

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENGENHARIA DE PROCESSOS



**EXTRAÇÃO DE ALCALÓIDES DE
PRODUTOS NATURAIS COM FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS**

Marleny Doris Aranda Saldaña

Autora

Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed

Orientador

Dissertação de Tese de Doutorado
apresentada à Faculdade de Engenharia
Química como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.

Campinas - São Paulo - Brasil
Fevereiro/2002

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCUIII ANTF

UNIDADE	CE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ar14e
V	48085
	16-837/02
PREÇO	R\$ 110,00
DATA	11/04/02
INCL. C.F.P.D.	

CM001657B4-2

BID 235723

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

Ar14e

Aranda Saldaña, Marleny Doris

Extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos. / Marleny Doris Aranda Saldaña.-- Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Rahoma Sadeg Mohamed.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Alcalóides. 2. Extração com fluido supercrítico. 3. Produtos naturais. 4. Cacau. 5. Guaraná. I. Mohamed, Rahoma Sadeg. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida por Marleny Doris Aranda Saldaña e aprovada em 5 de Fevereiro de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



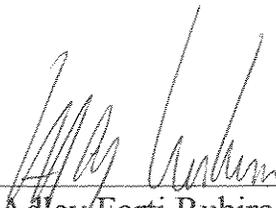
Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed
DTF/FEQ-Unicamp (Orientador)



Prof. Dr. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa
DEQ-UFRJ (titular)



Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
DEA/FEA-Unicamp (titular)



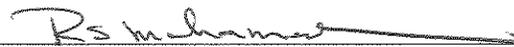
Prof. Dr. Adley Forti Rubira
Dep. Química-UEM (titular)



Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel
DPQ/FEQ-Unicamp (titular)

724425

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química, defendida pela Ms Eng. Marleny Doris Aranda Saldaña e aprovada pela banca examinadora em Fevereiro de 2002.



Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed

Orientador

PENSAMENTO

*“Não sei como o mundo me vê,
mas eu me sinto como uma
pessoa brincando na praia,
contente em achar aqui e ali
uma pedrinha mais lisa ou uma
concha mais bonita, tendo
sempre diante de mim, ainda por
descobrir, o grande oceano da
verdade”*

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Antonio e Olga Teresa,
Aos meus irmãos, Edwin e José Miguel
Ao meu esposo Rodrigo*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Rahoma Sadeg Mohamed pela valiosa orientação imprescindível para a boa qualidade desta tese de doutorado, pelas discussões e direcionamento eficaz, que contribuíram na minha formação como pesquisadora, e pela grande amizade durante todos estes anos,

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela amizade e discussões constantes, pela disposição durante o andamento da pesquisa,

Ao Prof. Dr Theo Guenter Kieckbush pela grande amizade e apoio constante, incondicional durante minha permanência no Brasil,

Ao Prof. Dr Gerd Brunner por me permitir trabalhar na Planta Piloto de Extração Supercrítica de TUHH (Alemanha), pelas discussões e apoio incondicional. Ao Dr. Carsten Zetzt pelas discussões e o trabalho em conjunto. A Monika Johannsen pela acolhida e as discussões. Aos técnicos Waldemar, Marianne e Kathrine pela ajuda constante. A Stefanie Meyer, Martin Jungster, Érika van Riesene, Jamal Bahkaheda pela amizade.

Ao Prof. Dr Cor Peters pela disposição e gentileza de disponibilizar o Laboratório de Termodinâmica Aplicada de TU-Delft (Holanda) para execução de experimentos com fluidos supercríticos. Ao Dr. La Maat pelas valiosas discussões sobre a pilocarpina. A Hans Raquel, Érika e Adri pelo apoio durante minha permanência na Holanda,

Aos senhores membros da banca examinadora, pelo aceite e indispensáveis contribuições a este trabalho,

Ao Técnico do DTF, senhor Levi pelo auxílio no Laboratório de Engenharia de Processos-FEQ, Unicamp,

A Família Marins Peixoto Siloto pelo carinho e incentivo constante,

A secretária da FEQ, Rosa e do DTF, Márcia pela pronta disposição em ajudar,

Aos amigos Sergio Bernardo, Lecsi Romero, Juan José Lovón, Juliana de Souza, Glicia Santos, Edna Santiago e Miriam Hinostroza da Unicamp pela amizade e apoio incondicional,

*Aos amigos do laboratório do LEP-FEQ, Unicamp pela amizade,
A FAPESP, CAPES e FAEP, pela ajuda financeira dispensada durante minha
pesquisa de doutorado e me permitir participar dos congressos
internacionais,*

*Ao Senhor Manoel da Silva Cravo da EMBRAPA de Manaus-Amazônia
Occidental (Manaus, Brasil) pela doação das sementes de guaraná.*

*A Janira Maria Bullões, do departamento de controle de qualidade da
CARDILL Ltda. (Bahia, Brasil) pela doação das amêndoas de cacau,*

A Senhora Célia da QUINES Ltda. (SP, Brasil) pela doação do jaborandi,

A White Martins pela doação de dióxido de carbono liquefeito,

À Faculdade de Engenharia Química pelo aceite no curso de doutorado,

Aos amigos,

A DEUS ... pela força espiritual sempre presente.

Muitíssimo Obrigada

RESUMO

Alcalóides são compostos orgânicos encontrados em produtos naturais que podem produzir efeitos fisiológicos no organismo humano. Dependendo da dose utilizada, tais efeitos podem ser tóxicos ou terapêuticos. Cafeína, teofilina, teobromina, pilocarpina, entre outros, são alcalóides utilizados em medicamentos e processos para extraí-los de produtos naturais são de grande interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. O objetivo geral desta Tese de Doutorado foi obter dados experimentais com o intuito de gerar subsídios que contribuam na compreensão adequada do processo de extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos. Os alcalóides considerados neste estudo incluem a cafeína encontrada em folhas de chá mate *Ilex paraguariensis* e nas sementes de guaraná *Paullinia cupuana*, a teofilina presente nas folhas de chá mate, a teobromina encontrada nas amêndoas de cacau *Theobroma cacao* e a pilocarpina presente nas folhas de jaborandi *Microphyllus jaborandi*. Foi estudada também a extração de gordura de cacau com fluidos supercríticos a partir das amêndoas de cacau moídas. Visando fornecer subsídios para o entendimento do comportamento nas matrizes complexas de plantas naturais e identificar as variáveis termodinâmicas que influenciam e controlam a solubilidade, foram estudados os sistemas binários de cafeína/CO₂SC, teofilina/CO₂SC e teobromina/CO₂SC.

Os dados experimentais foram obtidos em diversos aparelhos de extração a alta pressão no Laboratório de Engenharia de Processos da Faculdade de Engenharia Química (Unicamp, Brasil), na Planta Piloto de Extração Supercrítica da Faculdade de Processos Térmicos (TUHH, Alemanha), e no Laboratório de Termodinâmica Aplicada (TU-Delft, Holanda). O teor de alcalóides nas amostras iniciais e finais assim como nos extratos obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram usadas ainda técnicas de caracterização e análise, como a cromatografia de camada delgada, a cromatografia gasosa e a calorimetria diferencial de varredura.

Os dados experimentais dos sistemas binários, cafeína/CO₂SC, teobromina/CO₂SC e teofilina/CO₂SC, mostram que as solubilidades da cafeína no CO₂ supercrítico são maiores que as da teofilina e são aproximadamente duas ordens de magnitude maiores que as da teobromina. Foi possível a extração de metilxantinas de produtos naturais usando CO₂ supercrítico. Porém, as solubilidades em sistemas binários de CO₂/metilxantinas foram maiores que as solubilidades encontradas durante a extração de metilxantinas dos produtos naturais devido à presença de outros componentes e formação de complexos com o alcalóide. Influências significativas de pressão e temperatura na extração de metilxantinas dos produtos naturais foram observadas, enquanto que a variação da vazão mostrou pouco ou nenhum efeito no processo de extração na faixa estudada. As curvas de extração mostraram a existência de três regiões distintas: a primeira, dependente da solubilidade termodinâmica, a segunda intermediária e a terceira controlada pela difusão. Foi possível também fracionar a manteiga de cacau usando CO₂ e etano supercrítico, mostrando-se este último solvente mais eficiente. Esta diferença na extração usando dióxido de carbono e etano supercrítico pode ser atribuído às forças intermoleculares. Em escala industrial, no entanto, a escolha do solvente deve levar em consideração o elevado preço do etano em relação ao CO₂. Ao extrair as metilxantinas e a manteiga de cacau das amêndoas de cacau moídas, períodos de extração relativamente curtos foram observados para a remoção da manteiga de cacau quando comparados com a extração de cafeína e teobromina.

Usa-se a técnica de anti-solventes com fluidos supercríticos para a extração da pilocarpina hidrocloreada, sendo necessário o estudo do sistema quaternário: pilocarpina hidrocloreada/álcool/água e CO₂ como anti-solvente, que apresentou bons resultados na cristalização da pilocarpina. Para determinar a solubilidade do alcalóide no CO₂SC foram também usadas equações de estado e correlações baseadas na densidade.

Este trabalho contribuiu tanto na extração de produtos de interesse comercial, como por exemplo, os alcalóides quanto para o fornecimento de dados experimentais para um melhor controle do processo para extração destes princípios ativos de plantas naturais.

Palavras-chave: Extração supercrítica, alcalóides, metilxantinas, etano supercrítico, produtos naturais, chá mate, guaraná, cacau, jaborandi, modelos termodinâmicos, anti-solventes.

ABSTRACT

Alkaloids, organic compounds found in natural products, can produce physiological effects in the organism. These effects can be toxic or therapeutic depending on the quantity used. Caffeine, theophylline, theobromine, pilocarpine among others are used in pharmaceutical products. Processes for the extraction of alkaloids from natural plants are of great importance in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. The objective of this thesis was to obtain experimental data on the extraction of alkaloids from natural products with supercritical fluids. The alkaloids considered in this study were: caffeine as found in leaves of chá mate *Ilex paraguariensis* and guaraná seeds *Paullinia cupuana*, theophylline as found in leaves of chá mate, theobromine as found in cocoa beans *Theobroma cacao* and pilocarpine as found in the leaves of jaborandi *Microphyllus jaborandi*. Cocoa butter was also extracted from cocoa beans with supercritical fluids. Binary systems of caffeine/Supercritical CO₂, theophylline/Supercritical CO₂ and theobromine/Supercritical CO₂ were also studied to provide information that could be of help when examining extraction behavior in complex matrixes of natural plants and on the clear identification of the effects of some thermodynamic variables on the solubility of the methylxanthines in the supercritical solvent.

Experimental data were obtained in three different high pressure apparatus, one is the Process Engineering Laboratory of the School of chemical engineering (Unicamp, Brazil), another is the pilot plant of supercritical extraction of the Faculty of Thermal Processes at the Technical University of Hamburg-Hrburg (TUHH, Germany), and the third is an equilibrium data apparatus in the Laboratory of Applied Thermodynamics (TU-Delft, Holland). The quantities of alkaloids in the initial and final samples and in the extracts obtained were analyzed by high performance liquid chromatography. Techniques for characterization and analysis such as thin chromatography, gas chromatography and differential scanned calorimeter were also used to characterize extraction sample and products.

Experimental data of binary systems, caffeine/SCCO₂, theobromine/Supercritical CO₂ and theophylline/Supercritical CO₂, showed that the solubilities of caffeine in supercritical CO₂ were higher than those obtained with theophylline and are two orders of magnitude higher than those of theobromine. Solubilities in these binary systems of CO₂/methylxanthine were higher than those found from the extraction of methylxanthines from natural products due to the presence of other compounds and formation of complexes of the alkaloid in plant matrix. Effects of pressure and temperature on the extraction of methylxanthines from natural products were significant, while the variation of the flow rate showed little or no effect on the extraction process within the range of conditions tested. The extraction curves showed the existence of three different regions: a thermodynamic solubility dependent, an intermediate and a diffusion-controlled.

The fractionation of cocoa butter using supercritical CO₂ and ethane showed that ethane is more efficient. This difference in the extraction process can be attributed to intermolecular forces. In the extractions of methylxanthines and cocoa butter from ground cocoa beans, short extraction times were necessary for the removal of cocoa butter when compared with caffeine and theobromine extraction.

The use of the anti-solvent technique with supercritical fluids for the extraction of pilocarpine hydrochloride required the study of the quaternary system formed by pilocarpine

hydrochloride/alcohol/water and CO₂ as anti-solvent, which presented good results in the separation of pilocarpine crystals. For alkaloid solubility in Supercritical CO₂, both equation of states and density relations can be used to successfully correlate the data.

This work has contributed to provide data that would enhance a better understanding of the extraction process of alkaloids and in general all active principles from natural plants.

Key-words: Supercritical extraction, alkaloids, supercritical ethane, natural products, thermodynamic models, anti-solvent.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
SUMÁRIO	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
NOMENCLATURA	xxiii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	9
CAPÍTULO III - REVISÃO DA LITERATURA	11
III.1. Alcalóides.....	11
III.1.1. Alcalóides purínicos.....	11
III.1.1.1. Propriedades físicas e fisico-químicas das purinas.....	12
III.1.1.2. Propriedades farmacológicas.....	13
III.1.2. Alcalóide pilocarpina.....	16
III.1.2.1. Propriedades físicas e fisico-químicas da pilocarpina e isopilocarpina.....	17
III.1.2.2. Degradação da pilocarpina.....	18
III.1.2.3. Análise da pilocarpina.....	22

III.1.2.4. Efeitos farmacológicos da pilocarpina.....	23
III.2. Plantas naturais estudadas.....	25
III.2.1. Chá mate <i>Ilex paraguariensis</i>	25
III.2.2. Guaraná <i>Paullinia cupana</i>	30
III.2.3. Cacao <i>Theobroma cacao</i>	36
III.2.4. Jaborandi <i>Pilocarpus microphyllus</i>	41
III.3. Tecnologia para extração de alcalóides.....	45
III.4. Uso de fluidos supercríticos na extração de alcalóides.....	48
II.4.1. Uso de anti-solventes supercríticos (SAS).....	52
III.5. Técnicas experimentais usadas em extrações à alta pressão.....	54
III.6. Forças intermoleculares.....	61
<i>CAPÍTULO IV - MATERIAIS E METODOS</i>	67
IV.1. Materiais.....	67
IV.2. Sistemas de extração supercrítica.....	68
IV.2.1. Aparelho de extração supercrítica do Laboratório de Engenharia de Processos da UNICAMP.....	68
IV.2.2. Aparelhos de micro e macroextração da Planta Piloto da Alemanha.....	72
IV.2.2.1. Equipamento de Macro-extração.....	72
IV.2.2.2. Equipamento de Micro-extração.....	73
IV.2.3. Aparelho Cailletet do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio de Fases da Holanda.....	74
IV.3. Métodos experimentais.....	76
IV.3.1. Para obtenção de dados de sistemas binários.....	76
IV.3.1.1. Determinação da solubilidade da metilxantina pura em CO ₂	76
IV.3.1.2. Procedimento experimental do comportamento de fases da pilocarpina hidrocloreada usando CO ₂ supercrítico como anti-solvente num sistema quaternário.....	79
IV.3.2. Métodos experimentais para extração e fracionamento de sistemas complexos com CO ₂ SC.....	80
IV.3.2.1. Extração de metilxantinas de folhas de chá mate comercial.....	80

IV.3.2.2. Procedimento para extração de cafeína de sementes de guaraná usando a planta de micro-extração.....	81
IV.3.2.3. Procedimento de extração de cafeína de sementes de guaraná usando a planta de macro-extração.....	82
IV.3.2.4. Métodos experimentais para o fracionamento e a extração da manteiga de cacau, teobromina e cafeína com fluidos supercríticos.....	83
IV.4. Análises dos teores dos alcalóides e triglicerídeos usando CLAE, ácidos graxos usando GC, e de temperaturas e entalpias de fusão usando DSC.....	85
IV.4.1. Análise dos teores de metilxantinas.....	85
IV.4.2. Análise do teor de pilocarpina e alguns produtos de sua degradação.....	85
IV.4.3. Análise dos ácidos graxos na manteiga de cacau.....	86
IV.4.4. Análise e identificação dos triglicerídeos na manteiga de cacau.....	86
IV.4.5. Análise e determinação de porcentagem de sólidos na manteiga de cacau por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	87
 <i>CAPITULO V - RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	 89
V.1. Sistemas binários de metilxantinas e CO ₂ supercrítico.....	89
V.1.1. Sistema teofilina/CO ₂ supercrítico.....	90
V.1.2. Sistema teobromina/CO ₂ supercrítico.....	93
V.2. Extração de alcalóides e efeitos de variáveis do processo.....	97
V.2.1. Efeito de temperatura.....	98
V.2.1.1. Comportamento Retrógrado.....	108
V.2.2. Efeito da pressão.....	113
V.2.3. Efeito da vazão.....	123
V.2.4. Efeito da natureza do solvente.....	127
V.2.4.1. Efeito da saturação com etanol.....	136
V.2.4.2. Efeito do co-solvente.....	142
V.2.5. Seletividade.....	147
V.2.6. Efeito da matriz.....	159

V.2.7. Equilíbrio sólido-líquido e o efeito anti-solvente.....	162
V.2.8. Fracionamento da manteiga de cacau.....	169
CAPÍTULO VI – MODELAGEM TERMODINÂMICA.....	181
VI.1. Solubilidade dos alcalóides.....	182
VI.2. Cálculo de algumas propriedades das metilxantinas para a modelagem do sistema sólido/SCF.....	186
VI.2.1. Determinação da pressão de sublimação das metilxantinas.....	186
A. Pressão de sublimação da cafeína.....	186
B. Pressão de sublimação das dimetilxantinas.....	187
B.1. Cálculo da pressão de sublimação da teobromina.....	189
B.2. Cálculo da pressão de sublimação da teofilina.....	190
VI.2.2. Determinação das propriedades críticas das metilxantinas.....	192
VI.3. Sistema metilxantina pura/CO ₂ supercrítico usando a equação cúbica de Peng-Robinson com a regra de mistura de van der Waals.....	201
VI.4. Sistema metilxantina pura/CO ₂ supercrítico usando a equação cúbica de Peng-Robinson com a regra de mistura de Panagiotopoulos & Reid.....	203
VI.5. Sistema metilxantina pura/CO ₂ supercrítico usando a equação cúbica de Peng-Robinson com a regra de mistura de Mohamed e Holder.....	205
VI.6. Correlação de solubilidades de solutos em fluidos supercríticos.....	206
VI.6.1. Solubilidade usando a equação de Chrastil: log c vs log ρ.....	206
VI.7. Log E vs correlação da ρ.....	220
CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	213
VII.1. Conclusões.....	227
VII.2. Recomendações para trabalhos futuros.....	231
CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	233

APÊNDICES	259
APÊNDICE A. Resultados das análises por cromatografia líquida de alta eficiência da pilocarpina hidrociorada e dos produtos de sua degradação.....	260
APÊNDICE B.	264
B.1. Revistas internacionais e capítulos de livros.....	264
B.2. Congressos internacionais.....	266
APÊNDICE C. Publicações.....	268

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo III	Pág.
Figura III.1 : Alcalóide purina.....	12
Figura III.2 : A pilocarpina.....	17
Figura III.3 : Cristais de pilocarpina.....	18
Figura III.4 : Esquema de degradação da pilocarpina.....	22
Figura III.5 : Erva mate.....	26
Figura III.6 : Fruto e semente de guaraná.....	31
Figura III.7 : Semente inteira de cacau.....	33
Figura III.8 : Folhas de jaborandi.....	38
Figura III.9 : Extração convencional de alcalóides.....	43
Figura III.10 : Diagrama de estado do CO ₂	46
Figura III.11 : Sistema dinâmico de extração de alta pressão.....	52
Figura III.12 : Sistema típico estático.....	53
Figura III.13 : Perfil de extração para o modo dinâmico.....	55
Figura III.14 : Perfil de extração no modo estático/dinâmico.....	56
Figura III.15 : Formação da força dipolo-dipolo entre as moléculas de metanol e clorofórmio, dispersão e dipolo-dipolo induzido, e formação da ligação de hidrogênio entre o metanol e a água.....	60
Capítulo IV	
Figura IV.1 : Aparelho experimental: Laboratório de Engenharia de Processos (FEQ/UNICAMP, Brasil).....	71
Figura IV.2 : Fluxograma do sistema de macro-extração - Elaboração própria a partir da observação do equipamento do Laboratório de Processos Térmicos.....	72
Figura IV.3 : Fluxograma do sistema de micro-extração supercrítica - Planta Piloto de Micro-extração (TUHH, Alemanha).....	74
Figura IV.4 : Fluxograma do aparelho Cailletet.....	75
Figura IV.5 : Sistema de operação para um sistema binário.....	78
Figura IV.6 : Cromatografia de camada delgada após a extração dos alcalóides: cafeína, teobromina e amostras, das amêndoas de cacau moídas.....	84
Capítulo V	
Figura V.1 : Solubilidade da teofilina pura no CO ₂ supercrítico.....	91
Figura V.2 : Solubilidade da teofilina no CO ₂ SC como função da densidade reduzida.....	92
Figura V.3 : Solubilidade da teobromina a diferentes pressões e temperaturas.....	93
Figura V.4 : Diagrama de empacotamento das moléculas de teofilina.....	95
Figura V.5 : Associação das moléculas de: (A) teobromina e, (B) teofilina.....	95
Figura V.6 : Cromatograma da mistura de padrões de teobromina, teofilina e cafeína por CLAE.....	98
Figura V.7 : Extração de cafeína de 5g de sementes moídas úmidas de guaraná, a 40 MPa e 9,4 g min ⁻¹ . Total: 48 g cafeína/kg guaraná.....	99
Figura V.8 : Extração de cafeína de 3g de sementes de guaraná moídas, a uma pressão de 40 MPa e vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂	102
Figura V.9 : Extração de cafeína de 2g de folhas de chá mate moídas e úmidas a uma pressão de 40 MPa e vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂	103
Figura V.10 : Extração de cafeína de 30g de folhas de chá moídas e úmidas a uma pressão de 90 MPa e vazão de CO ₂ de 30 g min ⁻¹	104

