



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Engenharia de Processos

Extração de pilocarpina e episopiloturina de jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos

Élida de Castilho Barnabé

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Co-orientadores: Dr. Álvaro Bandeira Antunes de Azevedo (Petrobrás, RJ)

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (IB/UNICAMP)

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Outubro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

B252e Barnabé, Élide de Castilho
Extração de pilocarpina e episopiloturina de
jaborandi utilizando processos envolvendo solventes
supercríticos / Élide de Castilho Barnabé. --Campinas,
SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Theo Guenter Kieckbusch, Paulo
Mazzafera, Álvaro Bandeira Antunes de Azevedo.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Pilocarpina. 2. Alcalóides. 3. Extração com fluido
supercrítico. 4. Adsorção. I. Kieckbusch, Theo Guenter.
II. Mazzafera, Paulo. III. Azevedo, Álvaro Bandeira
Antunes de. IV. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. V. Título.

Título em Inglês: Extraction of pilocarpine and episopiloturine from jaborandi
(Pilocarpus Microphyllus) using processes involving supercritical solvents

Palavras-chave em Inglês: Jaborandi, Pilocarpine, Supercritical fluid extraction,

Adsorption

Área de concentração: Engenharia de Processos
Titulação: Mestre em Engenharia Química
Banca examinadora: Marco Vinicius Chaud, Martin Aznar
Data da defesa: 09/10/2008
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Élica de Castilho Barnabé e aprovada em 9 de outubro de 2008 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

DTF/FEQ/UNICAMP - Orientador



Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud

DCF/UNISO - Titular



Prof. Dr. Martin Aznar

DPQ/FEQ/UNICAMP - Titular

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, defendida por Elida de Castilho Barnabé e aprovada pela banca examinadora em outubro de 2008.



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Orientador

DEDICATÓRIA

A meus pais Rosemeiri e Valdemar, que sempre estiveram do meu lado, não medindo esforços para ajudar.

Aos meus irmãos Eberson e Enádija, que sempre contribuíram para meu crescimento pessoal.

Aos meus sobrinhos João Pedro e Sofia, que sempre trazem em seus sorrisos a alegria da vida.

Ao meu namorado Adriano, pelo companheirismo e pelo amor que serviram de estímulo para a finalização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pelas bênçãos recebidas.
- A FAPESP pela bolsa de mestrado.
- Ao CPQBA pela doação de folhas de jaborandi.
- Ao Professor Theo Guenter Kieckbusch pela excelente orientação e paciência.
- Aos co-orientadores Prof. Paulo Mazzafera e Álvaro Azevedo pela contribuição para a execução deste trabalho.
- Aos meus colegas de laboratório que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar.
- A todos meus amigos pelos momentos agradáveis que passamos no decorrer do curso.
- A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Pilocarpina é um alcalóide encontrado somente nas folhas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), uma espécie vegetal nativa da flora brasileira e empregada principalmente no tratamento de glaucoma e de xerostomia (boca seca). A epiisopiloturina, alcalóide também encontrado no extrato de jaborandi, tem atividade biológica semelhante à pilocarpina, embora atue por mecanismos diferentes. Esta pesquisa teve como objetivo o estudo da aplicabilidade da tecnologia que utiliza fluidos supercríticos na recuperação e purificação destes dois princípios ativos de folhas de jaborandi e de um resíduo industrial semi-sólido gerado na extração de pilocarpina de jaborandi com solventes orgânicos. Os ensaios de extração contemplaram pressões de 200 a 300 bar e temperaturas de 40, 50 e 60°C, utilizando CO₂ puro e CO₂ + 10% (em massa) de etanol. Em um estudo complementar investigou-se a influência do acoplamento de uma coluna de adsorção (sílica-gel) em ambiente supercrítico visando purificar os extratos. Os ensaios com CO₂ puro indicaram que aumentos de pressão melhoram a capacidade de extração em todas as situações estudadas, sendo esse efeito mais intenso nas extrações de pilocarpina das folhas e de epiisopiloturina da pasta. Aumentos de temperatura favorecem as extrações, exceto nos ensaios realizados a 200 bar, com pilocarpina contida nas folhas, que apresentaram uma tendência inversa, indicativa da proximidade de uma pressão de cruzamento. O CO₂ puro mostrou-se pouco eficiente em extrair pilocarpina das folhas. Nas condições avaliadas, a melhor recuperação de pilocarpina ocorreu a 60°C e na pressão de 300 bar (14,5% das folhas; 84,5% da pasta). O uso de co-solvente (10% etanol) melhorou esse nível de recuperação de pilocarpina e mostrou-se muito mais eficiente na recuperação de epiisopiloturina. Uma contaminação do extrato com clorofila foi observada no processamento das folhas de jaborandi com CO₂ puro e que se intensifica com o uso de etanol, prejudicando a pureza dos mesmos. A sílica-gel mostrou ter maior afinidade pela clorofila do que com os alcalóides. No processo extração/adsorção, a clorofila é completamente adsorvida na sílica, deslocando as moléculas de pilocarpina e de epiisopiloturina, indicativo de que esta pode ser uma alternativa promissora para a produção de um extrato de alta qualidade. Os ensaios de extração/adsorção com a pasta residual indicaram que a sílica-gel não é capaz de separar a pilocarpina da epiisopiloturina.

Palavras-chaves: jaborandi, pilocarpina, fluido supercrítico, extração, adsorção, clorofila.

ABSTRACT

Pilocarpine is an alkaloid found only in jaborandi leaves (*Pilocarpus microphyllus*), a native tree of Brazil, and is widely used in the treatment of glaucoma and xerostomia (dry mouth). Epiisopiloturine, another alkaloid also found in jaborandi has a similar biological activity, acting by different mechanisms. This research evaluated the applicability of the technology that uses supercritical fluid (SCF) in the recovery of these two active compounds from jaborandi leaves and from an industrial pastelike residue produced during extraction of pilocarpine with organic solvents. The SCF extractions runs used pure CO₂ and CO₂ + 10% (m/m) ethanol at pressures of 200 and 300 bar and temperatures of 40, 50 and 60°C. In an additional study, a silica gel adsorption stage was coupled to the system in an attempt to purify the extracts. Results using pure CO₂ indicate that increases in pressure increase the extraction capacity in all situations studied, more intensively the pilocarpine extraction from the leaves and epiisopiloturine from the paste. Higher temperatures improved the extraction rates, except for pilocarpine extractions from the leaves, at 200 bar, when a reverse trend was found, signaling the proximity of a crossing pressure. Pure CO₂ showed poor effectiveness in extracting pilocarpine from the leaves. At the conditions evaluated, the highest recovery found for pilocarpine was at 60°C and 300 bar (14.5% from the leaves; 64.5% from the paste). The addition of a co-solvent (10% ethanol) boosted the pilocarpine recovery level, and was even more effective in the recovery of epiisopiloturine. The pure CO₂ leaves extracts were contaminated with chlorophyll, a condition aggravated when CO₂ with ethanol was used. Silica showed higher affinity for chlorophyll than for the alkaloids. In the extraction/adsorption coupled process, all chlorophyll was adsorbed on silica, displacing the pilocarpine and epiisopiloturine molecules, and suggesting a suitable alternative for the production of high quality extracts. The extraction/adsorption runs using the paste indicated that silica was unable to separate pilocarpine from epiisopiloturine.

Key-words: jaborandi, pilocarpine, epiisopiloturine, supercritical fluid, extraction, adsorption chlorophyll.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1. Jaborandi.....	4
II.1.1. Pilocarpina.....	5
II.1.2. Epiisopiloturina.....	8
II.2. Extração convencional.....	9
II.3. Fluido supercrítico.....	11
II.3.1. Utilização de co-solventes (CSOL).....	14
II.3.2. Acoplamento de outras operações unitárias.....	18
II.4. Influência da matriz sólida.....	20
CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
III.1. Materiais.....	24
III.1.1. Matéria-prima.....	24
III.1.2. Padrões de pilocarpina e epiisopiloturina.....	25
III.1.3. Solventes HPLC.....	25
III.1.4. CO ₂ e co-solvente.....	25
III.1.5. Adsorvente.....	26
III.2. Equipamento de extração supercrítica.....	26
III.3. Determinação de pilocarpina e epiisopiloturina por HPLC.....	28
III.4. Determinação de clorofila por espectrofotômetro.....	29
III.5. Extração de pilocarpina e epiisopiloturina.....	30
III.5.1. Método convencional.....	30
III.5.2. Ensaio de extração supercrítica.....	31
CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
IV.1. Conteúdo de princípios ativos.....	33
IV.1.1. Folhas de jaborandi.....	33
IV.1.2. Pasta residual.....	34
IV.2. Solubilidade de pilocarpina e de epiisopiloturina em CO ₂ supercrítico.....	35
IV.3. Ensaio preliminares de extração supercrítica.....	36
IV.4. Extração supercrítica com CO ₂ puro: folhas de jaborandi.....	37
IV.4.1. Influência da temperatura na extração de pilocarpina.....	38

IV.4.2. Influência da pressão na extração de pilocarpina.....	40
IV.4.3. Recuperação de pilocarpina.....	41
IV.4.4. Extrações de epiisopiloturina	43
IV.5.1. Influência da temperatura na extração de pilocarpina.....	44
IV.5.2. Influência da pressão na extração de pilocarpina	45
IV.5.3. Recuperação de pilocarpina.....	46
IV.5.4. Extração da epiisopiloturina.....	47
IV.5.5. Correlação com a densidade do CO ₂ -SC.....	50
IV.6. Ensaios de extração supercrítica com CO ₂ puro + etanol	51
IV.6.1. Folhas de jaborandi	51
IV.6.2. Pasta residual.....	54
IV.7. Extração acoplada à adsorção em sílica-gel.....	57
IV.7.1. Folhas de jaborandi	57
IV.7.2. Pasta residual.....	61
CAPÍTULO V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	64
V.1. Conclusões.....	64
V.2. Recomendações para trabalhos futuros	65
CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICE A. CROMATOGRAMAS	76
APÊNDICE B. EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	82
APÊNDICE C. CURVAS DE ABSORBÂNCIA DA CLOROFILA A.....	83
APÊNDICE D. SOLUBILIDADE EFETIVA	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1. Pilocarpus microphyllus	4
Figura II.2. Estrutura molecular da pilocarpina.	5
Figura II.3. Degradação da pilocarpina (Chung <i>et al.</i> , 1970).	6
Figura II.4. Estrutura dos isômeros que compõem a pilosina (Scheerer, 2001).	8
Figura II.5. Extração convencional de alcalóides do jaborandi (adaptado de Saldaña, 2002).	10
Figura II.6. Variação da densidade em função da temperatura e pressão do dióxido de carbono (adaptado de Angus e Dereuck, 1976).	12
Figura II.7. Solubilidade da cafeína no CO ₂ (Saldaña <i>et al.</i> , 1999).	13
Figura II.8. Efeito do co-solvente na solubilidade do naproxeno em função da pressão. T= 333,1 K e 5,25 mol % de co-solvente (Ting <i>et al.</i> , 1993).	15
Figura II.9. Variação da temperatura crítica com a porcentagem molar de co-solvente (adaptado de Ting <i>et al.</i> , 1993).	16
Figura II.10. Adsorção em ambiente supercrítico da mistura ácido benzóico e ácido salicílico. Influência do a) tempo (P= 20MPa e T= 318K); b) pressão (T= 318K e t= 120 min); c) temperatura (P=20 e t= 120 min), U é a razão entre massa de soluto adsorvido e massa de solvente (Domingo <i>et al.</i> , 2001).	19
Figura II.11. Curvas de extração da cafeína do chá-mate moído (comercial) e in natura (Saldaña, 2002).	21
Figura IV.1. Curvas de extração supercrítica de pilocarpina de folhas de jaborandi a 200 bar.	38
Figura IV.2. Curvas de extração supercrítica de pilocarpina de folhas de jaborandi a 300 bar.	38
Figura IV.3. Fotografia das amostras obtidas em cada ponto da extração realizada com folhas de jaborandi utilizando CO ₂ puro.	39
Figura IV.4. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi a 40°C.	40
Figura IV.5. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi a 50°C.	41
Figura IV.6. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi a 60°C.	41
Figura IV.7. Recuperação de pilocarpina das folhas de jaborandi em função da densidade do CO ₂ .	42

Figura IV.8. Curvas de extração da epiisopiloturina de folhas de jaborandi, a uma pressão de 300 bar.	43
Figura IV.9. Curvas de extração da pilocarpina da pasta residual a pressão de 200 bar.	44
Figura IV.10. Curvas de extração da pilocarpina da pasta residual a pressão de 300 bar.	45
Figura IV.11. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a 40°C.	45
Figura IV.12. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a 50°C.	46
Figura IV.13. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a 60°C.	46
Figura IV.14. Recuperação de pilocarpina da pasta residual em função da densidade do CO ₂ .	47
Figura IV.15. Curvas de extração da epiisopiloturina da pasta residual a pressão de 200 bar.	48
Figura IV.16. Curvas de extração da epiisopiloturina da pasta residual a pressão de 300 bar.	48
Figura IV.17. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a 40°C.	49
Figura IV.18. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a 50°C.	49
Figura IV.19. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a 60°C.	50
Figura IV.20. Massa extraída de epiisopiloturina (em termos de área do pico) em função da densidade do CO ₂ .	50
Figura IV.21. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi com CO ₂ puro e com CO ₂ + 10% de etanol a pressão de 300 bar.	51
Figura IV.22. Curvas de extração de epiisopiloturina de folhas de jaborandi com CO ₂ puro e com CO ₂ + 10% de etanol a pressão de 300 bar.	53
Figura IV.23. Curvas de extração da clorofila (em unidades de absorbância) de folhas de jaborandi com CO ₂ puro e CO ₂ + 10% de etanol a pressão de 300 bar.	54
Figura IV.24. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a pressão de 300 bar.	55
Figura IV.25. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a pressão de 300 bar.	56
Figura IV.26. Curvas de extração/adsorção e curva de dessorção de pilocarpina de folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar.	58
Figura IV.27. Curvas de extração/adsorção e curva de dessorção de epiisopiloturina de folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar.	58
Figura IV.28. Curvas de extração/adsorção e curva de dessorção de clorofila de folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar.	59

Figura IV.29. Fotografia das amostras obtidas na etapa de extração/adsorção realizadas com folhas de jaborandi utilizando CO ₂ puro.	60
Figura IV.30. Fotografia das amostras obtidas na etapa de dessorção com CO ₂ + 10% etanol.	61
Figura IV.31. Curvas de adsorção/dessorção de pilocarpina da pasta residual a 60°C e 300 bar.	62
Figura IV.32. Curvas de adsorção/dessorção de epiisopiloturina da pasta residual a 60°C e 300 bar.	62
Figura A.1. Cromatograma do padrão de pilocarpina diluída em água.	76
Figura A.2. Cromatograma do padrão de epiisopiloturina diluída em água.	77
Figura A.3. Cromatograma do padrão de pilocarpina diluída em etanol.	78
Figura A.4. Cromatograma do padrão de epiisopiloturina diluída em etanol.	79
Figura A.5. Cromatograma da mistura dos padrões de pilocarpina e de epiisopiloturina diluída em água.	80
Figura A.6. Cromatograma da mistura dos padrões de pilocarpina e de epiisopiloturina diluída em etanol.	81
Figura B.1. Equipamento de extração supercrítica da EXTRAE/FEA (método estático).	82
Figura C.1. Espectrofotômetro da absorbância da clorofila das extrações supercríticas da folha de jaborandi a 300 bar.	83
Figura D.1. Solubilidade efetiva da pilocarpina em função da densidade do CO ₂ .	84
Figura D.2. Variação relativa da solubilidade efetiva da epiisopiloturina em função da densidade do CO ₂ .	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela IV.1. Conteúdo de pilocarpina nas folhas de jaborandi determinados por extração com alternância de pH.	33
Tabela IV.2. Recuperação de pilocarpina na extração de folhas de jaborandi, a 300 bar.	52
Tabela IV.3. Área acumulada de epiisopiloturina extração de folhas de jaborandi, a 300 bar, quando passados 1500g de CO ₂	53
Tabela IV.4. Recuperação de pilocarpina na extração da pasta residual a pressão de 300 bar.	55
Tabela IV.5. Área acumulada de epiisopiloturina na extração da pasta residual, a 300 bar, quando passados 1500g de CO ₂	56

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para combater enfermidades é milenar, já tendo sido utilizado por gregos, romanos e egípcios. A história da civilização mostra que, além de servirem como fonte de alimentos, os vegetais também foram usados na obtenção de remédios, cosméticos, perfumes e venenos (Agra *et al.*, 1994). Planta medicinal é aquela que exerce uma ação farmacológica quando administrada de alguma forma ao homem ou a animais, devido à presença de princípios ativos.

Muitas destas plantas medicinais devem sua ação farmacológica a princípios ativos conhecidos vindo mesmo, em vários casos, a fornecer matéria-prima para a indústria farmacêutica (Rizzini e Mors, 1995). Os principais tipos de compostos utilizados como princípios ativos em medicamentos e cosméticos são alcalóides, flavonóides, glicosídeos, mucilagens, óleos essenciais e taninos. Estas substâncias químicas são encontradas em folhas, sementes, raízes e cascas de plantas (Bentley, 1965). Os alcalóides pertencem a um grupo químico com amplo emprego farmacológico, tornando muito importante as proposições e novas metodologias que envolvam sua obtenção e purificação.

A biodiversidade brasileira, representando 20% das espécies do planeta, constitui um mercado economicamente atraente, possibilita a descoberta de medicamentos para a cura de moléstias como câncer e AIDS. Os fitofármacos, medicamentos produzidos a partir dos princípios ativos das plantas, foram responsáveis por 30% do mercado de medicamentos em 1999, e neste mesmo ano, a indústria farmacêutica brasileira ocupou o décimo maior mercado do mundo movimentando 9 bilhões de dólares e sua exportação gerou ao país uma receita de 22 milhões de dólares (Petrovick *et al.*, 1999). Nos últimos anos, a produção de fitofármacos tem sido o objetivo de instituições de pesquisas nacionais e internacionais, pois movimenta US\$ 20 bilhões/ano no mercado mundial (INPA, 2006).

Para o desenvolvimento de um produto farmacêutico, cosmético ou alimentício a partir de produtos naturais são necessários processos de extração, concentração e/ou purificação do princípio ativo. Quando a matéria-prima é constituída por folhas, a dificuldade aumenta por possuírem baixas concentrações do princípio ativo, sendo

necessário grande volume deste material. Para obter elevado rendimento com alta seletividade, os processos tradicionais de extração e purificação que utilizam solventes químicos e que tem sido utilizados por muitas décadas, tendem a ser demorados, fazem uso de substâncias tóxicas, usam severas condições de processo que favorecem a degradação dos produtos e oferecem grandes riscos de acidentes nocivos ao meio ambiente porque requerem volumes relativamente grandes de solventes, além da geração de resíduos tóxicos (Luque de Castro e Garcia-Ayuso, 1998).

Devido às preocupações ambientais com a utilização de solventes orgânicos em extrações, a tecnologia de fluido supercrítico surge como uma alternativa atraente como método de extração. O uso de fluido supercrítico (FSC) se destaca por ser uma tecnologia limpa, que permite a possibilidade de trabalhar a moderadas temperaturas e uma simples descompressão consegue separar o soluto do solvente.

Nos últimos vinte anos, a indústria farmacêutica demonstrou maior interesse por processos envolvendo fluido supercrítico devido ao seu potencial em produzir partículas com propriedades desejadas, níveis reduzidos de solventes e maior pureza dos princípios ativos, pois a presença de impurezas pode contribuir para mudança das propriedades químicas e físicas levando a instabilidades (Daintree, 2008).

O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado em extrações supercríticas. Apesar de ser um ótimo solvente de compostos não-polares, tais como hidrocarbonetos, princípios ativos como fenóis, alcalóides e glicosídeos são pouco solúveis em CO₂ fato que dificulta a extração (Vilegas *et al.*, 1997). Esta limitação pode ser superada modificando as condições termodinâmicas de pressão e temperatura, e/ou com a adição de pequenas quantidades de co-solventes polares ao CO₂ supercrítico.

A utilização de co-solventes polares faz aumentar significativamente a solubilidade de compostos polares. Um dos co-solventes mais utilizados é o etanol que pode ser uma boa escolha para a extração supercrítica de princípios ativos por causa da sua baixa toxicidade (Hamburger *et al.*, 2004; Lang e Wai, 2001).

O jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*) é um arbusto nativo da flora brasileira e nas últimas três décadas foi uma das espécies mais importantes e mais exploradas comercialmente, devido ao alcalóide pilocarpina presente em suas folhas (Pinheiro, 2002).

A importância da pilocarpina como um fitoterápico no tratamento do glaucoma e xerostomia pode ser avaliada através dos dados disponibilizados pela ABIQUIF (2008), os quais mostram que em 2007, o cloridrato e o nitrato de pilocarpina ocuparam o segundo lugar entre os produtos brasileiros farmacêuticos mais exportados, atingindo 8,6 milhões de dólares.

O processo convencional para a extração de pilocarpina utilizado pelas indústrias usa solventes como clorofórmio e soluções de hidróxido de amônia e ácido sulfúrico através da técnica de alternância de extremos de pH. Isto pode favorecer a degradação da pilocarpina por epimerização ou hidrólise, transformando-se em isopilocarpina e ácido isopilocárpico (Sternitzke *et al.*, 1992). O único trabalho encontrado na literatura sobre a utilização de FSC para a recuperação da pilocarpina foi realizado na Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, mas os limitados resultados apresentados são inconclusivos (Saldaña, 2002).

O objetivo deste trabalho é a exploração da promissora tecnologia que utiliza FSC para a extração e purificação de pilocarpina e epiisopiloturina a partir de folhas do jaborandi e de uma pasta residual industrial gerada através da extração de pilocarpina das folhas de jaborandi por métodos convencionais. Ensaio experimentais visam levantar subsídios técnico/científicos para o desenvolvimento adequado do processo, assim como a obtenção destes produtos de alto valor agregado com uma qualidade superior a dos métodos convencionais.

Este projeto de pesquisa se insere na programação de equipe multidisciplinar coordenada pelo Prof. Dr. Paulo Mazzafera (IB, UNICAMP), que vem, com o apoio da FAPESP, estudando sistematicamente estes dois importantes princípios ativos para elucidar as ações farmacológicas da epiisopiloturina, as rotas metabólicas de produção destes alcalóides e o domínio dos métodos de extração e recuperação. Esta pesquisa conta também com a colaboração do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) no fornecimento das folhas de jaborandi.

CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Jaborandi

Jaborandi é a designação de um grupo de espécies pertencentes à família *Rutaceae*, do gênero *Pilocarpus* sendo que as principais espécies são *microphyllus*, *jaborandi* e *pennatifolius*. O jaborandi pode ser classificado como um arbusto ou arvoreta com aproximadamente 3 a 7,5 m de altura, com folhas de 2 a 6 cm de comprimento apresentando bordas variando de lanceolado a oval, como mostrado na Figura II.1 (Oliveira *et al.*, 1991; Pinheiro, 2002).

O jaborandi é conhecido pelos índios tupi-guaranis há vários séculos, que o denominaram de ia-mbor-endi, que significa “que faz babar”, pois induz a salivação (Corrêa, 1984).



Figura II.1. *Pilocarpus microphyllus*

Dentre as espécies conhecidas, a *Pilocarpus microphyllus* e a *Pilocarpus jaborandi*, foram as mais estudadas devido aos maiores percentuais de pilocarpina contidos em suas folhas e pela sua vasta distribuição geográfica, que engloba praticamente todo o território nacional, desde o Pará até o Rio Grande do Sul (Avancini *et al.*, 2003; Pinheiro, 2002). O jaborandi é uma espécie nativa da flora brasileira muito explorada nas últimas três décadas, sendo o Maranhão o estado que participa com 95% da produção nacional

(Pinheiro, 2002). Desde 1992, porém, a planta faz parte da *Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção*, publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, devido à sua exploração descontrolada (IBAMA, 1992).

II.1.1. Pilocarpina

A pilocarpina é um alcalóide encontrado somente nas folhas de jaborandi, na faixa de concentração de 0,5 a 1%. Esta variação de concentração é influenciada por fatores climáticos e pelo tipo de solo. As folhas mais jovens apresentam 70% mais pilocarpina do que as folhas velhas; isto porque a fase jovem é dependente da formação de enzimas para o desenvolvimento dos processos de diferenciação dos respectivos tecidos (Scheerer, 2001).

Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas presentes em plantas, microrganismos e animais. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, e estes são responsáveis pela basicidade dos alcalóides (Dewick, 1997).

A pilocarpina é um alcalóide derivado, provavelmente, do aminoácido histidina (Dewick, 1997). Ela apresenta um núcleo imidazólico e outro pentagonal lactônico. Este alcalóide foi isolado por Hardy em 1875, sendo que sua constituição química foi determinada por Pinner e sua síntese foi realizada pelo químico polonês Preobrashenski em 1933 (Mingoia, 1967).

