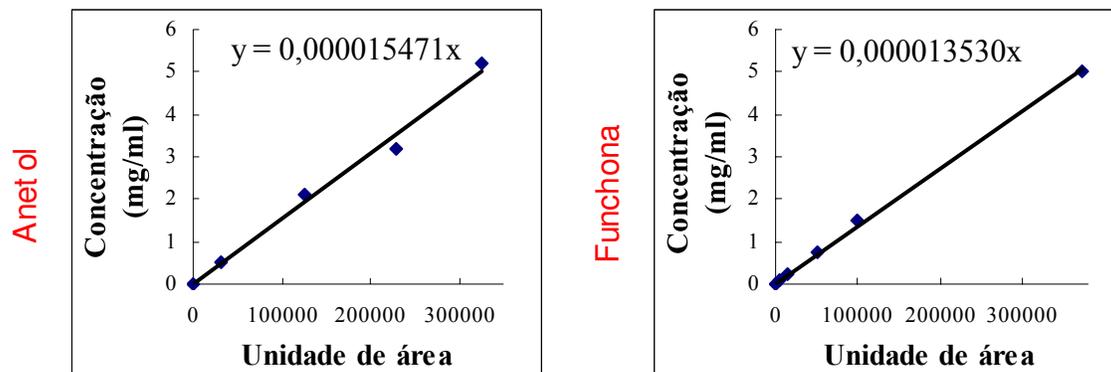


Figura C-3. Curvas de calibração de compostos presentes nos extratos dos diferentes sistemas.

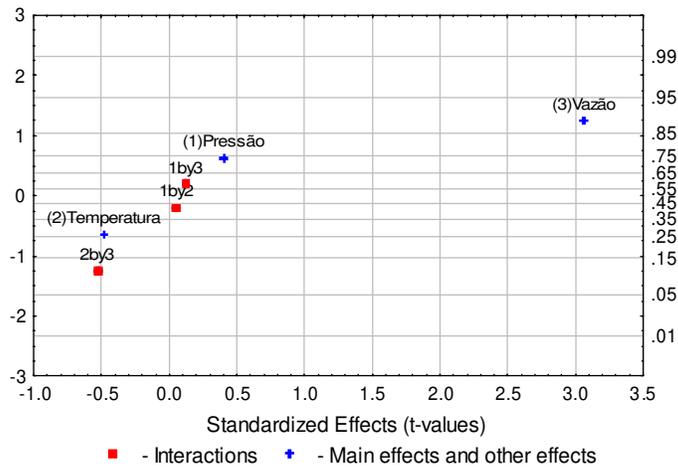
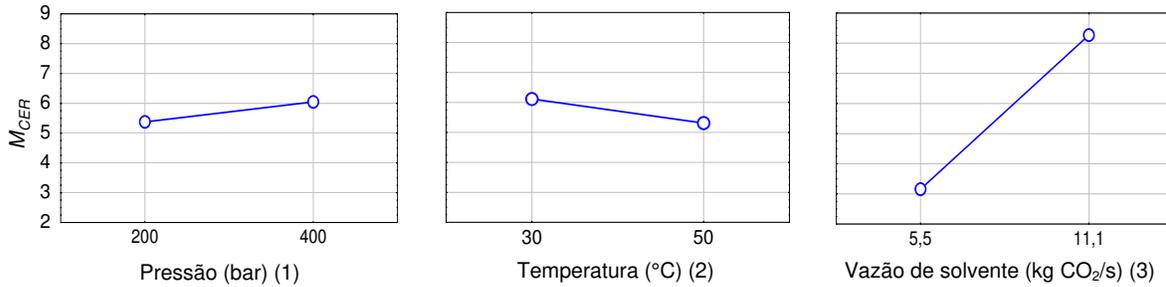
Referências bibliográficas

- Christen, P. & Veuthey, J.L. New trends in Extraction, Identification and Quantification of Artemisinin and its Derivates, **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.1827-1839, 2001.
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 7a Edição, Editora da Unicamp: Campinas, 1997, 229p
- Sipahimalani, A.T.; Fulzele, D.P.; Heble, M.R. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography, **Journal of Chromatography** v.538, p.452-455, 1991.

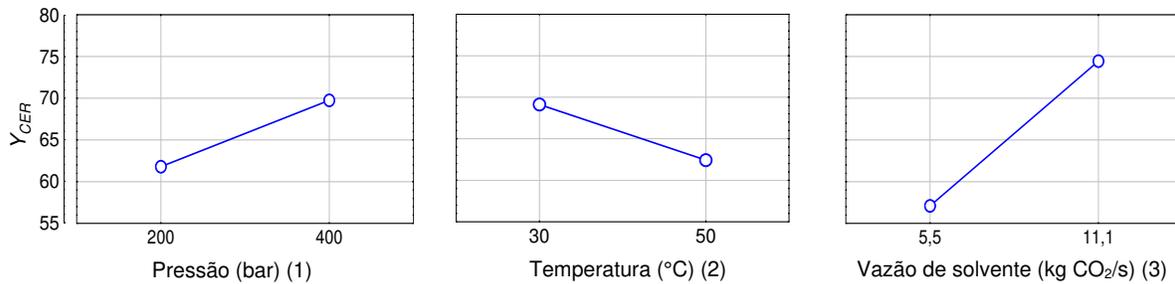
Anexo D – Análise Estatística da SFE de *A. annua*