Figura V.11	: Extração de teobromina de 3g de amêndoas de cacau a uma pressão de 40 MPa e uma vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	105
Figura V.12	: Extração de cafeína 30g de amêndoas de cacau moídas a 40 MPa e 30 g min ⁻¹	106
Figura V.13	: Extração de cafeína de 30g de amêndoas de cacau moídas a 90 MPa e 30 g min ⁻¹ .	107
Figura V.14	: Extração da cafeína de 3g de sementes de guaraná a uma pressão de 10 MPa e uma vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	109
Figura V.15	: Extração da cafeína de 2 g de folhas de chá mate a uma pressão de 10 MPa e uma vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	109
Figura V.16	: Curvas de extração da manteiga de cacau a uma vazão de 5,67 g min ⁻¹ com: (A) CO ₂ supercrítico seco e (B) CO ₂ supercrítico saturado com água, em base adimensional.	110
Figura V.17	: Curva de extração da manteiga de cacau em base adimensional a 323,2 e 343,2 K, e uma pressão de: (A) 15,2 MPa; (B) 24,8 MPa e (C) 28,3 MPa. Vazão de 0,87 g min ⁻¹ com etano.	113
Figura V.18	: Extração de cafeína de 3g de sementes de guaraná a uma temperatura de 313,2 K e vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	114
Figura V.19	: Extração de cafeína de 3g de sementes de guaraná a uma temperatura de 343,2 K e vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	115
Figura V.20	: Extração de cafeína de 50g de sementes de guaraná moídas e úmidas a uma temperatura de 343,2 K e 90 g min ⁻¹ de CO ₂ .	116
Figura V.21	: Extração de cafeína de 2g de folhas de chá mate moídas e úmidas a uma temperatura de 343,2 K e 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	118
Figura V.22	: Extração de cafeína de 2g de folhas de chá mate a uma temperatura de 343,2 K e 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂ .	119
Figura V.23	: Extração de teobromina de 30g de amêndoa de cacau a uma temperatura de 313,2 K e 30 g min ⁻¹ de CO ₂ .	119
Figura V.24	: Rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau a 323,2 K e duas pressões com CO ₂ supercrítico. Total: 1000 g óleo extraído/kg óleo inicial.	120
Figura V.25	: Curvas de extração da manteiga de cacau a temperaturas de: (A) 323,2 K e (B) 343,2 K, e vazão de 0,87 g min ⁻¹ com etano supercrítico em base adimensional.	122
Figura V.26	: Extração de cafeína de 5g de sementes de guaraná a uma pressão de 40 MPa e temperatura de 313,2 K.	125
Figura V.27	: Extração de cafeína de 5g de sementes de guaraná a uma pressão de 40 MPa e temperatura de 343,2 K.	125
Figura V.28	: Extração de cafeína de 40g de folhas de chá mate moídas a uma pressão de 40 MPa e temperatura de 313,2 K.	126
Figura V.29	: Extração de teobromina de 30 g de amêndoas de cacau a uma pressão de 90 MPa e temperatura de 313,2 K.	117
Figura V.30	: Rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau a 323,2 K e 15,2 MPa usando CO ₂ e etano supercrítico.	128
Figura V.31	: Rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau a 323,2 K e 24,8 MPa usando fluidos supercríticos.	129
Figura V.32	: Curva de extração da manteiga de cacau a 20 MPa (CO ₂), 15,2 e 24,8 MPa (etano) e vazão de 5,86 g min ⁻¹ (CO ₂) e 0,87 g min ⁻¹ (etano) em base adimensional a: (A) 323,2 K e, (B) 343,2 K. Total: 538 g óleo/kg cacau (CO ₂).	131
Figura V.33	: Potenciais de Lennard-Jones.	136
Figura V.34	: Extração da teobromina das amêndoas de cacau usando dióxido de carbono seco e saturado com etanol. Total: 12,2 g teobromina/kg cacau.	137

Figura V.35	: Extração de teobromina das amêndoas de cacau - efeito da temperatura a 40 MPa e 30 g min ⁻¹	138
Figura V.36	: Extração da teobromina das amêndoas de cacau – efeito da temperatura a 90 MPa e 30 g min ⁻¹	139
Figura V.37	: Extração da teobromina das amêndoas de cacau – efeito da pressão a 313,2 K e 30 g min ⁻¹	140
Figura V.38	: Extração da teobromina das amêndoas de cacau – efeito da pressão a 343,2 K e 30 g min ⁻¹	140
Figura V.39	: Extração da teobromina das amêndoas de cacau moídas – Efeito das vazões a 90 MPa e 343,2 K.....	141
Figura V.40	: Ligações da cafeína com: (A) etanol, (B) CO ₂ e (C) água.....	143
Figura V.41	: Ligações da teobromina: (A) etanol, (B) CO ₂ e (C) água.....	144
Figura V.42	: Extração de cafeína de sementes de guaraná a 20 MPa, 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂	145
Figura V.43	: Extração de cafeína de folhas de mate a 20 MPa, 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂	146
Figura V.44	: Extração de teobromina de amêndoas de cacau a 20 MPa, 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min ⁻¹ de CO ₂	135
Figura V.45a	: Extração de: (A) manteiga de cacau e, (B) teobromina e cafeína com CO ₂ seco e saturado com água (w) a 343,2 K e pressão de 20 MPa.....	149
Figura V.45b	: Extração de: (A) manteiga de cacau e, (B) teobromina e cafeína com CO ₂ seco e saturado com água (w) a 343,2 K e pressão de 40 MPa.....	150
Figura V.46a	: Extração: (A) manteiga de cacau, (B) teobromina e cafeína, com etano supercrítico a 343,2 K e pressão de 15,2 MPa.....	152
Figura V.46b	: Extração: (A) manteiga de cacau, (B) teobromina e cafeína, com etano supercrítico a 343,2 K e pressão de 24,8 MPa.....	153
Figura V.46c	: Extração: (A) manteiga de cacau, (B) teobromina e cafeína, com etano supercrítico a 343,2 K e pressão de 28,3 MPa.....	154
Figura V.47	: Curvas de extração: (A) cafeína e (B) teobromina e teofilina, durante o fracionamento do maté comercial a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO ₂ de 0,9-1,2 g min ⁻¹	155
Figura V.48	: Curvas de extração da: (A) cafeína e (B) teobromina e teofilina, no fracionamento do chá mate <i>in natura</i> a 313,2 K e 13,8 MPa e vazão de CO ₂ de 1,2-1,8 g min ⁻¹	157
Figura V.49	: Curva de extração: (A) cafeína e (B) teobromina e teofilina, no fracionamento do chá mate ' <i>in natura</i> ' a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO ₂ de 1,2-1,8 g min ⁻¹	158
Figura V.50	: Comparação das curvas de extração da cafeína no fracionamento do chá mate comercial e <i>in natura</i> a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO ₂ de 0,9-1,8 g min ⁻¹	162
Figura V.51	: Cromatograma da mistura pilocarpina hidrocloreada e isopilocarpina hidrocloreada como função do tempo de retenção (t _R) em minutos.....	164
Figura V.52	: Cromatograma de um extrato de jaborandi contendo isopilocarpina e pilocarpina por CLAE.....	165
Figura V.53	: Temperatura de precipitação do sistema CO ₂ /1-propanol/ácido salicílico como função da fração molar de dióxido de carbono a 7 MPa.....	167
Figura V.54	: Interfases S-L, L-V, S-V e o equilíbrio das três fases S-L-V a diferentes temperaturas e pressões.....	167

Figura V.55	: Isopleta sólido-líquido para a composição no sistema pilocarpina (p)-dióxido de carbono (CO ₂)-etanol (etOH)-água(w).....	168
Figura V.56	: Dados experimentais das interfases S-L e L-V (círculos vazios) e o equilíbrio das três fases S-L-V (círculos preenchidos) a diferentes concentrações, temperaturas e pressões para o sistema n-eicosano-etano.....	169
Figura V.57	: Percentual dos TGs nas frações extraídas a 24,3 Mpa e 323,2 K com CO ₂ SC. Cada fração foi obtida com 377 g de CO ₂	174
Figura V.58	: Percentual dos TGs nas frações extraídas a 323,2 K com etano supercrítico. Cada fração foi obtida com 61,95 g de etano.....	175
Figura V.59	: Curva de sólidos da manteiga de cacau pura por prensa e as frações obtidas com CO ₂ e etano supercrítico a 24,8 Mpa e 323,2 K.....	178
Capítulo VI		
Figura VI.1	: Ajuste dos dados experimentais dos sistemas cafeína pura/CO ₂ , teofilina pura/CO ₂ e teobromina pura/CO ₂ supercrítico, respectivamente, com a regra de mistura de van der Waals a diferentes temperaturas e pressões.....	202
Figura VI.2	: Ajuste dos dados experimentais dos sistemas binários: cafeína pura/CO ₂ , teofilina pura/CO ₂ e teobromina pura/CO ₂ supercrítico, com a regra de mistura de Panagiotopoulos & Reid.....	204
Figura VI.3	: Correlação das solubilidades dos sistemas binários cafeína/CO ₂ , teofilina/CO ₂ e teobromina pura/CO ₂ supercrítico utilizando as regras de mistura de Mohamed & Holder.....	206
Figura VI.4	: Correlação log-log para a solubilidade da cafeína no CO ₂ com a densidade.....	212
Figura VI.5	: Correlação log-log para a solubilidade da teofilina no CO ₂ com a densidade.....	212
Figura VI.6	: Correlação log-log para a solubilidade da teobromina no CO ₂ com a densidade.....	213
Figura VI.7	: Solubilidade da cafeína pura pela equação de Chrastil com dados experimentais.....	215
Figura VI.8	: Correlação das solubilidades no sistema binário (teofilina/CO ₂) utilizando a equação de Chrastil.....	215
Figura VI.9	: Correlação das solubilidades no sistema binário (teobromina/CO ₂) utilizando a equação de Chrastil.....	216
Figura VI.10	: Relação entre os parâmetros k vs T e A vs 1/T para a cafeína/CO ₂ utilizando a equação de Chrastil.....	217
Figura VI.11	: Relação entre os parâmetros k vs T e A vs 1/T para a teofilina/CO ₂ utilizando a equação de Chrastil.....	218
Figura VI.12	: Relação entre os parâmetros k vs T e A vs 1/T para a teobromina/CO ₂ utilizando a equação de Chrastil.....	219
Figura VI.13	: Correlação semi-log para a solubilidade do fator de melhoramento da cafeína no CO ₂ com os dados de densidade, a partir de densidades do solvente de 447 g/L.....	225
Figura VI.14	: Correlação semi-log para a solubilidade do fator de melhoramento da teofilina no CO ₂ com os dados de densidade, a partir de densidade do solvente de 447 g/L.....	226
Figura VI.15	: Correlação semi-log para a solubilidade do fator de melhoramento da teobromina no CO ₂ com os dados de densidade, a partir de densidade de 447 g/L.....	226
Apêndice		Pág.
Figura A1	: Cromatograma do padrão Sigma de pilocarpina hidrocloreada diluída em água, cromatograma dos padrões Diosynth de pilocarpina hidrocloreada, e isopilocarpina hidrocloreada.....	261
Figura A2	: Cromatograma da solução de pilocarpina hidrocloreada em etanol.....	261

Figura A1	: Cromatograma do padrão Sigma de pilocarpina hidrociorada diluída em água, cromatograma dos padrões Diosynth de pilocarpina hidrociorada, e isopilocarpina hidrociorada.....	261
Figura A2	: Cromatograma da solução de pilocarpina hidrociorada em etanol.....	261
Figura A.3	: Cromatograma da conversão de pilocarpina hidrociorada a ácido pilocárpico hidrociorado.....	262
Figura A.4	: Cromatograma da solução oftalmológica do colírio.....	263
Figura B.1	: Usando a regra de van der Waals a 313,2 K.....	264
Figura B.2	: Usando a regra de Panagiotopoulos e Reid a 313,2 K.....	265
Figura B.3	: Usando a regra de Mohamed e Holder a 313,2 K.....	265
Figura B.4	: Usando a regra de van der Waals a 313,2 K.....	266
Figura B.5	: Usando a regra de Panagiotopoulos e Reid a 313,2 K.....	266
Figura B.6	: Usando a regra de Mohamed e Holder a 313,2 K.....	267

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo III	Pág.
Tabela III.1 : Alcalóides purínicos.....	12
Tabela III.2 : Propriedades das metilxantinas.....	13
Tabela III.3 : Teor de cafeína em alguns alimentos.....	15
Tabela III.4 : Efeito do álcali na rotação específica da pilocarpina e isopilocarpina usando água como solvente.....	19
Tabela III.5 : Potenciais de rotação específica.....	19
Tabela III.6 : Solubilidades dos sais do alcalóide.....	21
Tabela III.7 : Especificações para identificar a pilocarpina e seus produtos de degradação por CLAE.....	23
Tabela III.8 : Conteúdo de metilxantinas (mg kg ⁻¹ material seco) no maté.....	28
Tabela III.9 : Produção Brasileira de erva-mate.....	29
Tabela III.10 : Consumo anual de erva-mate no Brasil (ton).....	29
Tabela III.11 : Exportações Brasileiras de erva-mate (ton/ano).....	30
Tabela III.12 : Substâncias presentes no guaraná (%).....	33
Tabela III.13 : Alcalóides presentes no guaraná.....	33
Tabela III.14 : Produção do guaraná no Brasil (ton).....	34
Tabela III.15 : Valor da produção do guaraná no Brasil (Mil dólares).....	35
Tabela III.16 : Nutrientes presentes no cacau.....	37
Tabela III.17 : Composição química dos subprodutos do cacau.....	38
Tabela III.18 : Composição dos ácidos graxos da manteiga do cacau.....	40
Tabela III.19 : Triglicerídeos na manteiga do cacau.....	40
Tabela III.20 : Alcalóides em várias espécies de <i>Pilocarpus</i>	42
Tabela III.21 : Folhas de jaborandi contendo pilocarpina.....	43
Tabela III.22 : Taxinomia do <i>Pilocarpus</i>	43
Tabela III.23 : Composição química das folhas de <i>Pilocarpus</i>	44
Tabela III.24 : Propriedades críticas de alguns fluidos.....	50
Tabela III.25 : Solubilidades da cafeína em fluidos supercríticos.....	60
Tabela III.26 : Solubilidades da teofilina em fluidos supercríticos.....	60
Tabela III.27 : Solubilidades da teobromina em fluidos supercríticos.....	61
Tabela III.28 : Magnitude das diversas forças presentes numa ligação.....	62
Capítulo V	
Tabela V.1 : Solubilidade da teofilina pura (99%) no CO ₂ supercrítico a 313,2 K.....	92
Tabela V.2 : Valores da densidade reduzida (ρ_r) e parâmetro de solubilidade (δ) para o CO ₂ supercrítico a 313,2 K e diferentes pressões.....	117
Tabela V.3 : Algumas propriedades físicas dos compostos em estudo.....	134
Tabela V.4 : Energias potenciais de interações intermoleculares.....	134
Tabela V.5 : Parâmetros do potencial de Lennard-Jones.....	135
Tabela V.6 : Pressão crítica (P_c) e temperatura crítica (T_c) da mistura de CO ₂ /etanol a diferentes concentrações de etanol.....	143
Tabela V.7 : Composição dos ácidos graxos da manteiga de cacau.....	170
Tabela V.8 : Composição dos ácidos graxos na manteiga do cacau (Saldaña, 2002).....	171
Tabela V.9 : Composição de triglicerídeos da manteiga de cacau extraída com solvente orgânico.....	172
Tabela V.10 : Triglicerídeos obtidos a partir de amêndoas de cacau moído com etano supercrítico a diferentes pressões e temperaturas.....	173

Tabela V.11	Conteúdo de sólidos na manteiga de cacau extraída com prensa mecânica e com etano supercrítico a diferentes temperaturas e pressões	177
Tabela V.12	Conteúdo de sólidos na manteiga de cacau extraída das amêndoas de cacau moídas com prensa mecânica e com etano supercrítico, a diferentes temperaturas e pressões.....	177
Tabela V.13	Entalpia de fusão correspondente ao fracionamento da manteiga de cacau usando etano supercrítico a diferentes pressões e temperaturas.....	179
Capítulo VI		
Tabela VI.1	: Pressão de sublimação da cafeína.....	186
Tabela VI.2	: Pressão de sublimação da teobromina.....	190
Tabela VI.3	: Pressão de sublimação da teofilina.....	191
Tabela VI.4	: Pressão de sublimação das metilxantinas (bar).....	192
Tabela VI.5	: Determinação das propriedades críticas da cafeína pelo método de Joback...	194
Tabela VI.6	: Determinação das propriedades críticas da teofilina pelo método de Joback..	195
Tabela VI.7	: Determinação das propriedades críticas da teobromina pelo método de Joback.....	195
Tabela VI.8	: Estimativa das propriedades críticas da cafeína pelo método de Somayajulu.....	196
Tabela VI.9	: Estimativa das propriedades críticas da teofilina pelo método de Somayajulu.....	196
Tabela VI.10	: Estimativa das propriedades críticas da teobromina pelo método de Somayajulu.....	197
Tabela VI.11	: Propriedades críticas encontradas para a cafeína pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani.....	198
Tabela VI.12	: Propriedades críticas encontradas para a teofilina pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani.....	198
Tabela VI.13	: Propriedades críticas encontradas para a teobromina pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani.....	199
Tabela VI.14	: Propriedades das purinas encontradas pelo uso do método de Constantinou e Gani.....	199
Tabela VI.15	: Propriedades críticas encontradas para a cafeína pelo uso de diferentes correlações.....	200
Tabela VI.16	: Propriedades críticas encontradas para a teofilina pelo uso de diferentes correlações.....	200
Tabela VI.17	: Propriedades críticas encontradas para a teobromina pelo uso de diferentes correlações.....	200
Tabela VI.18	: Sistema cafeína pura/CO ₂ supercrítico a 313,2 K usando as propriedades críticas de Constantinou e Gani.....	207
Tabela VI.19	: Sistema teofilina pura/CO ₂ supercrítico a 313,2 K usando as propriedades críticas de Twu.....	207
Tabela VI.20	: Sistema teobromina pura/CO ₂ supercrítico a 313,2 K usando o método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani.....	208
Tabela VI.21	: Constantes de associação k e interseção para a cafeína/CO ₂ determinado pela equação V.24.....	211
Tabela VI.22	: Constantes de associação k e interseção para a teofilina/CO ₂ determinado pela equação V.24.....	211
Tabela VI.23	: Constantes de associação k e interseção para a teobromina/CO ₂ determinado pela equação V.24.....	211
Tabela VI.24	: Parâmetros da equação de Chrastil em função da temperatura para a cafeína.....	213
Tabela VI.25	: Parâmetros da equação de Chrastil em função da temperatura para a teofilina.....	214

Tabela VI.26	: Parâmetros da equação de Chrastil em função da temperatura para a teobromina.....	214
Tabela VI.27	: Fator de melhoramento para o sistema cafeína/CO ₂	222
Tabela VI.28	: Fator de melhoramento para o sistema teofilina/CO ₂	223
Tabela VI.29	: Fator de melhoramento para o sistema teobromina/CO ₂	224

NOMENCLATURA

a	Parâmetro atrativo da equação de estado; Parâmetro da Equação de Chrastil
A	Parâmetro da equação
b	Parâmetro volumétrico ou repulsivo da equação de estado; Parâmetro da Equação de Chrastil
B	Parâmetro de equação ou segundo coeficiente virial
f	Fugacidade
k	Constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ J/K); Constante de equilíbrio
M	Peso molecular
m	Parâmetro da equação de estado
P	Pressão
R	Constante universal dos gases
T	Temperatura
SG	Peso específico
\bar{v}	Volume molar parcial
V	Volume total
x	Fração molar na fase líquida
x_{ij}	Fração molar local
y	Fração molar na fase vapor
z	Fator de compressibilidade
[A]	Concentração molar do soluto na fase vapor
[B]	Concentração molar do solvente

$[AB_k]$	Concentração molar do complexo de solvatação
K	Parâmetro de solvatação
ΔH_{sov}	Entalpia de solvatação
ΔH_{vap}	Entalpia de vaporização
q_s	Constante
q_v	Constante
C	Concentração do soluto no solvente
MA	Massa molecular do soluto
MB	Massa molecular do solvente
l_i	Valor das intercessões
d	Densidade do solvente
Dp	Diâmetro médio de Sauter
Dpi	Diâmetro médio das partículas entre duas peneiras
ΔD_{p_i}	Fração da massa retida na peneira
Q	Momento quadrupolo
I	Primeiro potencial de ionização

Letras Gregas

α	Parâmetro da equação; Polarizabilidade
η	Coefficiente de interação binária
δ	Coefficiente de interação binária; Parâmetro de solubilidade
ϕ	Coefficiente de fugacidade
ϕ_m	Fator de forma

∞	Infinito
μ	Potencial químico; Momento dipolo
ω	Fator acêntrico
ρ	Densidade
γ	Coefficiente de atividade
ξ	Tamanho do cluster
Δ	Variação
Γ	Energia potencial de interação molecular
ε	Parâmetro de energia potencial de ionização de Lenard-Jones
σ	Distância entre as moléculas onde o potencial de interação é nulo

Subscritos

b	Ebulição
c	Propriedade crítica
i	Componente de uma mistura
ij	Componentes i-j
j	Componente de uma mistura
k	Componente de uma mistura
m	Componente máximo
r	Propriedade reduzida

Sobrescritos

L	Fase líquida
---	--------------

m	Ordem de variação
OS	Fase sólida
V	Fase vapor
SCF	Fluido supercrítico
◦	Referência

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A história dos princípios ativos tem sua origem há mais de 4000 anos, quando os assírios e os egípcios já falavam de preparações e usos medicinais de algumas plantas, assim como os gregos o faziam alguns séculos antes de Cristo. Na Idade Média nasceu a Botânica Moderna, que classifica as drogas conforme as plantas das quais derivam, o tipo de enfermidade que combatem, sua natureza ou similaridade química.

Entre as substâncias químicas que procedem de extratos de folhas, sementes, raízes e cascas de plantas, encontram-se os alcalóides (Bentley, 1965). Estes compostos orgânicos contêm pelo menos um átomo de nitrogênio no anel heterocíclico e são princípios ativos que produzem efeitos fisiológicos no organismo humano e dependendo da dose utilizada, tais efeitos podem ser classificados como tóxicos ou terapêuticos.

Dentre os produtos mais consumidos, contendo alcalóides, encontram-se o café, o chá mate, o cacau e o guaraná, que contêm cafeína, e o tabaco, que contêm nicotina. Pilocarpina, morfina, emetina, quinina, entre outros, são alcalóides usados em medicamentos. Portanto, é de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas estabelecerem processos para extraí-los de produtos naturais.