Este alcalóide pode ser obtido na forma de cristais. Sua estrutura molecular é apresentada na Figura II.2. Sua fórmula química é $C_{11}H_{16}N_2O_2$, e sua massa molecular é 208,26 g/gmol. Seu ponto de fusão é 34°C e o de ebulição é 260°C, sendo que nesta temperatura ocorre uma parcial conversão à isopilocarpina. A pilocarpina é solúvel em água, álcool e clorofórmio (MERCK, 1983).

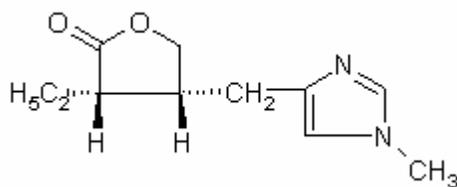


Figura II.2. Estrutura molecular da pilocarpina.

A pilocarpina é uma substância sensível à temperatura e ao pH e a degradação dela em solução aquosa ocorre por hidrólise ou por epimerização. A competição das duas rotas de degradação é dependente deste dois fatores, como pode ser observado na Figura II.3. A estabilidade da pilocarpina decresce com o incremento de pH e sobretudo com elevadas temperaturas (Bundgaard *et al.*, 1986; Neville *et al.*,1975; Fan *et al.*,1996). O aumento de temperatura faz com que a epimerização ocorra em maiores proporções do que a hidrólise (Neville *et al.*,1975).

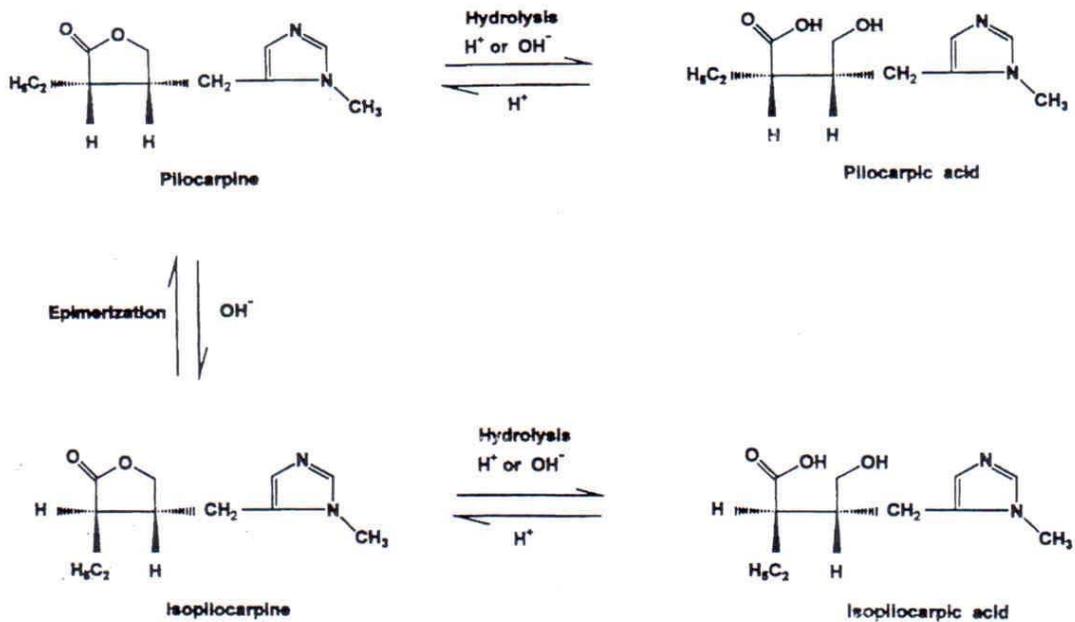


Figura II.3. Degradação da pilocarpina (Chung *et al.*, 1970).

Um estudo realizado por Saldaña (2002) investigou uma possível degradação da pilocarpina, avaliando a estabilidade de uma solução de pilocarpina hidrocloreto em etanol e mantida por três semanas, a temperatura de 21°C. O monitoramento foi realizado por CLAE e não se constatou degradação.

As ações muscarínicas da pilocarpina se manifestam em seres humanos através de uma potente excitação das secreções glandulares o que causam um aumento do suor e da saliva (Mingioia, 1967; Swan, 1967). A aplicação farmacêutica mais importante da

pilocarpina está baseada na sua capacidade em reduzir a pressão intra-ocular no tratamento do glaucoma e em cirurgias do olho, por causar a constrição da pupila (Migdal, 2000; Webster *et al.*, 1993). O glaucoma é uma doença comum manifestada pela lenta e progressiva perda de visão, sendo a segunda causa de cegueira nos EUA (Di Stasi, 1996). A pilocarpina tem sido também recomendada para o tratamento da xerostomia, que é a redução da produção da saliva, muito comum nos pacientes que foram submetidos à radioterapia e em pacientes com síndrome de Sjögren (Davies *et al.*, 2001 e Wynn, 1996), pois ativa as glândulas salivares. Algumas pesquisas apontaram que a pilocarpina estimula o crescimento de cabelo e que também possui ação renal, removendo metabólicos tóxicos (Swan, 1967).

Dentre os efeitos adversos associados ao uso da pilocarpina, merecem destaque, o rubor facial, a sudorese excessiva, náuseas, vômitos, distúrbios gastrintestinais, cefaléia, aumento da frequência urinária, alterações cardíacas, vasculares e da musculatura lisa (Taylor e Al-Hashimi, 1996; Bernardi *et al.*, 2002). De acordo com Nusair e Rubinow (1999), a posologia do medicamento que promove aumento do fluxo salivar ou conforto subjetivo ao paciente é de 5 mg de pilocarpina – via oral – tomada entre 3 a 4 vezes por dia, não podendo exceder 20 mg/dia. Doses superiores a esse limite não proporcionam um aumento dos benefícios esperados e os malefícios tendem a se exacerbar.

A pilocarpina é um fármaco parassimpatomimético que estimula de forma direta os receptores colinérgicos. Alguns dos produtos contendo sais de pilocarpina (cloridrato e nitrato) disponíveis no mercado são encontrados com os nomes de Adsorbocarpine, Akarpine, Almocarpine, I-pilocarpine, Isopto carpine, Minims Pilocarpine, Miocarpine, Ocu-carpine, Ocusert-Pilo, Pilocar, Pilocair, Pilopine HS, Piloptic, Pilostat, P.V. Carpine, P.V. Carpine Liquifilm, Spectro-pilo, Spersacarpine (Cosentino, 1998).

Um estudo realizado por Souza Filho *et al.* (2003) mostrou que os medicamentos à base de pilocarpina tiveram um considerável aumento no preço entre os anos de 1972 e 2002 e que apesar da introdução de outros medicamentos para o tratamento de glaucoma, a pilocarpina continua atual.

II.1.2. Epiisopiloturina

Nas folhas do jaborandi, além da pilocarpina, são encontrados outros alcalóides como a pilocarpidina, pilosina, isopilocarpina, jaborina e jaboridina, além de 0,24% a 0,38% de óleo essencial (Merck, 1983).

Comercialmente, pilosina é o nome dado a um conjunto de quatro isômeros: pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina, cujas estruturas estão apresentadas na Figura II.4. Estes isômeros são de difícil isolamento, mas em um trabalho feito recentemente por Abreu *et al.* (2007) foi possível sua separação e identificação analítica.

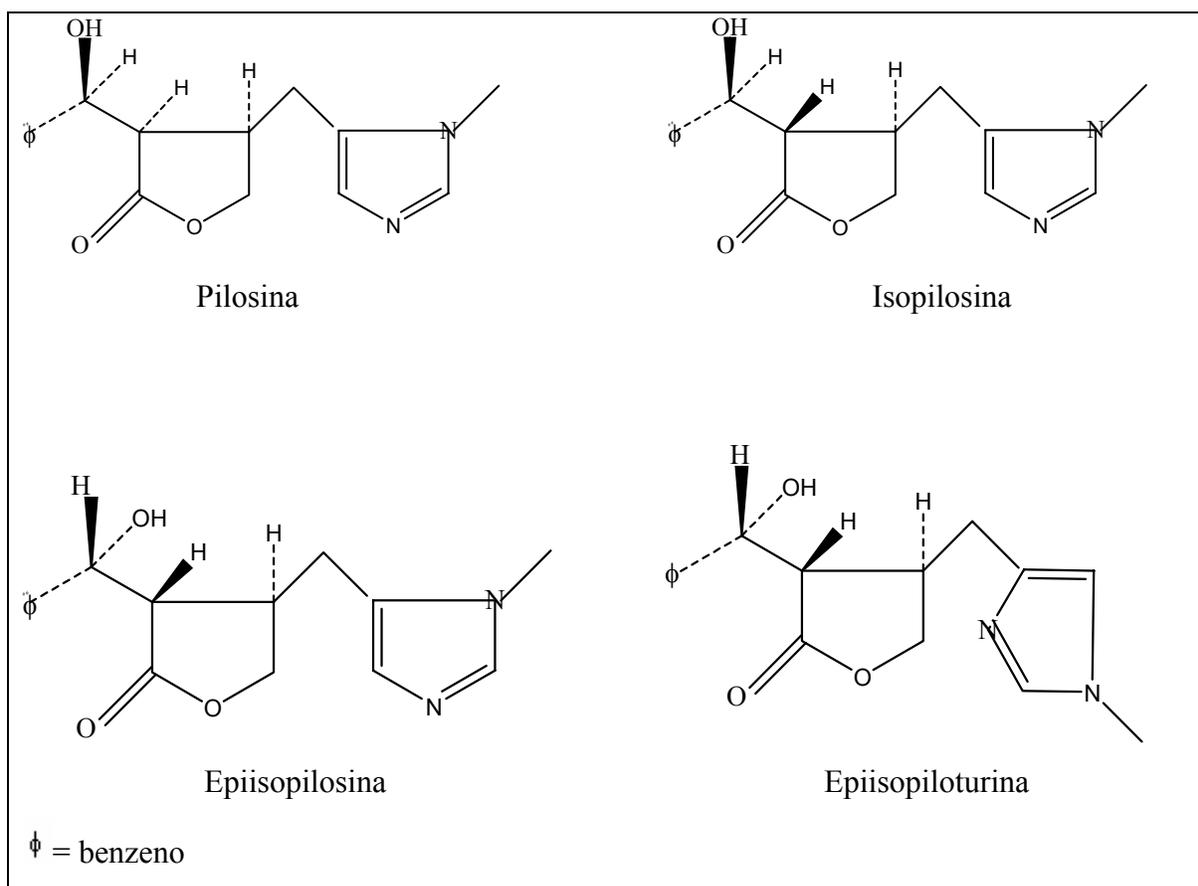


Figura II.4. Estrutura dos isômeros que compõem a pilosina (Scheerer, 2001).

O processo industrial de extração de pilocarpina das folhas do jaborandi gera um resíduo semi-sólido rico em epiisopiloturina, mas que contém também os outros isômeros.

O interesse pela separação destes isômeros é justamente descobrir fármacos para o tratamento de enfermidades.

O alcalóide epiisopiloturina foi isolado e identificado por Voigtlander *et al.* (1978). Sua fórmula é $C_{15}H_{18}N_2O_3$ e sua massa molecular é 274,32.

Um estudo que vem sendo realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal, IB/UNICAMP com a colaboração do Laboratório de Farmacologia, FCM/UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Mazzafera, tem como finalidade demonstrar qual a ação da epiisopiloturina em receptores colinérgicos e canais iônicos. Os resultados preliminares indicaram ação semelhante à da pilocarpina, apesar de ocorrer por mecanismos diferentes. Este mesmo grupo vem conduzindo diversos trabalhos visando confirmar a possível ação farmacológica da epiisopiloturina.

Nas folhas do jaborandi também são encontrados óleos essenciais, que são constituídos por 2-tridecanona, β -cariofileno, 2-pentadecanona, óxido de cariofileno, D-germacreno, entre outros (Taveira *et al.*, 2003).

II.2. Extração convencional

A Figura II.5 apresenta o fluxograma de uma extração convencional de alcalóides de jaborandi, a qual consiste nas etapas de preparo da matéria-prima, seguida de extração e purificação dos princípios ativos através da alternância de pH. Este tipo de extração é caracterizado por ser demorado e pouco seletivo, além de utilizar grande quantidade de solventes orgânicos, o que dificulta a fabricação de um produto de alta qualidade, ou seja, sem resíduos tóxicos (Saldaña, 2002).

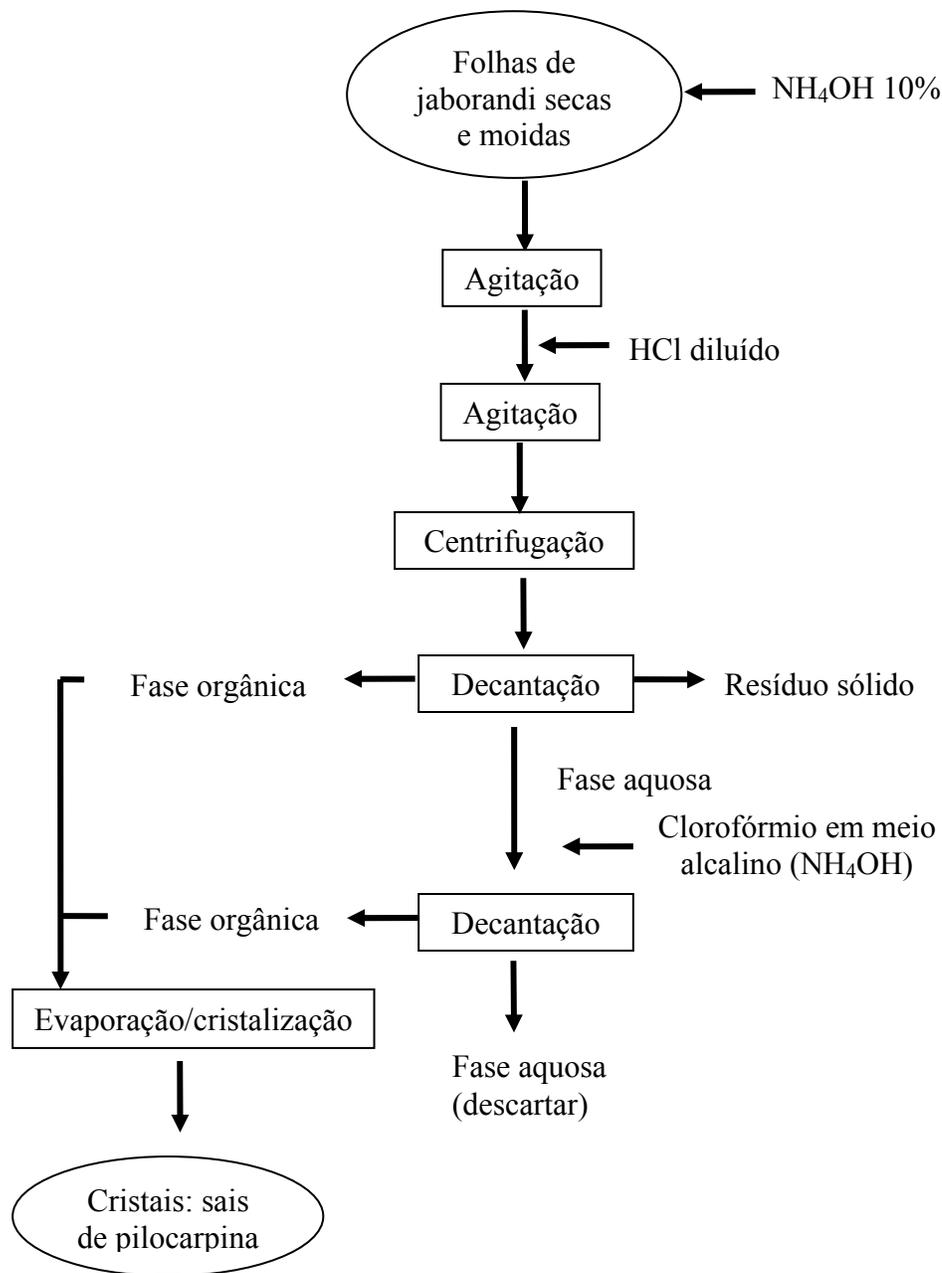


Figura II.5. Extração convencional de alcalóides do jaborandi (adaptado de Saldaña, 2002).

Um trabalho realizado por Avancini *et al.* (2003) avaliou métodos de extração convencional de pilocarpina das folhas de jaborandi. Para efeito de comparação com a extração supercrítica, o melhor método de extração convencional de pilocarpina das folhas de jaborandi foi o escolhido para a quantificação de pilocarpina neste trabalho.

II.3. Fluido supercrítico

O estado supercrítico é atingido quando a temperatura e a pressão de uma substância estão acima dos seus parâmetros críticos, ou seja, $T > T_c$ e $P > P_c$. A tecnologia que faz uso desse estado da matéria tem desenvolvido métodos de extração que se destacam por serem rápidos e eficientes para recuperar produtos químicos de matrizes de planta (Marr e Gamse, 2000; Lang e Wai, 2001). É uma tecnologia limpa que permite trabalhar com moderadas temperaturas e/ou pressões e a separação do soluto e solvente é relativamente fácil. Além disso, o tempo de extração é extremamente reduzido, obtêm-se produtos de alta qualidade e pureza e com tamanhos de partículas que podem ser controlados (Mohamed *et al.*, 1989).

O interesse pelos fluidos supercríticos cresceu muito nos últimos anos, bem como seu leque de aplicações, gerando uma gama maior de produtos para usos alimentício, cosmético e farmacêuticos.

O fluido supercrítico adquire uma densidade similar à de um líquido, o que lhe confere um maior poder de solvatação do que o dos gases. A compressibilidade desses fluidos, entretanto, é próxima a de um gás (Skoog e Leary, 1992; Stuart *et al.*, 1996).

Outra característica desses fluidos é ter um coeficiente de difusão de massa maior e viscosidade e tensão superficial menores do que um solvente líquido, o que lhe permite penetrar nos pequenos espaços e poros em materiais sólidos dos quais se deseja extrair o soluto, como tecidos de plantas, favorecendo a extração quando controlada pela difusão molecular (Wang e Weller, 2006; McHugh e Krukoni, 1994).

A escolha do fluido supercrítico é muito importante no desenvolvimento do processo de extração supercrítica. As limitações do uso de produtos orgânicos e a redução do preço do dióxido de carbono fizeram com que este se tornasse a substância mais empregada neste tipo de processo (Wang e Weller, 2006). Dentre as características que o tornaram o mais utilizado, as mais importantes são o fato de ser atóxico, não-inflamável, ter baixa reatividade e ser de grande acessibilidade, a possibilidade de sua obtenção com alto grau de pureza a baixo custo e, sobretudo, por apresentar baixos parâmetros críticos (Taylor, 1996). A baixa temperatura crítica do CO_2 permite sua utilização no estado

supercrítico, sem prejudicar as propriedades funcionais de proteínas e outros constituintes de alimentos e por isso é adequado para a extração de princípio ativo de produtos naturais complexos uma vez que a maioria destes compostos é hidrolisável e termolábil (McHugh e Krukonis, 1994).

A solubilidade depende de um complexo equilíbrio entre a densidade do fluido supercrítico e a pressão de vapor do soluto, os quais são controlados pela temperatura e pressão.

O CO₂ supercrítico é capaz de solubilizar componentes não polares ou de baixa polaridade e incapaz de solubilizar proteínas, polissacarídeos e sais minerais; tem um alto poder de solvatação para componentes com baixa massa molecular que decresce com o aumento da massa, tem alta afinidade por componentes orgânicos oxigenados de média massa molecular, tem baixa solubilidade em água a temperaturas abaixo de 100 °C e é capaz de separar componentes que tem baixa volatilidade e alta massa molecular e/ou que são mais polares com o incremento de pressão (Brunner, 2005).

O diagrama de estado do CO₂ apresentado na Figura II.6 permite observar as consideráveis variações da densidade do dióxido de carbono na região supercrítica, quando se aplicam pequenas alterações na temperatura ou na pressão.

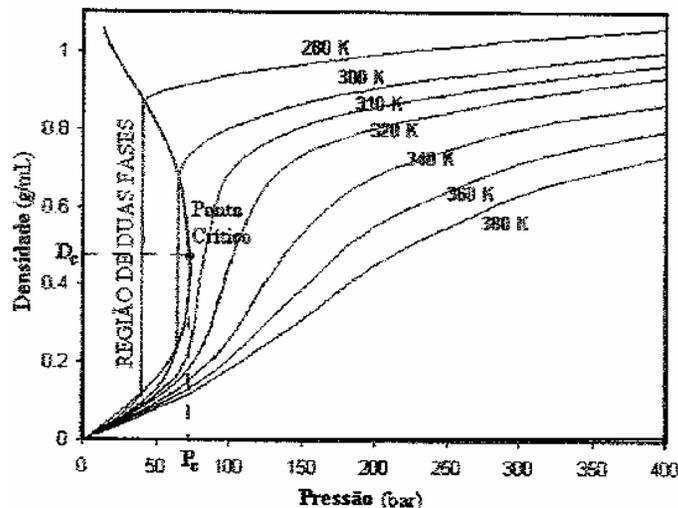


Figura II.6. Variação da densidade em função da temperatura e pressão do dióxido de carbono (adaptado de Angus e Dereuck, 1976).

Nota-se, através das isotermas, que após o ponto crítico, a densidade é muito influenciada pela temperatura. Ela é aproximadamente 5 vezes maior a 310 K do que a 380 K, e como conseqüência, baixas temperaturas favorecem o poder de solvatação do fluido supercrítico. Nessa região, a medida que se afasta da pressão crítica, esse efeito fica menos pronunciado. Por outro lado, aumentos de temperatura aumentam a energia livre do sistema e com isso seu potencial de solubilização

Este comportamento é delimitado pela pressão de cruzamento, onde a solubilidade é a mesma para qualquer temperatura (Chimowitz e Pennisi, 1986). Em situações nas quais a pressão está abaixo da pressão de cruzamento um aumento de temperatura diminui a solubilidade do soluto no fluido supercrítico. Acima da pressão de cruzamento, aumentos de temperatura aumentam a solubilidade. Essa situação acontece devido aos dois efeitos opostos do aumento da temperatura sobre a solubilidade, mencionados acima. Esse fenômeno é muito conhecido em extrações supercrítica e denominado de comportamento retrógrado.

Um exemplo de comportamento retrógrado está apresentado na Figura II.7, que apresenta a solubilidade de cafeína em CO₂ supercrítico (Saldaña *et al.*, 1999). Observa-se na figura que abaixo da pressão de cruzamento (cerca de 19 MPa), aumentos de temperatura diminuem a solubilidade da cafeína (devido à diminuição da densidade), enquanto que acima dessa pressão, temperaturas mais altas solubilizam maior quantidade de material.

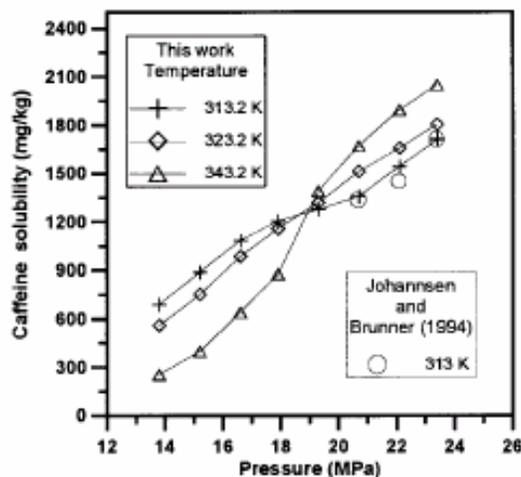


Figura II.7. Solubilidade da cafeína no CO₂ (Saldaña *et al.*, 1999).

A pressão desempenha um papel importante na extração supercrítica de substâncias presentes em vegetais. O aumento da pressão provoca um aumento da densidade do fluido supercrítico, resultando em dois efeitos opostos: o aumento do poder de solvatação pode ser compensado pela maior dificuldade de penetração do fluido supercrítico na matriz vegetal, o que reduz a quantidade de substância extraída (Bahramifar *et al.*, 2005).

Parâmetros como pressão, temperatura, estrutura química do co-solvente, concentração do co-solvente, vazão, método de operação (estática ou dinâmica), diâmetro de partículas e tempo de extração devem ser considerados na otimização das condições de extração.

II.3.1. Utilização de co-solventes (CSOL)

O dióxido de carbono apresenta uma baixa afinidade por moléculas polares devido ao alto valor de seu quadrupolo. O CO₂ apesar de ser caracterizado como uma molécula apolar apresenta um caráter intermediário entre um solvente totalmente não-polar e fracamente polar (Clifford, 1998). Esta desvantagem pode ser contornada pela adição de modificadores, também conhecidos como co-solventes ou *entrainers*, que apresentam característica polar. A adição de pequenas quantidades de co-solvente polar ao CO₂-SC forma uma mistura supercrítica polar (Dobbs *et al.*, 1986; Gurdial *et al.*, 1993).

A adição de um co-solvente faz aumentar a solubilidade de um determinado soluto por um determinado componente, devido às associações químicas e interações entre eles e/ou o aumento de densidade (Brunner, 1983). A presença de modificadores rompe a interação entre a molécula de interesse e a matriz, aumentando a eficiência de extração de componentes orgânicos polares (Lang e Wai, 2001). As vantagens são o favorecimento da dessorção do soluto e a diminuição da quantidade de solvente utilizado. O fator predominante depende da natureza química dos componentes e das condições experimentais de temperatura, pressão e concentrações (Zhong *et al.*, 1997).