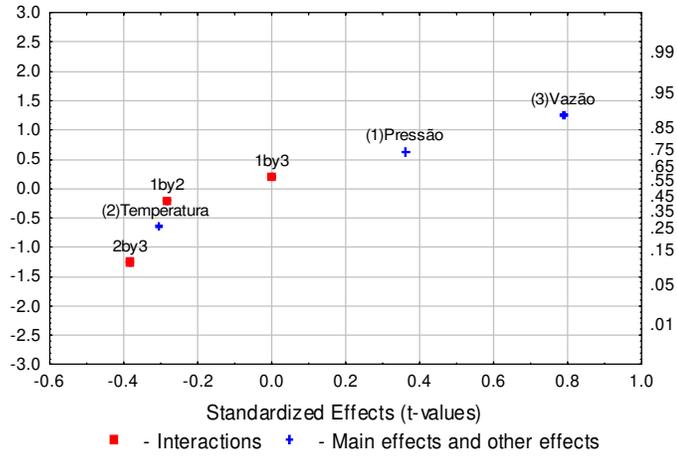
D.1. Parâmetros cinéticos

D.1.1. M_{CER}

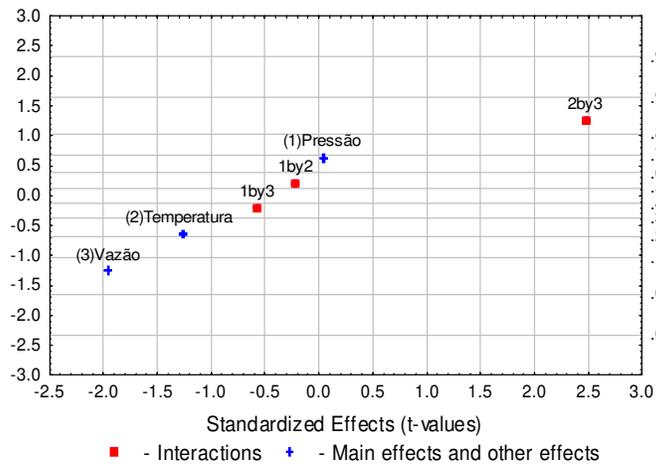
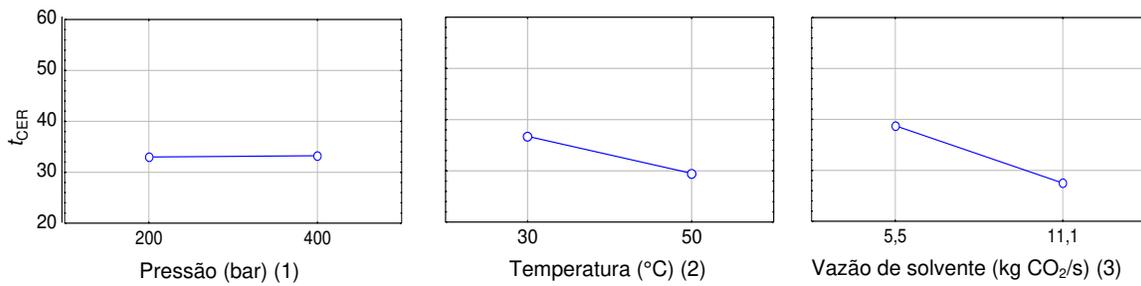


D.1.2. Y_{CER}



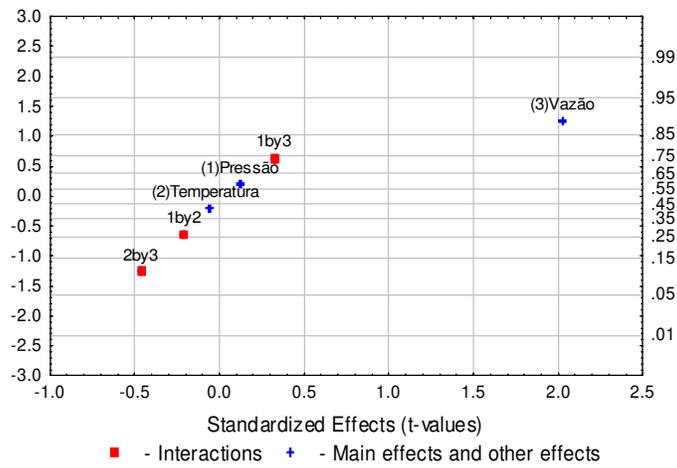
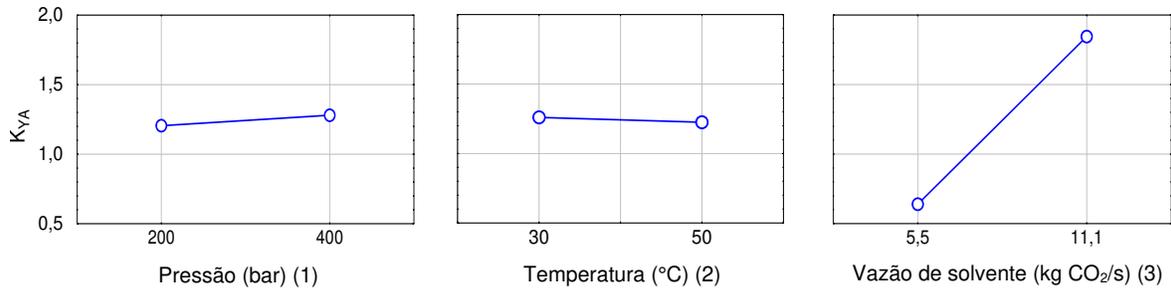


D.1.3. t_{CER}

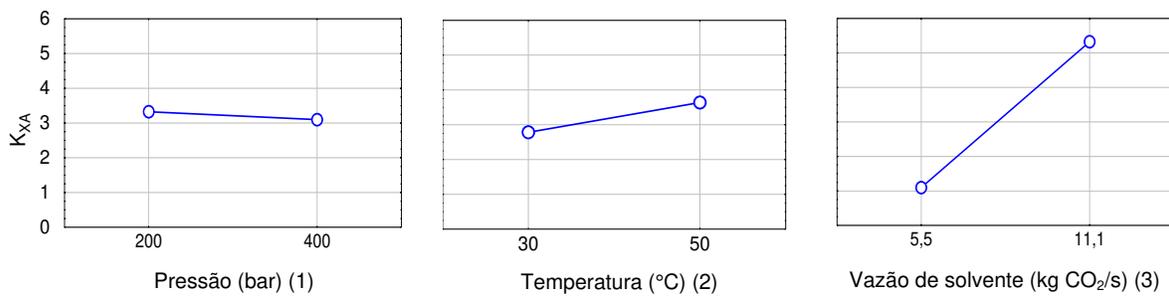


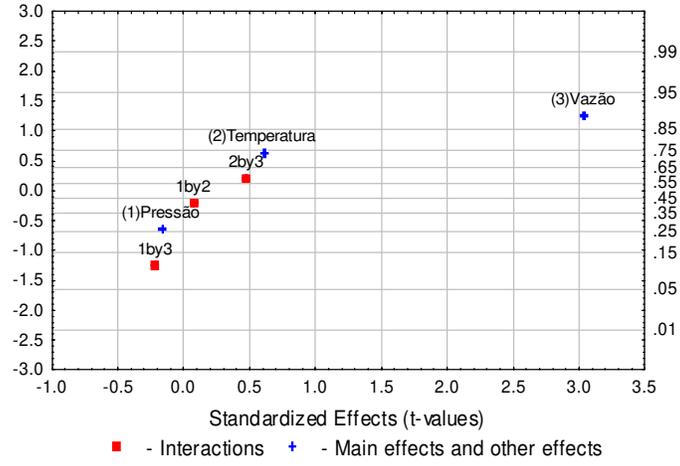
D.2. Coeficientes de transferência de massa

D.2.1. Coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{yA})



D.2.2. Coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{xA})





Anexo E – Teste de Atividade Anticâncer: *C. verbenacea*

No presente estudo foi avaliada a atividade anticâncer dos extratos de *Cordia verbenacea* obtidos pelos diferentes métodos de extração. Os testes foram realizados pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-UNICAMP.