As técnicas de extração de alcalóides usadas atualmente na indústria são constituídas principalmente pelas seguintes etapas: preparação da matéria prima, extração e purificação. A extração é normalmente realizada com solventes químicos imiscíveis na água, em meio alcalino, ou alternativamente com solventes solúveis em água. O uso de álcoois resulta em extrações mais rápidas devido ao maior poder de solubilização, mas apresenta uma seletividade menor. Para a purificação dos alcalóides a partir dos extratos, várias outras tecnologias, como destilação, cristalização entre outros têm sido utilizadas na indústria farmacêutica (McKillop, 1970). Além dessas tecnologias de extração, separação e

purificação já apontadas, surgiu recentemente a nova tecnologia que utiliza fluidos supercríticos como solvente de extração (Brunetti et al., 1985; McHugh e Krukonis, 1986). O potencial de cada um destes processos de extração, separação e purificação é limitado pelo compromisso entre custo e seletividade da operação. Para grandes volumes de produção, a tendência é optar pelos métodos convencionais, pois a tecnologia de fluidos apresenta alto custo de investimento e operação. Porém, estes métodos apresentam certas desvantagens, como a formação de resíduos indesejáveis provenientes dos solventes químicos usados na extração além das possíveis alterações no produto final como a degradação térmica, devido às altas temperaturas alcançadas durante as etapas de extração e purificação. Apesar da extração com dióxido de carbono supercrítico exigir um investimento maior, é um processo extremamente específico em sua atuação e, portanto, mais indicado para a extração e purificação de alcalóides. Esta tecnologia permite que a extração e a purificação sejam realizadas simultaneamente, pois a capacidade de solubilização e a seletividade do solvente supercrítico podem ser modificadas com pequenas alterações nas variáveis termodinâmicas (McHugh e Krukonis, 1994; Brunner, 1994, entre outros).

O processo de extração com fluidos supercríticos explora as propriedades do fluido em torno do seu ponto crítico. Nestas condições, o fluido, denominado como supercrítico, tem uma densidade semelhante àquela na fase líquida. As propriedades de transporte (como viscosidade e difusividade), porém aproximam-se daquelas da fase gasosa. Na região supercrítica, as propriedades são particularmente sensíveis à temperatura e pressão, gerando mudanças grandes na densidade e, portanto, no poder de solubilização. Essa característica confere ao fluido supercrítico (FSC) grande importância em processos de extração, pois as densidades de solventes líquidos só podem ser alteradas pela adição de outros solventes, ou por considerável aumento na temperatura. Outras vantagens da utilização de FSCs em relação aos líquidos são sua menor viscosidade que propicia menores gastos energéticos para movimentar o fluido, e seu maior coeficiente de difusão que eleva as taxas de transferência de massa. Numa certa faixa de pressão, a solubilidade da fase condensada no fluido supercrítico é caracterizada por um comportamento retrógrado, ou seja, aumenta com o aumento da pressão, à temperatura constante, e decresce com o aumento da temperatura, a pressão constante (Chimowitz e Pennisi, 1986; Brennecke e Eckert, 1989; Johnston e Peck, 1989).

Dentre as muitas vantagens do uso de fluidos supercríticos, pode-se citar a facilidade de separação do material extraído do solvente, que é realizada por uma simples manipulação de temperatura ou pressão, enquanto que nos processos de extração convencionais com líquidos, um outro processo, como destilação, é necessário para recuperar o soluto e reciclar o solvente. Na extração supercrítica, pode-se obter diretamente um produto cristalino com morfologias e tamanhos de partículas controláveis (Mohamed et al., 1989a; b). O dióxido de carbono, uma substância não-tóxica, não-inflamável e de custo relativamente baixo, é um solvente atrativo na extração de produtos farmacêuticos e componentes de alimentos.

Os primeiros usos da extração supercrítica foram relatados por Hannay e Hogarth em 1879. Após 1940, os estudos com fluidos supercríticos se intensificaram, e diferentes grupos de pesquisa relataram dados de solubilidades do naftaleno em fluidos supercríticos (Diepen e Scheffer, 1948; de Swaan Arons e Diepen, 1963; McHugh e Paulaitis, 1980). Também têm surgido muitas patentes relatando a extração de componentes de alto valor agregado a partir de diversos produtos naturais como café, tabaco, e algumas especiarias (Roselius et al., 1972a, b; Vitzhum e Hubert, 1972; 1973; Vitzhum et al., 1975; 1976; Zosel, 1971; 1972; 1974; 1975). A utilização de FSC também tem sido aplicada em outros processos de engenharia, como a regeneração do carbono ativo usado para extrair poluentes orgânicos de águas residuais (Modell et al., 1979), a separação de etanol-água (McHugh et al., 1981). Também foram extraídos com FSC antioxidantes (Cheng et al., 2001), antraquinonas (Kraska et al., 2001) e ainda os FSCs foram usados em processos de extração de aromas (Perrut, 2000), de tingimento (Mishima et al., 2001), de limpeza de peças de aparelhos (Russick et al., 1996), de remediação de solos com água supercrítica e da remoção de metais complexados de solos com CO₂ supercrítico (Brennecke et al., 2001), entre outros. Além disto, a extração supercrítica tem usado CO₂ como solvente para a obtenção de diversos alcalóides como a trigonelina (Saldaña et al., 1997), quinina e morfina (Ndiomu e Simpson, 1988), cafeína, teobromina e teofilina (Johannsen e Brunner, 1994; Saldaña et al., 1999), teobromina (Li et al., 1991; Saldaña et al., 1999), codeína e papaverina (Stahl e Willing, 1980), alcalóides indólicos (Song et al., 1992), entre outros.

Num processo típico de extração supercrítica, o material contendo o produto de interesse é colocado no extrator, em que uma corrente de solvente é passada, selecionando alguns compostos dependendo de sua solubilidade no solvente utilizado. A manipulação da temperatura ou da pressão pode tornar o solvente mais seletivo na extração de certos compostos. Portanto, alterando um destes parâmetros, um ou mais dos materiais dissolvidos podem precipitar no separador após a despressurização do sistema.

O uso de fluidos supercríticos para a extração da cafeína de produtos naturais tem demonstrado ser uma tecnologia muito promissora, apresentando vantagens em relação aos processos de extração convencional que usam solventes orgânicos, como o acetato de etila. Lack e Seidlitz (1993) demonstraram que no caso da extração deste alcalóide com CO₂ a partir de grãos de café, o custo de investimento inicial é alto, mas o processo provê uma boa qualidade tanto do produto (café descafeinado) como do sub-produto (cafeína). De fato, a recuperação da cafeína dos grãos de café com CO₂ já é um processo na escala de planta piloto e industrial em Bremen (Alemanha) e em Texas (Estados Unidos). Porém, as informações sobre o processo permanecem mantidas em segredo como patentes industriais e os dados são quase inexistentes na literatura científica (Saldaña, 1997).

A cafeína, teofilina e teobromina, que representam a classe das metilxantinas, são alguns dos mais bem estudados alcalóides encontrados nas folhas de chá mate, nos grãos de café, nos frutos de guaraná e nas amêndoas de cacau (Baltassa et al., 1984; Suzuki e Waller, 1988; Saldaña et al., 1998). No organismo humano, estes alcalóides atuam como estimulantes do sistema nervoso central, músculos e sistema circulatório (James, 1991), portanto, são utilizados como medicamentos em diversas formas farmacêuticas.

Estudos preliminares de sistemas binários demonstraram a viabilidade de utilização de CO₂ supercrítico como solvente (Johansenn e Brunner, 1994), e na extração de metilxantinas de matrizes de grãos do café (Peker et al., 1992), das amêndoas de cacau (Li et al., 1992) e das sementes de guaraná (Mehr et al., 1996). Não há relatos, porém, da extração de metilxantinas das folhas de chá mate e da extração de pilocarpina das folhas do jaborandi.

A descafeinação com CO₂ não tem alcançado um bom nível de utilização em países em vias de desenvolvimento pelo fato de não existir um avanço tecnológico adequado para a produção de produtos descafeinados, como por exemplo, o café, chá ou chá mate. A cafeína obtida é vendida às indústrias farmacêuticas e produtoras de bebidas de cola, permitindo receitas suficientes para cobrir os custos do processo de descafeinação (Coffee Benefaction, 1986). Isto não ocorre no Brasil, um dos maiores produtores e exportadores mundiais de café e chá mate.

A pilocarpina é um alcalóide encontrado nas folhas do jaborandi. Este princípio ativo é usado no tratamento do glaucoma, sendo empregado também para evitar a formação de aderências entre a íris e o cristalino (Taylor, 1991). A pilocarpina é também adicionada em loções capilares e usada na dermatologia como modificador da pele (Oliveira e Akisue, 1989). O processo convencional, usado atualmente para a extração da pilocarpina do jaborandi, requer várias extrações sucessivas com diferentes solventes como etanol, água, clorofórmio e éter para sua obtenção na forma cristalina. A pilocarpina pode ser também obtida por síntese orgânica, mas seus rendimentos são baixos e os custos deste processo são muito elevados (Maat e Beyerman, 1983). Frente a isto, surge a possibilidade de exploração de fluidos supercríticos na extração de pilocarpina.

O presente trabalho tem como objetivo geral obter dados experimentais e subsídios teóricos, que contribuam na compreensão adequada do processo de extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos, assim como, a verificação dos efeitos: natureza do solvente, temperatura e pressão no rendimento da extração, os quais estão descritos no Capítulo II.

No Capítulo III, apresenta-se uma breve revisão da literatura sobre os alcalóides cafeína, teofilina, teobromina e pilocarpina, suas propriedades e efeitos farmacológicos. Em seguida, os produtos naturais estudados (chá mate, guaraná, cacau e jaborandi) são descritos quanto às suas composições químicas e ações medicinais. Apresenta-se, ainda, neste capítulo a tecnologia convencional e a que utiliza fluidos supercríticos para extração de alcalóides bem como o levantamento dos principais trabalhos publicados sobre extração de metilxantinas usando fluidos supercríticos.

No Capítulo IV, são descritos os principais materiais e métodos utilizados no desenvolvimento desta tese de doutorado. Dentre os sistemas de extração supercrítica descritos, estão o aparelho de extração a alta pressão do Laboratório de Engenharia de Processos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (Campinas-SP, Brasil), os aparelhos de micro e macro-extração da planta piloto de extração supercrítica da Faculdade de Processos Térmicos da Universidade Técnica de Hamburg-Harburg-TUHH (Harburg-Hamburg, Alemanha) e o aparelho de equilíbrio de fases do Departamento de Termodinâmica Aplicada da Universidade Técnica de Delft-TU Delft (Delft, Holanda). Nos métodos experimentais são descritos os procedimentos básicos de operação para obtenção de dados em sistemas binários (metilxantinas/CO₂SC) e do fracionamento e extração de alcalóides de sistemas complexos com CO₂SC. Também são descritos os procedimentos de análises dos teores de alcalóides (cafeína, teofilina, teobromina e pilocarpina) e análises dos teores de ácidos graxos e triglicerídeos de frações de óleo usando técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente.

No Capítulo V, são apresentados os principais resultados e as discussões pertinentes deste trabalho de tese de doutorado, os quais contém basicamente experimentos de sistemas binários (metilxantinas/CO₂ supercrítico) e extração de metilxantinas de plantas naturais, assim como também a tentativa de extração da pilocarpina das folhas de jaborandi. Neste capítulo, são discutidos os diferentes resultados dos experimentos realizados com as folhas do chá mate *Ilex paraguariensis*, para extrações de cafeína, teofilina e teobromina usando dióxido de carbono supercrítico. Também são discutidos os resultados obtidos das extrações realizadas com sementes de guaraná, *Paullinia cupana*, para extração da cafeína e da matriz de amêndoas de cacau moídos, *Theobroma cacao*, para extração da teobromina e da manteiga e cacau.

No Capítulo VI, apresentam-se os desenvolvimentos teóricos para a determinação da pressão de sublimação das metilxantinas, determinação das propriedades críticas e a modelagem termodinâmica do equilíbrio sólido-fluido utilizando uma equação cúbica e de quarta ordem para correlacionar as solubilidades dos sistemas binários:

metilxantinas/CO₂SC. Para calcular as solubilidades do alcalóide no fluido supercrítico também apresentam-se as outras correlações que usam a equação de Chrastil e a abordagem usada em função do fator de melhoramento e da densidade.

No Capítulo VII, são apresentadas as principais conclusões dos sistemas binários estudados: cafeína/CO₂ supercrítico, teofilina/CO₂ supercrítico e, teobromina/CO₂ supercrítico, assim como a extração de metilxantinas de sistemas complexos de produtos naturais de folhas de chá mate, sementes de guaraná e amêndoas de cacau com CO₂ supercrítico. Neste mesmo capítulo, são apresentadas as conclusões referentes ao uso da técnica SAS (do inglês 'supercritical anti-solvent') no sistema quaternário pilocarpina hidrociorada/etanol/água e CO₂ como anti-solvente, bem como a tentativa de extração de pilocarpina do jaborandi usando a metodologia de extração supercrítica tradicional descrita no Capítulo IV. Também neste capítulo são sugeridas algumas recomendações para trabalhos futuros na área de extração de alcalóides a partir de produtos naturais usando fluidos supercríticos.

Para finalizar, são apresentadas as referências bibliográficas usadas nesta tese de doutorado no Capítulo VIII.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

O objetivo geral desta Tese de Doutorado foi obter dados experimentais com o intuito de gerar subsídios teóricos que contribuam para a compreensão adequada do processo de extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos. Os alcalóides considerados neste estudo incluem a cafeína encontrada em folhas de chá mate e nas sementes de guaraná, a teofilina presente nas folhas de chá mate, a teobromina encontrada nas amêndoas de cacau e a pilocarpina presente nas folhas do jaborandi. Neste trabalho, também foi estudada a extração de gordura de cacau com fluidos supercríticos a partir das amêndoas de cacau moídas. Os objetivos específicos para atingir a meta proposta foram:

- Determinar a solubilidade de teofilina, teobromina e pilocarpina puras em CO₂ supercrítico.
- Identificar as variáveis termodinâmicas de temperatura e pressão que influenciam e controlam as solubilidades e seletividades desses compostos.
- Extração dos alcalóides purina e pilocarpina usando CO₂ supercrítico a partir de produtos naturais.
- Determinar os efeitos das variáveis de temperatura e pressão no rendimento da extração de alcalóides a partir de produtos naturais.
- Extração da manteiga de cacau com fluidos supercríticos a partir das amêndoas de cacau moídas e caracterização desta manteiga.
- Desenvolver um modelo termodinâmico para correlação da solubilidade dos alcalóides purina estudados no CO₂ supercrítico.

Para cumprir estes objetivos, foram usados os materiais mencionados no Capítulo IV e empregados os métodos descritos também nesse capítulo.

CAPÍTULO III

REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo apresenta-se uma revisão da literatura sobre os alcalóides cafeína, teofilina, teobromina e pilocarpina, suas propriedades e efeitos farmacológicos. Em seguida, é apresentada uma descrição dos produtos naturais estudados e nos quais encontram-se estes alcalóides: o chá mate, o guaraná, o cacau e o jaborandi, além de suas composições químicas e ações medicinais. Apresentam-se também as tecnologias: convencional e a que utiliza fluidos supercríticos para extração de alcalóides bem como os principais trabalhos publicados sobre extração de metilxantinas usando fluidos supercríticos.

III.1. ALCALÓIDES

Alcalóides são compostos orgânicos contendo pelo menos um átomo de nitrogênio de caráter básico no anel heterocíclico. Costa (1975) conceituou como alcalóides os grupos heterogêneos de substâncias orgânicas de origem vegetal definidos pela função amina. Entre os alcalóides que possuem propriedades estimulantes encontram-se as metilxantinas (estimulantes psicoativos) e a pilocarpina (estimulante das glândulas salivares e lacrimais), descritos a seguir.

III.1.1. Alcalóides purínicos

Dentre os alcalóides purina mais importantes estão os derivados metilados de xantinas, destacando-se a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teofilina (1,3-dimetilxantina) e a

teobromina (3,7-dimetilxantina). Estes princípios ativos são encontrados nas sementes de café (1-2% de cafeína) assim como nas sementes de guaraná *Paullinia cupana* Kunth (com teor de 2,5-5% de cafeína). As folhas de chá mate *Ilex paraguariensis* contém aproximadamente 2% de cafeína e as amêndoas de cacau *Theobroma cacao* contém entre 0,9-3% de teobromina.

A xantina, mostrada na Figura III.1, é uma dioxipurina. A Tabela III.1 mostra os três derivados naturais da xantina.

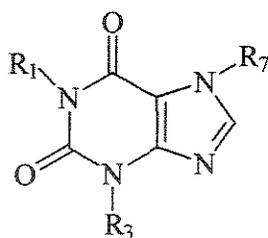


Figura III.1. Alcalóide purina

Tabela III.1. Alcalóides purínicos

Alcalóide Purina	R ₁	R ₃	R ₇
• Cafeína	CH ₃	CH ₃	CH ₃
• Teobromina	H	CH ₃	CH ₃
• Teofilina	CH ₃	CH ₃	H

III.1.1.1. Propriedades físicas e físico-químicas das purinas

As propriedades físico-químicas das metilxantinas ajudam a entender o processo de extração, pois, como se observa na Tabela III.2, existem grandes diferenças no ponto de ebulição, ponto de fusão e entalpia de fusão entre as metilxantinas. Elas também se tornarão úteis na compreensão de aspectos relacionados à solubilidade do composto no fluido supercrítico. A massa molecular da cafeína é de 194,19 g mol⁻¹, enquanto que a teofilina e a teobromina apresentam uma massa molecular igual a 180,17 g mol⁻¹, observando-se também uma maior polaridade da cafeína em comparação à da teobromina e à da teofilina.

Tabela III.2. Propriedades das metilxantinas (Martin et al., 1981; Li e Hartland, 1991; Johannsen e Brunner, 1994).

Propriedade	Cafeína	Teofilina	Teobromina
Fórmula	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
Massa molecular (g g mol ⁻¹)	194,19	180,17	180,17
Ponto de ebulição (K)	512,15 ^a ; 628,2 ^c	547,65 -	621,15 ^a ; 750,8 ^c
Volume molar a 298 K (ml mol ⁻¹)	144	124	124
Densidade a 298 K (g cm ⁻³)	1,321-1,333	1,358	1,419
Parâmetro de solubilidade a 298 K (cal cm ⁻³) ^{0,5}	13,8	14	14
Espectro de absorção UV ($\lambda_{\text{máx}}$)	273-280	270-280	273-280
Momento dipolo (Debye)	3,83 ^b	2,70	3,11
Ponto de sublimação (K)	451	-	563
Pressão de sublimação (bar) a 313 K	3,717 x 10 ⁻⁹	-	-
333 K	4,769 x 10 ⁻⁸	-	1,542 x 10 ⁻¹²
Ponto de fusão (K)	508-11	547-48	618-23
Entalpia de fusão no ponto de fusão (J mol ⁻¹)	21118	29714	41110
Solubilidade ideal (fração molar)			
a 298 K	0,0289	0,0042	0,0002
313 K	0,0435	0,0075	0,0004
333 K	0,0709	0,0148	0,0010
353 K	0,1092	0,0273	0,0024
Solubilidade (fração molar) ^a na água	0,6915	0,4237	0,0310
Dioxano	0,8917	0,7209	0,3080
Hexano	0,0040	0,0976	0,0192

^aMartin et al. (1981), ^bUsando ácido acético como solvente, ^cLi e Hartland (1991)

III.1.1.2. Propriedades farmacológicas

Os derivados xantínicos apresentam diversas propriedades farmacológicas em comum. Assim, por exemplo, a cafeína aumenta a atividade do sistema nervoso central, diminuindo a fadiga. Uma dose de 100-200 mg de cafeína associada à aspirina e fenacetina é

usada em combinação com alcalóides do ergo na formulação de medicamentos contra a enxaqueca. A teofilina é usada em doses de 200 mg no relaxamento muscular, principalmente bronquial (antiasmático). Ela pode também causar diurese (Swan, 1967). A teobromina é usada para diminuir a fadiga, sendo preferencial à cafeína em inchaços cardíacos e na angina (dor forte no peito). Uma dose normal de teobromina varia entre 300-500 mg (Cordell, 1981; Reed e Snieckus, 1977).

Em geral, as metilxantinas têm mostrado ação promissora no tratamento de dores de cabeça, pois diminuem o fluxo de sangue cerebral, aumentando a vasoconstrição e conseqüentemente a resistência vascular, de forma antagônica aos efeitos da adenosina (esta dilata fortemente os vasos sangüíneos coronários e cerebrais). No entanto, existem outros mecanismos de ação como, por exemplo, a interferência com o consumo maior de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.

As metilxantinas são consideradas benéficas em dosagens terapêuticas, sendo que em doses altas podem ocasionar efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais e nervosos, insônia, tremor, taquicardia, palpitações e arritmias (Gilman, 1991).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina) são os compostos psicoativos (causam mudanças no comportamento) mais amplamente consumidos no mundo (Mumford et al., 1996). A cafeína encontra-se em diversos produtos de consumo como o café, o chá, o cacau, bebidas de cola e guaraná (como refrigerante ou *in natura*) e outras bebidas achocolatadas (Choi et al., 1996). A grande maioria dos brasileiros adultos consome doses diárias de cafeína superiores a 300 mg o que corresponde a três xícaras de café expresso. Na Tabela III.3, encontram-se alguns produtos comerciais e a concentração de cafeína em suas composições.

Muitos autores estudaram os efeitos fisiológicos do consumo de cafeína. Libermann et al. (1987) estudaram os efeitos de pequenas doses de cafeína no desempenho humano. Griffiths et al. (1988) relataram os sintomas da dependência de cafeína. Rogers e Dernoncourt (1998) estudaram a síndrome da abstinência causada pela cafeína.

Tabela III.3. Teor de cafeína em alguns alimentos

Produto Comercial	Forma	Cafeína (mg)
Café solúvel ¹	1 xícara pequena (50 ml)	60,00
Café expresso ¹	1 xícara pequena (50 ml)	85,00
Café descafeinado ²	1 xícara pequena (50 ml)	3,00
Refrigerante à base de cola ¹	1 lata (350 ml)	37,00
Refrigerante à base de cola dietético ¹	1 lata (350 ml)	49,70
Sorvete de chocolate ¹	1 bola (100 ml)	40,92
Leite com achocolatado ¹	1 copo grande (240 ml)	5,00
Chá mate (ervas) ¹	1 xícara (180 ml)	35,50
Chá mate comercial ¹	1 copo (180 ml)	23,40
Chá mate pronto com limão ¹	1 copo (180 ml)	19,64
Barra de chocolate ³	56 g	150,00
Bebida de cola ³	100 ml	20,00
Refrigerante de guaraná ¹	1 lata (350 ml)	28,33
Refrigerante de guaraná dietético ¹	1 lata (350 ml)	32,00

¹Fonte: <http://www.prodam.sp.gov.br/sms/drogas/cafeina.htm>, ²Burg (1975), ³Lee (1971)

A cafeína produz um aumento no estado de alerta e causa dependência física e psicológica. Os mecanismos de ação no corpo humano são similares às anfetaminas e à cocaína. Seus efeitos, entretanto, são mais fracos do que os destas drogas, embora atuem nos mesmos receptores do sistema nervoso central (SNC).

A cafeína liga-se aos receptores da adenosina, um neurotransmissor natural, que causa diferentes efeitos no organismo, como a diminuição da atividade neural, dilatação dos vasos sanguíneos, entre outros. A cafeína bloqueia a ação do neurotransmissor adenosina sobre o SNC, estimulando a atividade neural e causando a constrição dos vasos sanguíneos. Com o aumento da atividade neural devido a ingestão do alcalóide, a glândula pituitária libera grandes quantidades de adrenalina, causando uma série de efeitos no organismo humano, como a taquicardia, aumento da pressão arterial, abertura das vias respiratórias, contração dos músculos, etc. Um outro modo de ação da cafeína é o bloqueio da enzima fosfodiesterase, responsável pela quebra do mensageiro cAMP (ciclo adenosil monofosfato).