O efeito do CSOL, segundo Ting *et al.* (1993), é explicado pelas interações entre as moléculas de soluto e as moléculas de CSOL, aumentando a densidade local em volta da molécula do soluto em relação à densidade do meio, por causa da formação de um *cluster*

ao redor dessa molécula (Debenedetti *et al.*, 1989; Brennecke *et al.*, 1990). O termo *cluster* se refere ao aumento de densidade local em decorrência da maior quantidade de solvente no entorno da molécula. Este aumento de densidade se deve à atração entre soluto e solvente e à compressibilidade do sistema próximo ao ponto crítico, formando assim aglomerados de moléculas de solvente.

Ting *et al.* (1993) afirmam que, dependendo do soluto e do CSOL, haverá a possibilidade da formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de soluto e as moléculas de CSOL. Esta conclusão foi baseada no estudo da solubilidade de naproxeno em misturas com CO₂-SC e co-solventes e os resultados são apresentados na Figura II.8. Foram realizados estudos com os seguintes CSOLs: metanol, etanol, 1-propanol e isopropanol. Os resultados demonstram que o efeito do CSOL (quantificado como sendo a razão entre a solubilidade do soluto na mistura do solvente com o CSOL e a solubilidade do soluto no solvente puro) aumenta com o aumento da cadeia do álcool, sendo que o propanol é o CSOL que maximiza este efeito. Os resultados mostram que o efeito do CSOL, para as condições e substâncias utilizadas, diminui com o aumento da pressão. O isopropanol tem um efeito de CSOL menor do que o propanol, devido ao impedimento estérico para a formação do *cluster* de solvatação, pois o posicionamento da hidroxila no meio da cadeia dificulta a aproximação para a formação da ponte de hidrogênio com os oxigênios presentes na molécula do soluto.

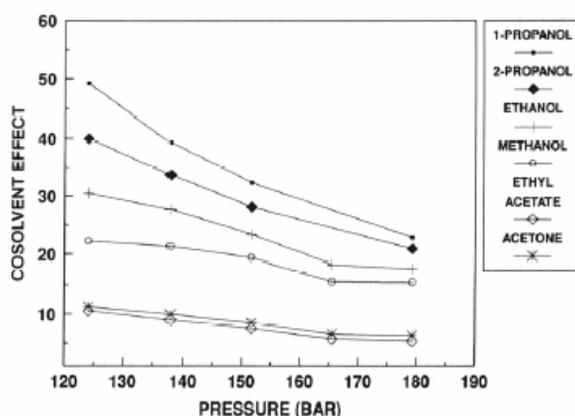


Figura II.8. Efeito do co-solvente na solubilidade do naproxeno em função da pressão.

T= 333,1 K e 5,25 mol % de co-solvente (Ting *et al.*, 1993).

Outro efeito discutido pelos autores é o maior distanciamento das condições críticas. A mistura de CO₂/isopropanol possui temperatura crítica menor do que a mistura CO₂/propanol. A adição de co-solvente modifica a polaridade do CO₂ e as propriedades do solvente supercrítico. No caso da adição de álcoois, a pressão crítica e a temperatura crítica aumentaram de acordo com o aumento da concentração deste na mistura (Ting *et al.*, 1993). Este efeito pode ser observado na Figura II.9. Portanto, para a condição experimental utilizada, a mistura utilizando isopropanol como co-solvente está mais distante do seu ponto crítico e, quanto mais distante, menor é o efeito de compressibilidade no sistema e a diferença de densidade local do *cluster* de solvatação em relação ao meio é menor, quando comparada com a mistura utilizando propanol como CSOL.

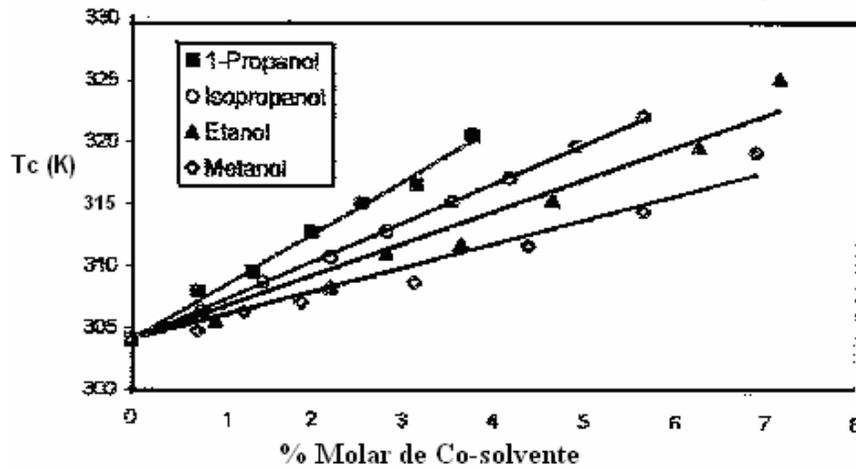


Figura II.9. Variação da temperatura crítica com a porcentagem molar de co-solvente (adaptado de Ting *et al.*, 1993).

Vários estudos confirmam os efeitos do co-solvente na extração de moléculas complexas. Schaeffer *et al.* (1988), estudaram a variação da solubilidade do alcalóide monocrotalina com a adição de etanol ao CO₂-SC. Os resultados encontrados pelos autores revelaram que com as adições de 5 e 10 mol % de etanol, a solubilidade aumentou 6 e 12 vezes, respectivamente, quando comparada com a solubilidade no CO₂-SC puro. Os autores também constataram um deslocamento da pressão de cruzamento com o aumento da quantidade de etanol.

Zhong *et al.* (1997), estudaram o efeito da adição de etanol como co-solvente, na solubilidade de ácido esteárico em CO₂-SC. Os resultados indicaram um aumento de solubilidade do ácido esteárico com o aumento da percentagem de etanol mantendo a mesma pressão. Segundo os autores, este resultado é em razão da formação de pontes de hidrogênio entre a hidroxila do etanol e o oxigênio do ácido carboxílico, juntamente com um aumento da densidade do fluido supercrítico com a adição do co-solvente, melhorando o poder de solvatação do FSC.

A solubilidade de resveratrol em mistura de CO₂ e etanol foi estudada por Berna *et al.*, (2001). Este estudo foi motivado pela baixa solubilidade deste soluto em CO₂-SC. Os autores estudaram misturas com 5; 7,5; 12,5 e 15 mol % de etanol. Os resultados apontam que as misturas contendo 7,5 % de etanol apresentavam o maior incremento da solubilidade.

Choi *et al.* (1999a, 1999b, 2000) estudaram a extração dos alcalóides hiosciamina e escopolamina de *Scopolia Japonica*, metil efedrina, norefedrina, efedrina e pseudoefedrina de *Ephedra Sinica* e de cefalotaxina das folhas de *Cephalotaxus Wilsoniana* utilizando CO₂-SC e CSOL. Estes autores apontam para o fato de que, apesar de alguns destes alcalóides apresentarem altas solubilidades em CO₂-SC puro, os rendimentos de extração a partir da matriz vegetal são muito baixos. Isto se deve ao fato de que os alcalóides se encontram presentes nos tecidos vegetais na forma de sais conjugados com ácidos orgânicos. Os autores verificaram ainda que a adição de um CSOL com características básicas (ex: soluções de dietilamina em água ou metanol) aumentou drasticamente a solubilidade dos alcalóides.

A extração supercrítica com co-solventes se torna menos seletiva, aumentando a extração de substâncias indesejáveis, como pigmentos e graxas de alto peso molecular. Um estudo realizado por Yang *et al.* (2002) mostrou que o processo de extração supercrítica de fármacos presentes em folhas de *Ginkgo biloba* com CO₂ puro e com a adição de etanol como co-solvente, forneceu extratos esverdeados ou amarelados, sendo necessárias etapas de purificação para obter um produto livre de impurezas. Processos de extração supercrítica realizados com folhas tem como contaminante principal a clorofila. Esta é extraída com CO₂ puro, e em maiores proporções, quando utilizado o etanol como co-solvente. Esta é

uma impureza difícil de ser retirada em uma única etapa de extração supercrítica, exigindo procedimentos de purificação para fabricar um produto de alta qualidade.

II.3.2. Acoplamento de outras operações unitárias

A separação de uma mistura por meio de extração com fluidos supercríticos pode ser obtida por extração seletiva, separação seletiva ou combinação das duas técnicas. Para que ocorra uma extração seletiva é necessário que exista um comportamento de solubilidade diferente de cada composto em relação ao solvente puro ou com co-solventes e em função da temperatura e pressão de trabalho. A separação seletiva pode ser obtida através do controle da descompressão, ou pelo acoplamento de outras operações unitárias. A combinação das estratégias acima descritas, devido à grande versatilidade dos processos que utilizam FSC, também deve ser considerada como uma alternativa para a recuperação e purificação de princípios ativos.

Quando a extração seletiva dos solutos de interesse não for possível, pode-se ainda acoplar outras operações unitárias ao sistema, como, por exemplo, adsorção, separação por membranas, etc., a fim de promover a separação desejada (Afrane e Chimowitz, 1995; Mohamed *et al.*, 2000; Corzo *et al.*, 2000). Na coluna de adsorção, a separação ocorre devido às diferenças de interação dos solutos de interesse com o adsorvente e o FSC, muito se assemelhando à técnica de cromatografia.

Azevedo (2005) utilizou a combinação destas técnicas para a recuperação e separação de cafeína, ácidos clorogênicos e óleo dos grãos de café verde. Este autor observou que parte da cafeína foi extraída junto com o óleo de café verde e que apenas traços de ácidos clorogênicos eram detectados nos extratos quando CO₂ puro foi utilizado como solvente. Para separar a cafeína e refinar o óleo foi utilizada uma coluna de adsorção. Observou-se ainda que, após o desengorduramento dos grãos moídos, os ácidos clorogênicos foram extraídos de forma mais efetiva através da modificação da polaridade do solvente utilizando álcoois alifáticos. Estes mesmos álcoois alifáticos foram utilizados para dessorver a cafeína da coluna de sílica. Para o refino dos ácidos clorogênicos do extrato obtido foi utilizada uma coluna empacotada com resina aniônica.

Domingo *et al.* (2001) estudaram o processo de adsorção do ácido benzóico e do ácido salicílico em alumina, sílica gel e *amberlite*[®], utilizando CO₂-SC como solvente. Foram avaliados sistemas binários e ternários, nos quais se procurou identificar os efeitos da pressão, temperatura e tempo de extração e natureza do material adsorvente em função da quantidade de soluto adsorvido (mol) por grama de adsorvente. Verificou-se que a temperatura e a natureza do adsorvente são as variáveis de processo que exercem maior influência como pode ser observado na Figura II.10.

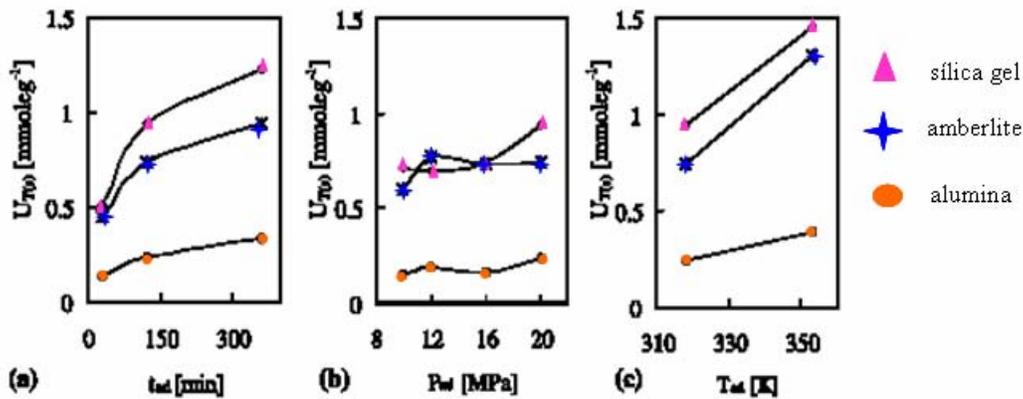


Figura II.10. Adsorção em ambiente supercrítico da mistura ácido benzóico e ácido salicílico. Influência do a) tempo ($P=20$ MPa e $T=318$ K); b) pressão ($T=318$ K e $t=120$ min); c) temperatura ($P=20$ e $t=120$ min), U é a razão entre massa de soluto adsorvido e massa de solvente (Domingo *et al.*, 2001).

Solutos polares têm maior afinidade por adsorventes hidrofílicos do que hidrofóbicos. Desse resultado pode-se estimar a maior ou menor afinidade de um determinado soluto por um dado adsorvente com base nas suas solubilidades em solventes polares e apolares. Entretanto, a análise não é tão simples, pois a capacidade das moléculas se auto-associarem influencia na cinética de adsorção. Aquelas que formam dímeros passam a ter um volume molecular maior e, conseqüentemente, um menor coeficiente de difusão. A polaridade das moléculas e, por conseguinte, a sua afinidade por adsorventes hidrofílicos também é alterada, como foi verificado pelos autores. Os autores não

explicitam a razão pela qual a adsorção dos solutos em alumina é baixa, apesar da alumina ter a mesma característica da sílica gel (íons OH^- na superfície). Ao que parece, a área superficial da alumina (aproximadamente 3 vezes menor que a da sílica-gel) é um fator importante a ser considerado. Em sistemas ternários formados de FSC e dois solutos, verificou-se também a possibilidade de adsorção seletiva de um dos solutos mostrando a potencialidade de utilização do processo de adsorção como técnica de separação de misturas (Domingo *et al.*, 2001).

Lim e Rizvi (1996) estudaram a remoção de colesterol da gordura de leite utilizando CO_2SC como solvente e acoplado uma coluna de adsorção contendo silicato de magnésio ao processo de extração. Estes autores verificaram que além da remoção do colesterol e da recuperação eficiente da gordura de leite, o adsorvente manteve a sua capacidade de adsorção após a etapa de dessorção.

Em trabalho posterior, Mohamed *et al.* (2000) estudaram o mesmo processo utilizando etano supercrítico como solvente. Alcançou-se a remoção completa do colesterol utilizando uma massa de etano cerca de 10 vezes menor do que a massa de CO_2 necessária para promover a mesma separação. Este resultado se deve ao fato da solubilidade do óleo de manteiga e do colesterol serem cerca de duas ordens de grandeza superiores em etano supercrítico em comparação aos valores de solubilidade em $\text{CO}_2\text{-SC}$ nas mesmas condições.

Como variante do processo de adsorção, Schaeffer *et al.* (1989) utilizaram uma resina de troca-catiônica para purificar a monocrotalina da *Crotolária Spectabilis*. Neste processo, a adsorção é realizada através das interações químicas entre as moléculas de monocrotalina e a resina. Estes autores conseguiram excelentes resultados, isolando a monocrotalina com pureza superior a 95 %.

II.4. Influência da matriz sólida

Um parâmetro que merece relevância na extração supercrítica é o tamanho de partícula da matriz. A Figura II.11 mostra o estudo feito por Saldaña (2002) comparando as

curvas de extração da cafeína do chá-mate moído e *in natura* a 343°C, pressão de 25,5 MPa e vazão de 0,9-1,8 g CO₂ min⁻¹.

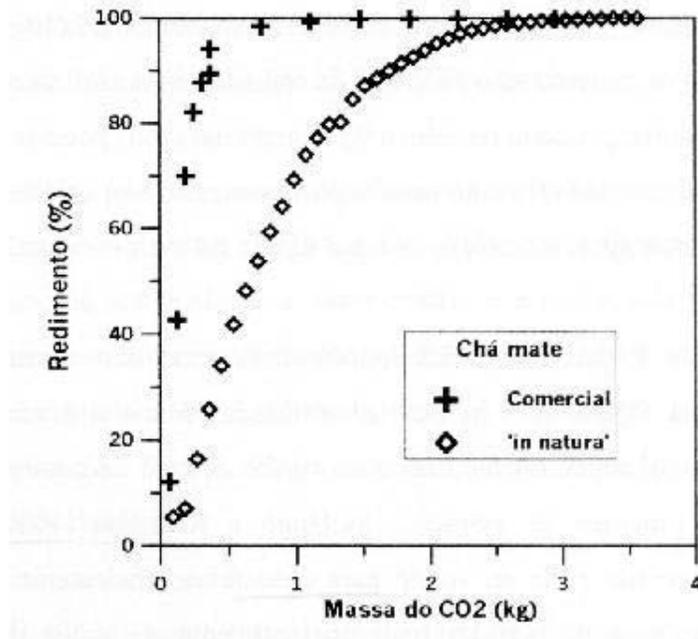


Figura II.11. Curvas de extração da cafeína do chá-mate moído (comercial) e *in natura* (Saldaña, 2002).

Observa-se que a inclinação da curva de extração da cafeína do chá-mate moído é muito mais acentuada do que a do chá-mate *in natura*. Dessa forma, pode-se concluir que a partícula com um menor diâmetro favorece a extração por ter uma maior área superficial. Além disso, a moagem rompe as células e expõe os solutos a um contato direto com o solvente.

O processo de extração ocorre de três maneiras diferentes, sendo que a primeira etapa é controlada apenas pela solubilização do soluto pelo fluido, devido à grande quantidade de soluto na superfície do produto. A segunda etapa é a de transição, pois a quantidade de soluto na superfície diminuiu e começa a difusão do soluto de dentro das partículas para a superfície, ocorrendo uma redução das taxas de extração. A última etapa é

controlada pela difusão interna, ou seja, o soluto contido no interior da partícula se difunde para o meio e devido à alta resistência, a transferência de massa é baixa.

Dessa forma, pode-se concluir que o processo de extração supercrítica a partir de matrizes sólidas depende de três fatores: a solubilidade do soluto no fluido supercrítico, a difusão do fluido na matriz sólida e o efeito das interações soluto-solvente-matriz (Daintree, 2008).

II.5. Extração supercrítica da pilocarpina

O único trabalho sobre a recuperação de pilocarpina envolvendo fluidos supercríticos encontrado na literatura foi realizado por Saldaña (2002), que estudou a solubilidade da pilocarpina hidrociorada em sistemas binários utilizando CO₂ ou FCH₃ (fluoreto de metila) como solventes na faixa de temperatura de 343 a 353 K e pressões de 6,9 a 8,6 MPa. Os resultados demonstraram que a quantidade de pilocarpina hidrociorada solubilizada pela fase supercrítica foi extremamente baixa, apesar da grande diferença de polaridade entre os solventes. Existem algumas suposições que podem explicar esse efeito:

- As pressões utilizadas nos ensaios foram baixas. Maiores pressões poderiam resultar em um aumento de solubilidade.

- A afinidade entre o fluido e a molécula de pilocarpina hidrociorada é baixa. A molécula de CO₂ apresenta uma baixa polaridade, resultando em uma pequena afinidade com a molécula de pilocarpina hidrociorada, e a presença do grupo HCl pode induzir uma maior polarização da molécula de pilocarpina. Com o fluorofórmio, apesar deste ser um solvente polar, não existe a formação de interações específicas (i.e. pontes de hidrogênio) com a molécula da pilocarpina, o que pode ter sido a principal causa da baixa solubilidade.

- Na literatura tem sido reportado que alcalóides na forma salina não são solúveis em CO₂ supercrítico, enquanto que na forma de base livre podem ser muito solúveis. A solubilidade da pilocarpina hidrociorada foi estudada por Saldaña (2002) em uma série de solventes de diferentes graus de polaridade na seguinte ordem: éter de petróleo < diclorometano < éter etílico < acetato de etila < acetona < etanol < água. Nesse estudo,

verificou-se que a pilocarpina foi solúvel em etanol e água, mas insolúvel nos outros solventes. Analisando-se a estrutura molecular dos solventes, observa-se que apenas a água e o etanol podem formar pontes de hidrogênio com a molécula de pilocarpina e dissociar o sal.

Esta pesquisadora também iniciou o estudo da extração da pilocarpina das folhas de jaborandi usando CO₂ supercrítico saturado com água. Os resultados preliminares obtidos indicaram a incapacidade do CO₂ em extrair a pilocarpina, embora pequena quantidade desse soluto tenha sido encontrada na água coletada do fundo do vaso de extração, ao final do experimento.

CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Materiais

III.1.1. Matéria-prima

a) Folhas de jaborandi

As folhas de jaborandi utilizadas nesta pesquisa foram obtidas de três fontes.

a.1) Folhas do Instituto de Biologia, UNICAMP

Folhas de jaborandi foram colhidas de árvores cultivadas no herbário do IB/UNICAMP e separadas de possíveis impurezas. Elas foram secas em estufa com recirculação de ar a 45°C, por 48 horas e moídas em um micro moinho de facas (marca Tecnal, modelo TE – 648). Essas folhas foram utilizadas em pesquisas exploratórias.

a.2) Folhas de produto comercial

Folhas de jaborandi secas foram adquiridas no comércio local, e moídas no moinho de facas Tecnal.

a.3) Folhas do CPQBA/UNICAMP

Folhas de jaborandi da espécie *Pilocarpus Microphyllus* foram doadas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), de árvores plantadas em Campinas, com mais de 20 anos de idade. Estas folhas foram colhidas em março de 2007. Dois lotes de folhas foram secos em estufa com recirculação de ar até atingir umidade de 7%. Um dos lotes foi seco a 40°C por 5 dias e o outro a 70°C por 3 dias. Essas duas condições foram escolhidas para poder avaliar a influência da temperatura do ar de secagem na quantidade de princípios ativos encontrado nas folhas, uma vez que estes compostos são termolábeis. As folhas inteiras foram armazenadas em sacos plásticos, fechados e mantidos em locais secos e sem luminosidade.

Antes de cada ensaio de extração, estas folhas eram moídas no moinho de facas Tecnal e submetidas à análise granulométrica. Amostras com diâmetro médio de 0,030 cm foram usadas em todos os ensaios. As folhas moídas eram deixadas por 12 horas na estufa a 40°C antes de cada ensaio de extração.

b) Pasta residual industrial

Além de folhas de jaborandi, foi utilizada uma pasta que é resultante do processo industrial de extração de pilocarpina das folhas de jaborandi, e cedida ao instituto de Biologia/UNICAMP pela Vegetex (Merck). A consistência desta pasta é semi-sólida, tem uma coloração acinzentada e, segundo os fornecedores, é muito rica em epiisopiloturina.

Segundo informações de pesquisadores do IB/UNICAMP, o lote desse material estava estocado a mais de 5 anos, sob refrigeração. No LEPPbio a pasta foi armazenada em local resfriado e em embalagens plásticas hermeticamente fechadas.

III.1.2. Padrões de pilocarpina e epiisopiloturina

Foram utilizados padrões de pilocarpina da marca Sigma, com 99% de pureza, e de epiisopiloturina (Vegeflora, Botucatu-SP), com 97,7% de pureza.

III.1.3. Solventes HPLC

Foram utilizados trietilamina PA (Riedel-de Haën - Alemanha, com 99% de pureza), ácido fosfórico PA (Merck - Alemanha, com 99% de pureza) e metanol (J. T. Baker - EUA, com 99,9% de pureza).

III.1.4. CO₂ e co-solvente

O dióxido de carbono foi adquirido junto a White Martins (Campinas), em cilindros contendo tubo pescador. O co-solvente utilizado é o etanol da marca Synth com grau de pureza de 99,8%.

III.1.5. Adsorvente

Na coluna de adsorção foi utilizada sílica-gel (Merck) com tamanho de partícula de 0,063 a 0,200 mm de diâmetro.

III.2. Equipamento de extração supercrítica

O equipamento de extração supercrítica utilizado foi projetado e desenvolvido pela equipe do Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos da FEQ/UNICAMP em parceria com a AUTIC (Automação e Instrumentação Industrial Ltda. - Campinas) (Azevedo, 2005). O desenvolvimento deste equipamento foi financiado com recursos FAPESP (Proc. 02/07753-0) e encontra-se em processo de patenteamento. A Figura III.1 mostra uma fotografia frontal do equipamento, que é constituído por cinco módulos, descritos a seguir:

Módulo 1 – Módulo de Alimentação do solvente e co-solvente. Neste módulo está localizado o quadro geral de força do equipamento. Ele é constituído por uma bancada em dois níveis. No nível inferior estão localizados os sistemas de alimentação de solvente e do co-solvente. Eles são constituídos por bombas para HPLC marca Gilson (EUA) modelos 305 (solvente) e 306 (co-solvente), um módulo manométrico marca Gilson modelo 805 para controle da pressão na descarga das bombas, um transdutor de pressão e *display* digital para indicação de pressão, um sistema de pré-aquecimento de solvente localizado à jusante do misturador estático. No nível superior estão localizadas as válvulas que permitem a alimentação dos solventes ao processo. A bancada superior constitui o apoio para os demais módulos.

Módulo 2 – Módulo Principal de Extração. É constituído por uma coluna de 500 mL, uma válvula reguladora de fluxo para coleta de material do fundo da coluna, um manômetro para monitoração da pressão dentro da coluna, um controlador de temperatura PID para a camisa de aquecimento da coluna, um controlador para temperatura na camisa de aquecimento da válvula e indicadores de temperatura.