E.1. Material e Métodos

O teste de atividade anticâncer foi realizado segundo o procedimento descrito na literatura [Braga et al., 2003; Leal et al., 2003]. As linhagens tumorais humanas foram cedidas pelo National Center Institute, Frederick, MD (NCI – E.U.A). Para a realização da triagem in vitro foram utilizadas as linhagens: K562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI460 (pulmão), PCO3 (próstata), HT29 (côlon), OVCAR (ovário) e 786-0 (rim). As células foram cultivadas em frascos de 25 mL (Nunc Brand Products, Roskilde, Dinamarca) contendo 5 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, São Paulo, Brazil) com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies, São Paulo, Brazil). Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) (Sigma Chemical Co.) a 400 vezes a concentração final. O ensaio da sulforrodamina B (SRB) foi realizado de acordo com o método de Skehan [1990]. As células foram fixadas por meio da precipitação de proteínas com 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma Chemical Co.), a 50% para as células aderidas e 80 % para as células em suspensão (leucemia), por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada. As células foram coradas por 30 minutos com 50 µL do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 % e subsequentemente lavadas por 4

vezes com uma solução de ácido acético 1 %. As placas foram novamente secas à temperatura ambiente, e o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 μL de uma solução de Trizma Base (Sigma Chemical Co.) 10 mM e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

E.2. Resultados e Discussão

Na Figura E-1 é apresentado o resultado do teste da atividade anticâncer do extrato de *C. verbenacea* obtido com $\text{CO}_2\text{-SC}$ a 200 bar / 40 °C. Para sua análise, os extratos podem ser considerados ativos se sua inibição de crescimento celular for maior que 50 % (indicada pela linha tracejada).

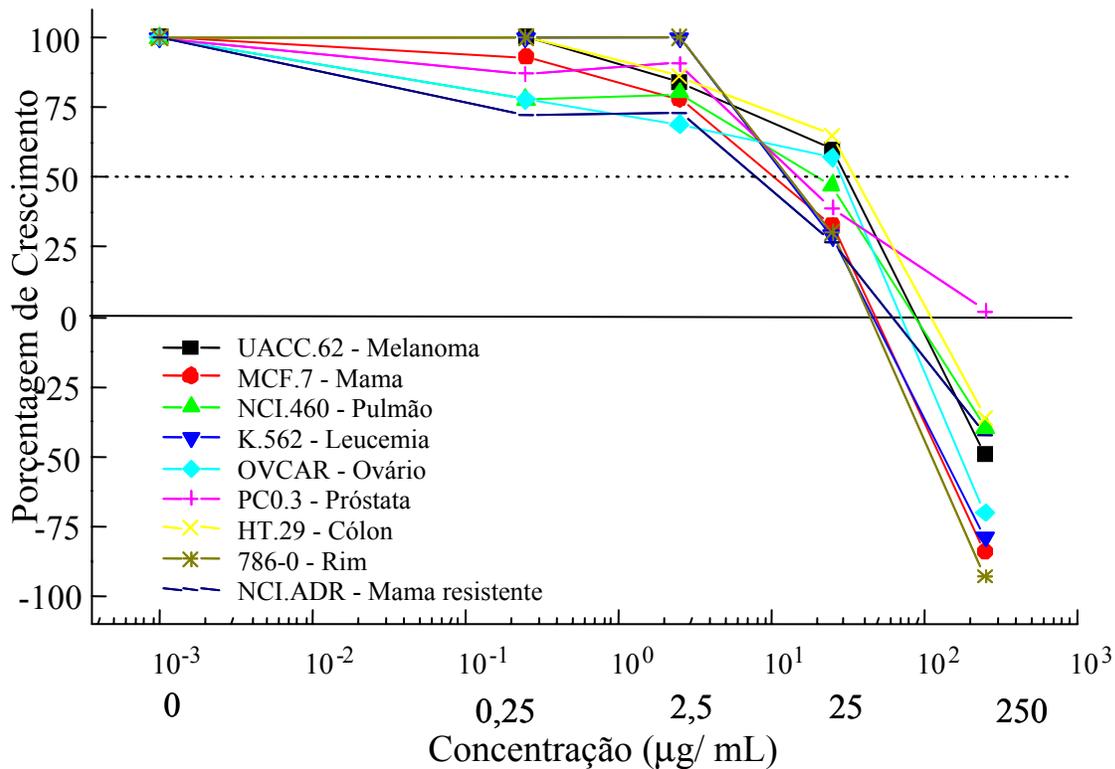


Figura E-1. Atividade anticâncer in vitro em função da concentração das células cancerosas do extrato de *C. verbenacea* obtido com CO_2 supercrítico a 200 bar e 40 °C.

Da Figura E-1 pode ser observado que o efeito citotóxico começou a uma concentração de extrato de 0,25 µg/mL, exceto para as células de leucemia (K562) e rim (786-0), que começaram a 2,5 µg/mL. O efeito citocida começou a 25 µg/mL, exceto para as células de ovário (OVCAR), melanoma (UACC.62) e cólon (HT29). Quando comparado com os resultados dos extratos obtidos pelos métodos convencionais, pode-se afirmar que os comportamentos foram aproximadamente iguais, com a diferença de que para o extrato obtido com etanol, o efeito citocida para todas as linhagens celulares começou na concentração de 25 µg/mL. Por outro lado, os resultados apresentados pelos extratos obtidos a 100 bar / 30 °C, 100 bar 50°C, 300 bar / 30 °C e 300 bar 50 °C, mostraram que, tanto o efeito citocida quanto o efeito citotóxico, variam de acordo com a condição operacional. Para 100 bar / 30 °C e 300 bar / 30 °C, o efeito citotóxico começou a uma concentração de 0,25 µg/mL. O efeito citocida só foi observado para algumas células (leucemia e ovário) na concentração de 25 µg/mL. Para 100 bar / 50°C e 300 bar / 50 °C, o efeito citotóxico para a maioria das células começou na concentração de 2,5 µg/mL, e o efeito citocida só foi observado a 250 µg/mL.