Tal bloqueio torna os efeitos excitatórios da adrenalina mais prolongados. A cafeína também aumenta a concentração de dopamina no sangue (de forma similar às anfetaminas e à cocaína), por diminuir a recaptação desta no SNC. Os problemas do consumo de cafeína só aparecem em longo prazo, sendo o mais importante a diminuição do sono. O tempo de meia-vida da cafeína no organismo é de 6 horas (Strain et al, 1994).

Muitos medicamentos contra a dor de cabeça, tal como a Aspirina Forte (Bayer), contém cafeína. A propriedade de dilatação das vias respiratórias permite a utilização da cafeína em muitos medicamentos contra a asma.

Peter et al. (1997) divulgaram um estudo mostrando as vantagens e desvantagens do consumo regular de cafeína no comportamento psicomotor. Esses autores concluíram que um consumo moderado favorece a diminuição do tempo de resposta a um estímulo que melhora o desempenho físico.

Riesselmann et al. (1999) estudaram casos de intoxicação fatal com cafeína. A dose letal de concentração de cafeína no sangue descrita pelos autores é de concentrações acima de 80 mg L⁻¹, o que representa a ingestão de aproximadamente 3g de cafeína, sendo que a dose terapêutica situa-se entre 50-200 mg.

A pilocarpina, descrita a seguir, é também um alcalóide com ação estimulante importante no organismo humano.

III.1.2. Alcalóide pilocarpina

Atualmente, os únicos alcalóides em plantas contendo um núcleo simples imidazol conhecidos são os alcalóides do jaborandi. A pilocarpina e a isopilocarpina são usualmente isolados como óleos viscosos sem cor, no entanto, na forma de sais são sólidos higroscópicos.

A pilocarpina (Figura III.2) é o principal alcalóide obtido dos folíolos de arbustos sul-americanos do gênero *Pilocarpus*. O alcalóide foi isolado em 1875 e, pouco depois, suas ações na pupila e nas glândulas sudoríparas e salivares foram descritas por Weber (Taylor, 1991).

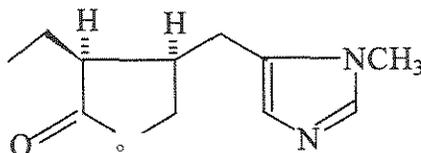


Figura III.2. A pilocarpina (Cordell, 1981)

III.1.2.1. Propriedades físicas e físico-químicas da pilocarpina e isopilocarpina

A pilocarpina pode ser encontrada comercialmente como sais de nitrato de pilocarpina ($C_{11}H_{16}O_2N_2 \cdot HNO_3$, ponto de fusão de $178^\circ C$), pilocarpina hidrociorada ($C_{11}H_{16}O_2N_2 \cdot HCl$, ponto de fusão de $204-205^\circ C$) assim como outros sais de hidrobromato de pilocarpina, sulfato de pilocarpina, picrato de pilocarpina, etc. Do mesmo modo, a isopilocarpina encontra-se como o nitrato de isopilocarpina, a isopilocarpina hidrociorada, a isopilocarpina hidrobromada, entre outros. A isopilocarpina hidrociorada, de forma monoclina e com ponto de fusão (p.f.) $159^\circ C$, contém meia molécula de água de cristalização. Sua rotação específica é $\alpha_D = +1,93^\circ$; $l=1$ dcm; $c=4,974$; $[\alpha]_D = +38,8^\circ$.

A (+)-pilocarpina (p.f. $34^\circ C$) dificilmente cristaliza, sendo que suas ligações principais no estado cristalino estão presentes entre o átomo de nitrogênio N-1 e o átomo de oxigênio O-1 de uma segunda molécula de pilocarpina como visualizados na Fig. III.3 (Haase e Kussather, 1972).

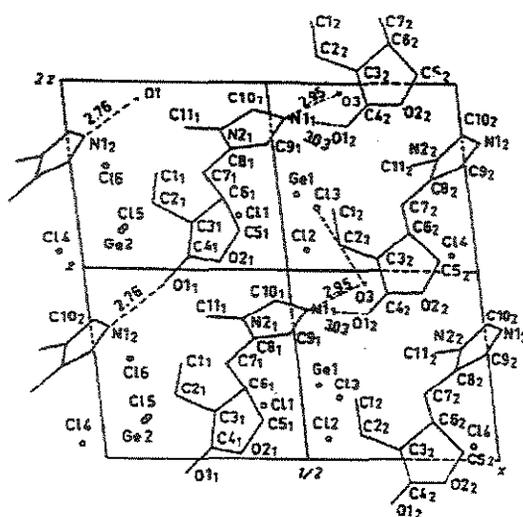


Figura III.3. Cristais de pilocarpina (Haase e Kussather, 1972)

Os dois isômeros, pilocarpina e isopilocarpina, têm a composição $C_{11}H_{16}O_2N_2$. A pilocarpina e a isopilocarpina se comportam como bases e apresentam solubilidades similares em água e etanol. A pilocarpina deriva de um álcool primário enquanto que a isopilocarpina provém de um álcool secundário. Isto explica porque a esterificação do álcool em HCl é completo com a pilocarpina e não com a isopilocarpina. O fato é que os álcoois primários esterificam mais facilmente que os álcoois secundários e são incompatíveis para formar o ácido pilocárpico (Petit e Polonovski, 1897).

A pilocarpina hidroclorada apresenta pH igual a 4,44 a 18°C (Samdahl e Tancred, 1942) e pode ser convertida a isopilocarpina por aquecimento, ou pela reação com hidróxido de sódio aquoso ou etóxido de sódio alcoólico como explicado no item a seguir (Petit e Polonovsky, 1987).

III.1.2.2. Degradação da pilocarpina

A cinética da epimerização da pilocarpina à isopilocarpina e sua hidrólise a ácido pilocárpico foram estudadas por Nunes e Brochmann-Hassen (1974). Ambas formas de degradação causam a perda de atividade farmacológica, sendo que o valor de suas rotações específicas diminuem pela adição de álcali (Tabela III.4) devido à abertura do anel da

lactona. A rotação específica da pilocarpina também diminui ao permanecer em soluções aquosas e em etanol devido à degradação (Tabelas III.4 e III.5).

Tabela III.4. Efeito do álcali na rotação específica da pilocarpina e isopilocarpina usando água como solvente

Proporção molar de álcali	Conc. alcalóide	$[\alpha]_D$	Ref.
Alcalóide Pilocarpina			
Sem NaOH	2,0	+106°	Petit e Polonovski (1897)
0,25 NaOH	5,95	+85,4°	Jowett (1900)
0,5 NaOH	5,95	+62,47°	Jowett (1900)
1 NaOH	5,95	+32,21°	Jowett (1900)
4 NaOH	2,97	+33,62°	Jowett (1900)
1 ou mais NaOH aquecido	2,83	+21,15°	Jowett (1900)
	2,09 ¹	+25,5°	Max e Polonovski (1922)
Solução com três semanas de preparo	7,09	+77,53°	Jowett (1900)
Alcalóide Isopilocarpina			
Sem NaOH	6,56-11,65	+42,8°	Jowett (1900)
Excesso NaOEt	1,30 ¹	+7,2°	Max e Polonovski (1922)

¹ etanol como solvente

Tabela III.5. Potenciais de rotação específica (Battersby e Openshaw, 1953).

Composto	Solvente	$[\alpha]^1$	Conc.	T (°C)
Pilocarpina	Água ²	+106,0°	2,0	18
	CHCl ₃ ³	+106,0°		
	Etanol ³	+100,0°	2,1	-
P. hidrociorada	Água ⁴	+91,7°	9,9	
	Água ²	+91,0°	2,0	18
Nitrato de pilocarpina	Água ⁴	+82,9°	9,6	
	Água ²	+82,2°	2,0	18
Degradação de produtos de pilocarpina				
α -ácido anhidropilocarpico etil éster nitrato	Etanol ³	-9,0°		
γ -ácido cloropilocarpico etil éster	Etanol ³	+29,2°		
Isopilocarpina hidrociorada	Água ²	+50,0°	2,0	18

Tabela III.5 Continuação. Potenciais de rotação específica (Battersby e Openshaw, 1953).

Composto	Solvente	$[\alpha]^1$	Conc.	T (°C)
Degradação de produtos de isopilocarpina				
γ -ácido cloroisopilocárpico etil éster	Etanol ³	-3,0°		
Isopilocarpinolactona	Etanol ⁴	-51,9°	4,0	16
Pilocarpidina hidrocloreada	Água ⁴	+81,3°	1,5	
	Água ⁵	+72,0°	6,3	16

¹Rotação específica para a luz de sódio, ²Petit e Polonovski (1897), ³Max e Polonovski (1922),

⁴Jowett (1901) e ⁵Merck (1896)

Existem diferentes maneiras de isomerização da pilocarpina de acordo com Petit e Polonovski (1897):

- i) Isomerização na planta. A isopilocarpina é encontrada com a pilocarpina na planta de jaborandi em diferentes proporções, dependendo da idade da planta. Para evitar a isomerização indesejável a isopilocarpina e a degradação enzimática, as folhas de Jaborandi são processadas rapidamente após a colheita.
- ii) Isomerização em solução neutra. Em solução aquosa, a pilocarpina é estável e pode ser conservada por um tempo prolongado 'a frio' sem sofrer alteração, mas pode ser alterada pela ebulição. Esta transformação parcial pode ser identificada pela sua rotação específica.
- iii) Isomerização com ácidos. Na presença de ácidos nas mesmas concentrações, a pilocarpina pode ser sensivelmente influenciada 'a frio', começando uma isomerização na presença de ácidos minerais diluídos.
- iv) Isomerização com álcalis. A frio e em solução aquosa não há degradação. A isomerização é rápida após a ebulição por um período prolongado.

- v) Isomerização 'a quente'. Na ausência de todos os solventes, o calor é um agente de isomerização potente. Para transformar a pilocarpina hidrociorada a isopilocarpina hidrociorada é necessário alcançar 205°C durante 15-20 min.
- vi) Isomerização usando C_2H_5ONa . O etilato de sódio é o melhor agente para causar isomerização.

A Tabela III.6 apresenta as solubilidades da pilocarpina hidrociorada e nitrato de pilocarpina nos diferentes solventes. Observa-se que a pilocarpina hidrociorada é muito solúvel na água.

Tabela III.6. Solubilidades dos sais do alcalóide

Sal	Solvente	T (°C)	Solubilidade (g/100 g solvente)
Pilocarpina hidrociorada	Água ¹	18	25,0
	95% Etanol ¹	18	9,6
Nitrato de pilocarpina	Água ²	20	15,6
	Água ¹	18	14,4
	95% Etanol ¹	18	0,7
	100% Etanol ²	20	0,4
Nitrato de isopilocarpina	Água ²	19	11,9
	Água ¹	18	12,4
	95% Etanol ¹	18	0,7
	100% Etanol ²	20	0,3

¹Petit e Polonovski (1897), ²Jowett (1900)

A pilocarpina pode degradar por epimerização ou hidrólise (Figura III.4). A epimerização da pilocarpina forma a isopilocarpina e a hidrólise origina o ácido pilocárpico. A isopilocarpina pode degradar ainda a ácido isopilocárpico. A competição entre as formas de degradação é dependente de ambos pH e temperatura (Fan et al., 1996). Em soluções aquosas, a degradação pode ocorrer por epimerização a isopilocarpina ou hidrólise a ácido pilocárpico e ácido isopilocárpico. Ambos os mecanismos resultam na perda de atividade farmacológica (Kennedy e McNamara, 1981). O mais importante destes mecanismos é a abertura do anel da lactona. Enquanto a lactona está intacta, o alcalóide conserva sua configuração estereoquímica (Chung et al., 1970).

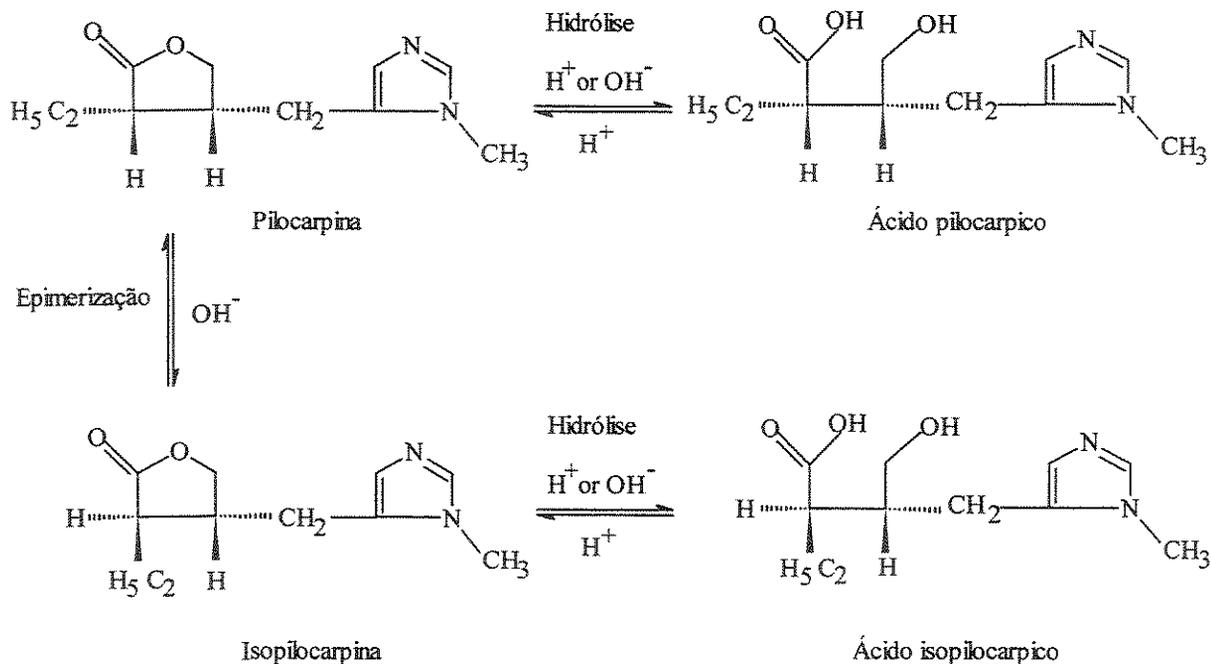


Figura III.4. Esquema de degradação da pilocarpina

III.1.2.3. Análise da pilocarpina

A pilocarpina pode ser identificada qualitativamente por análises de ensaios colorimétricos (Levine e Horrocks, 1960; Lynch et al., 1948; Wurtzen, 1939) e de ensaios gravimétricos (Bourcet, 1929). Entre outros métodos analíticos utilizados para identificação e quantificação da pilocarpina estão as cromatografias de camada delgada (Tulus e Iskender, 1970; Wan, 1971; Ebel et al., 1971), potenciometria com eletrodos (Kalman et al., 1972), fotodensitometria (Massa et al., 1971), cromatografia gás-líquido (Bayne et al., 1976; Link e Bernauer, 1972); espectrofotometria e polarimetria ultravioleta (Scott et al., 1981; El-Masry e Soliman, 1980) e cromatografia líquida de alta eficiência (Noordam et al., 1981; Kennedy et al., 1981; Sternitzke et al., 1992; van Ackeren et al., 1984; Dunn e Thompson, 1983; Wood e Robinson, 1984). De todos estes métodos citados acima, o mais preciso e rápido é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Por isto, especial atenção é conferida a este método.

Conforme mencionado anteriormente, a degradação da pilocarpina pode ocorrer com variações de pH, temperatura e tempo, sendo primordial avaliar a decomposição da pilocarpina nas formulações farmacêuticas, já que está relacionada aos efeitos farmacológicos no organismo humano. Portanto, vários métodos de análises usando CLAE foram descritos na literatura para a identificação da pilocarpina e os produtos de sua degradação. No entanto, enquanto alguns destes métodos mostram baixa resolução e ineficiência, outros requerem muito tempo, causando danos na coluna ou na bomba do cromatógrafo. Alguns parâmetros destes métodos presentes na literatura são descritos brevemente na Tabela III.7.

Tabela III.7. Especificações para identificar a pilocarpina e seus produtos de degradação por CLAE

Coluna	Tempo de retenção	Produto	Referência
C ₁₈	15,4	Pilocarpina	Noordam et al. (1978)
C ₁₈	11,7	Pilocarpina	O'Donnell et al. (1980)
Si 60	21,9	Isopilocarpina	Dunn et al. (1981)
Fenil	13,1	Pilocarpina	Kennedy e McNamara (1981)
Radial-pak C ₁₈	6,9	Pilocarpina	Dunn e Thompson (1983)
Fenil	50-54	Pilocarpina	van Ackeren et al. (1984)
	45-49	Isopilocarpina	
	33-38	Acido Pilocarpico	
β-ciclodextrina	7,6	Pilocarpina	Sternitzke et al. (1992)
	8,5	Isopilocarpina	
	4,3	Acido Pilocarpico	
	5	Acido isopilocarpico	
YMC Pack	10	Pilocarpina	Fan et al. (1996)
ODS-AM	8	Isopilocarpina	
	13	Acido Pilocarpico	
	14	Acido isopilocarpico	

III.1.2.4. Efeitos farmacológicos da pilocarpina

A pilocarpina atua sobre as terminações nervosas das células secretoras, causando aumento do suor e da saliva. Possui também ação renal, removendo metabólitos tóxicos. Algumas pesquisas reportaram que ela ainda estimula o crescimento de cabelo, portanto, é

incorporada em algumas loções capilares (Swan, 1967; Oliveira e Akissue, 1989). Em dermatologia, usa-se como modificador da pele (Oliveira e Akissue, 1989). Este alcalóide é usado no tratamento do glaucoma. Costuma ser mais bem tolerada que os anticolinesterásicos e constitui o agente colinérgico padrão no tratamento inicial do glaucoma de ângulo aberto (Beasley e Fraunfelder, 1979). A ação miótica da pilocarpina é útil para corrigir a midríase produzida pela atropina. A pilocarpina é também empregada para impedir a formação de aderências entre a íris e o cristalino (Taylor, 1991) e permite realizar medições oftalmológicas (Laibovitz et al., 1996). Kushnick et al. (1996) mencionam a toxicidade da pilocarpina e dentre seus efeitos adversos incluem-se miose, a dor de cabeça, náusea, vômito e diarreia, assim como salivação e, edema pulmonar. Com doses baixas (de 10 mg) de pilocarpina, pode-se causar diaforesis intensa num adulto.

Muitas prescrições médicas, atualmente em uso, contêm pilocarpina (Taylor, 1991). Dentre as preparações de pilocarpina, incluem-se as soluções oftálmicas de cloreto e nitrato de pilocarpina em concentrações que variam de 0,25-10%. A pilocarpina hidrociorada é um dos mais caros alcalóides parasimpatomimético e miótico. A pilocarpina é menos irritante que o salicilato de fisostigmina e pode ser empregada por períodos prolongados sem produzir efeitos indesejáveis (Chung et al., 1970). Ela estimula também as secreções no trato respiratório, nas glândulas gástricas, lacrimais, salivares e outras glândulas, acelera o pulso, aumenta o peristaltismo e promove contração uterina. Frequentemente, este alcalóide é usado nas preparações para tratamento da asma, calvície, catarro, diabetes, náusea, reumatismo e sífilis. Recentemente, os pacientes que sofrem de xerostomia (boca seca) têm usado este alcalóide na forma oral para melhorar a salivação (Hill e Barcza, 1966; Aromdee et al., 1996). Estudos recentes conduzidos na área farmacológica demonstraram que novas formulações melhoram a biodisponibilidade da pilocarpina e estendem a duração de sua atividade (Bucolo e Mangiafico, 1999; Zurowska et al., 1999). Meseguer et al. (1996) estudaram a possibilidade de aumentar a viscosidade da pilocarpina na formulação para melhorar o drenado e a penetração desta na córnea.

III.2. PLANTAS NATURAIS ESTUDADAS

Os alcalóides xantínicos descritos anteriormente, encontram-se em plantas naturais como o café (*Coffea sp.*), a erva mate (*Ilex sp.*), o guaraná (*Paullinia sp.*) e o cacau (*Theobroma sp.*). O alcalóide pilocarpina é encontrado no jaborandi (*Microphyllus sp.*). Visto que tais alcalóides exercem efeitos farmacológicos no organismo humano, é necessária a extração e purificação de suas matrizes de origem para produção de medicamentos. O conhecimento das matrizes a serem estudadas como, por exemplo, sua composição química permitirá uma melhor recuperação destes princípios ativos.

Nesta Tese de Doutorado foram estudadas a extração de metilxantinas a partir da erva mate, guaraná e cacau e a extração da pilocarpina de jaborandi. Para uma melhor compreensão das matrizes estudadas, são descritas a seguir algumas características botânicas, bioquímicas e econômicas das plantas naturais de erva mate, guaraná, cacau e jaborandi.

III.2.1. ERVA MATE

O *Ilex*, pertencente à família *Aquifoliaceae*, pode ser classificado em mais de 400 espécies. No Brasil existem 60 espécies e na Ásia 112 espécies (Alikaridis, 1987). O *Ilex* possui espécies conhecidas também como plantas 'holly'. As espécies mais conhecidas deste gênero são o *I. aquifolium* ('holly' Europeu ou Inglês), *I. opaca* ('holly' Americano), *I. cornuta* ('holly' Chinês) e *I. crenata* ('holly' Japonês). Nos últimos anos, 'hollies' têm sido comercializadas como artigos de decoração pelas suas sementes coloridas e folhas verdes brilhantes (Grieve, 1982). No Brasil e Paraguai é cultivada uma das espécies mais utilizadas para o consumo humano: o *Ilex paraguayensis* ou *paraguensis* ou conhecida, também, como *paraguarienses*.

A erva mate, mostrada na Figura III.5, é um arbusto do sub-bosque que pode medir até 12 metros. As folhas, que são a parte mais importante da planta, são ovais (Guimarães, 1989).

A erva mate ou chá do Paraguai é uma bebida similar ao chá preto (de folhas de *Camelia sinensis*). O mate é preparado pela infusão de folhas verdes ou secas principalmente de *Ilex paraguariensis* ou misturadas com folhas de outras espécies de *Ilex* (Clifford e Ramirez, 1990). A erva de chá mate é conhecida na região da América do Sul como ‘chimarrão’ e é tradicionalmente consumida pelos gaúchos. A bebida começou a ser consumida na América do sul antes da invasão da Espanha, sendo que a planta foi primeiramente cultivada por missionários jesuítas (Herzfeld, 1920; Moreau, 1948).