Este módulo foi projetado visando proporcionar versatilidade de configurações de operação. A coluna deste módulo possui um conjunto de tampas e bocais que permite a realização de processos concorrentes e contracorrente e uma válvula de amostragem no fundo (que pode ser ligada facilmente à conexão de saída do módulo). Este módulo foi projetado para servir a diferentes propósitos como em operações de extração, absorção, adsorção, e mesmo na formação de partículas por processos através de mudanças de configuração nas tampas. O solvente pode ser alimentado à coluna de 3 diferentes maneiras. No presente trabalho, o solvente foi alimentado pelo fundo da coluna, e quando necessário, já misturado com o co-solvente.



Figura III.1. Equipamento de extração supercrítica.

Módulo 3 – Módulo de Separação. É composto por uma coluna de 300 mL, duas válvulas reguladoras de fluxo, sendo uma para controle de pressão na coluna e outra para retirada de amostra do fundo da coluna, um manômetro para monitoração da pressão dentro da coluna, um controlador de temperatura PID para a camisa de aquecimento da coluna, um controlador P para a camisa de aquecimento da válvula e indicadores de temperatura. Devido a versatilidade do sistema, este módulo pode ser utilizado como módulo de separação por adsorção, por absorção, por controle da condensação retrógrada e ainda utilizado como um segundo módulo de extração.

Módulo 4 – Módulo de Separação. Este módulo é igual ao Módulo 3. Este segundo módulo de separação confere ao equipamento uma versatilidade ainda maior, permitindo que separações seqüenciadas, ou extrações e separações em paralelo sejam realizadas.

Módulo 5 – Módulo de Medição e Coleta. Este módulo é constituído por válvulas de bloqueio, uma válvula reguladora de fluxo na qual a pressão da corrente de saída do módulo de extração (ou separação, a depender do processo) é reduzida para a pressão atmosférica, dois filtros de linha que tem por finalidade proteger o medidor totalizador de vazão, um manômetro pra monitorar a perda de carga nos filtros, um medidor totalizador de vazão tipo mássico (Dwyer, EUA). Ele contém ainda um controlador de temperatura PID para a camisa da válvula reguladora de fluxo, uma camisa de aquecimento para a válvula reguladora de fluxo e frascos separadores (kitassatos, tubos em U, etc.).

A função deste módulo é reduzir a pressão da corrente de saída de um dos módulos acima descritos e localizados a montante. Após a redução da pressão pela válvula reguladora de fluxo, o gás expandido passa pelos frascos separadores e segue para o medidor totalizador de vazão. Neste instrumento é medida a vazão do solvente após a expansão e quantificada a massa de solvente que passou pelo sistema (Azevedo, 2005).

III.3. Determinação de pilocarpina e epiisopiloturina por HPLC

As quantificações de pilocarpina e epiisopiloturina nos extratos foram realizadas usando o método isocrático proposto por Avancini *et al.* (2003). A coluna utilizada foi uma Supelcosil LC18 (SUPELCO) e o eluente foi preparado com a seguinte composição: 13,5 mL de H₃PO₄ em 1000 mL de água MiliQ, seguido da adição de 3,0 mL de trietilamina (pH 3,0) e 111,2 mL de metanol (Fan *et al.* 1996). A vazão de solvente foi de 1 mL/min. A separação foi monitorada com detector de UV a 212 nm. A identificação dos picos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção dos padrões de pilocarpina e epiisopiloturina.

O Apêndice A apresenta os cromatogramas obtidos com os dois padrões separados e juntos, dissolvidos em água e em etanol. As Figuras A.1 e A.2 mostram cromatogramas

dos dois padrões dissolvidos em água. Os picos estão bem definidos e tem um tempo de retenção de 4,5 e 5,6 minutos, respectivamente para a pilocarpina e epiisopiloturina. A mistura dos dois padrões, em água, apresentou os mesmos picos (Figura A.5).

Como o material das extrações supercrítica era coletado em etanol, também foi feita uma análise dos padrões dissolvidos em etanol e constatou-se uma aproximação dos picos de pilocarpina e epiisopiloturina, assim como uma pior definição dos mesmos, dificultando a quantificação desses princípios ativos (Figuras A.3, 4 e 6 no Apêndice A). Para melhor resolução na cromatografia, os extratos obtidos nos ensaios foram secos em *speed vac* e depois dissolvidos em água. A quantificação dos picos foi realizada através de comparação com as áreas do padrão de composição conhecida.

A quantidade existente de padrão de epiisopiloturina não foi suficiente para realizar todas as análises. No monitoramento dos ensaios de extração, os picos cromatográficos eram identificados e as áreas correspondentes eram relacionadas entre si. Desta maneira foi possível determinar a variação da quantidade de epiisopiloturina recuperada ao longo do processo em função das condições de extração.

III.4. Determinação de clorofila por espectrofotômetro

A determinação da clorofila foi realizada por leitura direta no espectrofotômetro (HP, modelo 8453, EUA). Da mesma forma, como com a epiisopiloturina, não foi determinada a concentração absoluta de clorofila devido à ausência do padrão. Os picos correspondentes à clorofila A foram identificados entre os comprimentos de onda 400 a 700 nm, e lido no comprimento de onda 666, como apresentado na Figura III.2 em um estudo realizado com clorofila extraída de folhas de espinafre em etanol (Soares, 2006). Dessa forma, as absorvâncias eram relacionadas entre si, o que possibilitou acompanhar o processo de extração da clorofila em alguns diferentes ensaios.

Alguns espectrogramas obtidos da clorofila são apresentados no Apêndice C. Para a leitura no espectrofotômetro, todas as amostras tinham seu volume completado até 200 mL com etanol.

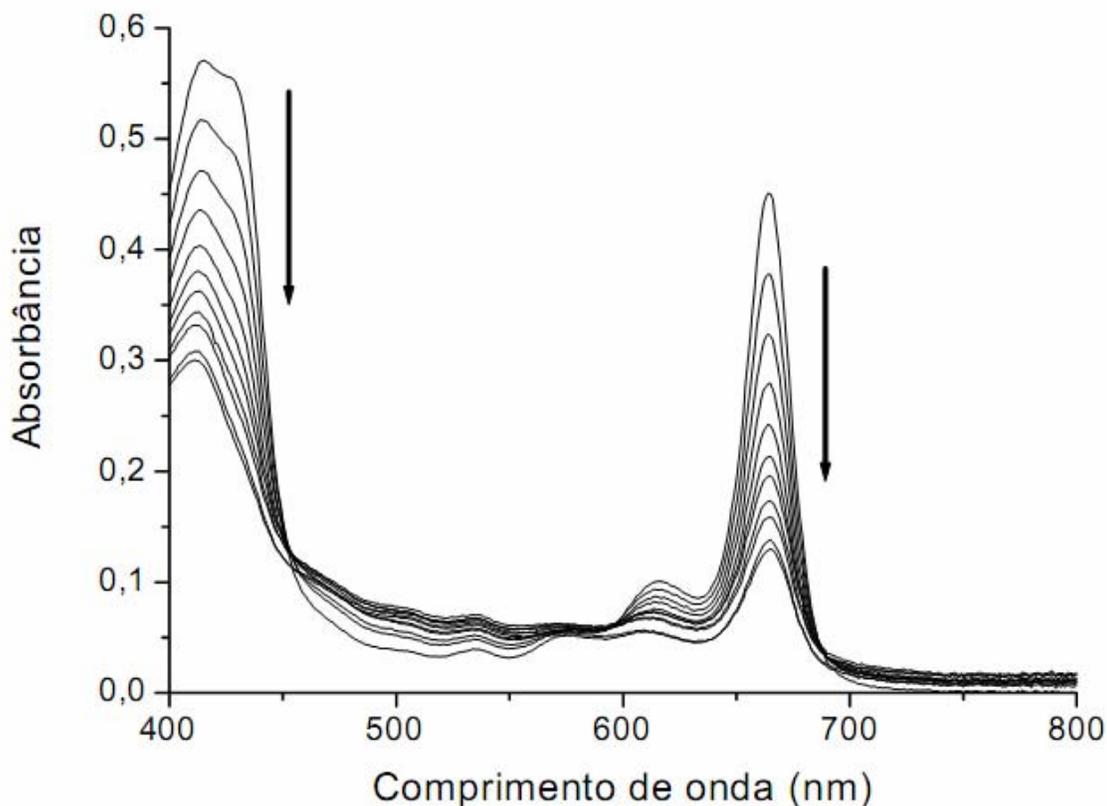


Figura III.2. Sobreposição de espectros da clorofila a (5×10^{-6}) em etanol, obtidos a intervalos de 5 min em amostra iluminada. As setas indicam a diminuição das bandas com a exposição contínua à luz vermelha –LED (Soares, 2006),

III.5. Extração de pilocarpina e epiisopiloturina

III.5.1. Método convencional

A extração de pilocarpina e epiisopiloturina foi feita pelo método convencional e o valor encontrado foi assumido como o conteúdo desses componentes na matéria-prima para possibilitar uma comparação com a extração supercrítica. Foi utilizada a metodologia otimizada por Avancini (2003) mas adaptada para maiores quantidades de material. Para cada 1g de folhas são adicionados 10 mL de NH_4OH (10%) e a mistura é agitada. Após 15 minutos, adiciona-se 10 mL de clorofórmio, e agita-se. O sistema é deixado decantar e a fase clorofórmica é coletada. O procedimento é repetido três vezes. As frações

clorofórmicas são reunidas e extraídas duas vezes com 10 mL de ácido sulfúrico, 2%. Agita-se os tubos com as amostras. As frações ácidas são reunidas e alcalinizadas à pH 12 com NH_4OH . Uma nova extração em clorofórmio é realizada duas vezes, e as frações orgânicas obtidas são reunidas e secas em *speed-vac*.

III.5.2. Ensaios de extração supercrítica

A parte central da coluna de extração do Módulo 3 (Figura III.1) é alimentada com cerca de 10 g de folhas de jaborandi (moídas e secas) ou da pasta industrial. O fundo e o topo da coluna recebiam uma camada de esferas de vidro para direcionar o escoamento do solvente e junto a tampa foi colocado uma camada de lã de vidro para evitar arraste mecânico. O extrator do Módulo 2 estava vazio, e foi utilizado como pulmão.

III.5.2.1. Ensaios de extração supercrítica com CO_2 puro.

O CO_2 era alimentado lentamente, mantendo a válvula de saída fechada, até que a pressão no interior do extrator se igualasse à pressão do cilindro e o sistema de aquecimento do extrator era então ligado. Após atingir a temperatura de processo, as bombas são ligadas e espera-se o sistema alcançar a condição de pressão de processo. Atingidas as condições pré-definidas de pressão e temperatura, abria-se cuidadosamente a válvula micrométrica (pela qual se dá a depressurização do sistema) localizada na saída do módulo de medição e coleta, até estabelecer a vazão de processo desejada. O material que escoava através da válvula micrométrica era coletado nos frascos separadores para posterior quantificação e o CO_2 seguia para o medidor totalizador de vazão sendo medido em CNTP. O material extraído foi coletado em intervalos de tempo pré-estabelecidos. Havendo necessidade, a vazão das bombas era corrigida para que o sistema operasse a pressão constante, monitorada através de manômetro.

III.5.2.2. Ensaios de extração supercrítica com CO_2 + 10% de etanol.

Os procedimentos nos ensaios de extração que usam CO_2 + etanol são os mesmos descritos no Item III.5.2.1 exceto pela necessidade de programar a segunda bomba para adicionar a quantidade de etanol desejada.

Nos ensaios de extração com co-solvente, usou-se uma percentagem de 10% em massa em relação a vazão de CO₂.

III.5.2.3. Ensaios de extração supercrítica com coluna de adsorção

Uma coluna de adsorção com sílica-gel foi acoplada ao sistema após a coluna de extração, ou seja, o extrator do Módulo 2 do equipamento foi empacotado com a matéria-prima e o extrator do Módulo 3 (módulo de separação) recebeu a sílica-gel. A coluna de adsorção foi empacotada da seguinte forma: uma camada inferior de esferas de vidro, seguida de 20g de sílica, e o volume do extrator foi completado com esferas de vidro. Junto à tampa foi colocada uma camada de lã de vidro.

O procedimento para a extração conforme descrito no Item III.5.2.1, foi adotado na primeira etapa do processo (extração e adsorção). Foi utilizado CO₂ puro para essa etapa e a extração e adsorção ocorreram seqüencialmente. Depois de uma quantidade pré-fixada de CO₂ puro ter passado, o ensaio de extração e adsorção é interrompido e o Módulo 2 (módulo de extração) é isolado e limpo. Na etapa de dessorção o solvente usado foi CO₂ + 10% etanol. Ele é admitido no Módulo 2 (vazio) e escoado pelo Módulo 3, que contém a sílica-gel com o material adsorvido. A metodologia de controle da operação e coleta das amostras utilizada na etapa de dessorção é igual ao descrito no Item III.5.2.2, onde foi utilizado CO₂ adicionado de 10% de etanol em massa.

A programação do uso da coluna de adsorção contemplava dois objetivos:

- Avaliar a possibilidade de separar pilocarpina e epiisopiloturina. Neste caso usou-se a pasta residual.
- Separar a clorofila nos extratos com os princípios ativos de interesse. A matéria-prima nesse ensaio foram folhas de jaborandi.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Conteúdo de princípios ativos

O método de extração convencional com alternância de pH foi utilizado para definir a composição de pilocarpina e epiisopiloturina nas amostras, conforme indicado no Item III.5.1.

IV.1.1. Folhas de jaborandi

Foram utilizadas folhas de jaborandi secas a duas temperaturas, 40°C e 70°C, a fim de avaliar se a temperatura do ar de secagem das folhas afetava a estabilidade da pilocarpina. Essas determinações foram repetidas após 13 meses de armazenamento para avaliar uma possível degradação da pilocarpina com o tempo de estocagem.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV.1 e correspondem a médias de determinações em duplicatas. Observa-se que as amostras secas a 40°C apresentam um conteúdo de pilocarpina cerca de 10% maior do que as folhas secas a 70°C, nos dois períodos de tempo em que foi feita a determinação. Como consequência desse resultado, os ensaios de extração supercrítica foram realizados com folhas secas a 40°C.

Tabela IV.1. Conteúdo de pilocarpina nas folhas de jaborandi determinados por extração com alternância de pH.

Temperatura de secagem	Maiio/2007	Junho/2008
40°C	0,45%	0,35%
70°C	0,41%	0,32%

A variação na porcentagem de pilocarpina encontrada nas folhas de jaborandi, secas nas duas condições, indica que o tempo de armazenagem de 13 meses causou uma perda em torno de 22% de pilocarpina.

As análises também confirmaram a presença do princípio ativo epiisopiloturina, porém em quantidades muito menores ao da pilocarpina. Uma determinação exata do conteúdo de epiisopiloturina não foi possível devido a escassez do padrão cromatográfico.

O conteúdo de pilocarpina encontrado nas folhas de jaborandi pelo método de alternância de pH se enquadra entre os valores encontrados na literatura para esta espécie de *pilocarpus microphyllus*.

IV.1.2. Pasta residual

Para a determinação da umidade da pasta foi utilizada uma estufa a vácuo, a 105°C por 48 horas. A média do teor de umidade de 5 amostras foi de 4,8%.

O laudo apresentado pela indústria Vegetex (Merck) indica que a composição deste produto é:

- Epiisopiloturina 55%
- Pilocarpina 4,7%
- Isopilocarpina 2,1%
- matriz vegetal 38,2%

A porcentagem de pilocarpina encontrada na pasta residual foi de 1,41%. Este valor é uma média de triplicatas de extrações realizadas pelo método convencional. A quantidade de pilocarpina medida é muito menor do que o valor informado no laudo da indústria, o que pode ser um indicativo de que a pilocarpina tenha se degradado com o tempo.

Análises realizadas no espectrômetro de massas (*Applied Biosystems Q-trap mass spectrometer* - Foster City, CA, USA) indicaram a presença de várias outras substâncias, como ácido pilocárpico, isopilocarpina, pilosina, epiisopiloturina (Sawaya *et al.*, 2008).

IV.2. Solubilidade de pilocarpina e de epiisopiloturina em CO₂ supercrítico

A determinação da solubilidade de equilíbrio de um componente em um fluido supercrítico deve ser realizada pelo contato desse fluido com o produto puro por um tempo suficiente para atingir a saturação. Várias tentativas de determinação da solubilidade de pilocarpina em CO₂ supercrítico foram realizadas no equipamento do Laboratório EXTRAE da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP. Os resultados obtidos, entretanto, não puderam ser validados devido à solidificação da pilocarpina no interior da válvula de despressurização do sistema, impedindo assim sua recuperação completa. Os resultados apresentaram quantidades de recuperação de pilocarpina muito distintos e não serão considerados aqui. Um esquema do equipamento usado está apresentado no Apêndice B.

A determinação da solubilidade pelo método dinâmico, usando vazões baixas de CO₂ no extrator supercrítico alimentado com pilocarpina pura também não pode ser realizada devido a necessidade de um volume considerável desse material, que tem um custo elevado.

A determinação do comportamento da solubilidade da epiisopiloturina em fluido supercrítico também não foi possível devido à ausência desse produto no mercado com um grau de pureza adequado.

Como consequência, o comportamento de solubilidade dos princípios ativos só pode ser avaliado através das curvas de extração dos mesmos. Considerando sua baixa concentração nas folhas e a grande resistência à transferência de massa que a estrutura celular das folhas de jaborandi poderia oferecer, preferiu-se trabalhar com a pasta residual. O valor determinado, mesmo quando obtido na primeira fase da extração, não é absoluto, e deve ser considerado como uma solubilidade efetiva em comparações em situações idênticas pois esses princípios ativos estão dissolvidos na matriz e os outros componentes afetam sua fugacidade. Por ser um resultado que pode apresentar incertezas, a solubilidade destes princípios ativos estão apresentados no Apêndice D e podem servir como base para a determinação da solubilidade destes compostos puros.

IV.3. Ensaios preliminares de extração supercrítica

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares exploratórios, visando, sobretudo uma familiarização com a operação do equipamento.

Os ensaios definitivos de extração foram realizados com as folhas de jaborandi da espécie *Pilocarpus Microphyllus* doadas pelo CPQBA. Além de folhas de jaborandi, foi utilizada a pasta residual industrial doada pela Vegetex (Merck).

Alguns ensaios foram realizados com folhas de jaborandi, colhidas em árvores cultivadas no IB/UNICAMP. Na extração foram utilizadas 20g de folhas secas e moídas. Este ensaio foi feito nas mesmas condições utilizadas por Saldaña (2002), ou seja, pressão de 255 bar e temperatura de 77°C, usando CO₂ puro como solvente. Um total de 613g de CO₂ (CNTF) foram escoados pelo leito. O extrato foi coletado em etanol e depois da extração uma parte da tubulação foi limpa com este mesmo solvente. O resultado indicou a extração de 0,002 g de pilocarpina, mas nenhuma epiisopiloturina.

Embora a quantidade de pilocarpina extraída tenha sido baixa, o resultado foi promissor pois confirmou a possibilidade de extrair esses princípios ativos com CO₂ supercrítico, fato que não fora conseguido por Saldaña (2002). Esse resultado é especialmente importante porque o CO₂ é uma molécula apolar e a pilocarpina polar e, portanto, com pouca afinidade mútua.

Para avaliar esse efeito de polaridade na solubilização, as folhas processadas com CO₂ foram mantidas no extrator e após o primeiro ensaio foi feito uma extração complementar utilizando CO₂ com 10% de etanol (em massa).

Neste segundo ensaio, a pressão e a temperatura utilizadas foram as mesmas do primeiro ensaio, e bombeou-se um total de 589g CO₂. Como resultado obteve-se 0,003 g de pilocarpina mas ainda nenhuma epiisopiloturina.

Um terceiro ensaio foi realizado com 34 g de folhas secas e moídas adquiridas no comércio. As mesmas temperatura e pressão dos testes anteriores foram utilizadas em uma extração utilizando CO₂ com 10% de etanol, em um total de 505g CO₂. A quantidade de pilocarpina extraída foi de 0,143g e, como nos ensaios anteriores ainda não se conseguiu

identificar epiisopiloturina. Estes ensaios preliminares confirmaram a excelente afinidade do etanol pela pilocarpina, além da possibilidade de extrair a pilocarpina apenas com CO₂ puro.

IV.4. Extração supercrítica com CO₂ puro: folhas de jaborandi

As extrações supercríticas com folhas de jaborandi foram realizadas com aproximadamente 10g de matéria-prima utilizando CO₂ puro como solvente. A vazão de 1,0 L/min de CO₂ (CNTP) foi pré-definida, obedecendo a restrições do próprio equipamento de extração supercrítica, e também para obter uma condição próxima ao equilíbrio de saturação (Azevedo, 2005). As temperaturas usadas nos ensaios de extração supercrítica foram 40, 50 e 60°C, tendo em vista que a pilocarpina pode se degradar a elevadas temperaturas. As pressões de trabalho escolhidas foram de 300 e 200 bar pois abaixo deste valor a densidade do dióxido de carbono é pequena, tornando difícil a extração de moléculas polares. A coleta dos extratos foi realizada a cada 50g, 150 g a 350g, de CO₂, ao longo do tempo de operação.

Curvas da massa acumulada de pilocarpina extraída em função da massa acumulada de CO₂ que escoou a diferentes temperaturas estão traçadas nas Figuras IV.1 (pressão de 200 bar) e IV.2 (pressão de 300 bar). Não foi constatada recuperação de epiisopiloturina nas extrações a 200 bar, constatando dessa forma que nestas condições de temperatura e pressão a extração é mais seletiva para a pilocarpina. As curvas correspondentes para a epiisopiloturina, são apresentadas em termos de área dos picos no cromatogramas e estão na Figura IV.8 (300 bar).

Uma análise destes resultados será feita a seguir.

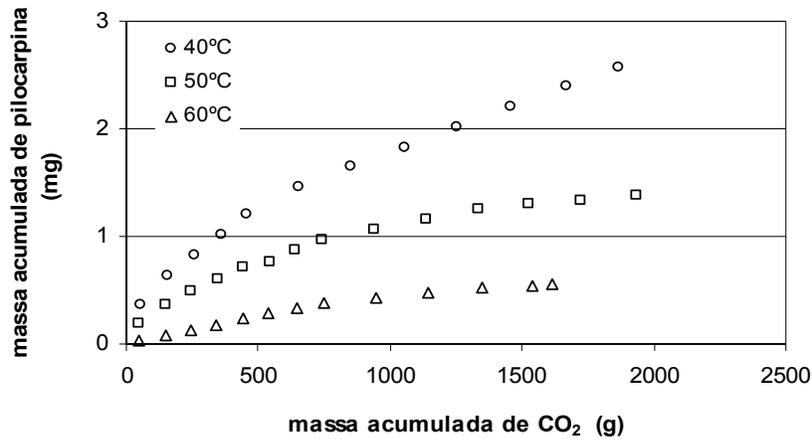


Figura IV.1. Curvas de extração supercrítica de pilocarpina de folhas de jaborandi a 200 bar.

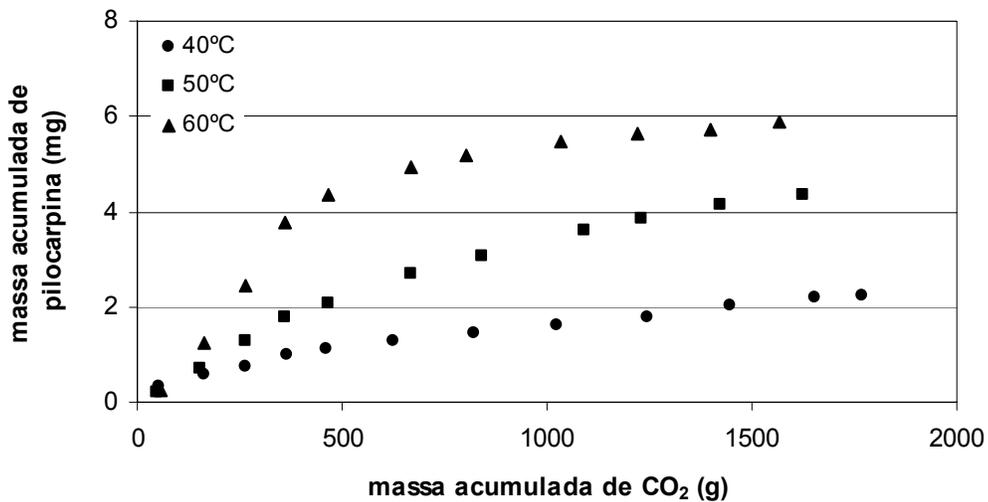


Figura IV.2. Curvas de extração supercrítica de pilocarpina de folhas de jaborandi a 300 bar.

IV.4.1. Influência da temperatura na extração de pilocarpina

A influência da temperatura à pressão constante de 200 bar na extração de pilocarpina pode ser observada diretamente na Figura IV.1. O posicionamento das curvas indica claramente que o aumento de temperatura diminui a quantidade de pilocarpina

extraída, uma confirmação de que, a essa pressão, a extração é controlada pelo poder de solubilidade do dióxido de carbono.