Embora não se tenha identificado o componente ativo da atividade anticâncer, é possível fazer uma inferência sobre os resultados anteriormente apresentados, relacionando a atividade anticâncer com a composição dos extratos. Uma tendência geral foi observada do efeito da pressão e temperatura sobre a composição do extrato: para a pressão de 100 bar, o aumento da temperatura foi acompanhado por um incremento do teor de óleo volátil no extrato, entretanto o contrário foi observado para a pressão de 300 bar. Este comportamento foi verificado pela variação da pureza relativa de β-cariofileno nos extratos ($\text{kg } \beta\text{-cariofileno} / \text{kg extrato} \times 100$). Na condição de 100 bar / 50 °C a pureza relativa do β-

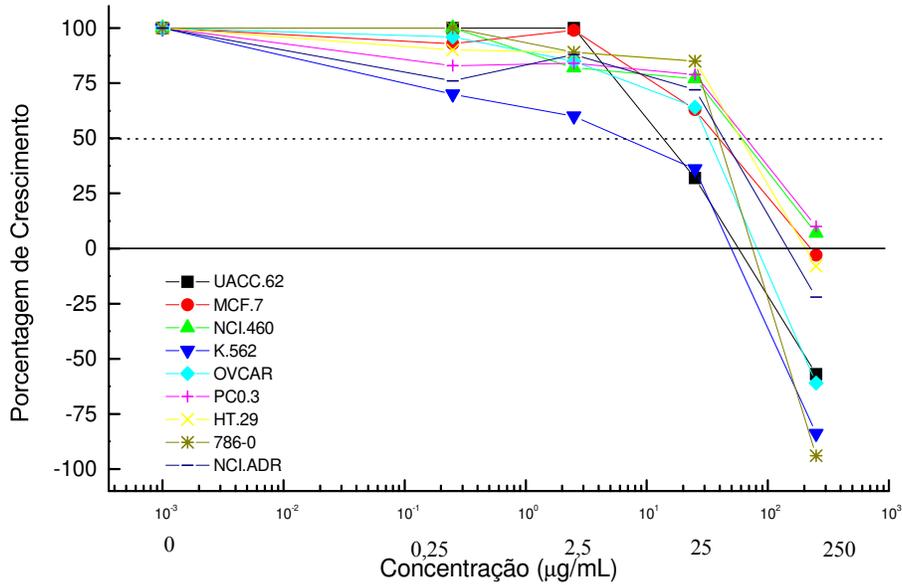
cariofileno foi de 23,62 % (m/m), similar à pureza relativa no óleo volátil (hidrodestilação) (Tabela 4-8). Na medida em que foi aumentada a densidade do CO₂, a pureza relativa de β-cariofileno foi diminuindo. A 100 bar / 30 °C, a pureza relativa de β-cariofileno foi de 3,16 % (m/m). Na pressão de 300 bar as razões de β-cariofileno foram 2,64 % e 2,52 % (m/m), para 30 °C e 50 °C, respectivamente. Desta forma, é verificado que o aumento da densidade do CO₂ permitiu a co-extração de componentes de massa molecular elevada, porém, este aumento não parece favorecer a atividade anticâncer, pois como visto anteriormente para o extrato obtido a 300 bar / 50 °C, é necessária uma maior concentração de extrato para provocar um efeito citocida nas linhagens celulares. O β-elemento é o componente ativo da planta *Rhizoma zedoariae* que inibe o crescimento de células K562 (leucemia) [Yuan et al., 1999, citado por Reddy et al., 2003]. Este componente foi identificado nos extratos de *Cordia verbenacea*, e principalmente concentrado na fração obtida a 60 °C / 80 bar.

E.3. Referências bibliográficas

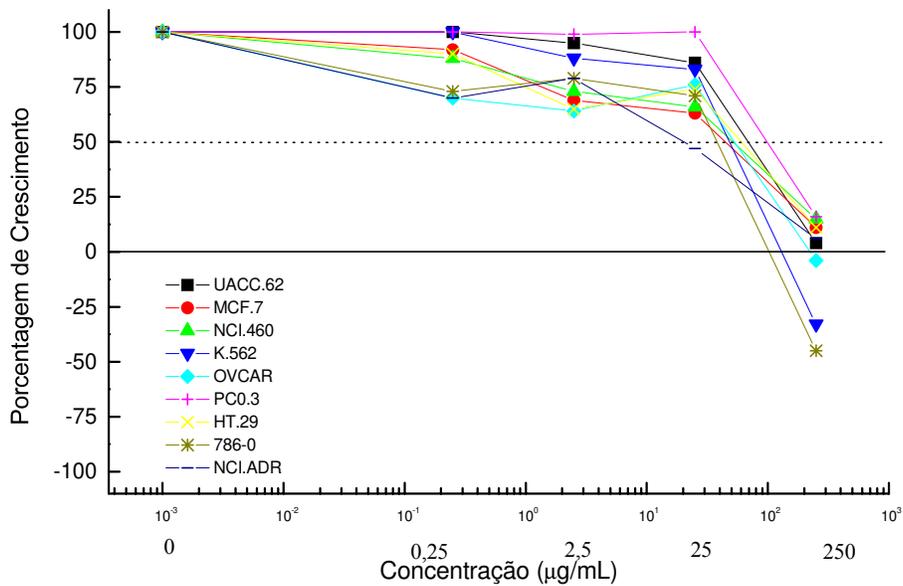
- Braga, M.E.M.; Leal, P.F.; Carvalho, J.E.; Meireles, M.A.A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 6604-6611, 2003.
- Leal, P.F.; Braga, M.E.M.; Sato, D.N.; Carvalho, J.E.; Marques, M.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.
- Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective, **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p.1-13, 2003.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D. New colorimetric cyto-toxicity assay for anticancer-drug screening, **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.1107-1118, 1990.