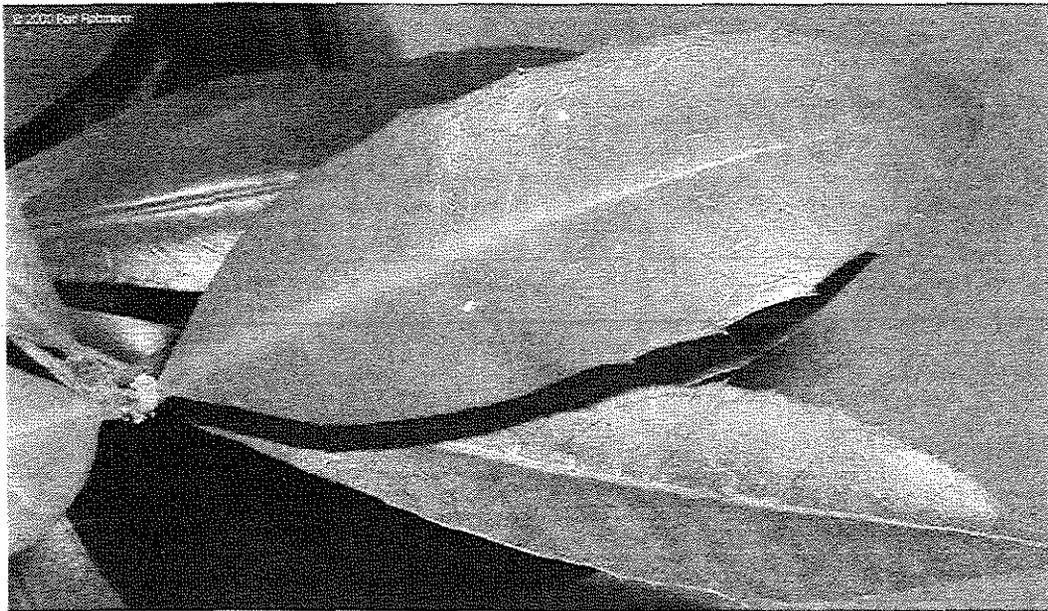


Figura III.5. Erva mate.

Na América do Sul, a maior quantidade de mate é produzida e consumida pela Argentina, Paraguai e Uruguai (Graham, 1984; Alikaridis, 1987; James, 1991). Os Estados Unidos, a Alemanha e o Japão começaram recentemente a importar erva mate (Tormen, 1995).

Oudry, em 1827, descobriu no erva uma substância de características semelhantes à cafeína, denominando-a teína. Posteriormente, Pfaff e Liebig, em 1832, verificaram que se tratava do alcalóide cafeína (Leblond, 1883). As espécies *Ilex* são formadas por diversos constituintes químicos que podem ser classificados segundo Alikaridis (1987) como fenóis, antocianinas, flavonóides, terpenóides, esteróis, alcalóides purina, aminoácidos, compostos

nitrogenados, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e carotenóides. A erva mate é uma importante fonte de minerais e substâncias nutritivas na dieta da população regional, considerando o seu consumo massivo na forma de infusão de chá. Seu valor protéico se deve principalmente a presença da colina (ácido aminado essencial). Entre as vitaminas foram identificadas as do complexo B, a aneurina (B1), o ácido nicotínico (B2), o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina E. Dentre os minerais, destacam-se manganês, cálcio, potássio e ferro (Vera et al., 1997).

O conhecimento dos constituintes químicos das espécies *Ilex* tem permitido elucidar os possíveis usos do erva mate como estimulante, anti-reumático e diurético para o qual as folhas de *I. paraguariensis* são tradicionalmente usadas, possivelmente devido ao seu alto teor de purinas (Alikaridis, 1987).

Os teores de cafeína variam de 132 mg kg⁻¹ em frutos maduros a 9147 mg kg⁻¹ em folhas novas, enquanto a teofilina e a teobromina não foram detectadas em frutos maduros, mas sim em folhas novas, com teores de 1565 mg kg⁻¹ de teobromina e 47 mg kg⁻¹ de teofilina. Mazzafera (1994) mostrou que os teores de cafeína e teobromina são maiores em tecidos de folhas de mate novas que em tecidos de folhas velhas (Tabela III.8). Dados quantitativos de ácido clorogênico (9,40%) e purinas (teobromina: 0,71%, cafeína: 1,44% e teofilina: não detectada) na erva mate do Brasil foram também apresentados por Clifford e Ramirez (1990).

Muitos estudos de laboratório (Wang et al., 1994; Ohno et al., 1995; Inagake et al., 1995; Hasegawa et al., 1995; Katiyar et al., 1995; entre outros) têm revelado que os preparos de chá e seus polifenóis exercem um efeito inibitório na formação e crescimento de tumores. O alto consumo de chá, entretanto, provoca irritabilidade e insônia, podendo ocasionar depressão cerebral, tremor nervoso e entorpecimento. O teísmo crônico é caracterizado por constipação e emagrecimento.

Tabela III.8. Conteúdo de metilxantinas (mg kg⁻¹ material seco) no maté (Mazzafera, 1994).

Órgãos	Teobromina	Teofilina	Cafeína
Folhas novas - FB ¹	768 _± 30	209 _± 5	8375 _± 251
Folhas velhas - FB	221 _± 10	58 _± 2	1626 _± 52
Folhas novas - NFB	1565 _± 45	47 _± 4	9147 _± 256
Folhas velhas - NFB	340 _± 7	142 _± 6	5371 _± 161
Frutos imaturos	14 _± 0,6	nd	378 _± 9
Frutos maduros	Nd	nd	132 _± 2
Cortesã	695 _± 21	nd	1484 _± 59

FB¹: ramos que dão frutos; NFB: ramos que não dão frutos; nd: não detectadas.

O processo de beneficiamento e industrialização da erva maté é dividido em duas partes: o ciclo do cancheamento e o ciclo da industrialização, executados em níveis de produtor e de indústria, respectivamente. Na industrialização, três etapas são claramente definidas até a obtenção do produto final, a saber: o sapeco, a secagem e o cancheamento.

A maior parte do mate produzido no Sul do Brasil provem de ervas nativas. Com a diminuição de sua produção, pela exploração contínua, houve um aumento na demanda do produto tanto no mercado interno como no externo. Desse modo, tornou-se prática comum o plantio dessa espécie. A região Sul do Brasil responde por cerca de 97% da produção nacional, enquanto Mato Grosso do Sul, embora crescente, apresenta uma participação de apenas 3%. Na primeira metade da década de 80, a produção brasileira de erva mate cancheada manteve-se estagnada, flutuando ao redor de 102.000 toneladas (ton) anuais. A partir de 1985, ocorreu um incremento de 7% ao ano. O Rio Grande do Sul no início da década de 70 era o principal produtor, respondendo por cerca de 50% da produção do país, diminuindo sua participação para 25% em 1989. O consumo brasileiro de erva mate tem um grande potencial com produtos como: chimarrão, chás e outros derivados. A região Sul tradicionalmente é a que mais usa o chimarrão, consumindo em média mais de 90% da produção paranaense, destacando-se os Estados do Paraná e Rio Grande do Sul. Os outros 10% são usados para produtos como chás, mate solúvel, etc (Tormen, 1995).

A erva mate, em forma de chá, possui grande potencial de penetração nos estados de climas mais quentes do país. A Região Sudeste é a maior consumidora de erva mate industrializado paranaense, absorvendo em média mais de 60% do total da produção exportada para outros estados. Os estados do Brasil que produzem erva-mate são quatro, sendo o Paraná o grande produtor, como observado na Tabela III.9.

Tabela III.9. Produção Brasileira de erva-mate (Tormen, 1995)

Estado	Produção Anual (ton)
Mato Grosso do Sul	4.000
Paraná	50.000
Santa Catarina	45.000
Rio Grande do Sul	40.000
Total/ano	139.000

Tormen (1995) analisou o consumo nacional apresentado na Tabela III.10, mostrando ser o estado de Rio Grande do Sul o maior consumidor de erva para chimarrão, e o Rio de Janeiro, de erva mate, originando um consumo total de 117.000 toneladas por ano.

Tabela III.10. Consumo anual de erva-mate no Brasil (ton)

Estado	Erva para chimarrão	Erva-mate
Rondônia	1.000	50
Mato Grosso do Sul	5.000	50
São Paulo	1.000	600
Rio de Janeiro	500	1.500
Paraná	20.000	300
Santa Catarina	15.000	200
Rio Grande do Sul	70.000	300
Outros	1.000	500
Total/ano	113.500	3.500

Fonte: Tormen (1995)

A análise da evolução das exportações brasileiras demonstra que desde 1980 praticamente todas as exportações brasileiras de erva maté cancheada destinavam-se ao Uruguai. Apenas em 1988, as exportações para outros países tiveram alguma importância. De uma produção brasileira de aproximadamente 150.000 ton/ano, apenas 20.000 toneladas são exportadas para o Chile e o Uruguai, mas a erva mate brasileira atinge também os mercados da Síria e Alemanha e começa a conquistar o Japão e os Estados Unidos. A Tabela III.11 mostra as exportações brasileiras que somam um total de 22.000 toneladas, destinadas principalmente para o Uruguai, o Chile, a Alemanha e os Estados Unidos de América (Tormen, 1995).

Tabela III.11. Exportações Brasileiras de erva-mate (ton/ano)

País	Quantidade
Uruguai	14.000
Chile	7.000
Argentina	(esporádica)
Alemanha e EUA	1.000
Total/ano	22.000

Fonte: Tormen (1995)

III.2.2. GUARANÁ

O guaraná espécie *Paullinia sorbilis*, pertencente à família *Sapindaceae/Paulinieae*, é conhecido também como *Paullinia cupana* Kunth. O nome *Paullinia* é dedicado a Simon Paulli (professor de botânica, anatomia e cirurgia) e *sorbilis* provêm do latim *sorbilare* que significa infuso, elixir, etc. O guaraná é um nome indígena proveniente dos *Guaranis* da Amazônia. A espécie é encontrada em vários países da América do sul (Brasil, Venezuela, Paraguai e Uruguai).

Os frutos do guaraná (Figura III.6) são ovalados, com cápsulas carnosas e segmentadas de 2-2,5 cm de diâmetro, possuem cor laranja-avermelhada quando maduros, contendo de uma a três sementes, revestidas por uma casca (endocarpo) dura, lisa e de cor marrom escuro. Após secas ou torradas, as amêndoas formam o produto comercial, com alto teor de cafeína (4 a 5%), em torno de 3 a 5 vezes mais que no grão de café arábica; muito mais que na erva mate (1%) (Marx et al., 1985). As sementes de *Paullinia cupana* apresentam cheiro pouco perceptível, sabor fracamente adstringente e amargo e cor pardo-purpúria ou pardo-negra.



Figura III.6. Fruto e semente de guaraná.

O gênero *Paullinia* compreende aproximadamente 180 espécies, das quais são conhecidas ao redor de 40 espécies pelos seus usos como veneno para peixes, em medicamentos, bebidas estimulantes, entre outros. As espécies usadas em bebidas ricas em cafeína são a *P. cupana*, var. *sorbilis* e *P. yoco* (encontrada na Colômbia, Equador e Peru).

O cultivo tradicional e o processamento das sementes do guaraná são realizados pelos índios Saterê-Maué, na Amazônia central, próxima aos Maués. O guaraná é colhido manualmente e torrado para facilitar a remoção da casca da semente, em seguida os 'kernels' são moídos num moinho. Enquanto se mói, é adicionada água para formar uma pasta, a qual é dividida, dando a forma de 'bastões', para depois ser armazenada após o

processo de secagem no fogo. De acordo com a necessidade, o bastão é ralado, resultando num pó suspenso em água.

A pasta do pó de guaraná apresenta-se, geralmente, sob a forma de cilindros duros, de cerca de 3 a 5 cm de diâmetro e de 10 a 30 cm de comprimento, de cor pardo-avermelhado escura externamente. Internamente é de cor pardo-avermelhada clara e apresenta fragmentos mais ou menos grossos da semente e, às vezes, com seus tegumentos pardo-negros.

O primeiro relato do uso do guaraná ocorreu em 1669, quando o missionário jesuíta João Felipe Betendorf, na Amazônia, observou que os índios tinham predileção por uma bebida estimulante que tomavam a toda hora. Ele notou que essa bebida tinha efeitos diuréticos e muitos falavam de sua eficácia contra dores de cabeça, febres e câibras. No século XVII, o bispo João Queiróz afirmava que o guaraná aliviava diarreias e servia para atenuar os efeitos do calor (Henman, 1986). O guaraná era então usado apenas em forma de pó ou de bastão. Recentemente, ele se encontra também em xaropes, extratos e outros produtos de destilação, facilitando sua utilização como fonte de cafeína nas indústrias de refrigerantes.

As sementes possuem 2 cotilédones rodeados por uma casca (testa). O conteúdo de cafeína maior encontra-se nos cotilédones (4,3%) em base seca (Baumann et al., 1995). As sementes do guaraná sem casca são formadas principalmente por celulose (37,8%), ácido tânico (8,5%), amido (5,5%) e cafeína (4,8%), como mostrados na Tabela III.12. Benigni et al. (1962) apresentam alguns dados na Tabela III.13, dos principais alcalóides presentes no guaraná (4,5% cafeína e 0,3% teofilina). A composição química das sementes de guaraná, *Paullinia cupana*, indicam que esta planta contém 3 vezes mais cafeína que o café. As análises bromatológicas identificam nos taninos (especialmente no flabofeno) a responsabilidade pela coloração vermelho-castanha tão característica dos extratos usados na indústria de refrigerantes.

Tabela III.12. Substâncias presentes no guaraná (%).

Em cada 100 g de substância seca ao ar	Casca	Semente sem casca	Pasta Peckholt
Cafeína	2,43	4,81	4,28
Óleo graxo (amarelo)	-	2,29	2,95
Resina (vermelha)	0,49	4,00	7,80
Substância corante (vermelha)	1,02	1,05	1,52
Saponina	0,09	-	0,06
Ácido tânico	4,4	8,51	8,65
Amido	-	5,49	9,35
Glicose	1,26	0,54	0,77
Dextrina, pectina e mucilagem	1,55	8,94	7,40
Umidade	4,14	8,94	7,65
Celulose e fibra vegetal	84,68	37,83	49,12

Tabela III.13. Alcalóides presentes no guaraná (Benigni et al., 1962)

Componentes	Composição (%)
Cafeína	4,49
Teofilina	0,28
Teobromina	0,003
Adenina	0,0045
Guanina	0,005
Xantina	0,006
Hipoxantina	0,008

Os principais compostos químicos presentes na semente de guaraná podem ser resumidos, em g kg⁻¹, como: cinza (14,2), gordura (30), proteína (98,6), amido (50-60), tanino (85-120) e resina (70). Decorrentes do alto teor de purinas, saponinas e taninos, a bebida de guaraná produz vários efeitos no organismo. Tais efeitos são classificados por Henman (1986) e Benigni et al. (1962) como: estimulante do sistema nervoso central, regulador intestinal do aparelho digestivo, diurético nos rins; tônico cardio-vascular (afeta o

sistema sangüíneo periférico, causando a dilatação e a contração no cérebro, produzindo uma ação analgésica em enxaquecas); anti-blenorrágico (usado em diversos distúrbios do útero e da vagina, principalmente na blenorragia); afrodisíaco (aumenta o apetite sexual e diminui a secreção espermática). Como droga de abuso pode produzir dependências ou efeitos colaterais como dores intestinais agudas, agitação nervosa, gastrites e diarreias, se ingerido em doses maiores.

A maior parte da produção de guaraná é absorvida pela indústria de refrigerantes, que tritura e mói as sementes com cascas, submetendo o pó resultante a um processo de destilação com álcool, sendo então adicionado ao 'guaraná champagne'. As Tabelas III.14 e III.15 mostram a produção Brasileira e cotação no mercado de guaraná desde 1994 até 1998.

Tabela III.14. Produção do guaraná no Brasil (ton) (IBGE, 2001)

Estado	1994	1995	1996	1997	1998
Acre	19	24	30	30	30
Amazonas	333	503	806	359	448
Rondônia	676	147	50	N.D.	N.D.
Amazônia Oc. ¹	1028	674	886	389	478
Pará	41	21	24	22	25
Região Norte ²	1069	695	910	411	502
Bahia	1424	1546	957	1449	1893
Mato Grosso	181	149	157	132	132
Total	2674	2390	2024	1992	2527

¹Amazônia Ocidental: engloba os estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima, ²Região Norte: Amazonas, Acre, Para, Rondônia e Roraima.

O processamento do guaraná usa uma série de técnicas simples. Primeiro, os cachos dos frutos são colhidos e fermentados durante dez dias, em seguida são passados por uma malha grossa de arame para a remoção dos talos. Os frutos são sujeitos à ação de cilindros rolantes que partem sua casca externa e são espalhados sobre o piso de concreto em túneis recobertos de plástico para secarem ao sol. A seguir são debulhados para separá-los de suas

sementes; não precisam ser torrados para a moagem que antecede à sua eventual destilação (Henman, 1986).

Tabela III.15. Valor da produção do guaraná no Brasil (Mil dólares)

Estado	1994	1995	1996	1997	1998
Acre	70,74	263,68	148,20	148,20	148,20
Amazonas	1.084,67	2.534,98	3.874,41	1.608,90	1.869,29
Rondônia	3.912,11	948,33	242,30	N.D.	N.D.
Amazônia Oc.	5.067,52	3.746,99	4.264,96	1.757,10	2.017,49
Pará	31,08	155,01	89,78	76,73	81,18
Região Norte	5.098,60	3.902,00	4.354,74	1.833,83	2.098,67
Bahia	6.668,81	5.135,63	3.382,44	4.774,74	5.807,62
Mato Grosso	1.314,04	1.074,27	783,92	572,11	572,11
Total	13081,45	10111,90	8521,10	7180,68	8478,40

Fonte: IBGE (2001)

Segundo a Federação das Indústrias do Estado do Amazonas (FIEAM, 2001), a comercialização do guaraná apresenta grande potencial nos mercados internos e externo. O guaraná é comercializado como refrigerante, bastão, pó e xarope, sendo mais consumido o pó e extrato líquido devido ao crescente interesse por parte de laboratórios, farmácias e lojas de produtos naturais na utilização das suas bases purínicas (alcalóides cafeína, teobromina e teofilina) do guaraná, para a fabricação de diversos produtos, como por exemplo o *Red Bull* –energizante- que se encontram no mercado (FIEAM – Investimentos no Amazonas - guaraná).

Espínola et al. (1997) estudaram atividade farmacológica da ingestão de guaraná em pó (*Paullinia cupana* Mart.) em cobaias (ratos) de laboratório. Os melhores resultados foram conseguidos com a menor dose de guaraná que equivale a concentração de cafeína de $0,0062 \text{ mg mL}^{-1}$ e indicam um aumento da performance física e memória das cobaias. Os resultados apontam que não apenas a cafeína, mais outros componentes das sementes do guaraná contribuíram com o resultado. Mattei et al. (1998) estudaram os efeitos tóxicos e

comportamentais causados pela ingestão de doses diárias de guaraná em cobaias por até 23 meses. Os resultados obtidos indicam que nas dosagens administradas não causaram efeitos tóxicos ou comportamentais nestas cobaias durante os estudos, nem alteração no peso e mortalidade no peso em relação a cobaias utilizadas para controle. As intoxicação letais devido ao uso guaraná são raras, porém Riesselmann et al. (1999) relata um único caso comprovado ocorrido na Alemanha em 1998 em que a autópsia revelou cápsulas de guaraná em pó no estômago da vítima e a análise sangüínea detectou uma taxa letal de cafeína.

III.2.3. CACAU

O cacau, *Theobroma cacao* pertence à família *Sterculiaceae/teobromee* e é conhecido pelo asteca como 'cacahuate' do qual os antigos mexicanos preparavam a bebida de chocolate, e denominado pelos espanhóis de 'cacau'. O cacau é originário da América central (litoral do México) e da ribeira da Amazônia (Maranhão), Orinoco, Magdalena, etc. Ele possui cheiro e sabor levemente amargo, agradável e aromático (Oliveira et al., 1991; Benigni et al., 1962).

A semente, mostrada na Figura III.7, é oviforme, medindo de 20 a 30 mm de comprimento, por 4 a 16 mm de largura e 4 a 8 mm de espessura. Em sua superfície externa, a coloração varia de pardo-avermelhada a pardo-acinzentada.



Figura III.7. Semente inteira de cacau (Oliveira et. al., 1991)

Entre seus principais componentes destacam-se as proteínas 12%, amidos 5-8%, polpa de cacau 50-52% e cinzas 3,3%. As amêndoas de cacau contêm principalmente óleo (50-55% peso seco) e xantinas (1,2-1,8% teobromina e 0,1-0,2% cafeína).

Na indústria de alimentos, o cacau é um produto valioso, pois seus subprodutos são empregados na fabricação de chocolates e outros produtos de confeitaria. Aremu e Abara (1992) identificaram nas amêndoas de cacau: proteínas, gorduras, carboidratos, fibra e cinza como mostrados na Tabela III.16. Wiggall em 1970 já havia encontrado algumas vitaminas, como por exemplo nicotinamida, riboflavina, piridoxina, pantotenato de cálcio, etc.

Tabela III.16. Nutrientes presentes no cacau (Aremu e Abara, 1992; Wiggall, 1970).

Nutriente	% massa seca (g/g material seco x 100%)	Vitamina	mg/100 g cacau
Proteína	14,3	Nicotinamida	1,85
Gordura	42,8	Riboflavina	0,30
Carboidrato	29,3	Piridoxina	0,04
Fibra	9,0	Pantoteonato de cálcio	0,70
Cinza	4,6	Ácido Nicotínico	1,70
		Tiamina	0,08
		Caroteno	0,04

Estudos de Abiola e Tewe (1991) também mostraram sua utilidade e valor nutritivo em alimentos para animais: aves, cavalos e porcos. Eles avaliaram a composição química dos quatro principais subprodutos do cacau: casca (*shell*), palha (*husk*), torta e pó. A Tabela III.17 mostra os resultados da extração de teobromina das quatro matérias já mencionadas, sendo que a torta foi a que apresentou maior teor de alcalóide com 2,2% enquanto que a palha (*husk*) apresentou o menor valor.

Tabela III.17. Composição química dos subprodutos do cacau.