Esses extratos apresentaram uma coloração levemente esverdeada, devido à contaminação com clorofila. Essa coloração era mais intensa nas primeiras amostras, conforme pode ser observado na fotografia das amostras, apresentada na Figura IV.3. O monitoramento da extração de clorofila por meio de espectrofotômetro, foi feito em um ensaio complementar e apresentado na Figura IV.23.



Figura IV.3. Fotografia das amostras obtidas em cada ponto da extração realizada com folhas de jaborandi utilizando CO₂ puro.

As curvas de extração de pilocarpina a 300 bar (Figura IV.2) indicam uma maior capacidade de extração do que a 200 bar, e um comportamento diferenciado em relação à temperatura. A extração a 40°C, que se mostrara a mais eficiente a 200 bar, tem o pior desempenho a 300 bar. O posicionamento das curvas de extração indica que o aumento de temperatura favoreceu a extração de pilocarpina, ao contrário do que aconteceu nas extrações realizadas a pressão de 200 bar (Figura IV.1). Esta inversão ocorre devido ao fenômeno conhecido como comportamento retrógrado, que é limitado pela pressão de cruzamento, na qual a solubilidade é a mesma, independentemente da temperatura. Abaixo da pressão de cruzamento, a predominância é do efeito da densidade e o aumento de temperatura favorece a extração de pilocarpina. Após a pressão de cruzamento, o efeito

predominante é da pressão de vapor do soluto, que se eleva e desta forma aumenta a solubilidade da pilocarpina no fluido supercrítico.

IV.4.2. Influência da pressão na extração de pilocarpina

As curvas de extração já apresentadas (Figura IV.1 e 2) foram relocadas conforme a temperatura para melhor demonstrar o efeito da pressão de CO₂, e dispostas nas Figuras IV.4, 5 e 6, a temperaturas de 40, 50 e 60°C, respectivamente.

Uma análise comparativa das curvas de extração nessas três figuras indica um comportamento diferenciado entre as extrações a 40°C e a 50 ou 60°C.

Na Figura IV.4 (extrações a 40°C) as curvas estão próximas entre si indicando que o aumento de pressão não aumenta de forma significativa a quantidade de pilocarpina extraída. Nestas condições de baixo poder de extração, um aumento de densidade do CO₂ não aumenta a solubilidade.

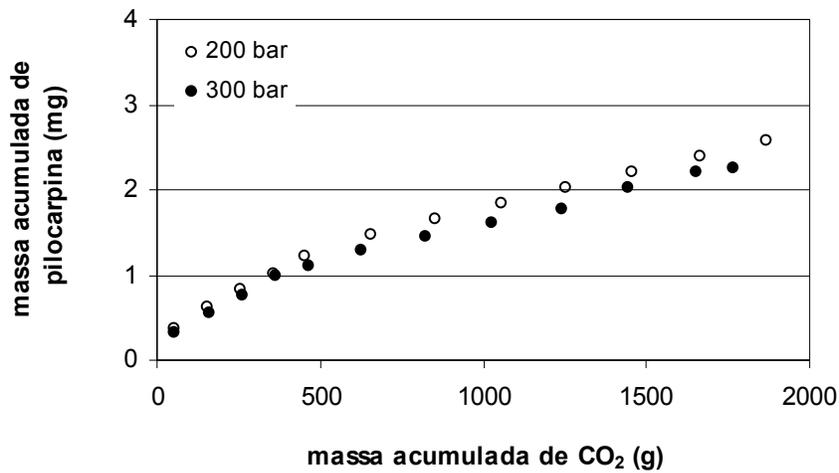


Figura IV.4. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi a 40°C.

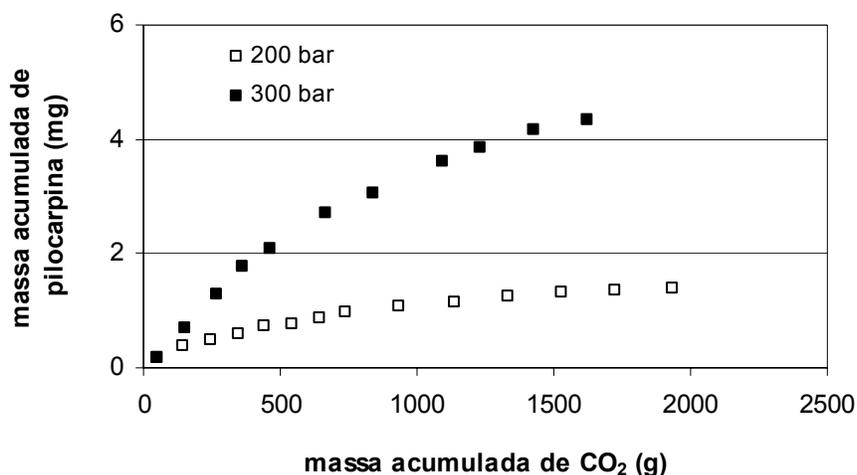


Figura IV.5. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi a 50°C.

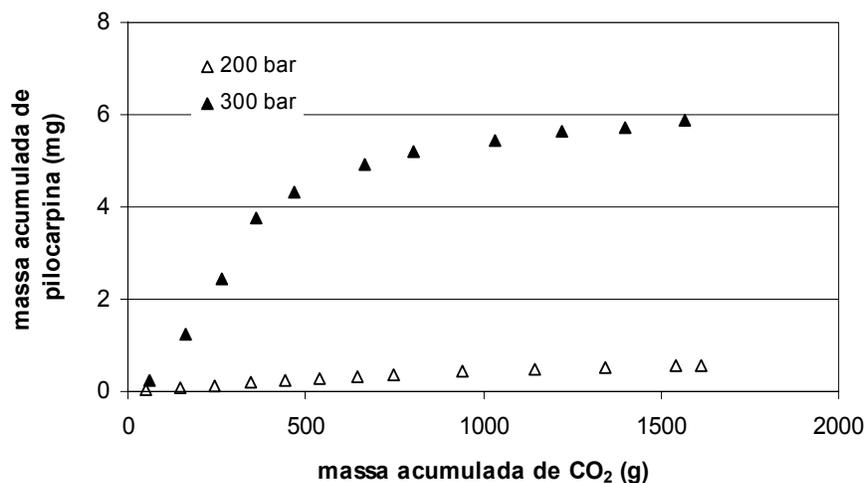


Figura IV.6. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi a 60°C.

Nas extrações a 50°C (Figura IV.5) e 60°C (Figura IV.6) houve um considerável aumento de massa de pilocarpina extraída com o incremento da pressão. A 50°C esse aumento é de cerca de 3,3 vezes e a 60°C ele sobe para 10 vezes.

IV.4.3. Recuperação de pilocarpina

A Figura IV.7 apresenta os dados de recuperação de pilocarpina (massa de pilocarpina extraída (mg)/ massa de pilocarpina inicial (mg)) das folhas de jaborandi em função da densidade do CO₂, calculada quando 1500g de CO₂ escoaram pelo sistema, isto é,

no começo da terceira fase da extração. Para este cálculo foi considerado que as folhas de jaborandi contêm 0,40% de pilocarpina, como encontrado pela extração convencional.

Os dados experimentais lançados na Figura IV.7 indicam que não existe uma correlação global entre densidade do CO₂ e recuperação da pilocarpina. Os valores obtidos, entretanto, podem ser correlacionados conforme a pressão. Isso pode ser devido ao fato da extração, em alguns casos, não ter alcançado o patamar da terceira etapa, como por exemplo, o ensaio a 40°C e 200 bar. Essa situação corresponde ao controle do processo de extração pela solubilidade da pilocarpina no CO₂ supercrítico. Nesses casos, curvas com descontinuidade sinalizam o efeito do comportamento retrógrado, como encontrado em Azevedo (2005) na extração de cafeína com fluido supercrítico.

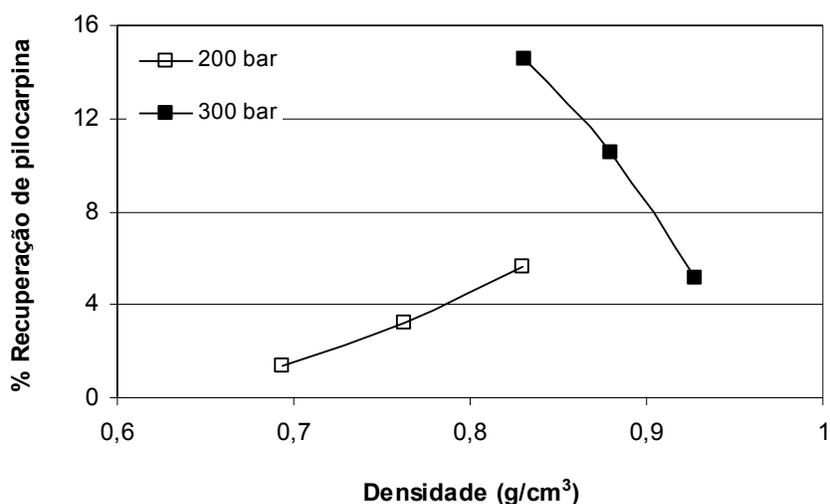


Figura IV.7. Recuperação de pilocarpina das folhas de jaborandi em função da densidade do CO₂.

O outro aspecto importante que se pode observar pelos valores na Figura IV.7 são os baixos rendimentos obtidos. Para as curvas de extração apresentadas na Figura IV.1, a recuperação de pilocarpina foi de 5,6%, 3,2% e 1,4% nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, respectivamente. Conforme já mencionado, nesse caso a diminuição de temperatura teve um efeito positivo na extração de pilocarpina, pois de 60°C para 50°C ocorreu um aumento de cerca de 2,3 vezes e de 50°C para 40°C um acréscimo de 1,8 vezes. Para as extrações realizadas a 300 bar (Figura IV.2) o aumento de temperatura favoreceu a extração de

pilocarpina. Em relação à extração a 40°C, o aumento na recuperação de pilocarpina foi de aproximadamente 2 e de 2,8 em relação às extrações a 50°C e 60°C, respectivamente na pressão de 200 bar.

Vários estudos mostram que substâncias na forma de base livre são mais solúveis em CO₂ do que quando estão na forma de sais (Choi, 1999a). A extração dos princípios ativos das folhas de jaborandi obteve um baixo rendimento devido ao fato destes estar em forma de sais na plantas como já foi reportado na literatura. A adição de co-solventes basificados pode extrair estes compostos na forma de bases livres, que passam então a ser solúveis em solvente não polar, como mostra o estudo realizado por Choi *et al.* (1999a).

No presente trabalho não se fez uso de solvente basificado, pois estes são solventes tóxicos. Neste contexto, optou-se por utilizar um solvente com baixa toxicidade, o etanol, já que o princípio ativo tem emprego farmacológico.

IV.4.4. Extrações de epiisopiloturina

Conforme já mencionado, apenas nas extrações a 300 bar foi detectada a presença de epiisopiloturina. Os resultados encontrados estão traçados na Figura IV.8, que apresenta a massa de epiisopiloturina como proporcional à área do pico (unidades arbitrárias) correspondente, nos cromatogramas. Da mesma forma como ocorreu com a extração da pilocarpina, a 300 bar a ordem das curvas indica que o aumento da temperatura favoreceu a extração supercrítica e pode-se concluir, portanto, que nestas condições de extração o efeito da pressão de vapor do princípio ativo prevalece sobre o efeito da densidade.

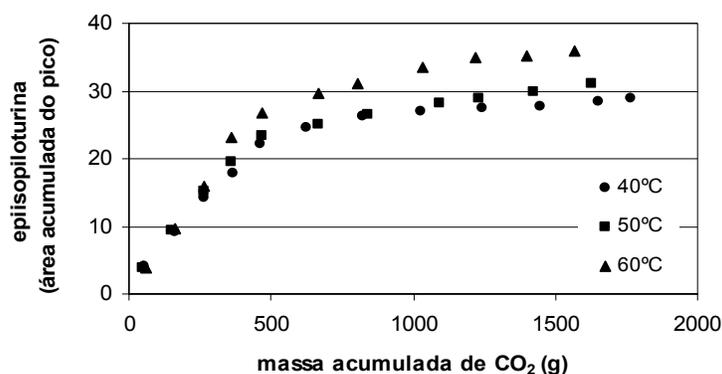


Figura IV.8. Curvas de extração da epiisopiloturina de folhas de jaborandi, a uma pressão de 300 bar.

IV.5. Extração supercrítica com CO₂ puro: pasta residual

Curvas da massa acumulada de pilocarpina extraída em função da massa acumulada de CO₂ a diferentes temperaturas estão traçadas nas Figuras IV.9 (pressão de 200 bar) e IV.10 (pressão de 300 bar). As curvas correspondentes para a episopiloturina são apresentadas em termos de área dos picos no cromatogramas e estão nas Figuras IV.15 e 16. Uma análise destes resultados será feita a seguir.

IV.5.1. Influência da temperatura na extração de pilocarpina

As Figuras IV.9 e 10 apresentam a variação da massa de pilocarpina extraída da pasta residual a diferentes temperaturas, usando CO₂ supercrítico a pressão de 200 e de 300 bar, respectivamente. Observa-se que o efeito do aumento da temperatura tende a ser o mesmo nas duas pressões, isto é, um incremento na temperatura aumenta a massa de pilocarpina extraída. Esses resultados indicam que nas extrações usando a pasta, o efeito da pressão de vapor do soluto é mais importante que o poder de solvência (densidade) do CO₂.

Uma comparação entre o comportamento de extração da pilocarpina da pasta com as curvas de extração das folhas (Figuras IV.1 e 2) indica que o efeito da temperatura é o mesmo à pressão de 300 bar, mas inverso à pressão de 200 bar.

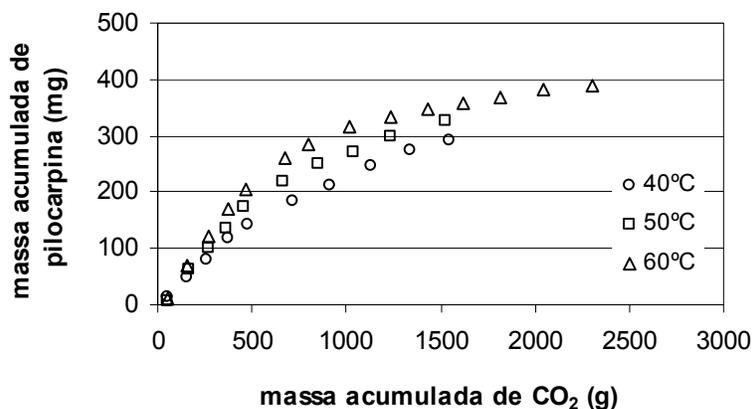


Figura IV.9. Curvas de extração da pilocarpina da pasta residual a pressão de 200 bar.

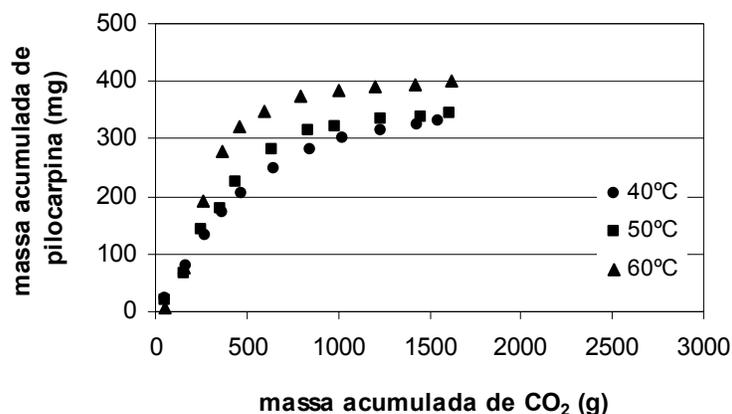


Figura IV.10. Curvas de extração da pilocarpina da pasta residual a pressão de 300 bar.

Esses resultados revelam a influência da matriz sobre a capacidade de extração mas uma indicação mais precisa, entretanto, só pode ser obtida em ensaios de solubilidade usando produtos puros. O fato das extrações realizadas com pasta obter um melhor rendimento pode ser atribuído à presença residual de solventes utilizados na extração convencional de pilocarpina de folhas de jaborandi. O conjunto desses resultados são fortes indícios de que a pressão de cruzamento da pilocarpina deve se situar próxima a 200 bar.

IV.5.2. Influência da pressão na extração de pilocarpina

As curvas de extração de pilocarpina da pasta residual já apresentadas nas Figuras IV.9 e 10 foram reagrupadas conforme a temperatura de 40, 50 e 60°C e traçadas nas Figuras IV.11, 12 e 13, respectivamente.

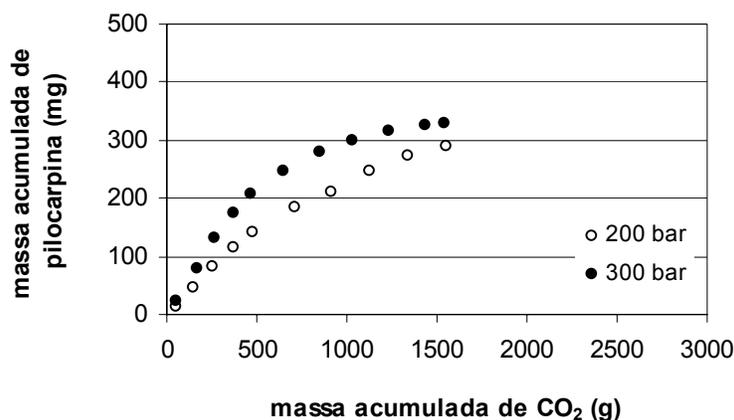


Figura IV.11. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a 40°C.

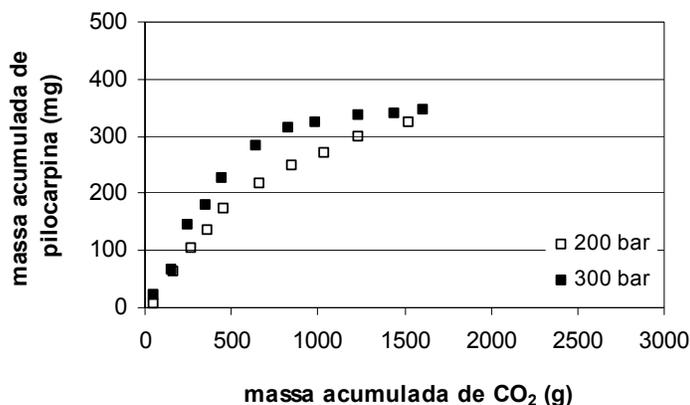


Figura IV.12. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a 50°C.

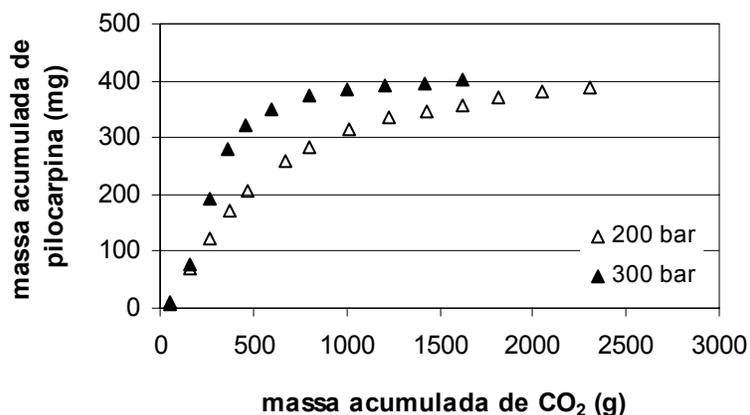


Figura IV.13. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a 60°C.

Observa-se que o aumento da pressão de 200 para 300 bar aumentou a massa de pilocarpina extraída da pasta, mas em uma proporção bem menor do que a observada com as folhas de jaborandi.

Após a passagem de 1500g de CO₂ pelo sistema, o aumento de pressão provocou um aumento de 15, 5,8 e 13% para as temperaturas de 40, 50 e 60°C, respectivamente, na quantidade de pilocarpina extraída.

IV.5.3. Recuperação de pilocarpina

A Figura IV.14 mostra a recuperação de pilocarpina (massa de pilocarpina extraída/ massa de pilocarpina inicial) na situação em que 1500g de CO₂ escoaram pelo

sistema, em função da densidade do dióxido de carbono calculada através da equação de Peng-Robinson. O cálculo foi feito assumindo uma concentração inicial de 4,7% de pilocarpina na pasta.

Os valores da Figura IV.14 revelam que a recuperação da pilocarpina da pasta foi acima de 60%, e portanto muito mais eficiente do que das folhas. O formato das curvas da Figura IV.9 indica que com 1500g de CO₂, ainda não se atingiu o patamar de extração, e portanto as recuperações de pilocarpina a 200 bar poderiam ser ainda maiores.

Os pontos experimentais da Figura IV.14 não apresentam uma correlação definida em relação à densidade do CO₂, embora em cada nível de pressão ocorra uma tendência de diminuição da recuperação com o aumento da densidade. Esse fato, conforme já se concluiu antes, reflete uma situação na qual o aumento de temperatura é mais importante do que o aumento da pressão.

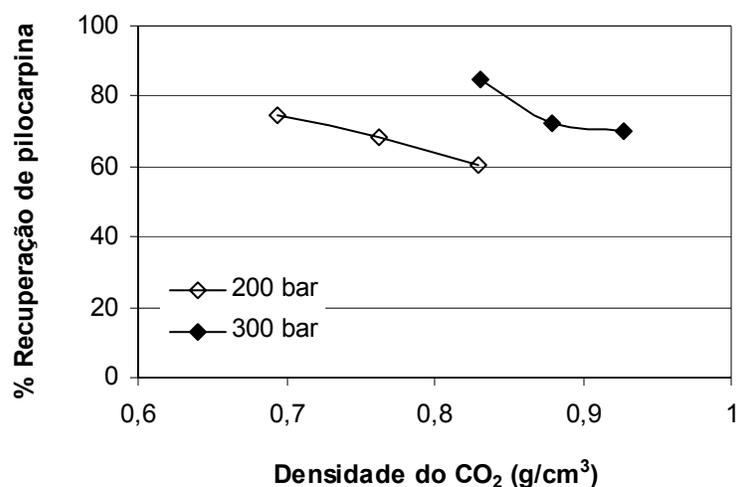


Figura IV.14. Recuperação de pilocarpina da pasta residual em função da densidade do CO₂.

IV.5.4. Extração da epiisopiloturina

As curvas de extração da epiisopiloturina em termos da área do pico correspondente nos cromatogramas das amostras são apresentadas nas Figuras IV.15 e 16. Apesar de não se ter conseguido quantificar de forma absoluta a massa de epiisopiloturina

extraída, uma comparação relativa dos resultados deixa claro que nas duas pressões de trabalho, o aumento de temperatura favorece a extração. Essa mesma tendência foi encontrada na extração da pilocarpina da pasta (ver Figuras IV.9 e 10).

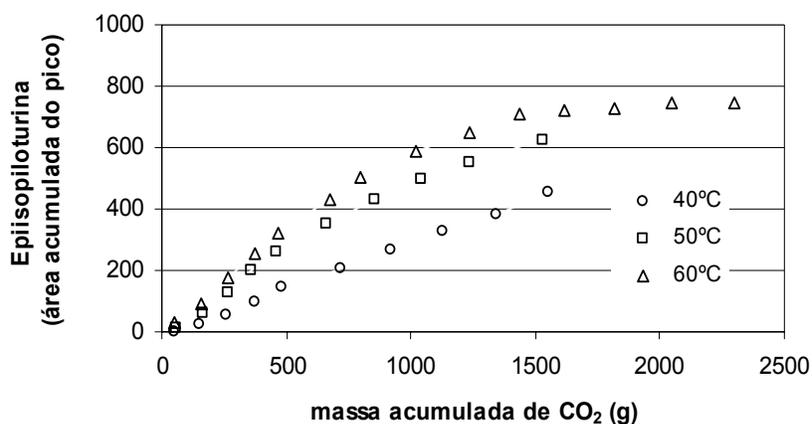


Figura IV.15. Curvas de extração da episopiloturina da pasta residual a pressão de 200 bar.

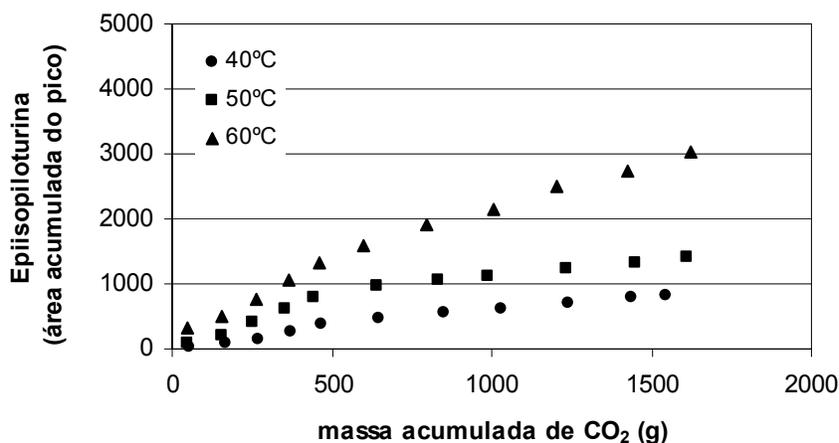


Figura IV.16. Curvas de extração da episopiloturina da pasta residual a pressão de 300 bar.