E.4. Resultados da Atividade Anticâncer dos extratos de *C. verbenacea*

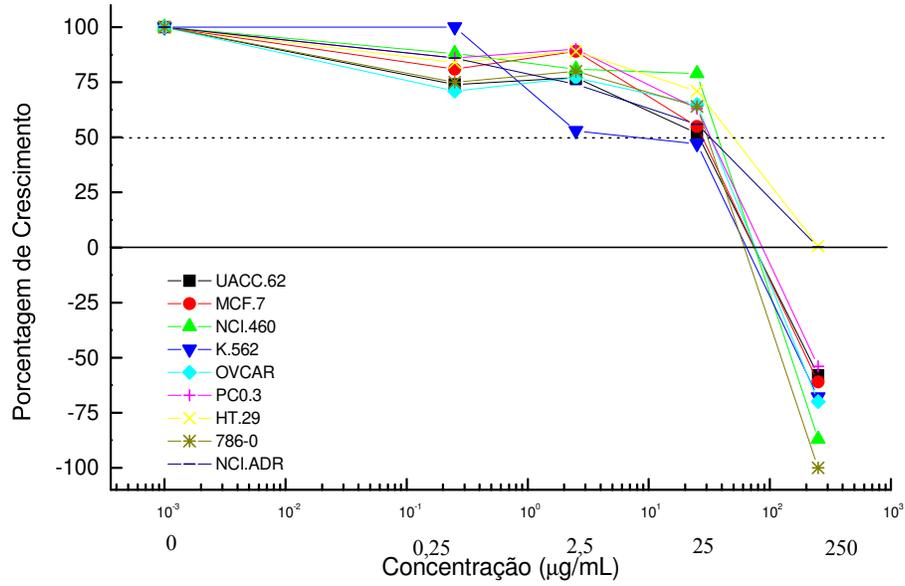
☛ SFE 100 bar / 30 °C



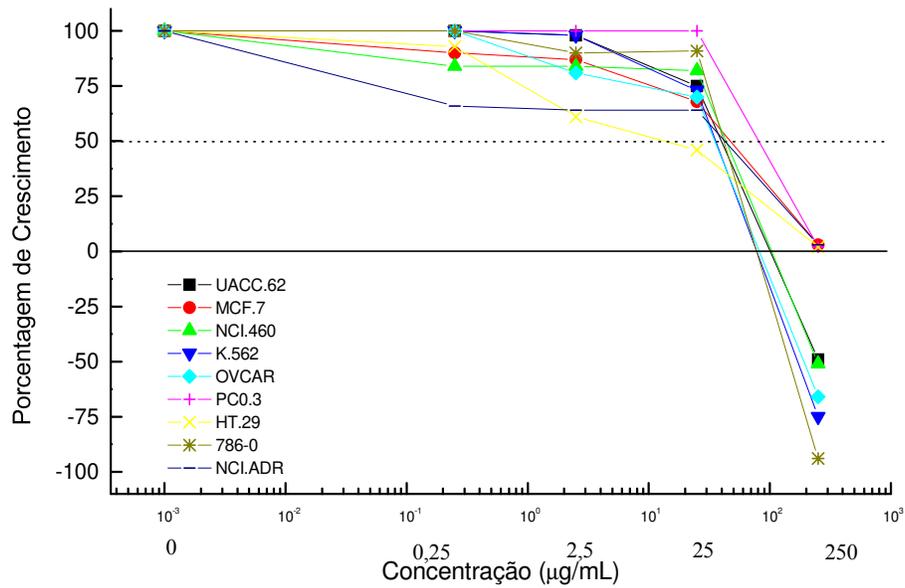
☛ 100 bar / 50 °C



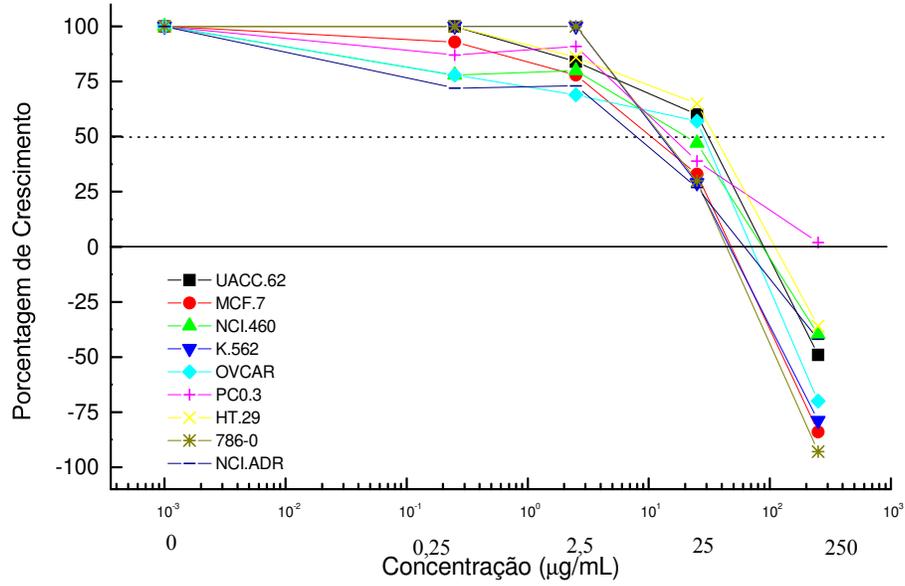
300 bar / 30 °C



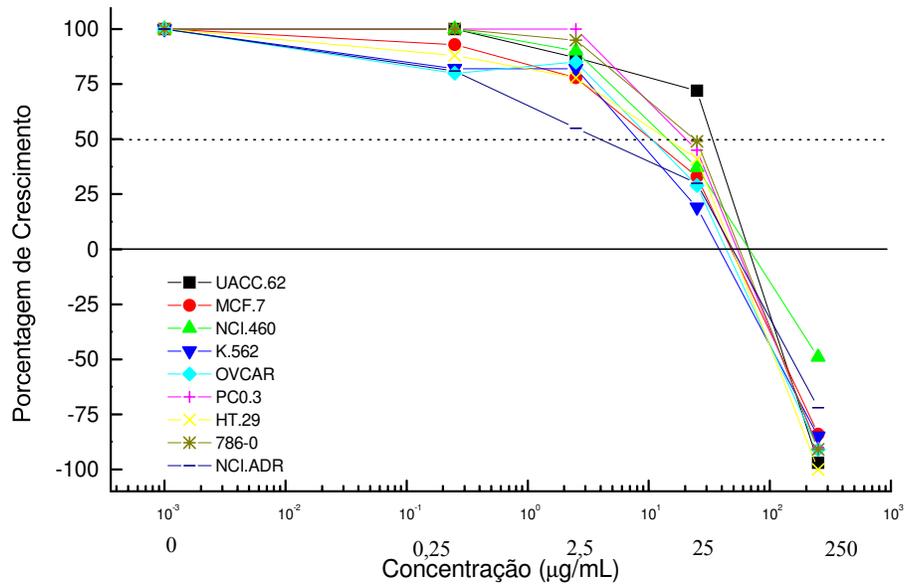
300 bar / 50 °C



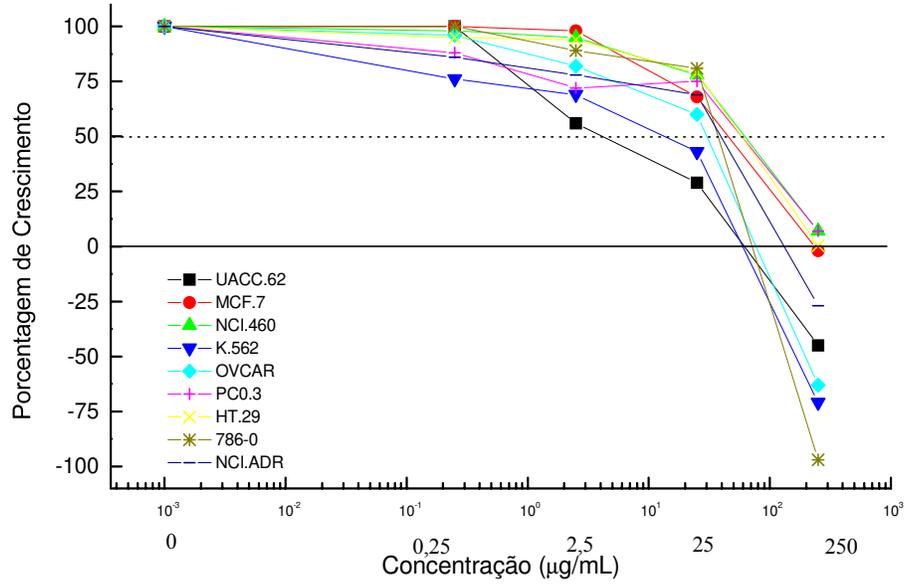
200 bar / 40 °C



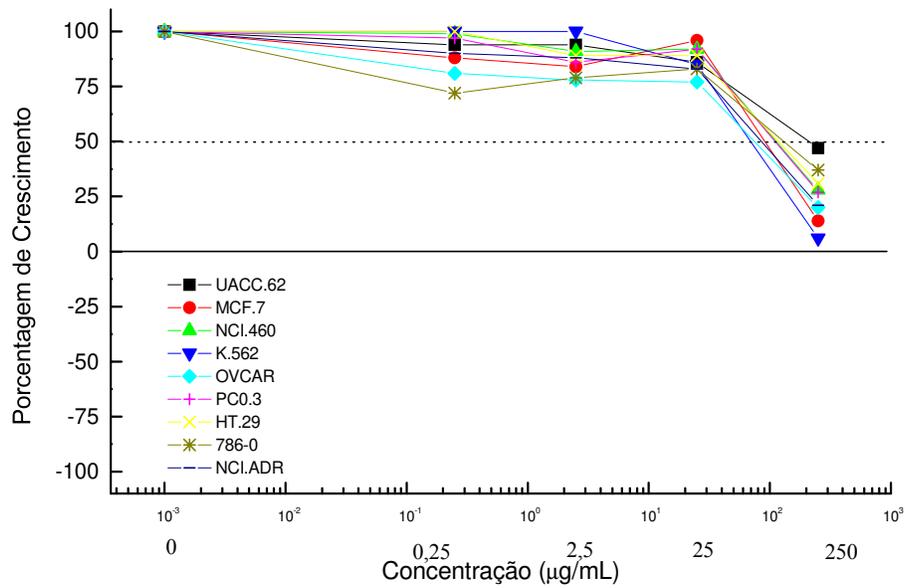
200 bar / 26 °C



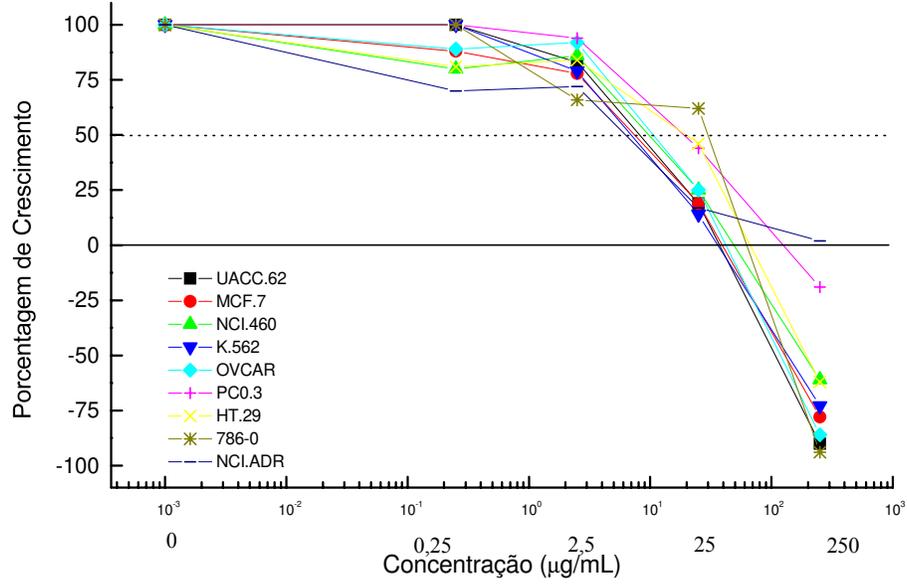
200 bar / 54 °C



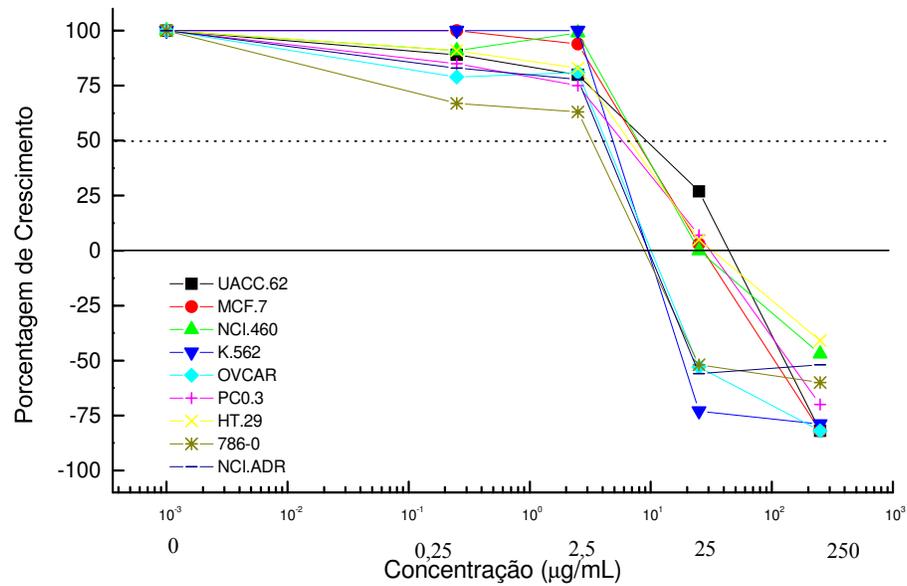
78 bar / 40 °C



Hidrodestilação



Extração com Etanol



Anexo F – Teste de Atividade Antibacteriana

No presente estudo foi avaliada a atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* dos extratos de *Eugenia caryophyllus*, *Cordia verbenacea* e *Artemisia annua* obtidos com CO₂ supercrítico. Estes ensaios foram realizados pela Dra. Daisy Sato, do Instituto Adolfo Lutz – Ribeirão Preto. A atividade antibacteriana foi avaliada através do teste MBA. A descrição da metodologia foi apresentada por **Leal et al. [2003]**. Os resultados são apresentados na Tabela F-1.

Tabela F-1. Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos de cravo-da-índia, *C. verbenacea* e *A. annua*, obtidos com CO₂ supercrítico, contra *M. tuberculosis* H37Rv

Matéria prima	Condição de extração	MIC (µg/mL)
<i>Eugenia caryophyllus</i>	100 bar / 35 °C	>128
	200 bar / 40 °C	128
	100 bar / 30 °C	128
<i>Cordia verbenacea</i>	300 bar / 50 °C / amostra coletada no intervalo de extração de 0 – 15 min	128