Componentes do cacau	Casca (<i>shell</i>)	Palha (<i>husk</i>)	Pó (<i>dust</i>)	Torta (<i>cake</i>)
Matéria seca (%)	95,0	92,7	94,3	96,5
Proteína (%)	13,2	8,0	15,4	24,5
Fibra (%)	13,0	43,9	19,1	10,9
Extrato em éter (%)	12,3	1,1	21,1	14,6
Cinza (%)	7,2	15,3	6,8	7,3
N.F.E. (%)	54,4	31,8	37,6	42,7
GE (kcal g ⁻¹)	5,4	5,1	5,3	5,5
Teobromina (%)	1,9	0,4	1,7	2,2

O processo de beneficiamento do cacau compreende várias etapas, começando pela colheita, seguida da fermentação, secagem, torração, micronização e refino. O cacau torrado é moído e transformado em 'liquor de cacau' (massa de cacau). Algumas indústrias produzem dois tipos de massas de cacau: uma para a produção de chocolate e outra para a obtenção da manteiga de cacau. Geralmente, a massa de cacau prensada já passou por uma etapa prévia de alcalinização (normalmente feita no cacau moído). Este processo consiste em tratar o cacau com uma solução alcalina, resultando numa matéria prima mais escura e com sabor suave, como resultado da neutralização da acidez do cacau fermentado.

A manteiga de cacau é a gordura extraída das amêndoas de cacau. As formas mais conhecidas de extração de manteiga de cacau são por: i) prensagem hidráulica, que permite a remoção de até 93% da gordura; ii) 'expeller', em que a pressão é regulada, podendo-se desta forma controlar a quantidade de manteiga de cacau extraída que passa por uma rosca sem fim que a comprime extraindo até 90% da gordura; iii) solvente químico, o qual consegue remover até 99% da gordura usando geralmente hexano que deve ser posteriormente removido do produto final pela sua elevada toxicidade.

Após a extração da manteiga de cacau obtém-se o cacau em pó desengordurado (usado na indústria de bebidas achocolatadas). Para a produção de chocolates usa-se massa de cacau ('liquor') e uma percentagem de manteiga de cacau. Após a remoção dos

alcalóides da manteiga de cacau é obtido um óleo de alta qualidade, usado em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Em produtos farmacêuticos, o óleo de cacau é empregado como corretivo para melhorar o sabor e odor de algumas sulfamidas, antibióticos, vitaminas (em particular B₁), proteínas, aminoácidos, extratos orgânicos animais, preparações de cálcio, de substâncias doces, amargas e salinas, assim como de substâncias oleosas, etc.

O óleo extraído, importante na dieta humana como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais, deve ser caracterizado com técnicas de cromatografia gasosa para determinar a composição de ácidos graxos. Segundo Badolato et al. (1992), esta técnica tem apresentado melhores resultados do que os métodos clássicos de detecção (índice de iodo e refração).

A composição de ácidos graxos dos alimentos é importante sob vários aspectos. Do ponto de vista tecnológico, a degradação dos alimentos começa em muitos casos pela fração lipídica, devido à oxidação de ácidos graxos insaturados. Além disso, informações minuciosas sobre os ácidos graxos são necessárias no planejamento e avaliação nutricional de pacientes e população em geral (Mercandante e Rodriguez-Amaya, 1986). A composição média de uma manteiga de cacau é de 26-28% de ácido palmítico; 34-36% de ácido esteárico; 33-35% de ácido oléico e 2,5-3,0% de ácido linoléico (Silva, 1988 e Salgado, 1999). Minifie (1970) afirma que a manteiga de cacau contém 60% de ácidos graxos saturados. De acordo com a Tabela III.18, os ácidos esteárico, oleico e palmítico são os principais ácidos graxos da gordura de cacau. Os triglicerídeos palmítico-oleico-palmítico (POP), palmítico-oleico-esteárico (POS) e esteárico-oleico-esteárico (SOS), mostrados na Tabela III.19, são os principais constituintes na manteiga de cacau (Lehriam e Keeney, 1980).

Tabela III.18. Composição dos ácidos graxos da manteiga do cacau

Nº de carbono	Ac. Graxo	Manteiga de cacau ¹	Manteiga de cacau ²
C14:0	Mirístico	0,1	0,1-0,3
C16:0	Palmítico	26,0	25,0-28,0
C16:1	Palmitoleico	0,3	0,4-0,7
C18:0	Estearico	34,4	33-37
C18:1	Oleico	34,8	31-35
C18:2	Linoleico	3,0	2-3,5
C18:3	Linolênico	0,2	0,2
C20:0	Araquídico	1,0	0,6-1,0
C22:0	Behênico	-	0,1
Saturados		61,7	66,4-60,6
Insaturados		38,3	33,6-39,4

¹Salgado (1999), ²Silva (1988)

Tabela III.19. Triglicerídeos na manteiga do cacau (Lehriam e Keeney, 1980)

POP (C50)	POS (C52)	SOS (C54)
15,5-23,4	45,6-48,7	28,9-38,9

O fracionamento da manteiga de cacau é um processo de separação termo-mecânico formado por uma etapa de cristalização e outra de filtração. Com este processo são obtidas duas frações: uma com triglicerídeos de alto ponto de fusão (estearina) e outra com triglicerídeos de baixo ponto de fusão (oleina) (Melo, 1999).

Atualmente, são usados três métodos de fracionamento de óleos e gorduras: fracionamento com detergente, com solvente e o processo em fase seca. Destes três fracionamentos, o mais utilizado é de fase seca. Este é um processo físico que se baseia na cristalização parcial por resfriamento e posterior filtração. Quando comparado com tecnologias de modificação como a hidrogenação e interesterificação, o fracionamento é

preferido devido ao seu baixo custo de operação, sem perda de óleo e também pelo caráter reversível (Melo, 1999).

III.2.4. JABORANDI

O jaborandi é um arbusto de tamanho médio encontrado no norte do Brasil (Oliveira et al., 1991). O uso de folhas do jaborandi para propósitos medicinais foi inicialmente empregado por populações indígenas. O nome do jaborandi provém de 'ia-mbor-endi' que significa 'causar secreção ou salivação'. Infusões de folhas de jaborandi têm sido usadas no tratamento de várias enfermidades, incluindo a gripe, a bronquite, a febre, a laringite e a pneumonia. Das plantas de jaborandi são conhecidas as famílias Rutaceae e Piperaceae, em diferentes espécies tais como *Pilocarpus giganteus* Engl., *Pilocarpus jaborandi* Holmes, *Pilocarpus pauciflorus* St. Hil, *Pilocarpus selleanus* Eng., *Pilocarpus spicatus* St. Hil., *Pilocarpus subcoriaceus* Engl., *Pilocarpus pinnatifolius* Lem., *Pilocarpus microphyllus* Stapf., entre outros. A espécie jaborandi, *Pilocarpus microphyllus* Stapf., da família Rutaceae é atualmente a maior fonte de pilocarpina.

As folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. têm um comprimento de 2-6 cm. As bordas variam de lanceolado a oval. A base do folio é geralmente assimétrica (Figura III.8).



Figura III.8. Folhas de jaborandi (Oliveira et al., 1991).

A presença de alcalóides na planta de jaborandi foi primeiramente reportada por Byasson em 1875, sendo que o alcalóide pilocarpina foi descoberto por Gerrard em 1875 e também por Hardy (1875). Petit e Polonovski (1897) mostraram a presença de um segundo alcalóide, isomérico de pilocarpina, denominado isopilocarpina. A quantidade de isopilocarpina presente pode ser estimada por rotação específica da mistura (Petit e Polonovski, 1897) e, dependendo da variedade da planta de jaborandi, a isopilocarpina pode constituir de 5-75% dos alcalóides totais. A proporção de pilocarpina e isopilocarpina também varia nas diferentes partes da planta, o talo geralmente contém mais isopilocarpina que as folhas (Petit e Polonovski, 1897). A Tabela III.20 mostra as diferentes quantidades de alcalóides presentes nas diferentes matrizes da planta de jaborandi.

Tabela III.20. Alcalóides em várias espécies de *Pilocarpus* (Battersby e Openshaw, 1953)

Nome botânico	Fonte comercial	Alcalóides presentes	% tot. alcalóide (m.s)	% pilocarpina (m.s) ¹
<i>P. jaborandi</i>	jaborandi do Pernambuco	Pilocarpina ² Isopilocarpina ³	0,72	0,7 0,5-0,8
<i>P. pennatifolius</i>	jaborandi do Paraguai	Pilocarpina ³	> 0,4	0,2-0,4
<i>P. microphyllus</i>	jaborandi do Maranhão	Pilocarpina ² Isopilocarpina ³	0,84 0,8	0,45 0,16-0,19
<i>P. racemosus</i> Vahl.	jaborandi Guadalupe	Pilocarpina ⁴	0,6	0,3
<i>P. heterophyllus</i> Griseb.	Barquisimento (Venezuela)	Pilocarpina ⁵	0,25	0,04

¹isolado como nitrato, m.s. (g alcalóide/g jaborandi x 100), ²Paul e Cownley (1896), ³Homes (1895), ⁴Cownley (1904), ⁵Black et al. (1923)

Os principais países produtores de jaborandi são México (Jaborandi Guadalupe) e Brasil (Jaborandi do maranhão e de pernambuco). Entre as espécies de jaborandi, as mais conhecidas são *Pilocarpus jaborandi*, *P. microphyllus*, *P. pennatifolius* e *P. racemosus* (Tabela III.21).

Tabela III.21. Folhas de jaborandi contendo pilocarpina

Taxonomia	Quantidade (g kg ⁻¹)
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	6-10
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	6-10
<i>Pilocarpus pennatifolius</i>	2-4
<i>Pilocarpus racemosus</i>	2-4

Na Tabela III.22 é mostrada a taxonomia das duas principais espécies, *Pilocarpus jaborandi* e *P. microphyllus*, que contém altas quantidades de pilocarpina.

Tabela III.22. Taxinomia do *Pilocarpus*

Taxinomia	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	<i>P. microphyllus</i>
Família	Rutaceae	Rutaceae
Gênero	<i>Pilocarpus</i>	<i>Pilocarpus</i>
Espécie	<i>Jaborandi</i>	<i>mycrophyllus</i>
Autor da espécie	HOLMES	STAPF
Nomes comuns	Jaborandi do pernambuco	Jaborandi do maranhão

Os principais componentes ativos da planta de jaborandi são os alcalóides pilocarpina, pilocarpidina e isopilocarpina. No entanto, Jowett (1900) obteve, além desses componentes ativos, o alcalóide jaborina das folhas de *P. pennatifolius* após extração com clorofórmio em excesso de amônia. Dentre outros componentes, destacam-se os óleos essenciais, terpenos, materiais resinosos e ácidos tânico (Oliveira e Akissue, 1989). A Tabela III.23 mostra alguns componentes químicos das duas espécies mais usadas.

Tabela III.23. Composição química das folhas de *Pilocarpus*

Componentes químicos	<i>P. microphyllus</i> (g kg ⁻¹)	<i>P. jaborandi</i> (g kg ⁻¹)
2-tridecanone	0,55-0,69	
2-undecanone		1,13
3,7,7-trimetilbicyclo (3,1,1)-2-heptano	0,30	
Alfa-copaene	0,075-0,29	
Alfa-pineno	0,025	0,13
Cariofileno	0,45-0,48	
Delta-cadinene	0,12-0,17	
Humuleno	0,10	
Limoneno	0,050	2,35
Mirceno		0,025
Pilocarpina	6-10	6-10
Sandaracopimaradiene		0,025
Vinil-dodecanoate		0,025
Sabinene	0,09	

O *P. Jaborandi* contendo os alcalóides pilocarpina e isopilocarpina têm se mostrado escasso em anos recentes, sendo, portanto, substituído pelo jaborandi do maranhão de *P. microphyllus*, o qual contem os alcalóides pilocarpina e isopilocarpina. Jowett (1900) comprovou que não há existência de pilocarpidina nas folhas de jaborandi.

A planta de jaborandi é usada como um antídoto da atropina, como um diaforético para o tratamento do glaucoma, pelo alto teor de pilocarpina (Ver item III.1.2.2). Com uso de altas concentrações pode ser venenosa, causando irritação no estômago, náuseas, vômito, suor, salivação, lacrimação, pulso rápido, contração das pupilas, diarreia e ainda um edema pulmonar fatal (Kushnick et al., 1996).

Devido à importância destes princípios ativos tanto do ponto de vista farmacológico como industrial, a seguir mostram-se as tecnologias usadas até o momento para a extração destes alcalóides.

III.3. TECNOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE ALCALÓIDES

Os alcalóides extraídos de plantas constituem uma importante fonte de princípios ativos para fármacos. A extração de alcalóides é uma operação difícil e prolongada, assim como sua purificação. Nos métodos convencionais para extração de alcalóides, em geral, o material vegetal é extraído em meio alcalino (NH_4OH) com solventes orgânicos como o cloreto de etila, o benzeno, entre outros. Ao extrato obtido, em seguida é adicionada uma solução de ácido clorídrico diluído, formando duas fases (uma fase orgânica e outra fase aquosa). O alcalóide forma um sal de cloro na fase aquosa e é separado dos demais componentes do extrato, que permanecem na fase orgânica. Uma base (NH_4OH) é subsequentemente adicionada a fim de precipitar os alcalóides na fase aquosa. Para alcançar um maior grau de pureza, o precipitado obtido pode ser dissolvido novamente num outro solvente orgânico imiscível na água (clorofórmio), cristalizando em seguida o alcalóide pela evaporação do solvente (Wingrove e Caret, 1992) (Ver Figura III.9).

As técnicas industriais de extração baseiam-se nas propriedades de solubilização e precipitação. Os aparelhos industriais convencionais são formados por moinhos mecânicos, percoladores cilíndricos, destiladores, separadores, e agitadores. Na purificação, utilizam-se também filtros, estufas e centrífugas para secagem dos cristais.

A extração industrial convencional compreende as seguintes fases: i) preparação da matéria prima, ii) extração e iii) purificação. Após a escolha do material e a determinação de sua umidade, do tamanho da partícula, e do solvente, procede-se à extração do alcalóide como mostrado na Figura III.9.

A extração com solventes imiscíveis na água, em meio alcalino, nem sempre é completa, exigindo tratamentos prolongados, tornando o processo moroso e com isso afetando o rendimento econômico. Deve-se considerar o perigo de explosões e incêndios quando os esgotamentos se efetuam à quente. Nestas circunstâncias, a perda de solventes volatilizados e não recuperados pode atingir cifras elevadas. Os solventes clorados diminuem

estes riscos, sendo necessário, no entanto, proteger os operários de intoxicações provocadas pelos vapores dos solventes.

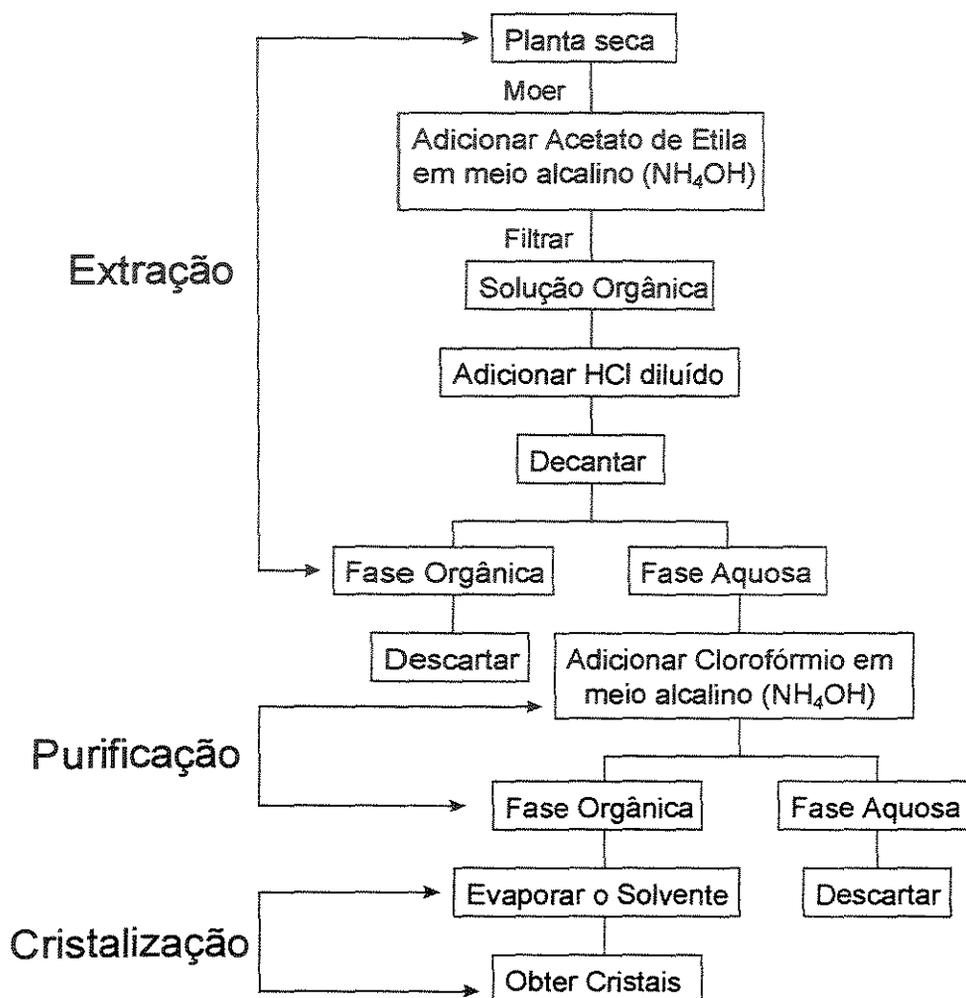


Figura III.9. Extração convencional de alcalóides.

Do mencionado acima, a extração convencional de alcalóides realizada com solventes apresenta inconvenientes de operação, de tempo e de alto consumo de energia, aos quais adiciona-se o alto custo de produção.

Outro processo para a extração de alcalóides usa uma membrana líquida, recomendada para substâncias muito básicas e lipossolúveis. Porém, nem sempre as substâncias a serem extraídas apresentam estas propriedades. Nas folhas de chá *Camelia sinensis*, por exemplo, o alto conteúdo de purinas (1-3%) é raramente extraído por possuir caráter levemente básico (Hong et al., 1990).

No caso da extração de pilocarpina das folhas moídas de jaborandi, Chemnitius (1928) descreveu um procedimento de extração convencional com solventes em que o extrato alcoólico inicialmente obtido é destilado, e o resíduo é agitado com cera parafínica aquecida. Após resfriamento, o alcalóide é extraído da cera sólida com água quente. A solução aquosa é tratada com carbonato de sódio, obtendo-se um precipitado de massa resinosa escura que é rejeitada. Em seguida, o alcalóide é extraído com clorofórmio que posteriormente será evaporado. O resíduo é dissolvido em etanol, adicionando-se também ácido nítrico concentrado. Então, é adicionado éter para iniciar a precipitação do nitrato, que é lavado com etanol até a obtenção de cristais. O nitrato de pilocarpina é então novamente extraído com água e clorofórmio para obtenção de pilocarpina pura de ponto de fusão de 34°C. Na extração do alcalóide pilocarpina são usadas atualmente as folhas de *Pilocarpus microphyllus*. A pilocarpina sintetizada possui um preço mais elevado do que aquela extraída do produto natural (Maat e Beyerman, 1983), provavelmente devido aos problemas intrínsecos estereoquímicos envolvidos e os baixos rendimentos obtidos. Algumas formas de síntese da pilocarpina estão bem descritas na literatura (Gonzalez et al., 1989; Dener et al., 1993; Sauerberg et al., 1989; Noordam et al., 1981), sendo que todas estas sínteses partem do aminoácido L-Histidina.

Conforme foi descrito anteriormente, a extração e purificação dos alcalóides utiliza grandes quantidades de solventes orgânicos. Resíduos de tais solventes no produto extraído podem ocasionar riscos de toxicidade ao consumidor. De maneira alternativa poderia-se utilizar como solvente a água. Porém, este processo resulta em extrações não-seletivas com uma conseqüente perda de componentes valiosos (Mazzafera e Carvalho, 1991). Outro inconveniente na utilização de solventes líquidos é a necessidade de emprego de temperaturas elevadas, que resulta na perda de compostos termolábeis (McHugh e Krukonis, 1994; Saldaña, 1997).

Frente a estes inconvenientes mencionados surge uma nova tecnologia de extração que explora as propriedades distintas de fluidos supercríticos pela sua capacidade de evitar degradação térmica e não deixar resíduos tóxicos nos alcalóides recuperados de plantas. A extração supercrítica tem usado CO₂ como solvente para extração de diversos alcalóides

como a cafeína, quinina e morfina (Ndiomu e Simpson, 1988), cafeína, teofilina e teobromina (Johannsen e Brunner, 1994), nicotina (Hubert e Vitzthum, 1978), alcalóides indólicos do *Catarantus roseus* (Song et al., 1992), entre outros.

Para um melhor entendimento deste processo, apresenta-se a seguir, uma descrição dos fluidos supercríticos, suas propriedades e aplicações na extração de produtos naturais.

III.4. USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS NA EXTRAÇÃO DE ALCALÓIDES E FRACIONAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS

Desde 1879, quando Hannay e Hogarth observaram pela primeira vez, a vantagem de se utilizar como solvente, fluidos em condições supercríticas, algumas aplicações de interesse comercial foram desenvolvidas usando este tipo de extração (Rizvi et al., 1986).

O uso de fluidos supercríticos (FSCs) na extração oferece muitas vantagens pelo comportamento de suas propriedades como gás ou como líquido, as quais nunca antes estiveram presentes ao mesmo tempo. As baixas viscosidades e altas velocidades de difusão dos fluidos supercríticos comparados às dos líquidos, os fazem ideais para a extração de matrizes controladas pela difusão, tais como tecidos de plantas ou polímeros. Os FSCs são facilmente removidos após a extração sem a necessidade de outra operação de separação, tal como a destilação do solvente, no caso da extração líquida, sendo só necessária a redução da pressão para solubilizar a temperaturas relativamente baixas, reduzindo com isto a decomposição térmica.

Na Figura III.10, a forma parabólica representa a curva de saturação do fluido. Na região dentro desta parábola mostra-se a coexistência de duas fases (vapor - líquido) numa temperatura menor que a crítica ($T_r < 1$), encontrando-se também as linhas isotérmicas de mudança de fase a pressão constante. Para densidades reduzidas baixas, tem-se a fase vapor e para altas, a fase líquida. Acima da temperatura crítica ($T_r > 1$) existe uma grande variação da densidade com a pressão. De fato, o fluido supercrítico se caracteriza por possuir uma alta densidade e próximo ao ponto crítico sua compressibilidade é infinita. Portanto,

escolhendo as condições é possível formar um fluido com a densidade de um líquido e a compressibilidade de um gás. Na linha para T_r igual a 1 temos o ponto crítico (C.P.) quando ela tangencia a linha de saturação. Como se trata de uma forma parabólica, neste ponto, a derivada da pressão em relação à densidade é zero, portanto, o inverso, ou seja, a derivada da densidade em relação à pressão, a compressibilidade, tende a infinito. Isso quer dizer que, para uma pequena variação na pressão tem-se uma grande variação na densidade do fluido supercrítico.