As Figuras IV.17, 18 e 19 apresentam as curvas de extração da episopiloturina (medida pela área do pico correspondente) da pasta residual a 40, 50 e 60°C nas pressões de 300 e 200 bar, respectivamente. Para todas as temperaturas, estudadas o aumento de pressão teve um efeito positivo bem definido sobre a massa de episopiloturina extraída e a temperaturas mais altas esse efeito se intensifica. Essas mesmas tendências foram

encontradas na extração de pilocarpina da pasta, o que dificulta a otimização das condições de operação, visando recuperar seletivamente apenas um dos componentes.

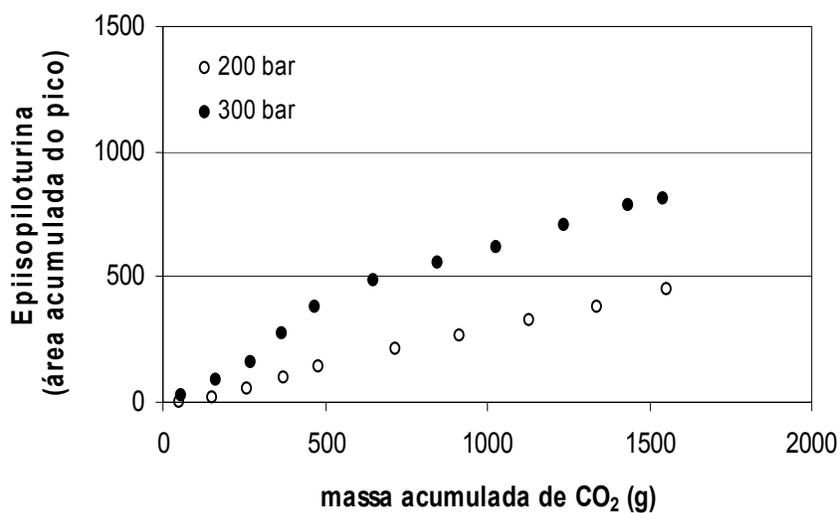


Figura IV.17. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a 40°C.

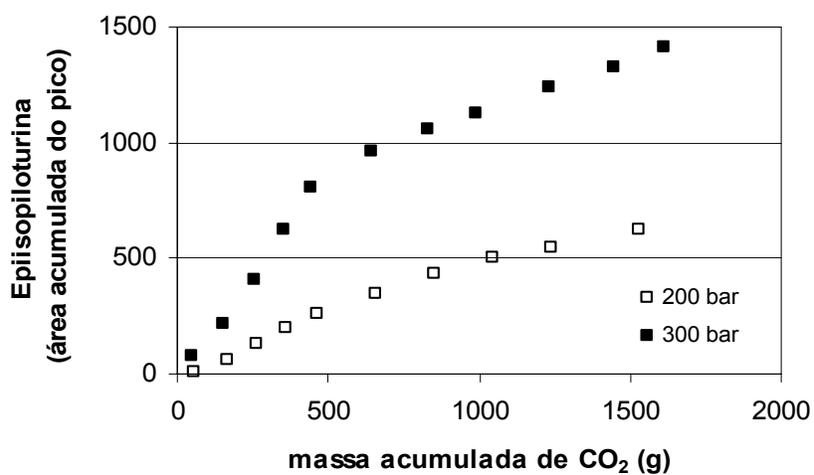


Figura IV.18. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a 50°C.

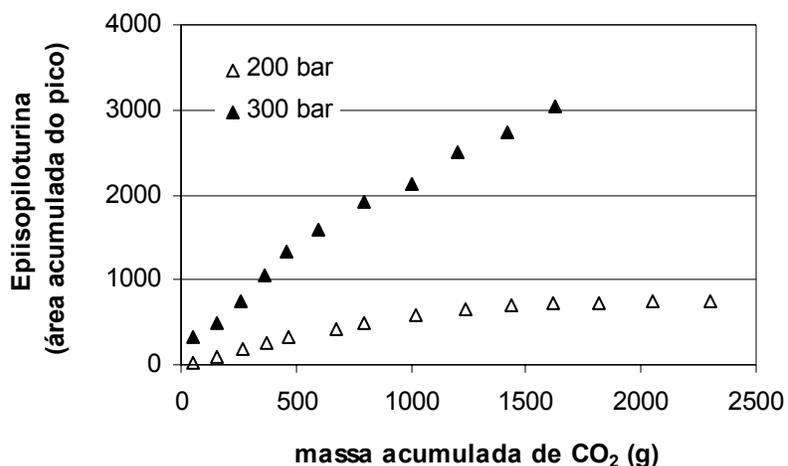


Figura IV.19. Curvas de extração de episipiloturina da pasta residual a 60°C.

IV.5.5. Correlação com a densidade do CO₂-SC

A recuperação da episipiloturina não pode ser avaliada, pois o conteúdo total inicial desse princípio na pasta não foi determinável. A fim de correlacionar tendências em função da densidade do CO₂, como foi feito com a pilocarpina na Figura IV.14, optou-se por utilizar a massa extraída (em termos de área do pico) com 1500g de CO₂ em função da densidade do CO₂. A Figura IV.20 apresenta as curvas encontradas, para 200 e 300 bar.

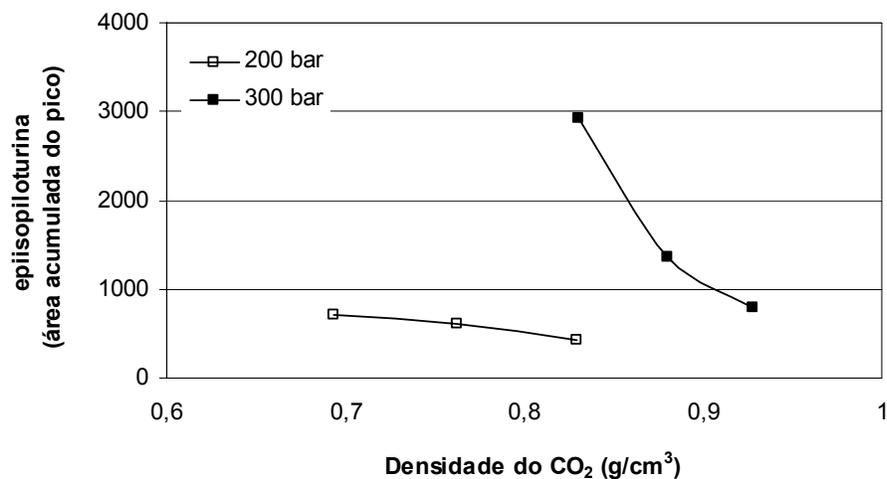


Figura IV.20. Massa extraída de episipiloturina (em termos de área do pico) em função da densidade do CO₂.

IV.6. Ensaios de extração supercrítica com CO₂ puro + etanol

As condições de operação que resultaram em alta recuperação de pilocarpina com CO₂ puro foram escolhidas para se avaliar o efeito da adição de etanol como co-solvente, isto é, pressão de 300 bar e temperaturas de 50 e 60°C.

IV.6.1. Folhas de jaborandi

Os extratos obtidos na extração de folhas de jaborandi utilizando CO₂ adicionado de 10% de etanol (em massa) apresentaram coloração mais esverdeada do que a extração com CO₂ puro, devido à extração de clorofila. Uma avaliação deste efeito será apresentada no Item IV.6.1.C.

A. Pilocarpina

A Figura IV.21 compara as curvas de extração de pilocarpina das folhas de jaborandi a pressão de 300 bar e temperaturas de 50 e 60°C utilizando CO₂ com 10% etanol com os valores obtidos sem o etanol, e já apresentados na Figura IV.2. Observa-se que, para as condições de temperatura usadas, a adição de 10% de etanol no CO₂ supercrítico favoreceu de uma forma notável a extração de pilocarpina das folhas de jaborandi em relação a extração apenas com CO₂.

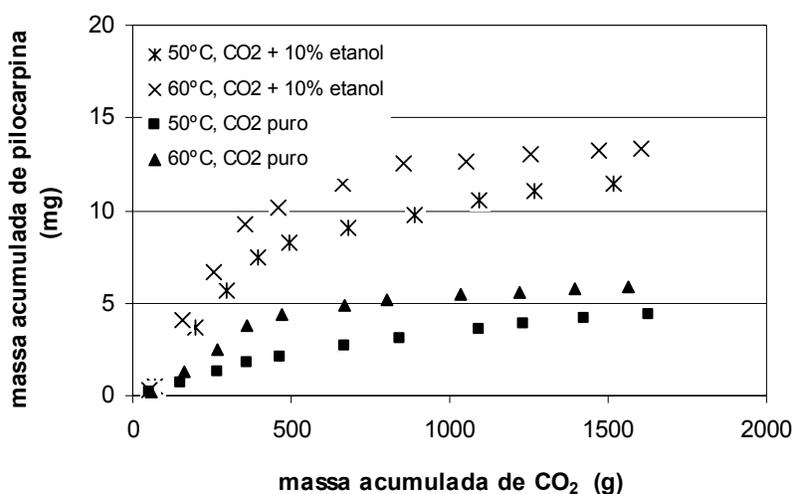


Figura IV.21. Curvas de extração de pilocarpina de folhas de jaborandi com CO₂ puro e com CO₂ + 10% de etanol a pressão de 300 bar.

A Tabela IV.2 apresenta os rendimentos de extração, calculados com a massa extraída com 1500g de CO₂. Em relação à extração com dióxido de carbono supercrítico puro a adição de 10% etanol aumentou em cerca de 2,7 vezes a quantidade de pilocarpina extraída na temperatura de 50°C e em 2,3 na temperatura de 60°C. Comparando os dados obtidos nas duas temperaturas na extração com co-solvente, observa-se que o aumento de temperatura favoreceu a recuperação de pilocarpina.

Tabela IV.2. Recuperação de pilocarpina na extração de folhas de jaborandi, a 300 bar.

T	CO₂	CO₂ + 10%etanol
50°C	10,6%	28,4%
60°C	14,6%	33,1%

Esses resultados confirmam o maior poder de solubilização do etanol em relação a componentes polares e o ganho obtido na extração é equivalente aos valores encontrados na literatura. Infelizmente, entretanto, a contaminação com clorofila é muito mais intensa e visível do que nas extrações com CO₂ puro.

B. Epiisopiloturina

A Figura IV.22 apresenta as curvas de extração da epiisopiloturina das folhas de jaborandi na pressão de 300 bar, temperatura de 50 e 60°C, com CO₂ puro e com CO₂ modificado com 10% de etanol. Observa-se que a adição de 10% de etanol no CO₂ supercrítico também promoveu uma maior extração, sobretudo à temperatura de 60°C.

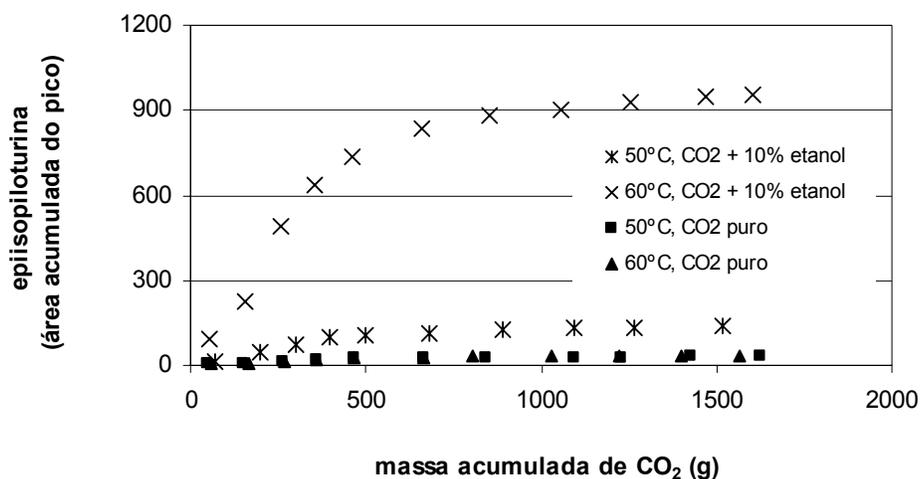


Figura IV.22. Curvas de extração de epiisopiloturina de folhas de jaborandi com CO₂ puro e com CO₂ + 10% de etanol a pressão de 300 bar.

A Tabela IV.3 apresenta os valores da área acumulada de epiisopiloturina após a passagem de 1500g de CO₂. Observa-se pela comparação entre esses valores que o efeito da adição de etanol propiciou um aumento de aproximadamente 5 vezes a 50°C, e de 27 vezes a 60°C. Na temperatura mais alta estudada (60°C), ocorreu a melhor solubilização da epiisopiloturina nas folhas de jaborandi, assim como a pilocarpina.

Tabela IV.3. Área acumulada de epiisopiloturina extração de folhas de jaborandi, a 300 bar, quando passados 1500g de CO₂.

T	CO ₂	CO ₂ + 10%etanol
50°C	30,3	139,3
60°C	35,5	951,9

B. Clorofila

A Clorofila A extraída em conjunto com os princípios ativos foi quantificada por espectrometria e os resultados, em termo de absorbância, estão apresentados na Figura IV.23.

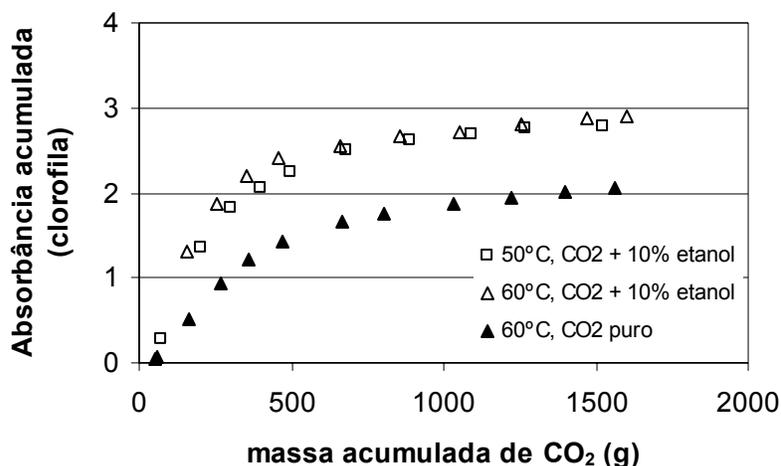


Figura IV.23. Curvas de extração da clorofila (em unidades de absorbância) de folhas de jaborandi com CO₂ puro e CO₂ + 10% de etanol a pressão de 300 bar.

Observa-se que a mudança de temperatura nas extrações realizadas com co-solvente não alterou de modo significativo a quantidade de clorofila extraída. As amostras da extração com CO₂ puro apresentaram menores quantidades de clorofila do que o processo com CO₂ adicionado de 10% etanol, mas os valores de absorbância lidos, entretanto, são consideráveis, e muito mais significativos do que uma avaliação inicial subjetiva indicou.

A presença de etanol, portanto, favorece a extração dos princípios ativos de interesse mas produz um extrato contaminado por clorofila. Conseqüentemente, para se obter um produto com alto grau de pureza são necessárias etapas de purificação posterior.

As curvas de absorbância de alguns extratos obtidos na extração supercrítica de folhas de jaborandi em etanol são apresentadas no Apêndice C.

IV.6.2. Pasta residual

A Figura IV.24 apresenta valores da extração de pilocarpina da pasta residual obtido em ensaios a 50 e 60°C utilizando CO₂ com 10% de etanol, à pressão de 300 bar. Na mesma figura estão traçadas as curvas já apresentadas de extração com CO₂ puro. Da mesma forma que nos ensaios com as folhas de jaborandi, a adição de etanol garantiu uma maior extração dos princípios ativos nas duas temperaturas.

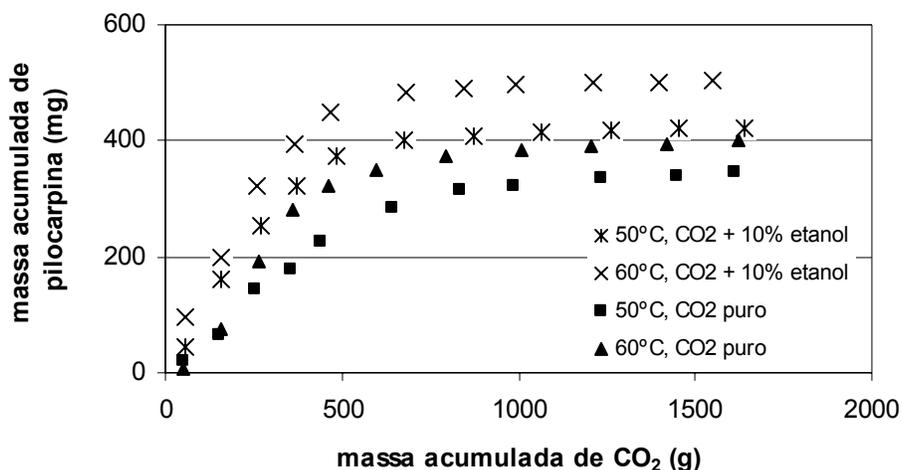


Figura IV.24. Curvas de extração de pilocarpina da pasta residual a pressão de 300 bar.

A Tabela IV.4 apresenta a recuperação da extração de pilocarpina (massa de pilocarpina extraída/ massa de pilocarpina na pasta) da pasta residual depois de escoado 1500g de CO₂. O maior rendimento foi obtido na extração a 60°C e 300 bar, com 10% de etanol.

Tabela IV.4. Recuperação de pilocarpina na extração da pasta residual a pressão de 300 bar.

Temperatura	CO ₂	CO ₂ + 10%etanol
50°C	72,6%	89,8%
60°C	84,5%	106,9%

As curvas de extração da epiisopiloturina da pasta residual a 50 e 60°C utilizando CO₂ com 10% de etanol, a pressão de 300 bar estão apresentadas na Figura IV.25 Juntamente com as curvas obtidas com CO₂ puro. Como em todos os ensaios anteriores, a adição de co-solvente favoreceu a extração de epiisopiloturina para todas as condições estudadas. O formato das curvas deixa claro que o etanol favoreceu a solubilidade da epiisopiloturina no fluido supercrítico, pois as curvas se diferenciam desde o começo da extração.

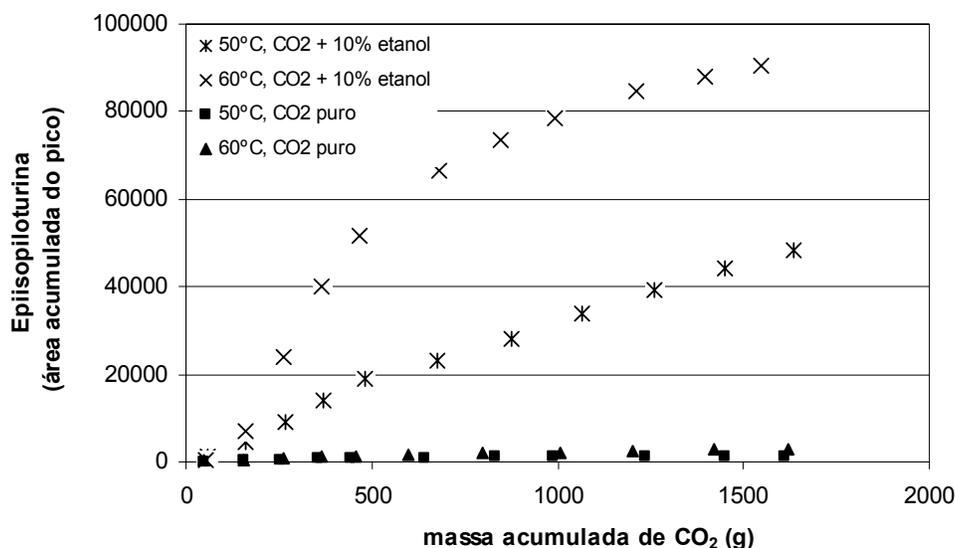


Figura IV.25. Curvas de extração de epiisopiloturina da pasta residual a pressão de 300 bar.

Os valores da área acumulada de epiisopiloturina após a passagem de 1500g de CO₂ é apresentada na Tabela IV.5. Nas duas temperaturas estudadas o aumento de massa extraída com etanol em relação a extração sem etanol foi de aproximadamente 30 vezes para a epiisopiloturina e de 1,3 vezes para a pilocarpina. A adição de etanol nas extrações realizadas com a pasta residual mostrou ter um efeito positivo mais intenso com relação a epiisopiloturina do que a pilocarpina.

Tabela IV.5. Área acumulada de epiisopiloturina na extração da pasta residual, a 300 bar, quando passados 1500g de CO₂.

T	CO ₂	CO ₂ + 10%etanol
50°C	1352	45375
60°C	2932	89803

IV.7. Extração acoplada à adsorção em sílica-gel

O acoplamento de uma etapa de adsorção ao processo de extração teve como objetivo conseguir um extrato de alta qualidade sem a presença de clorofila e, se possível, separar a pilocarpina da epiisopiloturina.

A escolha pela sílica-gel está baseada no fato dela ser um adsorvente hidrofílico, ou seja, tem bastante afinidade com solutos polares e ter maior área superficial do que a alumina (Domingo *et al.*, 2001).

IV.7.1. Folhas de jaborandi

Folhas de jaborandi foram inicialmente submetidas ao processo contínuo e combinado de extração (no Módulo 2) e adsorção (no Módulo 3) com CO₂ puro, a 60°C e 300 bar. As amostras para análise eram recolhidas após a passagem do fluido pela adsorção. Para a etapa de extração e adsorção foi utilizado como solvente CO₂ puro e para a etapa de dessorção (lavagem) foi utilizado CO₂ com 10% etanol em massa, após a retirada da carga do Módulo 2.

Um total de 1250g de CO₂ escoram pelo sistema na etapa de extração e adsorção. Para a etapa de dessorção, ativou-se a bomba do co-solvente, e outras 1250 g de CO₂ contendo 10% de etanol passaram pelo sistema completando a operação.

As Figuras IV.26, 27 e 28 apresentam as curvas de extração obtidas, correspondentes a pilocarpina, epiisopiloturina e clorofila, respectivamente. Para facilitar comparações, nas mesmas figuras estão traçadas as curvas de extração obtidas sem a coluna de adsorção, utilizando CO₂ puro.

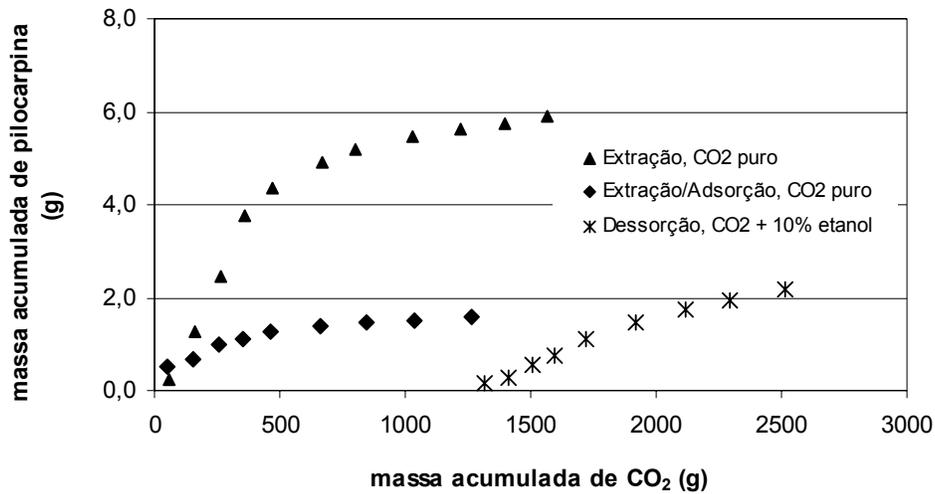


Figura IV.26. Curvas de extração/adsorção e curva de dessorção de pilocarpina de folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar.

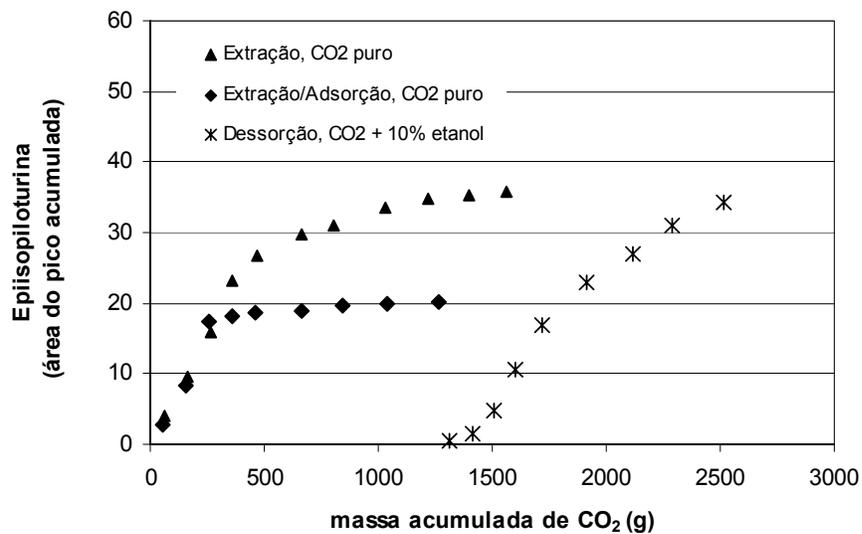


Figura IV.27. Curvas de extração/adsorção e curva de dessorção de episipiloturina de folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar.