	300 bar / 50 °C / amostra coletada no intervalo de extração de 15 – 45 min	128
	300 bar / 40 °C	64
	400 bar / 50 °C	64
<i>Artemisia annua</i>	200 bar / 30 °C / amostra coletada no intervalo de extração de 5 – 10 min	64
	200 bar / 30 °C / amostra coletada no intervalo de extração de 110 – 130 min	128

O extrato de cravo-da-índia apresentou a menor atividade antibacteriana (Concentração Mínima Inibitória (MIC - Minimum Inhibitory Concentration) > 128 µg/mL). As condições operacionais usadas para obter os extratos de *C. verbenacea* não afetaram sua atividade antibacteriana, uma vez que os valores do MIC foram constantes para todas as condições testadas (MIC = 128 µg/mL). Os menores valores de MIC foram apresentados pelos extratos de *A. annua* (64 µg/mL). Para estes extratos as condições de temperatura e pressão não afetam o MIC. Entretanto, é observada uma significativa diferença entre os MIC's dos extratos obtidos nos intervalos de 5–10 min (MIC = 64 µg/mL) e 110–130 min (MIC = 128 µg/mL), obtidos a 200 bar e 30 °C. Embora não se tenha identificado o composto responsável pela atividade antibacteriana de *A. annua*, é possível inferir sobre os resultados observados, relacionando a atividade antibacteriana com o teor de artemisinina. A artemisinina é uma droga altamente efetiva contra a malária. A análise química mostrou que o teor de artemisinina (kg artemisinina / kg of extrato × 100) diminui com o tempo de extração, sendo 14,95 % no