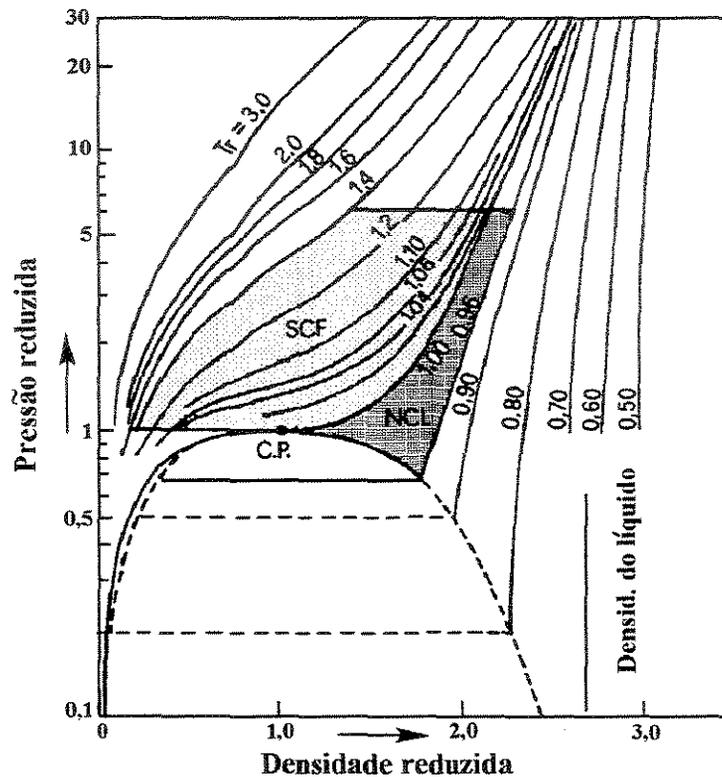


Figura III.10. Diagrama de estado do CO_2 .

C.P.: Ponto crítico, SCF: Região supercrítica, NCL: Região próxima ao ponto crítico (Brunetti et al., 1985)

Os fluidos mais conhecidos e usados são o dióxido de carbono e a água, pois apresentam baixa toxicidade, não são inflamáveis, são de fácil disponibilidade, oferecem alta pureza, possuem baixo custo, não prejudicam o operador e causam baixo impacto ambiental. No entanto, o principal problema do CO_2 é sua baixa polaridade, a qual pode ser modificada adicionando-se, por exemplo, o etanol como modificador orgânico, aumentando assim o poder de solvência. Estes aspectos benéficos dos FSCs têm resultado numa aplicação

extensiva em diversos campos. Na Tabela III.24, apresentamos alguns fluidos com suas respectivas propriedades críticas.

Tabela III.24. Propriedades críticas de alguns fluidos (Sandler, 1989; Smith e Srivastava, 1986)

Fluido	P _c (MPa)	T _c (K)
Acetileno	6,140	308,3
Água	22,114	647,3
Dióxido de carbono	7,376	304,2
Etano	4,884	305,4
Etanol	51,392	60,6
Metanol	51,26	79,4
n-Butano	3,800	425,2
n-Hexano	2,969	507,4
Propano	4,246	369,8
2-propanol	50,83	47,6

Dentre as inúmeras vantagens que os FSCs oferecem podem ser citadas: velocidade de difusão maior que os líquidos; viscosidade menor que os líquidos; pressão de vapor maior que os líquidos, facilitando a evaporação; mais denso que um gás, podendo solvatar; poder de solubilização facilmente controlada pela alteração de pressão e/ou temperatura (Smith, 1996; McHugh e Krukonis, 1986; Brunetti et al., 1985).

Muitos componentes importantes de plantas naturais de interesse industrial podem ser extraídos com FSCs tais como: óleos essenciais de camomila (Pekic et al., 1995), do cravo (Hauptschott e Lentz, 1993), do limão (Sugiyama e Saito, 1988), da hortelã (Hawthorne et al., 1993), do tomilho (Manninen et al., 1995; Zekovic et al., 2000) que formam a matéria prima para a fabricação de fragrâncias e perfumes. Dentre as aplicações dos FSCs destaca-se também a extração de compostos farmacêuticos, como por exemplo, o taxol um agente anticancerígeno presente no córtex do *Taxus brevifolia* (Heaton et al., 1993), lactonas sesquiterpeno da magnólia grandiflora (Castañeda-Acosta et al., 1995); alcalóides de opium da semente da papoula (Ndiomu e Simpson, 1988), tocoferóis do bacilo

de trigo (Saito et al., 1989), alcalóides indólicos (Song et al., 1992), quinina do capim de limão (Ndiomu e Simpson, 1988) e outros exemplos recentes de extrações de princípios ativos de plantas naturais apresentados por Smith (1996).

Mehr et al. (1996) estudaram a extração da cafeína a partir das sementes de guaraná úmidas utilizando CO₂ supercrítico, concluindo que a extração da cafeína é possível com o dióxido de carbono e que a solubilidade aumenta com o aumento de pressão. Porém seus resultados foram obtidos para uma faixa estreita de pressão e temperatura.

Na obtenção de uma manteiga de alta qualidade, o uso de fluidos supercríticos é uma tecnologia com grande potencial, evitando a presença de contaminantes na manteiga de cacau (Roselius et al., 1975; McHugh e Krukoni, 1986). Li e Hartland (1996) reportaram apenas uma curva de extração de óleo de cacau e xantinas (teobromina e cafeína) das amêndoas de cacau usando CO₂ supercrítico a uma temperatura de 333,2 K e pressão de 15 MPa. Na literatura, foi também encontrada uma patente sobre a remoção da teobromina dos grãos úmidos de cacau com CO₂ supercrítico. Roselius et al. (1975) apresentaram uma patente sobre métodos de produção da manteiga de cacau usando CO₂ supercrítico a pressões de 20,2-40,4 MPa e temperaturas de 313,2-333,2 K a partir de massa de cacau e cacau moído. Os rendimentos obtidos foram de 99 e 74% manteiga de cacau da massa de cacau e cacau moído, respectivamente. A patente apresentada por Margolis em 1976 reporta baixos rendimentos na extração da manteiga de cacau com o uso de dióxido de carbono supercrítico. Krukoni em 1982 verificou que somente 5% da manteiga de cacau foi extraída usando cacau moído a 48,3 MPa e 313,2-333,2 K por um período de 8h. Pelos baixos rendimentos obtidos nessas condições de trabalho, seria necessário realizar um estudo mais abrangente assim como testes com outros solventes supercríticos visando melhorar o rendimento alcançado.

Recentemente, os FSCs têm sido empregados em operações de limpeza de maquinaria de precisão, por não deixar nenhum resíduo de graxa ou gordura. Brennecke (2001) reportou o uso de água supercrítica na remediação de solos (remoção de dioxinas), resultando num processo de alta eficiência à incineração (processo atualmente usado), pois não emite gases poluentes. Outros estudos pelo mesmo grupo de pesquisa utilizando FSCs

para a remediação de meio-ambientes contaminados vem sendo realizados. Outra aplicação importante do CO₂SC é nas operações de tintas na indústria têxtil e automobilística (pintar e recobrir carros). Esta tecnologia é também considerada importante na destruição de armas químicas e de explosivos. No campo ambiental, permite a extração de contaminantes industriais, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e resíduos de pesticidas (Brennecke, 1996; Smith, 1996). Tom et al. (1993) tem demonstrado o potencial desta técnica no microencapsulamento, produzindo um composto útil na indústria de alimentos e química, pois aumenta a vida útil do produto, alcançando gradualmente sabores e fragrâncias. Segundo Smith (1996), nestes últimos anos, a extração com fluidos supercríticos tem-se mostrado como uma alternativa viável para muitas substâncias, mas ainda apresenta áreas de interesse a serem exploradas como o uso de solventes supercríticos como anti-solventes (SAS) na obtenção de partículas micronizadas importantes para a indústria farmacêutica (Winters et al., 1996; Reverchon et al., 2000). Esta tecnologia é adequada a processos em que os sólidos não solubilizam facilmente nos fluidos supercríticos ou quando estes produtos são muito sensíveis à temperatura, como por exemplo, peptídeos e proteínas. A seguir, apresenta-se uma breve descrição de uso de anti-solventes supercríticos.

III.4.1. Uso de anti-solventes supercríticos (SAS)

Os processos com anti-solventes líquidos estão baseados no uso de dois solventes líquidos que são completamente miscíveis, o soluto a ser micronizado é solúvel no primeiro solvente, mas não é solúvel no segundo solvente. A adição de um anti-solvente induz, portanto, a formação de uma solução de dois líquidos e a supersaturação e precipitação do soluto. O uso de fluidos supercríticos como anti-solventes tem sido recentemente proposto como alternativa a processos de anti-solventes líquidos devido à sua vantagem potencial, pois é possível remover completamente o anti-solvente pela redução de pressão da fase gasosa. Este processo é problemático para anti-solventes líquidos que requerem tratamentos complexos de pós-processo para a eliminação completa dos resíduos líquidos. Além disso, o anti-solvente supercrítico (SAS) é caracterizado pelas difusividades que podem ser acima de

duas ordens de magnitude, maiores que as dos líquidos. Portanto, uma difusão rápida no solvente líquido produz a supersaturação do soluto e precipitação de partículas micronizadas de diâmetros menores que não são possíveis de obter usando anti-solventes líquidos ou outras técnicas, sendo também possível o controle de distribuição do tamanho de partículas (Reverchon, 1999). O processo SAS é especialmente atrativo na área biomédica devido às suas condições relativamente baixas de operação e a disponibilidade de anti-solventes não tóxicos tais como o dióxido de carbono.

O processo SAS (do inglês 'supercritical anti-solvent') tem sido usado para recristalizar diferentes produtos explosivos, polímeros, materiais farmacêuticos, e outros, com o objetivo de obter partículas finas ou microesferas. Em processos SAS, a extração da hidroquinona requer, por exemplo, acetona e CO₂ (Wubbolts et al., 1997); a extração da insulina usa uma mistura de etanol/água 90:10 e CO₂ (Debenedetti et al., 1992); a obtenção da lecitina usa etanol ou hexano e CO₂ (Weber et al., 1999). Reverchon (1999) afirma que o processamento com anti-solventes supercríticos está ainda num estágio inicial de desenvolvimento. A influência da velocidade do gás anti-solvente em algumas propriedades físicas como a morfologia do cristal, o tamanho e a distribuição uniforme das partículas na recristalização de explosivos foram estudadas por Gallagher et al. (1989). As tendências mostram que o aumento da pressão diminui o tamanho da partícula e uma diminuição da temperatura causa a formação de partículas bem menores (Turk, 2000).

Yeo et al. (1993) encontraram microferulitos de poliamida com um grau de variação de cristalinidade de amorfos a semicristais em batelada e contínuos usando SAS. Também SAS tem sido usado para produzir micro e nano partículas de amoxicilina (Reverchon et al., 2000). Drogas amorfas são mais facilmente solubilizadas que os cristais e, portanto a ação terapêutica é obtida em tempos menores. O efeito do tempo de armazenagem na morfologia e estrutura cristalina de drogas será um campo interessante de estudo, pois materiais amorfos podem ser menos estáveis que os cristalinos em função do tempo.

Reverchon (2000) usou SAS para a precipitação de vários biopolímeros mostrando que o tamanho de partículas de biopolímeros micronizados por SAS apresentam uma dependência limitada aos parâmetros do processo. Magnan et al. (2000) estudaram a

micronização da lecitina de soja por precipitação com um fluido anti-solvente comprimido, nos quais foi avaliada a influência dos parâmetros do processo. Amaro-Gonzalez et al. (2000) afirmam que a morfologia das partículas é fortemente dependente do diâmetro dos capilares de alimentação para o caso do composto ativo lobenzarit.

Devido às vantagens que apresenta o uso de fluidos supercríticos frente aos solventes convencionais, como já visto neste capítulo, um dos campos a serem explorados seria a extração de alcalóides de plantas naturais usando fluidos supercríticos, sendo necessário, portanto, conhecer as técnicas experimentais descritas na literatura para extração a altas pressões.

III.5. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS USADAS EM EXTRAÇÕES A ALTA PRESSÃO

Para determinação da solubilidade de um composto em fluidos supercríticos são usados dois métodos principais: o método estático e o método dinâmico.

O método dinâmico é o mais comum e usado por diversos pesquisadores (Van Leer and Paulaitis, 1980; Kurnik et al. 1981; Johnston e Eckert, 1981; Krukonis e Kurnik, 1985). A Figura III.11 mostra que o fluido supercrítico de interesse é carregado ao sistema com uma bomba de alta pressão e comprimido à pressão de operação desejada. A bomba pode ser do mesmo tipo que a utilizada na cromatografia líquida de alta pressão ou um compressor pequeno de diafragma. Quando se usam bombas é necessário resfriar, ambos, à corrente de entrada da bomba e à cabeça da bomba; isto assegura o bombeamento estável do fluido. As velocidades de fluxo típico de equilíbrio estão em aproximadamente 1 L min^{-1} (padrão, a 1 bar e 0°C). Mas, se o objetivo é fracionar ou extrair material de solutos sólidos, as velocidades de fluxo são maiores, como por exemplo, de 15 a 30 L min^{-1} .

Após a saída da bomba, o fluido supercrítico (FSC) flui na tubulação ou na coluna pré-aquecida num banho de temperatura constante; isto faz com que alcance a temperatura do banho antes que entre em contato com o soluto. O fluido supercrítico é em seguida

alimentado às colunas a alta pressão cuidadosamente empacotada com o soluto, permitindo um contato adequado. Depois que o fluido supercrítico saturado com o soluto sai da coluna, se expande à pressão atmosférica numa válvula micrométrica aquecida. Então, o componente pesado da solução precipita num recipiente resfriado. Este tipo de sistema de fluxo apresenta muitas características positivas como (McHugh e Krukonis, 1994): i) número razoavelmente grande de dados de solubilidade podem ser obtidos de forma rápida e reproduzível; ii) extração e fracionamento podem ser obtidos; e iii) o procedimento de amostragem é simples.

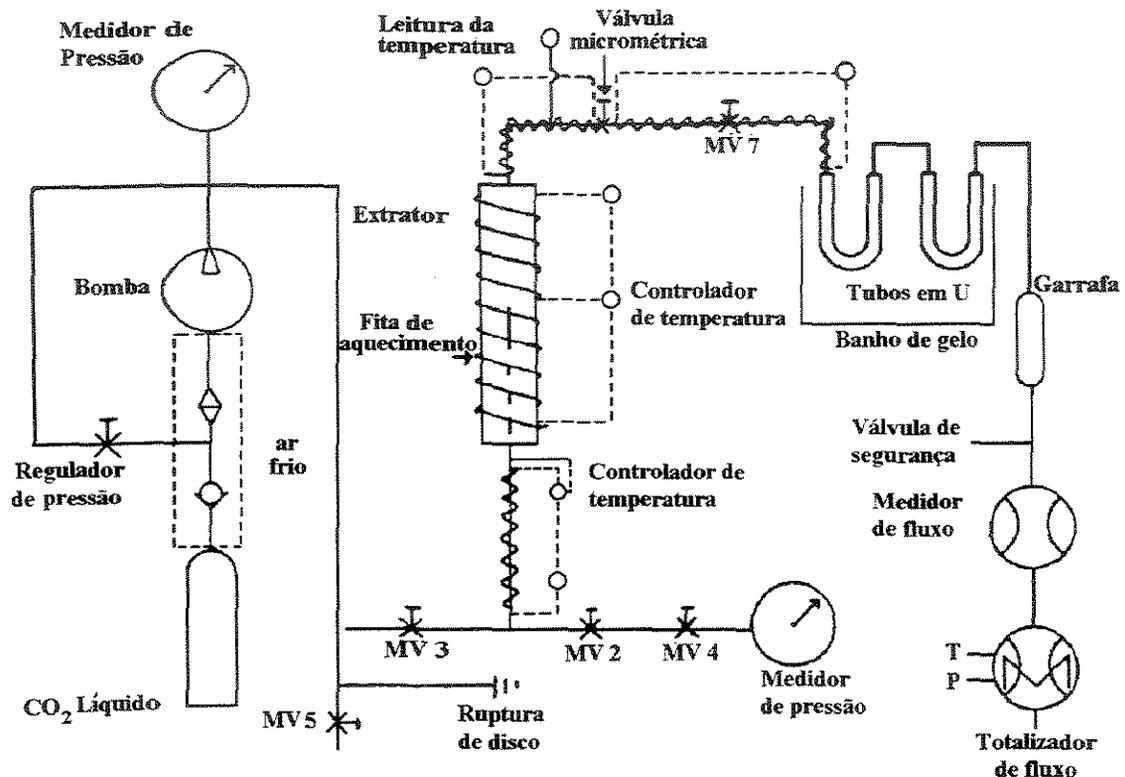


Figura III.11. Sistema dinâmico de extração de alta pressão, MV(1): válvula (Chimowitz e Pennisi, 1986)

No entanto, este método também apresenta algumas limitações: i) quando não é utilizado um extrator com janela de observação, mudanças de fases tais como sólido-líquido e líquido-líquido podem ocorrer sem que sejam detectadas ou percebidas; ii) normalmente, só a fase mais leve é amostrada, não havendo forma de saber a solubilidade do fluido supercrítico na fase líquida; iii) experimentos de equilíbrio com misturas multicomponentes

devem ser cuidadosamente desenhados, para evitar o esgotamento completo de um ou mais componentes durante o experimento; iv) um sólido ou um líquido podem obstruir a válvula micrométrica e causar a retenção do soluto e levar a erros nas medidas de solubilidade.

O método estático para medir a solubilidade de substâncias em fluidos supercríticos é formado principalmente por uma célula (com janela de observação) de volume variável a alta pressão. Esta célula permite a determinação visual das fases presentes em equilíbrio (McHugh e Krukonis, 1994).

A célula é inicialmente carregada com uma quantidade de sólido ou líquido e purgada 5 vezes ou mais à temperatura ambiente com o gás de interesse a aproximadamente 4 bar para remover o ar. O gás é em seguida transferido a uma célula gravimétrica, usando uma bomba de alta pressão. O conteúdo da célula é misturado por agitação contínua, usando, por exemplo, um magneto abaixo da célula. Numa dada temperatura, a célula é comprimida a uma só fase a alta pressão, a qual diminuirá lentamente até que a segunda fase apareça. A imagem deste processo pode ser projetada num vídeo câmera. Os dados de solubilidade são relatados para as duas fases em equilíbrio. A solubilidade é determinada pelo conhecimento da quantidade de gás e soluto carregados dentro da célula. Um modelo avançado deste método (Figura III.12) foi apresentado por Floter et al. (1997), McHugh e Krukonis (1994), Peters (1986) e De Loos (1983).

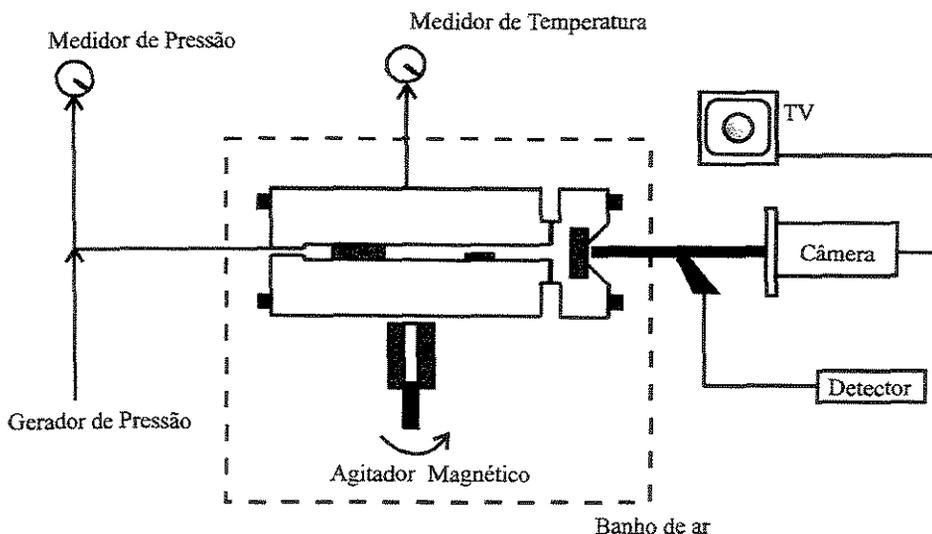


Figura III.12. Sistema típico estático.

Entre as vantagens deste modelo tem-se: i) as transições de fase são determinadas visualmente e uma possível inversão de fases é facilmente detectada; ii) a solubilidade de sólidos e líquidos em misturas binárias é obtida sem amostragem; iii) quantidades mínimas de componentes ou fluidos supercríticos são usadas num experimento; iv) a pressão da mistura pode ser continuamente ajustada numa temperatura e composição fixa; v) com misturas multicomponentes, as fases de equilíbrio podem ser amostradas. Por outro lado, a desvantagem do uso do método estático é que os dados de extração ou fracionamento com fluidos supercríticos não são facilmente obtidos.

As extrações com fluidos supercríticos (FSCs) podem ser realizados usando o modo estático, dinâmico ou a combinação (estático/dinâmico), como já explicados detalhadamente acima. A extração estática consiste no uso de uma quantidade fixa de fluido que interage com o extrato/matriz. Normalmente, o extrator que contém a matriz é pressurizado com o fluido numa dada temperatura. A alta difusividade do fluido supercrítico é usada para acessar o extrato/matriz. Este sistema estático é formado por controladores, bombas, válvulas e um detector. O extrato deve migrar à célula de fluxo num processo limitado por difusão. Um dos problemas experimentais na extração estática é a impossibilidade de esgotar o extrato devido à saturação do fluido supercrítico com o extrato (Hedrick et al., 1992).

Por outro lado, o método dinâmico usa o FSC renovado constantemente, fluindo continuamente na matriz. Ao contrário do que acontece no modo estático, a extração dinâmica se realiza até esgotar o extrato. Portanto, a pureza do fluido é fundamental a fim de evitar a concentração de contaminantes que poderiam interferir na análise do extrato. Um problema apresentado com este método é a remoção de maior número de componentes da matriz extraível pelo uso de maior quantidade de FSC (Hedrick et al., 1992).

Finalmente, uma combinação do período inicial estático seguido pelo método dinâmico na extração é cada vez mais utilizada, especialmente em situações em que exista difusão à superfície da matriz. Quando a extração depende do tempo, o sistema é colocado num modo dinâmico.

Dos três modos explicados brevemente acima, a extração dinâmica é a mais fácil de modelar. A Figura III.13 mostra um perfil de extração teórica de um extrato de uma matriz sólida, usando o método dinâmico. O eixo Y representa a quantidade de extrato recuperado enquanto o eixo X a quantidade de fluido ou tempo usado durante a extração. O perfil de extração pode ser dividido em três regiões distintas. Na Região I, a extração inicial do material ocorre relativamente rápida e é dependente da solubilidade do extrato no fluido supercrítico. Os fatores limitantes desta região são a solubilidade do extrato no fluido supercrítico, a velocidade com a qual o fluido supercrítico se desloca no sistema e o volume morto no extrator e na tubulação associada. A região II é uma zona intermediária em que a extração é controlada entalpicamente (interação matriz-extrato), mostrando uma velocidade de extração menor que a primeira região. A região III representa a limitação da extração pela difusão. Este fenômeno ocorre pela limitação de movimento de um extrato dentro de uma matriz (como por exemplo, a extração de um produto num tecido animal).