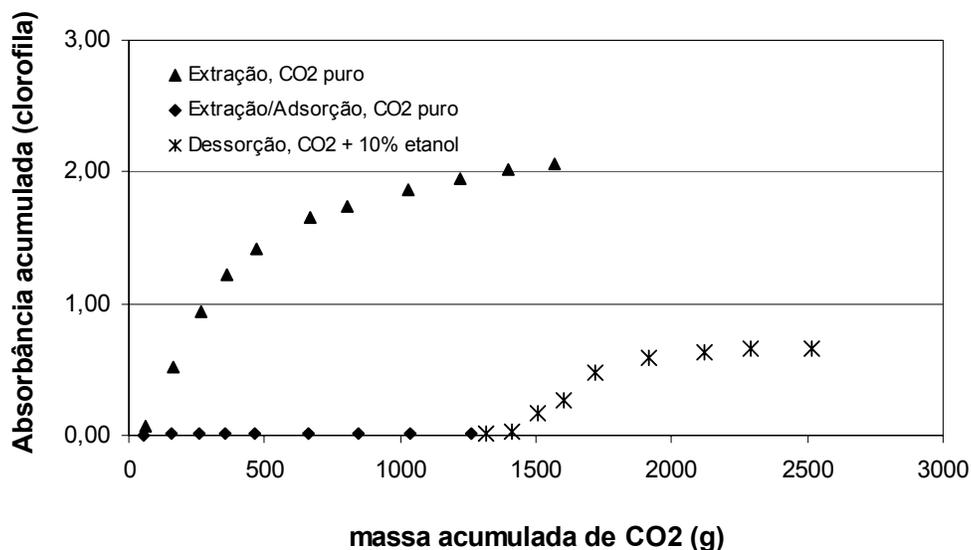


Figura IV.28. Curvas de extração/adsorção e curva de dessorção de clorofila de folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar.

Uma análise desses resultados experimentais deve ser feita comparando as curvas obtidas com e sem adsorção, assim como as curvas obtidas com os três componentes entre si. O comportamento da clorofila (Figura IV.28) o classifica como um soluto com intensa interação com o adsorvente. Durante todo o período em que o sistema recebeu CO₂ puro, toda a clorofila extraída ficou adsorvida na sílica. Isto pode ser constatado pela limpidez das amostras coletadas e apresentadas na Figura IV.29 e confirmado pela absorvância zerada, na leitura com o espectrofotômetro. A Figura IV.28 destaca a forte interação soluto/adsorvente pela comparação com a curva sem o uso da sílica, traçada com os dados da Figura IV.23.

Na etapa de extração e adsorção em que apenas CO₂ puro foi usado como solvente, o comportamento da pilocarpina (Figura IV.26) foi semelhante ao da epiisopiloturina (Figura IV.27) e bem diferenciado do da clorofila. As curvas obtidas indicam que a sílica-gel adsorve apenas parte da massa de pilocarpina e de epiisopiloturina extraída das folhas. Uma comparação entre as curvas obtidas com adsorção e sem o adsorvente sugere que a retenção de pilocarpina no adsorvente é superior à da epiisopiloturina, indicando uma interação mais forte entre a sílica e a pilocarpina. Esses mecanismos de adsorção, entretanto, podem estar sendo influenciados pela adsorção

preferencial da clorofila, e ensaios de equilíbrio de adsorção dos componentes puros são necessários.



Figura IV.29. Fotografia das amostras obtidas na etapa de extração/adsorção realizadas com folhas de jaborandi utilizando CO₂ puro.

A forte interação da clorofila com a sílica se mantém mesmo na etapa de dessorção, no qual se utiliza CO₂ + 10% etanol. Isso pode ser constatado pela limpidez das duas primeiras amostras recolhidas (ver Figura IV.30) e pelo valor da absorbância, conforme Figura IV.28. A curva indica que apenas após a passagem de 250g de CO₂ é possível detectar clorofila no extrato.

As curvas de dessorção da pilocarpina e da epiisopiloturina também apresentam um período inicial sem a presença destes componentes. Esse período, entretanto, é menor do que o da clorofila e pode ser atribuído a um “volume morto” dentro do sistema.

Cessado o processo de extração de dessorção, observou-se, durante a retirada da sílica-gel de dentro do extrator, que ela não apresentava nenhum vestígio de coloração esverdeada, decorrente da adsorção de clorofila. Pode-se assumir, portanto, que a clorofila foi completamente removida da sílica.

Uma avaliação dos valores de absorbância acumulada da Figura IV.28, entretanto, lança dúvidas sobre o monitoramento de toda a operação. Observa-se que a massa total de

clorofila extraída (em termos de somatório de absorvância) no processo com adsorção é inferior ao da extração simples, com CO₂ puro. Essa constatação está baseada em apenas um ensaio, com cargas diferentes de folhas de jaborandi. Um planejamento experimental com várias repetições do ponto central daria maior confiabilidade estatística a essas conclusões. O mesmo dever ser feito em relação a pilocarpina e epiisopiloturina.



Figura IV.30. Fotografia das amostras obtidas na etapa de dessorção com CO₂ + 10% etanol.

IV.7.2. Pasta residual

A fim de avaliar uma possível separação de pilocarpina da epiisopiloturina sem a interferência da clorofila, programou-se um ensaio com a pasta residual. Uma nova carga de sílica-gel foi utilizada, pré-tratada em estufa a 105°C por 24 horas antes do experimento.

A operação extração/adsorção foi mantida até que um total de 1250g de CO₂ puro escorram pelo sistema. Nesse instante ativou-se a bomba do co-solvente, e outras 800g de CO₂ contendo 10% de etanol completaram a operação.

Os resultados deste estudo estão apresentados nas Figuras IV.31 e 32 respectivamente para a pilocarpina e epiisopiloturina. Para facilitar uma comparação, nas figuras também estão locados os pontos experimentais obtidos nas extrações correspondentes sem o estágio de adsorção, usando CO₂ puro.

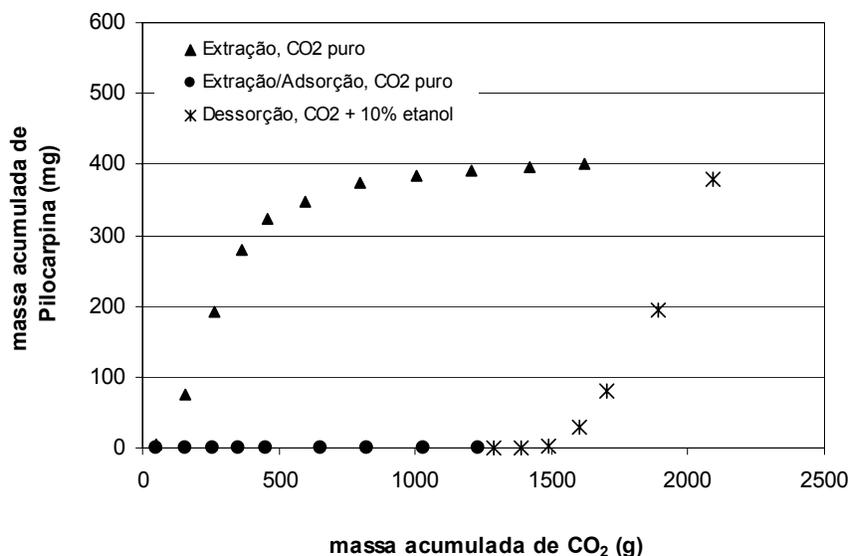


Figura IV.31. Curvas de adsorção/dessorção de pilocarpina da pasta residual a 60°C e 300 bar.

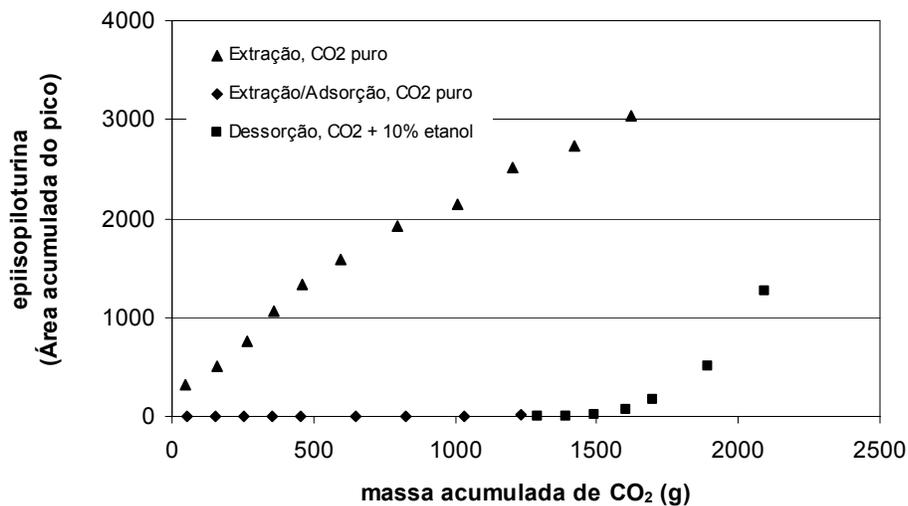


Figura IV.32. Curvas de adsorção/dessorção de epiisopiloturina da pasta residual a 60°C e 300 bar.

As curvas da massa coletada, tanto da pilocarpina como da epiisopiloturina, no primeiro estágio do processo, indicam que ambas têm muita afinidade com a sílica pois

ficaram completamente adsorvidas na mesma, quando CO₂ puro é o solvente. Esse comportamento contrasta com o que foi encontrado no ensaio com as folhas de jaborandi. Uma comparação entre os resultados do processo que usa adsorção aplicada às folhas e aplicada à pasta residual indica que existe uma competição pelos sítios de adsorção entre a clorofila e os alcalóides. A forte interação entre clorofila e sílica tende a prevalecer e destacar a adsorção da pilocarpina e epiisopiloturina. Essa situação abre perspectivas para uma otimização do processo e maximizar a extração desses dois componentes em um extrato livre de clorofila.

As curvas de dessorção têm um formato inicial ligeiramente diferente da dessorção constatada no processo com clorofila. Observa-se que o período sem a presença destes componentes é maior, o que pode ser consequência de vários fatores, como por exemplo, uma baixa capacidade de dessorção do CO₂ + 10% etanol, ou uma quantidade excessiva de adsorvente.

Uma comparação entre as figuras indica que a sílica-gel utilizada não se revelou um bom agente de separação entre a pilocarpina e a epiisopiloturina, pois elas apresentaram um comportamento semelhante de adsorção/dessorção. Será necessário um estudo exaustivo, procurando outros adsorventes e outras condições de operação (adsorção e dessorção) para poder separar esses dois princípios ativos. Os resultados preliminares aqui obtidos, entretanto, lançam dúvidas sobre essa possibilidade, pois fez-se uso de condições típicas de extração/adsorção e a sílica-gel é o adsorvente dotado de uma polaridade padrão adequada para esse objetivo.

CAPÍTULO V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

V.1. Conclusões

Essa pesquisa demonstrou ser possível extrair pilocarpina e epiisopiloturina de matrizes vegetais ou de resíduos industriais. As principais conclusões e tendências encontradas são listadas abaixo, e poderão servir para auxiliar na otimização do processo. Elas são válidas dentro dos limites de condições operacionais avaliadas, isto é, pressão de 200 e 300 bar e temperaturas de 40 a 60°C.

A. Com relação a extrações usando CO₂ puro:

1. Aumentos de pressão e de temperatura favorecem a extração de pilocarpina e epiisopiloturina.
2. A matriz que contem o princípio ativo tem grande influência no processo de extração: as folhas de jaborandi ofereceram maior resistência do que a pasta residual, e a 200 bar, aumentos de temperatura diminuem a extratibilidade da pilocarpina.
3. A recuperação de pilocarpina obtida na extração com folhas de jaborandi a 60°C e 300 bar, foi de apenas 15%, mas para a pasta alcançou 84,5%.
4. O extrato é contaminado por clorofila.

B. Com relação a extrações usando CO₂ + 10% etanol:

1. Aumentos de temperatura favorecem a extração a 300 bar.
2. A adição de 10% de etanol em massa ao CO₂ supercrítico favorece a extração da pilocarpina, epiisopiloturina e da clorofila das folhas de jaborandi e da pasta residual.
3. A recuperação de pilocarpina das folhas de jaborandi foi de 33%, e foi superior a 90%, da pasta.
4. A contaminação com clorofila foi cerca de 40% superior em relação a extração sem o co-solvente.

C. Com relação ao acoplamento de uma coluna de adsorção:

1. A sílica-gel tem grande capacidade de adsorção de pilocarpina, epiisopiloturina e clorofila em ambiente supercrítico com CO₂ puro.
2. A afinidade da clorofila pela sílica-gel é muito alta, deslocando o equilíbrio de adsorção da pilocarpina e epiisopiloturina em ambiente supercrítico com CO₂ puro.
3. A adição de 10% de etanol ao CO₂-SC desloca o equilíbrio de adsorção da clorofila, assim como da pilocarpina e epiisopiloturina, dessorvendo esses solutos da sílica-gel.

V.2. Recomendações para trabalhos futuros

1. Dar continuidade aos ensaios de extração com folhas de jaborandi com pressões e temperaturas mais altas e utilizando outros co-solventes de baixa toxicidade, lembrando que o emprego destes princípios ativos é farmacológico.
2. Investigar o fracionamento dos componentes de interesse pelo controle da descompressão.
3. Avaliar a influência de pré-tratamento das folhas (grau de moagem, condição de secagem, conteúdo de umidade, maceração parcial em etanol, etc).
4. Avaliar o efeito de altas temperaturas na desnaturação de pilocarpina em ambiente supercrítico.
5. Determinar isotermas de equilíbrio de adsorção em ambiente supercrítico para a pilocarpina e epiisopiloturina e seus contaminantes principais.
6. Avaliar outras combinações de extração/adsorção/dessorção (tipo de adsorventes, solventes e condições de lavagem) visando sobretudo separar a clorofila.
7. Estudar o acoplamento de outras etapas de purificação, para uma possível separação de pilocarpina e epiisopiloturina.
8. Fazer a modelagem do processo.
9. Determinar a solubilidade de pilocarpina e epiisopiloturina em fluido supercrítico, e encontrar a pressão de cruzamento.

10. Avaliar a viabilidade econômica da extração dos princípios ativos de folhas de jaborandi por fluido supercrítico.

CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N., MASSAFERA, P., EBERLIN, M. N., ZULLO, M. A. T., SAWAYA, A. C. H. F., Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21: 1205 - 1213, 2007.

ABIQUIF, Associação Brasileira da Indústria Farmacoquímica. Disponível em: <http://www.abiquif.org.br/PDFs/mercado.pdf>. Acessado em 04/08/2008.

AFRANE, G., CHIMOWITZ, E. H., Adsorption in near critical binary solvents mixtures: Thermodynamic analysis and data. *Fluid Phase Equilibria*, 3: 213 - 238, 1995.

AGRA, M. de F., ROCHA, E.A., FORMIGA, S.C., LOCATELLI, E. Plantas Medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba. Parte I Subclasse Asteridea. *Revista Brasileira de Farmácia*, 75: 61 – 64, 1994.

ANGUS, S. B. A., DEREUCK, K. M., *International Thermodynamic Tables of the Fluid State: Carbon dioxide*. Pergamon Press. Oxford, Inglaterra, 1976.

AVANCINI, G., ABREU, I. N., SALDAÑA, M. D. A., MOHAMED, R. S., MAZZAFERA, P., Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry*, 63: 171 - 175, 2003.

AZEVEDO, A. B. A., *Extração e recuperação dos princípios ativos do café utilizando solventes supercríticos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado).

BAHRAMIFAR, N., YAMINI, Y., SHAMSIPUR, M., Investigation on the supercritical carbon dioxide extraction of some polar drugs from spiked matrices and tablets. *Journal of Supercritical Fluids*, 35, 205 - 211, 2005.

BENTLEY, K.W. *The alkaloids-Part II, The chemistry of natural products*, vol. VII, Interscience Publishers John Wiley & Sons Inc., New York, USA, 1965.

BERNA, A., CHÁFER, A., MONTÓN, J. B., High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) + ethanol (2) + CO₂ (1). *Journal of Supercritical Fluids*, 19: 133 - 139, 2001.

BERNARDI, R., PERIN, C., BECKER, F. L., RAMOS, G. Z., GHENO G. Z., LOPES, L. R., PIRES, M., BARROS, H. M. T., Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. *Braz J Med Biol Res*; 35: 105 - 110, 2002.

BRENNECKE, J. F., TOMASKO, D. L. PESHKIN, J. ECKERT, C. A., Fluorescence spectroscopy studies of dilute supercritical solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 29: 1682, 1990.

BRUNETTI, M. L., DAGHETTA, A., ZANDERIGHI, A., Tecnologie di estrazione com fluidi supercritici. *Industrie Alimentari*; luglio-agosto; 593 - 603, 1985.

BRUNNER, G., Selectivity of supercritical compounds and entrainers with respect to model substances. *Fluid Phase Equilibria*, 10: 289 - 298, 1983.

BRUNNER, G., Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67: 21 – 33, 2005.

BUNDGAARD, H., FALCH, E., LARSEN, C., MOSHER, G. L., MIKKELSON, T. J., Pilocarpine prodrugs II. Synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties of sequentially labile pilocarpine acid diesters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (8): 775 - 783, 1986.

CHIMOWITZ, E. H., PENNISI, K. J., Process synthesis concepts for supercritical gas extraction in the crossover region. *AIChE Journal*, 32 (10): 1665 - 1676, 1986.

CHOI, Y. H., CHIN, Y. W., KIM J., JEON S. H., YOO K. P., Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. *Journal of Chromatography A*, 863: 47 - 55, 1999a.

CHOI, Y. H., KIM, Y. C., KIM, J., YOO, K. P., Selective extraction of ephedrine from *ephedra sicica* using mixtures of CO₂ and dietilamine and methanol, *Chromatographia*, 50: 673 - 679, 1999b.

CHOI, Y. H., KIM, J., KIM, J. K., JOUNG, S. N., YOO, K. P., CHANG, Y. S., Modifier effects on supercritical CO₂ extraction efficiency of cephalotaxine from *cephalotaxus wilsoniana* Leaves. *Archives of Pharmacal Research*, 23: 163, 2000.

CHUNG, P-H., CHIN, T-F., LACH, J. L., Kinetics of the hydrolysis of pilocarpina in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutica Sciences*, 59 (9), 1300 - 1306, 1970.

CLIFFORD, T., *Fundamentals of Supercritical Fluids*. Oxford University Press, Inglaterra, 1998.

CORRÊA, M. P., *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasil, 123 - 129, 1984.

CORZO, C. T., KUMARAN, C. V., CHIMOWITZ, E. H. Experimental study of retrograde adsorption in supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 17: 25 - 33, 2000.

COSENTINO, H. M., *Proposta de substituição do uso de benzeno na obtenção de sais de pilocarpina a partir de folhas de pilocarpus jaborandi h*. São Paulo, Universidade Mackenzie, mestrado em Saneamento Ambiental, Dissertação, 1998.

DAINTREE, L. S., KORDIKOWSKI, A., YORK, P., Separation processes for organic molecules using SCF technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50: 351 - 372, 2008.

DAVIES, A. N., BROADLEY, K., BEIGHTON, D., Xerostomia in patients with advanced cancer. *J. Pain Symp. Manag.*, 22: 820 – 825, 2001.

DEBENEDETTI, P. G., PETSCHÉ, I. B. and MOHAMED, R. S., Clustering in supercritical mixtures: theory, applications and simulations. *Fluid Phase Equilibria*, 52: 347, 1989.

DEWICK, P. M., *Medicinal Nature Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, 1997.

DI STASI, L. C., *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo. Ed. UNESP, 230, 1996.

DOBBS, J. M., WONG, J. M., JOHNSTON, K. P., Nonpolar co-solvents for solubility enhancement in supercritical fluids carbon dioxide. *J.Chem. Eng. Data*, 31: 303 - 308, 1986.

DOMINGO, C., GARCIA-CARMONA J., FANOVICH, M. A., LLIBRE, J. RODRIGUEZ-CLEMENTE R., Single or two solute adsorption processes at supercritical conditions: an experimental study; *The Journal of Supercritical Fluids*, 21: 147 - 151, 2001.

FAN, T. Y., WALL, G. M., STERNITZKE, K., BASS, L., MORTON, A. B., MUEGGE, E., Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions importance of octadecylsilane column choice. *Journal of Chromatography A*, 740: 289 - 295, 1996.

GURDIAL, G. S., MACNAUGHTON, S. J., TOMASKO, D. L., FOSTER, N. R., Influence of chemical modifiers on the solubility of o- and m-hidroxybenzoic acid in supercritical CO₂. *Ind. Chem. Eng. Res.*, 32: 1482, 1993.

HAMBURGER, M., BAUMANN, D., ADLER, S., Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants – Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, 15: 46 - 54, 2004.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). 1992. Portaria No. 06N. Janeiro 15. *Diário Oficial*, Brasília, 870 - 872, 1992.

INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Disponível em: http://www.inpa.gov.br/noticias/noticia_sгно2.php?codigo=60. Acessado em 20/08/2008.

LANG, Q., WAI, C. M., Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. *Talanta*, 53: 771 - 782, 2001.

LIM, S.; RIZVI, S. S. H., Adsorption and desorption of cholesterol in continuous supercritical fluid processing of anhydrous milk fat. *Journal of Food Science*, 61: 817 - 820, 1996.

LUQUE DE CASTRO, M. D., GARCIA-AYUSO, L. E., Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369: 1 - 10, 1998.

MARR, R., GAMSE, T., Use of supercritical fluids for different processes including new developments – A review. *Chemical Engineering and Processing*, 39: 19 - 28, 2000.

McHUGH, M. A., KRUKONIS, V. J., *Supercritical fluid extraction: Principles and practice*. Butterworths Pub; Boston; MA; 1994.

MERCK., *An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals*. Merck & Co. New Jersey, 1983.

MIGDAL, C., Glaucoma medical treatment: philosophy, principles and practice. *Eye*, 14: 515 – 518, 2000.

MINGOIA, Q., *Química Farmacêutica*, Universidade de São Paulo, 274 – 273, 1967.

MOHAMED, R. S., HALVERSON, D. S., DEBENEDETTI, P. G., PRUD'HOMME, R., Solid formation after the expansion of supercritical mixtures. *ACS Symposium Series*, Cap. 23, 355 - 378, 1989.

MOHAMED, R. S., SALDAÑA, M. D. A., SOCANTAYPE, F. H., KIECKBUSCH, T. G., Reduction in cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. *Journal Supercrit. Fluids*, 16, 225, 2000.

NEVILLE, G. A., HASAN, F. B., SMITH, I. C. P., Stereoselective epimerization of pilocarpine in aqueous solution as determined by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can. Journal Chem*, 54: 2094 – 2100, 1975.

NUSAIR S., RUBINOW A., The use of oral pilocarpine in xerostomia and Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*; 28: 360 - 67, 1999.

OLIVEIRA F., AKISUE, G., AKISUE, M. K., *Farmacognisia*, Editora Atheneu, São Paulo – Brasil, p. 216, 412; 1991.

PAPA, D. C. P., *Fracionamento do óleo de palma com dióxido de carbono supercrítico*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; DE PAULA, I. C., New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 51 - 55, 1999.

PINHEIRO, C. U., Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus* Stapf Ex Holm., Rutaceae) no Maranhão, Brasil. *Acta Bot. Brás*, 16: 141 - 150, 2002.

RIZZINI, C. T., MORS, W., *Botânica Econômica Brasileira*. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural Edições Ltda, 1995.

SALDAÑA, M. D. A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R. S., Extraction of purine alkaloids from maté plant *Ilex paraguariensis* using supercritical CO₂. *Journal of Agric. and Food Chemistry*, 47: 3804 - 3808, 1999.

SALDAÑA, M. D. A., *Extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos*. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Tese (Doutorado), 2002.

SAWAYA, A.CH.F., ABREU, I. N., ANDREAZZA, N. L., EBERLIN, M. N., MAZZAFERA, P., HPLC-ESI-MS/MS of imidazole alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules*, 13: 1518 – 1529, 2008.

SCHAEFFER S. T., ZALKOW L. H., TEJA A. S., Solubility of monocrotaline in supercritical carbon-dioxide and carbon-dioxide ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 43: 45 - 56, 1988.

SCHAEFFER, S. T.; ZALKOW, L. H., TEJA, A. S., Supercritical fluid isolation from *crotolaria spectrabilis* using ion exchange resins. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 28: 1017 - 1020, 1989.

SCHEERER, J., *Untersuchungen zum Einfluss exogener und endogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardleworth unter natürlichen Bedingungen*. Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg. Tese de Doutorado. 2001.

SKOOG, D. A., LEARY, J. J., *Principles of Instrumental Analysis*, 4^a ed., Saunders College Publ, Philadelphia, 670 - 671, 1992.

SOARES, R. R. S., *Estudo de propriedades da clorofila A e da feofitina A visando a terapia fotodinâmica*. Maringá, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá. Dissertação (Mestrado), 2006.