intervalo de tempo de 5-10 min e 10,62 % no intervalo de 110-130 min. A co-extração de compostos de elevada massa molecular, no intervalo de 110-130 min, é possível, e conseqüentemente é necessária uma maior quantidade de extrato para inibir o crescimento bacteriano.

Referências bibliográficas

Leal, P.F.; Braga, M.E.M.; Sato, D.N.; Carvalho, J.E.; Marques, M.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.

Anexo G – Dados Experimentais

G.1. *Artemisia annua* (Umidade 8,3 % b.u.)

G.1.1. Rendimento global

Extração com CO₂ pressurizado

🚦 30 °C

Pressão (bar)	Massa de alimentação (g)	Massa de extrato (g)
75	2,01	0,0657
100	2,01	0,087
150	2,01	0,0973
200	1,99	0,0949
300	2,02	0,1011
400	3,05	0,1548

🚦 50°C

75	1,99	0,0052
100	2,01	0,0658
150	2,01	0,0811
200	2,02	0,0915
300	2,01	0,1057
400	3,01	0,1795

Extração com métodos convencionais

🚦 Extração com Hexano	8	0,5345
🚦 Hidrodestilação	40,01	0,1806

G.1.2. Curvas globais de extração (Massa de alimentação: 50 g)

✚ $P = 400 \text{ bar}; T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$

Vazão de solvente $\times 10^{-5} \text{ kg CO}_2 / \text{s} (Q_{\text{CO}_2})$			
5,5		11,1	
Tempo (min)	Massa total de extrato (g)	Tempo (min)	Massa total de extrato (g)
6,5	0,1871	5	0,4303
10	0,2596	10	0,7344
15	0,3453	15	1,0037
20	0,4256	20	1,2154
30	0,5615	30	1,4653
40	0,6857	40	1,6880
50	0,7832	50	1,9055
60	0,9105	60	2,1181
70	1,0334	70	2,3327
80	1,1439	80	2,4858
90	1,2679	90	2,5997
110	1,4648	100	2,6778
130	1,6636	130	2,8896