SOUZA FILHO, J. P. F., DIAS, A. B. T., FILHO, A. A. S. L., SARTORI, M. F., MARTINS, M. C., A evolução do mercado farmacêutico brasileiro no tratamento do glaucoma nos últimos 30 anos; *Arq. Bras. Oftalmol*, 66: 811 - 817, 2003.

STERNITZKE, K. D., FAN, T. Y. DUNN, D. L., High-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine hydrochloride and its degradation products using a β -cyclodextrin column. *Journal of Chromatography*, 589: 159 - 164, 1992.

STUART, I. A., MACLACHLAN, J., MCNAUGHTAN, A., Compounds of agricultural significance using environmental analytical supercritical fluid extraction. *Analyst*, 121 (1996) 11R.

SWAN, G. A., *An Introduction to the alkaloids*. Blackwell Sc. Publ., Inglaterra, 188 - 192, 1967.

TAVEIRA, F. S. N., ANDRADE E. H. A., LIMA W. N., Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 27 - 31, 2003.

TAYLOR, L. T., *Supercritical Fluid Extraction*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1996.

TAYLOR S. E., AL-HASHIMI I., Pilocarpine, an old drug; A new formulation. *Texas Dental Journal*, 113 (10-12): 9 - 13, 1996.

TING, S. S. T., MACNAUGHTON, S. J., TOMASKO, D. L., FOSTER, N. R., Solubility of naproxen in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* 32: 1471 - 1481, 1993.

VILEGAS, J. H. Y., DE MARCHI, E., LANCAS, F. M., Extration of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) form *Mikania glomerata* ("Guaco") leaves. *Phytochemical Analysis*, 8: 266 - 270, 1997.

VOIGTLANDER, H. W., BALSAM, G., ENGELHARDT, M., POHL, L., Epiisopiloturin, ein neues *Pilocarpus* – Alkaloid. *Arch. Pharm.* 311: 927 - 935, 1978.

WANG, L., WELLER, C. L., Recent advances in extraction of nutraceutical from plants. *Trend in Food Science & Technology*. 17: 300 - 312, 2006.

WEBSTER, A. R., LUFF, A. J., CANNING, C. R., ELKINGTON, A. R., The effect of Pilocarpine on glaucomatous visual-field. *Brit. J. Ophthalm.* 77: 721 – 725, 1993.

WYNN, R. L., Oral pilocarpine (salagen): a recently approved salivary stimulant. *Gen. Dent.* 44: 29 – 30, 1996.

YANG, C., XU, Y-R., YAO, W-X., Extration of pharmaceutical components from ginkgo biloba leaves using supercritical carbon dioxide. *Journal Agric. Food Chem*, 50: 846 - 849, 2002.

ZHONG, M., HAN, B., YAN, H., PENG, D., Effect of ethanol and n-octane on solubility of stearic acid in the supercritical CO₂. *Fluid Phase Equilibria*, 134: 175 - 183, 1997.

APÊNDICE A. CROMATOGRAMAS

Pk #	Retention Time	Area
1	4.5	8411876

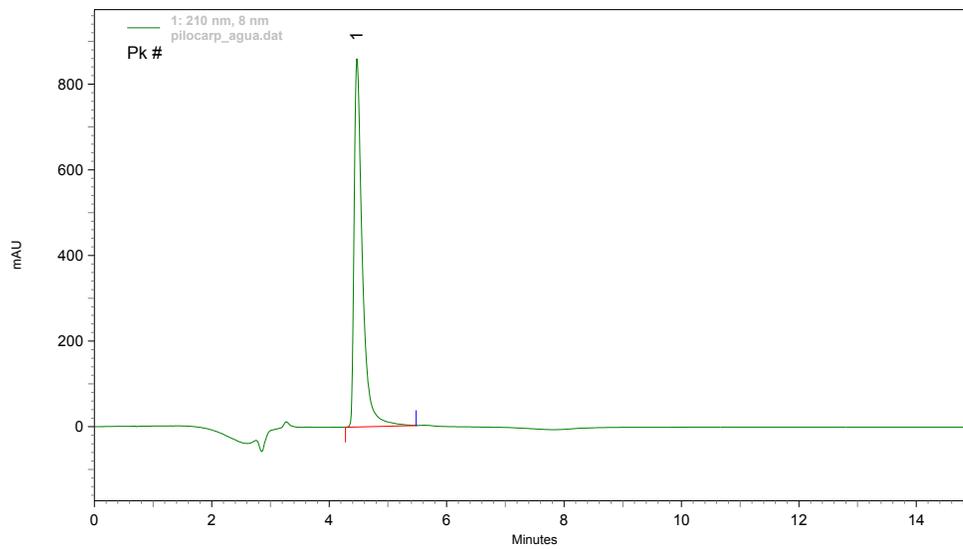


Figura A.1. Cromatograma do padrão de pilocarpina diluída em água.

Pk #	Retention Time	Area
1	5.5	12596653
2	7.1	113699

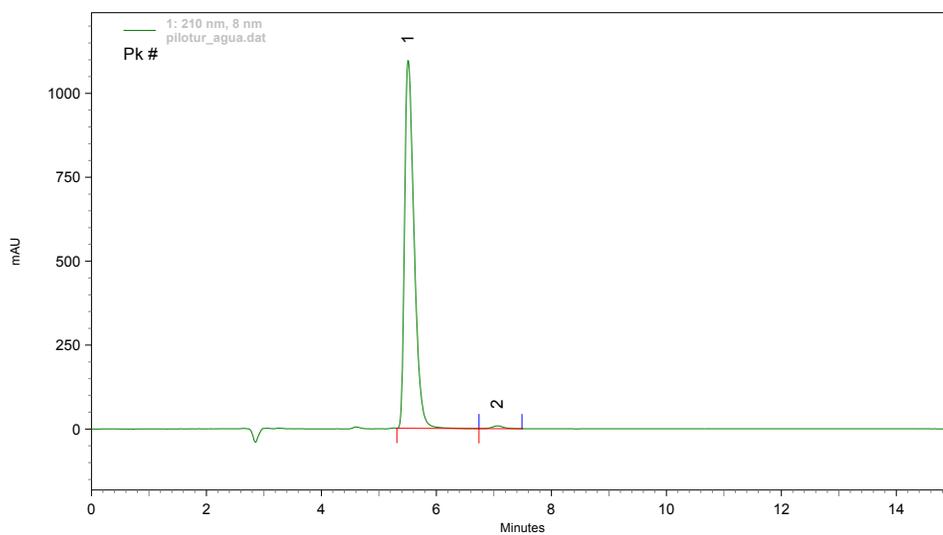


Figura A.2. Cromatograma do padrão de epiisopiloturina diluída em água.

Pk #	Retention Time	Area
1	3.5	6281609
2	3.6	5055338

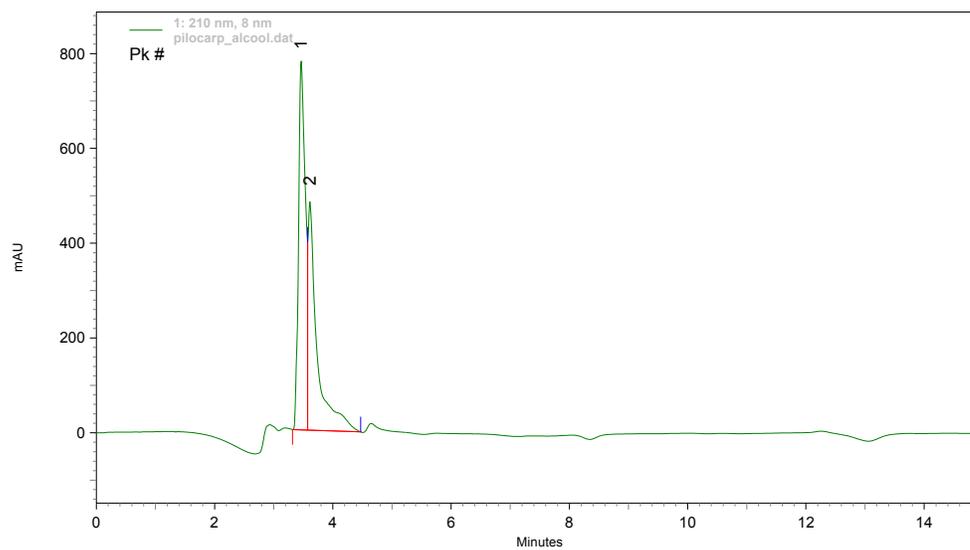


Figura A.3. Cromatograma do padrão de pilocarpina diluída em etanol.

Pk #	Retention Time	Area
1	2.9	416564
2	3.8	5590646
3	4.8	629868
4	5.6	1133002

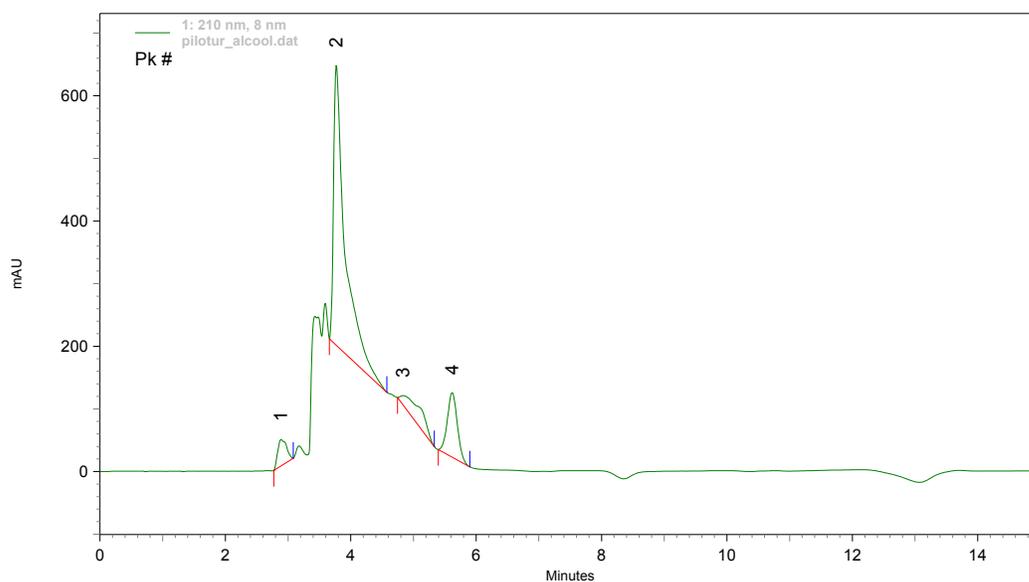


Figura A.4. Cromatograma do padrão de episopiloturina diluída em etanol.

Pk #	Retention Time	Area
1	4.5	4786002
2	5.5	7980712
3	7.1	1001950
4	12.5	1753428

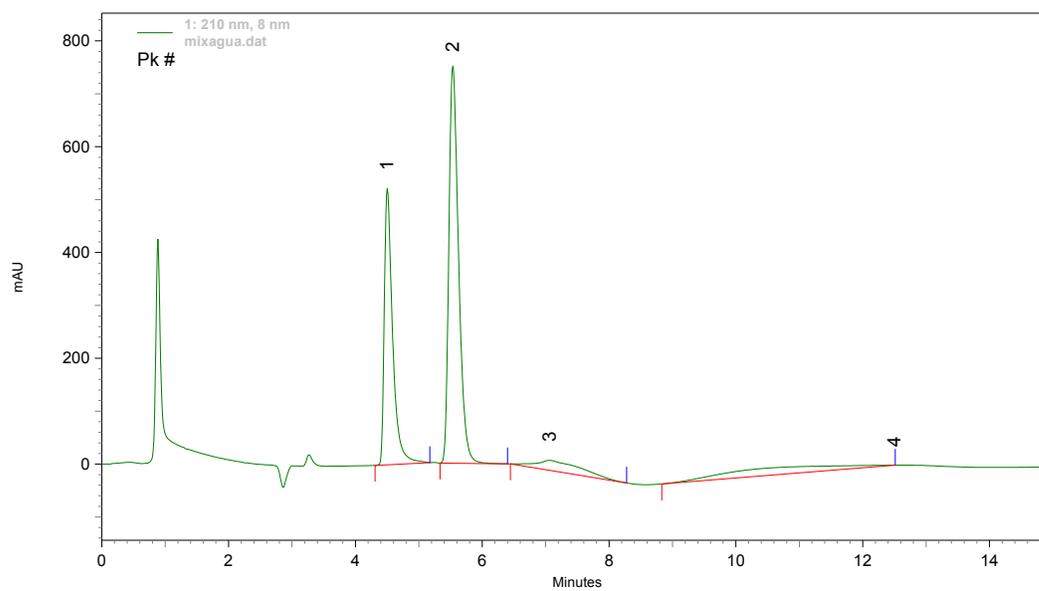


Figura A.5. Cromatograma da mistura dos padrões de pilocarpina e de episopiloturina diluída em água.

Pk #	Retention Time	Area
1	3.5	4696117
2	3.7	839299
3	4.0	847374
4	4.6	38421
5	5.0	284069
6	5.6	538454
7	7.9	48105
8	9.0	140340
9	12.1	165571
10	13.7	303485

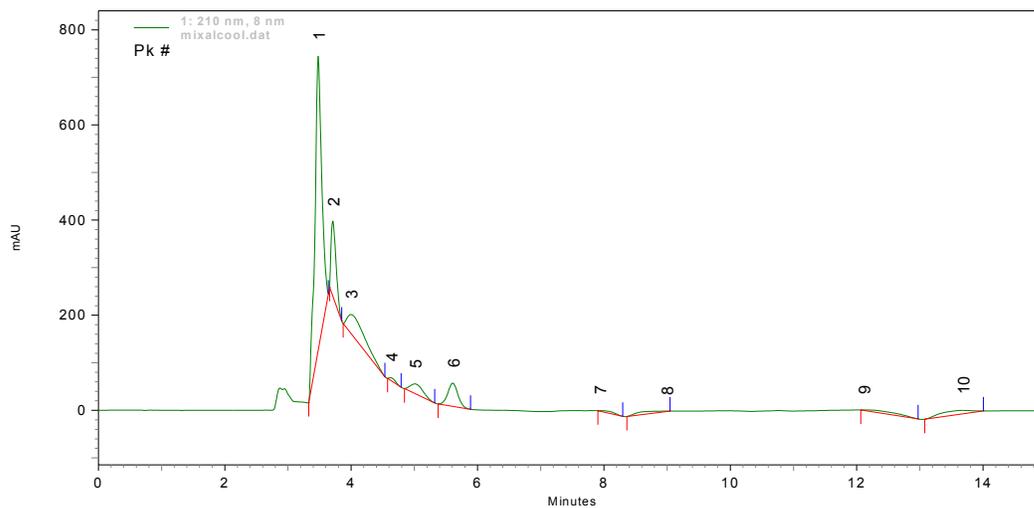


Figura A.6. Cromatograma da mistura dos padrões de pilocarpina e de episopiloturina diluída em etanol.

APÊNDICE B. EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

O equipamento de extração supercrítica do Laboratório EXTRAE/FEA/UNICAMP é apresentado na Figura B.1. No extrator deste equipamento de extração supercrítica foi colocado 2 g de padrão de pilocarpina misturado com esferas de vidro.

Este ensaio não permitiu encontrar a solubilidade da pilocarpina, pois a válvula de bloqueio pela qual ocorria a depressurização que levaria o material ao coletor, era mantida submersa em água aquecida e as condições de temperatura utilizadas não foram capazes de impedir a solidificação da pilocarpina na válvula, bloqueando a passagem do fluido. Maiores informações sobre o equipamento e o procedimento de extração podem ser encontradas em Papa (2007).

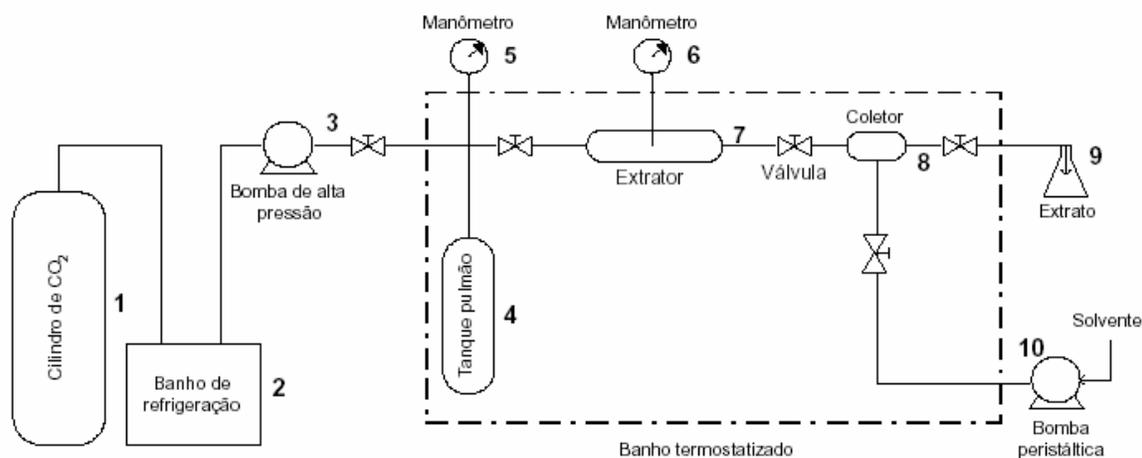


Figura B.1. Equipamento de extração supercrítica da EXTRAE/FEA (método estático).

APÊNDICE C. CURVAS DE ABSORBÂNCIA DA CLOROFILA A

A Figura C.1, apresenta as curvas de absorvância na região visível do espectro obtidas com extratos de diferentes curvas de extração para determinação de clorofila. A absorvância foi monitorada no comprimento de onda de 666 nm.

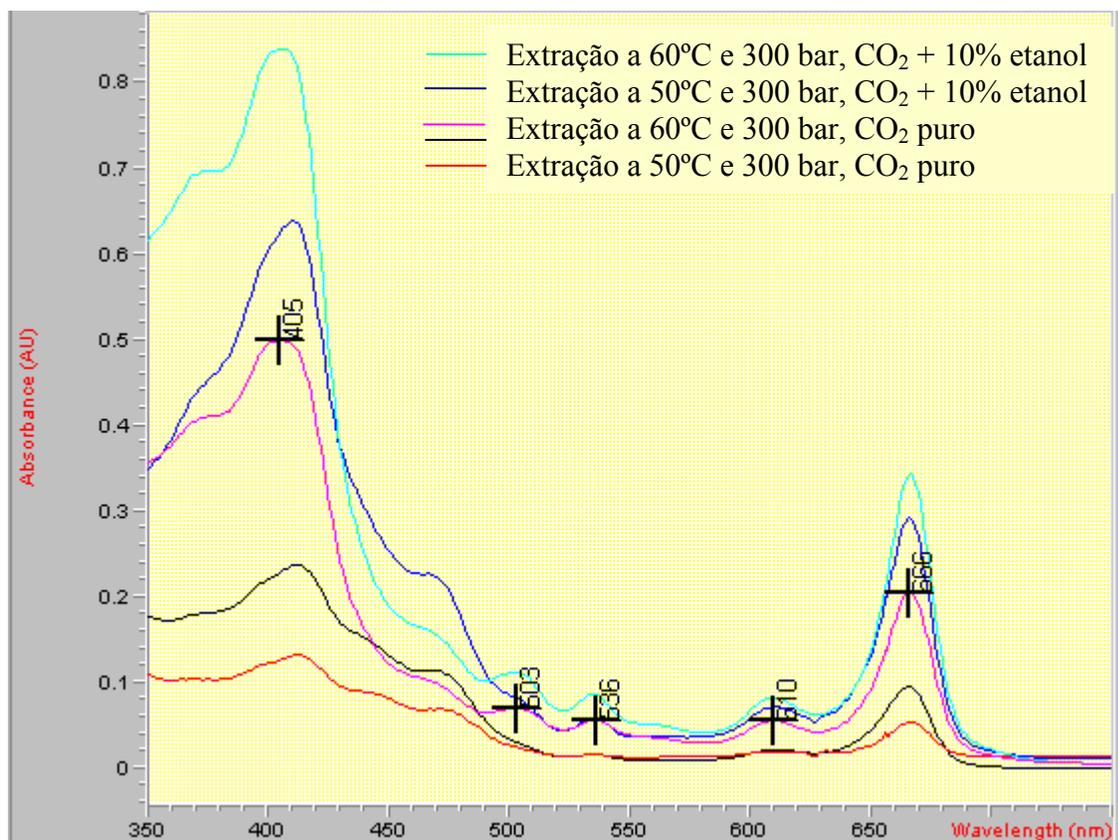


Figura C.1. Espectrofotômetro da absorvância da clorofila das extrações supercríticas da folha de jaborandi a 300 bar.

APÊNDICE D. SOLUBILIDADE EFETIVA

A solubilidade da pilocarpina e da epiisopiloturina foi calculada através da inclinação na parte inicial das curvas de extração dos princípios ativos da pasta residual. É importante salientar que esta solubilidade deve ser considerada efetiva pelo fato de não ter sido determinada usando os princípios ativos puro, e, no caso da pasta, incluir o efeito de outros componentes na pressão de vapor.

a. Pilocarpina

A Figura D.1 apresenta a solubilidade efetiva da pilocarpina (mg de pilocarpina/ g CO₂). As curvas são bem definidas para cada pressão e mostram que a uma pressão constante o aumento de densidade (que é consequência da diminuição da temperatura) desfavorece a extração de pilocarpina.

A variação da solubilidade com a densidade é mais intensa a 300 bar do que a 200 bar.

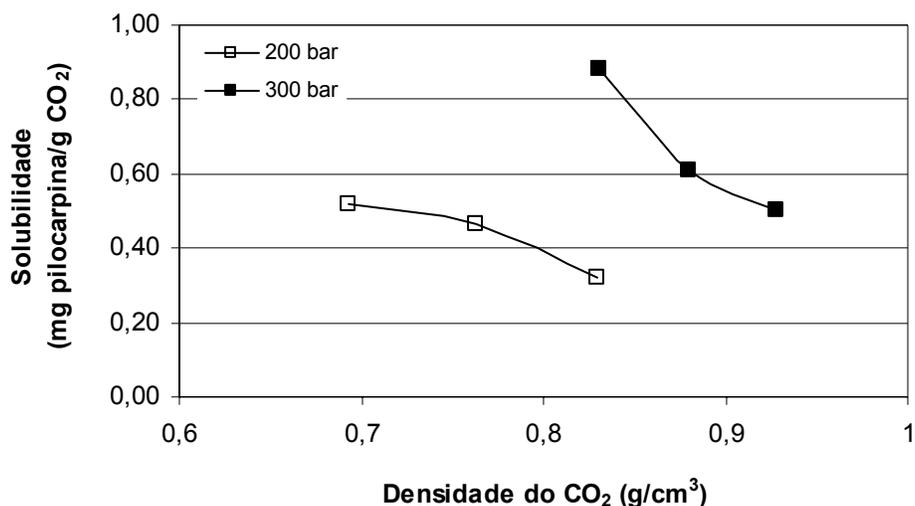


Figura D.1. Solubilidade efetiva da pilocarpina em função da densidade do CO₂.

b. Epiisopiloturina

A variação da solubilidade efetiva da epiisopiloturina em termos de área do pico/ g CO₂ em função da densidade do CO₂ é apresentada pela Figura D.2. Da mesma forma que com a pilocarpina, os valores de solubilidade da epiisopiloturina na pressão de 200 bar foram inferiores aos encontrados para a pressão de 300. O formato das duas curvas é semelhante às da pilocarpina (Figura D.1). Em cada nível de pressão, os dois princípios ativos têm o mesmo comportamento em relação à densidade do CO₂, dificultando dessa forma sua separação.

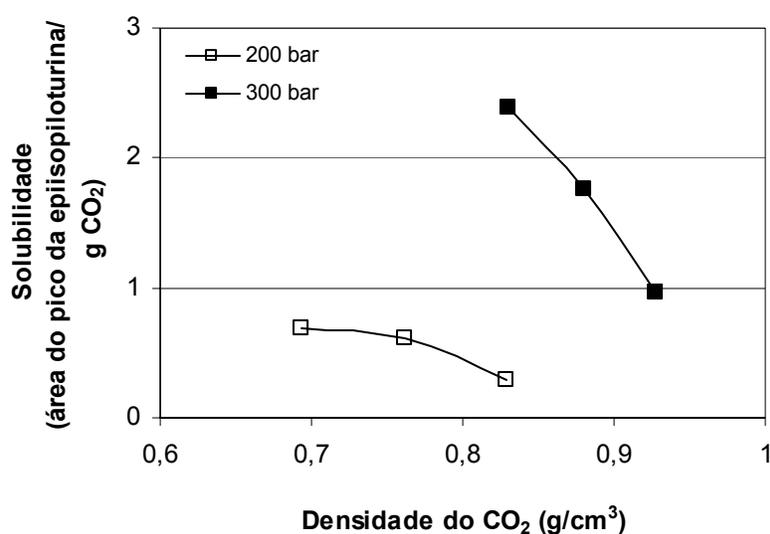


Figura D.2. Variação relativa da solubilidade efetiva da epiisopiloturina em função da densidade do CO₂.