✚ $P = 200 \text{ bar}; T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$

Vazão de solvente $\times 10^{-5} \text{ kg CO}_2 / \text{s} (Q_{\text{CO}_2})$			
5,5		11,1	
Tempo (min)	Massa total de extrato (g)	Tempo (min)	Massa total de extrato (g)
5	0,1240	5	0,2711
10	0,2525	10	0,5402
15	0,3711	15	0,7570
20	0,4593	20	0,9158
30	0,5777	30	1,2051
45,5	0,7226	40	1,4382
50	0,7634	50	1,5566
62	0,8690	60	1,6974
73	0,9757	70	1,8179
80	1,0266	80	1,9103
90	1,1151	90	1,9781
110	1,2530	110	2,1029
130	1,3640	130	2,2054

✚ $P = 400 \text{ bar}; T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$

Vazão de solvente $\times 10^{-5} \text{ kg CO}_2 / \text{s} (Q_{\text{CO}_2})$			
5,5		11,1	
Tempo (min)	Massa total de extrato (g)	Tempo (min)	Massa total de extrato (g)
5	0,0971	5	0,2812
10	0,2141	10	0,6676
15	0,3520	15	0,8831
20	0,4833	20	1,0764
30	0,7368	30	1,3484
40	0,9559	40	1,5031
50	1,1183	50	1,6267
60	1,2472	60	1,7206
70	1,3590	70	1,7678
80	1,4319	80	1,8564
90	1,4844	90	1,8782
110	1,5592	110	1,9647
130	1,6321	130	2,0338

✚ $P = 200 \text{ bar}; T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$

Vazão de solvente $\times 10^{-5} \text{ kg CO}_2 / \text{s} (Q_{\text{CO}_2})$			
5,5		11,1	
Tempo (min)	Massa total de extrato (g)	Tempo (min)	Massa total de extrato (g)
5	0,0543	5	0,4367
10	0,1182	10	1,0109
15	0,2221	15	1,1840
20	0,2589	20	1,3332
30	0,3791	30	1,5213
40	0,5012	40	1,6382
50	0,6188	50	1,7379
60	0,6895	60	1,8011
70	0,7726	70	1,8532
80	0,8470	80	1,8995
90	0,8999	90	1,9442
110	1,0227	110	2,0154
130	1,1488	130	2,0839

G.2. *Cordia verbenacea* (Umidade 6,3 % b.u.)

G.2.1. Curvas globais de extração – Efeito da Temperatura e Pressão

✚ $P = 300 \text{ bar}; T = 50 \text{ }^\circ\text{C}, Q_{\text{CO}_2} = 7,63 \times 10^{-5} \text{ kg CO}_2/\text{s}$

Experimento 1		Experimento 2	
Tempo (min)	Massa total de extrato (g)	Tempo (min)	Massa total de extrato (g)
5	0,0460	5	0,0387
10	0,1927	10	0,1466
15	0,3808	17	0,3060
20	0,4871	20	0,3641
25	0,5871	25	0,4674
30	0,6813	30	0,5604
35	0,7483	35	0,6416
40	0,8125	40	0,6914
45	0,8558	45	0,7599
50	0,9116	50	0,8212
60	0,9942	60	0,9610
70	1,0884	70	1,0517
80	1,1796	80	1,1030
90	1,2442	90	1,1385
100	1,2907	100	1,1782
110	1,3308	110	1,2200
120	1,3642	120	1,2572
140	1,4168	140	1,3217
155	1,4534	159	1,3747
175	1,4982	175	1,4091

✚ $P = 200 \text{ bar}; T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, Q_{\text{CO}_2} = 7,63 \times 10^{-5} \text{ kg CO}_2/\text{s}$

Experimento 1		Experimento 2	
Tempo (min)	Massa total de extrato (g)	Tempo (min)	Massa total de extrato (g)
5	0,0404	5	0,0542
10	0,0967	10	0,1391
15	0,1699	15	0,2144
20	0,2432	20	0,2798
25	0,2971	25	0,3692
30	0,3336	30	0,3996
35	0,3656	35	0,4364
40	0,4324	40	0,4715
45	0,4716	45	0,5131
50	0,5025	50	0,5389
60	0,5509	60	0,5966
70	0,6091	70	0,6317
80	0,6446	80	0,6682
90	0,6969	90	0,7034
100	0,7262	100	0,7374
110	0,759	110	0,764
120	0,7802	123	0,7981
130	0,8057	130	0,818
150	0,8503	150	0,8631
170	0,8932	170	0,8968

G.2.2. Curvas globais de extração - Efeito da Altura do Leito

P = 200 bar

T = 40 °C

 $Q_{CO_2} = 6,49 \times 10^{-5} \text{ kg CO}_2 / \text{s}$

Tempo (min)	Altura do leito (cm)		
	8	16	24
	$F = 10,05 \text{ g}$	$F = 20,11 \text{ g}$	$F = 30,16 \text{ g}$
Massa total de extrato (g)			
5	0,0351	0,0828	0,0903
10	0,0512	0,1210	0,1584
15	0,0590	0,1476	0,1951
20	0,0653	0,1639	0,2132
25	0,0694	0,1743	0,2351
30	0,0725	0,1849	0,2562
40	0,0796	0,1946	0,2788
50	0,0867	0,2011	0,2938
60	0,0948	0,2045	0,3187
80	0,1039	0,2144	0,3572
100	0,1187	0,2218	0,3820
120	0,1289	0,2276	0,4013
140	0,1397	0,2415	0,4145

G.3. *Foeniculum vulgare* (Umidade 7,6 % b.u.)

G.3.1. Curva global de extração

Massa de alimentação = 24,98 g

P = 250 bar

T = 40 °C

$Q_{CO_2} = 6,8 \times 10^{-5}$ kg de CO₂

Tempo (min)		
	Experimento 1	Experimento 2
5	0,4330	0,4778
10	0,7565	0,7585
15	1,0258	1,0308
20	1,2409	1,2105
25	1,4055	1,4530
30	1,5873	1,6213
40	1,8510	1,8678
50	2,0323	2,0078
60	2,1421	2,1064
80	2,2213	2,1752
100	2,2650	2,2223
120	2,3156	2,2422