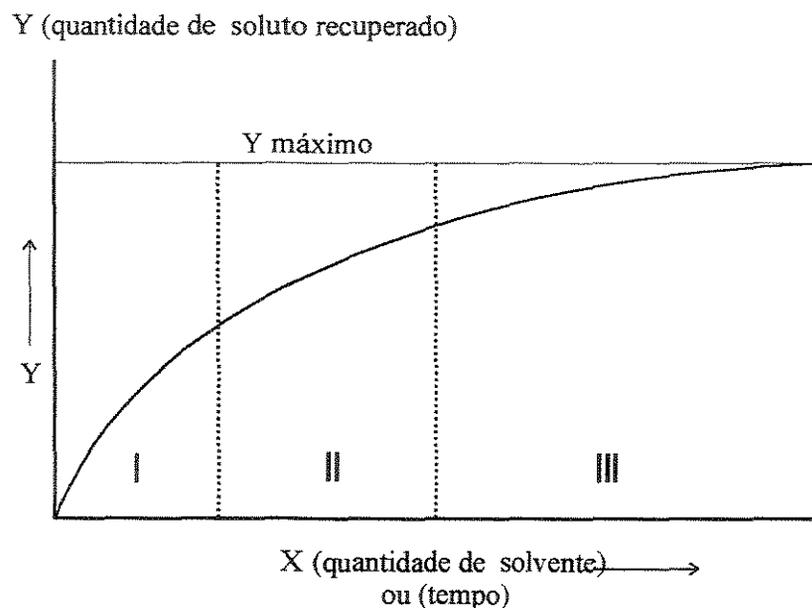


Figura III.13. Perfil de extração para o modo dinâmico

Região I: depende da solubilidade; Região II: intermediária; Região III: limitada pela difusão

A Figura III.14 mostra o perfil de extração no modo estático (ou em equilíbrio). O eixo X representa o tempo do processo. As regiões I, II e III representam a região dependente da solubilidade, a região intermediária e a região limitada pela difusão, empiricamente. Com o aumento do tempo, se estabelece o equilíbrio entre o extrato no FSC e o extrato na matriz

Especificamente, numa extração dinâmica, o fluido encontra-se em constante movimento com qualquer extrato longe da matriz. No modo estático, no entanto, o equilíbrio entre a matriz da amostra e o FSC não são sempre favoráveis. Portanto, nem em todos os casos da extração estática se espera o esgotamento. Na prática, o modo estático é mais frequentemente usado quando combinado com o modo dinâmico.

A Figura III.14 mostra o perfil de extração de um ciclo estático/dinâmico. A região I representa uma extração puramente estática. A região II é a fase de solubilidade. Este método tem sido vantajoso, principalmente quando a quantidade de FSC é limitada. No entanto, o tempo requerido para realizar uma extração estática/dinâmica pode ser maior do que o total empregado pela extração dinâmica.

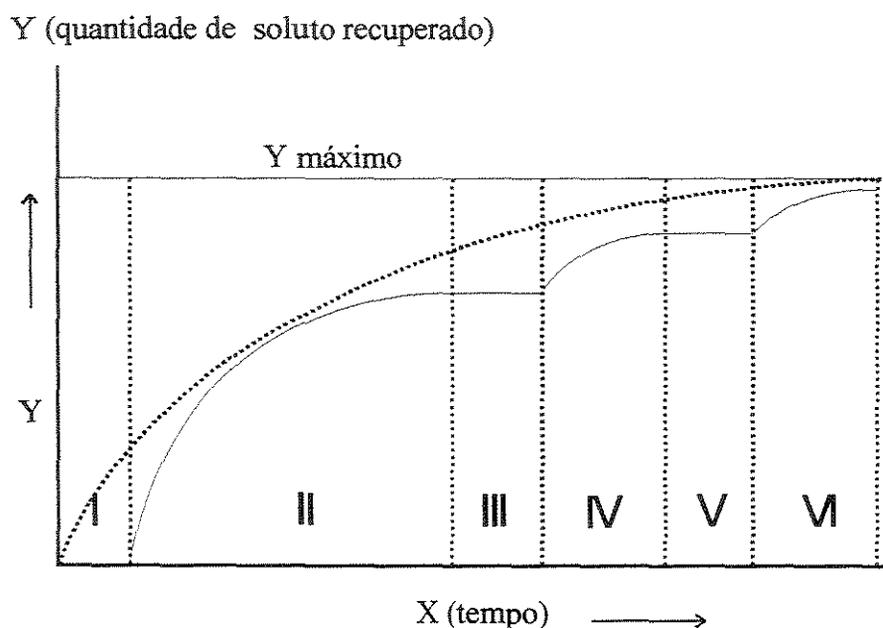


Figura III.14. Perfil de extração no modo estático/dinâmico

Região I: extração estática inicial (sem movimento do extrato no sistema), Região II: extração dinâmica (extrato sendo removido do sistema), Região III: 2ª extração estática, Região IV: extração dinâmica, Região V: extração estática e Região VI: extração dinâmica

Neste trabalho foi usado o método dinâmico e um extrator com janela que permite a observação das fases em coexistência (superando a desvantagem do método dinâmico convencional). O aparelho de fluxo permite a determinação da solubilidade de um sólido num fluido supercrítico. Esse método é adequado para a extração e fracionamento dos componentes ativos das matérias primas em estudo.

Na Tabela III.25 apresentam-se as referências bibliográficas, as condições de extração investigadas por diversos autores e os métodos usados para determinação da solubilidade da cafeína em fluidos supercríticos.

Tabela III.25. Solubilidades da cafeína em fluidos supercríticos.

Solvente	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Método	Autor (es)
CO ₂	1-20	294-333	dinâmico	Stahl e Schilz (1979)
CO ₂	16-40	308-353	-	Gahrs (1984)
CO ₂	5-25	323-433	estático	Ebeling e Franck (1984)
NH ₃	100	423	estático	Liedtke e Lentz (1984)
NH ₃	10-13	433	estático	Yonker e Smith (1985)
CO ₂	26-33	333	dinâmico	McHugh e Krukonis (1986)
CO ₂ , CO ₂ / H ₂ O	15-70	310-430	estático	Lentz et al. (1986)
CO ₂	8-30	313-368	dinâmico	Li et al. (1991)
CO ₂ , CO ₂ /etanol	15-30	333-368	dinâmico	Li e Hartland (1992)
CO ₂	20-35	313-353	estático	Johannsen e Brunner (1994)
CO ₂	9-24	313-343	dinâmico	Saldaña et al. (1997)

Há poucos dados bibliográficos relatando as solubilidades da teofilina e teobromina em fluidos supercríticos como mostrados nas Tabelas III.26 e III.27.

Tabela III.26. Solubilidades da teofilina em fluidos supercríticos.

Solvente	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Método	Autor (es)
NH ₃	10-13	433	estático	Yonker e Smith (1985)
CO ₂	20-35	313-353	estático	Johannsen e Brunner (1994)

Tabela III.27. Solubilidades da teobromina em fluidos supercríticos.

Solvente	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Método	Autor (es)
CO ₂	8-30	313-368	dinâmico	Li et al. (1991)
CO ₂ , CO ₂ /etanol	15-30	333-368	dinâmico	Li e Hartland (1992)
CO ₂	20-35	313-353	estático	Johannsen e Brunner (1994)

Não foi encontrado na literatura nenhum dado sobre a extração supercrítica da pilocarpina com CO₂SC. No caso da extração da cafeína da erva maté, *Ilex paraguariensis*, os dados obtidos são contribuições novas à literatura. Dados limitados de extração de cafeína das sementes de guaraná foram apresentadas por Mehr et al. (1996). No caso da extração e fracionamento da teobromina e a manteiga de cacau das amêndoas de cacau somente foram encontrados os dados de Li e Hartland (1991) a uma temperatura de 333,2 K e pressão de 15 MPa. Visando suprir essa falta de dados experimentais na literatura são descritos no Capítulo IV os principais materiais e métodos empregados na obtenção de dados de extração de metilxantinas de produtos naturais.

Para explicar alguns efeitos macroscópicos como os do comportamento de solubilidade de um soluto num solvente supercrítico específico é necessário compreender a atuação das forças intermoleculares bem como das possíveis ligações químicas.

III.6. FORÇAS INTERMOLECULARES

As forças entre moléculas se dividem em repulsivas e atrativas. As forças atrativas podem ser de natureza química ou física (Tabela III.28). Pode-se observar que as forças intermoleculares não são tão fortes como as ligações químicas (de 100-1000 kJ mol⁻¹, para ligações covalentes e iônicas) mas são importantes para explicar as propriedades macroscópicas de uma substância. Estas forças atrativas são as responsáveis pela existência dos três estados físicos, pois sem elas só existiriam gases.

Tabela III.28. Magnitude de algumas forças químicas e físicas presentes numa ligação (Morrison, 1989; Vinogradov e Linnell, 1971; QMCWEB, 1991)

Força	Natureza	Magnitude (kJ mol ⁻¹)
Química	ligação-H	10-40
Física	íon-dipolo	1-70
	dipolo-dipolo	0,1-10
	dispersão	0,1-2

Em 1873, J.D. van der Waals propôs uma equação de estado cúbica para descrever o comportamento de gases reais, adicionando dois parâmetros que corrigem a pressão e o volume, já que na equação dos gases ideais não estão consideradas as forças intermoleculares. As forças intermoleculares, também chamadas de forças de van der Waals, têm origem eletrônica e surgem de uma atração eletrostática entre nuvens de elétrons e núcleos atômicos. As forças de van der Waals ou intermoleculares podem surgir em três formas: i) as moléculas de alguns materiais, embora eletricamente neutras, podem possuir um dipolo elétrico permanente. Devido a alguma distorção na distribuição da carga elétrica, um lado da molécula é ligeiramente mais positivo e o outro é ligeiramente mais negativo. A tendência destas moléculas é se alinharem, e se interagirem umas com as outras, por atração eletrostática entre os dipolos opostos. Esta interação é chamada de dipolo-dipolo (Figura III.15a); ii) a presença de moléculas que possuem dipolos permanentes podem distorcer a distribuição de carga elétrica em outras moléculas vizinhas, mesmo as que não possuem dipolos (apolares), através de uma polarização induzida - esta interação é chamada de dipolo-dipolo induzido (Figura III.15b) e, iii) mesmo em moléculas que não possuem momento dipolo permanente existe uma força de atração. A natureza destas forças requer o conhecimento da mecânica quântica para sua correta descrição, mas foi primeiramente reconhecida pelo físico polonês Fritz London, que as relacionou com o movimento eletrônico nas moléculas. London sugeriu que, em um determinado instante, os centros de carga negativa dos elétrons e de carga positiva do núcleo atômico poderiam não coincidir. Esta flutuação eletrônica poderia transformar as moléculas apolares, tal como o benzeno, em dipolos momentâneos, mesmo que, após um certo intervalo de tempo, a polarização média seja zero. Estes dipolos instantâneos não podem orientar-se para um alinhamento de suas moléculas, mas eles podem induzir a polarização das moléculas adjacentes, resultando em

forças atrativas conhecidas como forças de dispersão (ou forças de London), e estão presentes na maioria das moléculas apolares e, algumas vezes, mesmo entre moléculas polares (Ver Figura III.15c).

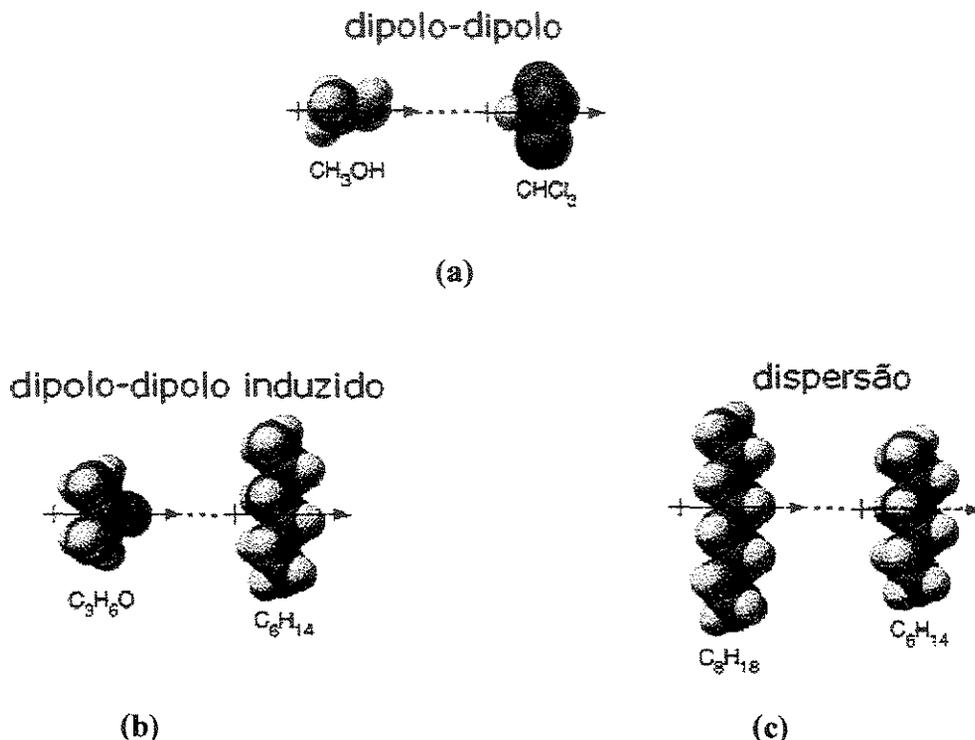


Figura III.15. (a) Formação da força dipolo-dipolo entre as moléculas de metanol e clorofórmio. (b) Dispersão e (c) Dipolo-dipolo induzido.

A água possui um tipo de interação diferenciada, pois os hidrogênios ligados ao oxigênio formam o lado positivo do dipolo permanente desta molécula. O átomo de hidrogênio é formado por apenas um próton e um elétron. Como o elétron é fortemente atraído pelo oxigênio, na água, este próton encontra-se desprotegido. A água possui então um dipolo bastante forte, com uma das cargas (positiva) bastante localizada. Este próton pode interagir com as regiões negativas (oxigênio) de outras moléculas de água, resultando em uma forte rede de ligações intermoleculares. Esta interação é chamada de ponte de hidrogênio, e ocorre entre átomos de hidrogênio ligados a elementos como o oxigênio, flúor ou nitrogênio. A água e o metanol, por exemplo, mostrados na Figura III.15d, interagem via a ponte hidrogênio. A água possui dois hidrogênios ligados ao oxigênio o que explica a sua maior temperatura de ebulição, em relação ao metanol, que possui apenas um. A substituição dos hidrogênios da água por grupos $-\text{CH}_3$ leva a compostos com menor

temperatura de ebulição. Além disso, as ligações hidrogênio, no estado sólido, conferem à água uma organização reticular quase cristalina, com um maior espaço entre as moléculas, ou seja, uma menor densidade. A maioria das outras substâncias tem um maior grau de compactação ou maior densidade no estado sólido.



Figura III.15d. Formação da ligação de hidrogênio entre o metanol e a água

As forças intermoleculares são também responsáveis pelas diferenças nas temperaturas de ebulição de vários isômeros orgânicos que possuem a mesma fórmula molecular (e a mesma massa molar). Quanto mais forte for a atração entre as moléculas ou maior forem as forças intermoleculares, maior também será a temperatura necessária para a ebulição do líquido ou sublimação do sólido.

O n-pentano e o neo-pentano são isômeros apolares de fórmula C₅H₁₂ que não apresentam dipolo permanente e interagem, entre si, via forças de dispersão (London). Porém, o n-pentano tem uma temperatura de ebulição bem maior do que o neo-pentano, pois à temperatura ambiente o n-pentano é um líquido, enquanto que o outro isômero é um gás. Quanto maior for a área de contato entre as moléculas, maior é a interação. No caso do neo-pentano, a interação é dificultada devido ao impedimento espacial provocado pelos grupos -CH₃. A polarização induzida ocorre mais intensamente no caso da cadeia linear.

As forças de interação são calculadas de acordo com as seguintes expressões (Tassios, 1993):

$$\text{Dipolo-Dipolo: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{3 \mu_i^2 \mu_j^2}{2 kTr^6} \quad \text{[III.1]}$$

$$\text{Dipolo-Dipolo Induzido: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{\alpha_i \mu_j^2}{r^6} \quad \text{[III.2]}$$

$$\text{Dispersivas: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_i \alpha_j}{r^6} \left[\frac{I_i I_j}{I_i + I_j} \right] \quad [\text{III.3}]$$

onde (α) é a polarizabilidade da molécula, (r) a distância entre os núcleos das moléculas, (μ) o momento dipolo das moléculas, (I) o primeiro potencial de ionização da molécula, (k) a constante Boltzman e T a temperatura.

Estas equações podem ser escritas na seguinte forma (Tassios, 1993):

$$\text{Dipolo-Dipolo: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{\beta_{d-d}}{r^6} \quad [\text{III.4}]$$

$$\text{Dipolo-Dipolo Induzido: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{\beta_{d-id}}{r^6} \quad [\text{III.5}]$$

$$\text{Dispersivas: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{\beta_{id-id}}{r^6} \quad [\text{III.6}]$$

onde (β_{d-d}) (β_{d-id}) (β_{id-id}) são constantes positivas para cada tipo de força. As contribuições para cada tipo de força podem ser então avaliadas em função de r , apenas determinando o valor das constantes. Para avaliar as forças de indução foi considerada a abordagem apresentada por Prausnitz et al. (1986) para a energia potencial de indução entre uma molécula que apresenta quadrupolo e uma molécula apolar. A equação leva em consideração as polarizabilidades das moléculas, os momentos quadrupolos e a distância entre as moléculas. A equação apresenta-se na seguinte forma:

$$\text{Quadrupolo-Dipolo induzido: } \bar{\Gamma}_{ij} = -\frac{3(\alpha_i Q_j^2 + \alpha_j Q_i^2)}{2r^8} = -\frac{\beta_{Q-id}}{r^8} \quad [\text{III.7}]$$

onde Q é o momento quadrupolo das moléculas.

Outra forma de avaliar as interações dispersivas é se fazer uma extrapolação da faixa de aplicação do potencial de Lennard-Jones. Este tipo de potencial leva em consideração às contribuições dispersivas das forças de interação atrativas e as forças repulsivas entre duas moléculas em dois termos distintos resultando em um valor de energia potencial de dispersão entre duas moléculas. O potencial de Lennard-Jones é aplicado a

pequenas moléculas simétricas, não levando em conta as interações por indução ou orientação. Entretanto, pode-se encontrar as constantes ϵ e σ que representam a magnitude da energia de interação e a distância entre as moléculas respectivamente, para várias moléculas na literatura. O potencial de Lennard-Jones é calculado pela seguinte equação:

$$\Gamma = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad \text{[III.8]}$$

O primeiro termo do lado direito da equação representa as forças de interação repulsivas que impedem que duas moléculas se entrelacem e o segundo termo do lado direito o termo de interação atrativa (forças dispersivas de London). Na qual, os valores para as constantes de interação de duas moléculas diferentes podem ser calculados de acordo com a aproximação de Lorentz-Bertthelot:

$$\epsilon_{AB} = \sqrt{\epsilon_{AA} \epsilon_{BB}} \quad \text{[III.9]}$$

$$\sigma_{AB} = \frac{(\sigma_{AA} + \sigma_{BB})}{2} \quad \text{[III.10]}$$

Com base nas definições de forças intermoleculares, espera-se explicar o comportamento de um determinado solvente no processo de extração de alcalóides a partir dos produtos naturais em estudo.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os principais materiais e métodos utilizados no desenvolvimento desta tese de doutorado. Para a realização dos ensaios de extração foram utilizados o aparelho de extração a alta pressão do Laboratório de Engenharia de Processos da Unicamp (Brasil), o aparelho Cailletet do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio de Fases da Universidade Técnica de Delft (Holanda) e os aparelhos de micro e macro extração da planta piloto da Universidade Técnica de Hamburgo-Harburgo (Alemanha). Nos métodos experimentais são descritos os procedimentos básicos de operação para obtenção de dados em sistemas binários (metilxantinas/CO₂SC) e (pilocarpina hidroclorada/CO₂SC), assim como do fracionamento e extração de alcalóides de sistemas complexos com fluidos supercríticos. Também são descritos os procedimentos básicos de análises dos teores de alcalóides e triglicérides usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, de análises de ácidos graxos por cromatografia gasosa e de determinação de temperaturas e entalpias de transição de fases por calorimetria diferencial de varredura.

IV.1. MATERIAIS

Cafeína, teofilina e teobromina com 99% de pureza (comprovada por análise pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE) e pilocarpina hidroclorada com 99,9% de pureza foram compradas da Sigma Chemical Co. (St. Louis-MO, USA). A isopilocarpina hidroclorada foi doada pelo Dr. Vrijhof da empresa Diosynth B.V. Akzonobel (Amsterdam, Holanda).

Folhas de chá mate produzidas por Ximango Erva-Mate Ltda (Ilópolis-RS, Brasil) foram compradas no mercado local de Campinas. Este produto, pronto para a infusão do mate, é formado por folhas e talos moídos e quase secos. Também foram usadas folhas de chá mate *Ilex paraguariensis* 'in natura', obtidas no Campo Experimental da Fisiologia Vegetal da Unicamp (Campinas-SP, Brasil). Os frutos de guaraná foram obtidos na forma seca da Embrapa (Manaus-AM, Brasil). A manteiga de cacau e as amêndoas de cacau foram doadas pela Cardill Ltda (Bahia, Brasil).

Os fluidos supercríticos, dióxido de carbono e etano super seco com 99,9% de pureza, foram fornecidos pela White Martins Gases Industriais S.A. (Campinas-SP, Brasil), na fase líquida em garrafas contendo tubo pescador; enquanto que o dióxido de carbono, com as mesmas especificações usado na Alemanha, foi fornecido pela KWD (Bad Hönninghen, Alemanha).

IV.2. SISTEMAS DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

A seguir são descritos os diferentes aparelhos utilizados durante esta pesquisa. Devido às limitações do aparelho do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp em alcançar pressões maiores que 37,2 MPa, os experimentos a pressões de 40 e 90 MPa foram realizados na planta piloto da Alemanha; pois em estudos anteriores (Saldaña et al., 1997) o aumento da pressão de 9 para 25,5 MPa mostrou um aumento significativo na solubilidade da cafeína no dióxido de carbono supercrítico.

IV.2.1. APARELHO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNICAMP

É um sistema de alta pressão com fluxo semicontínuo projetado pelos pesquisadores do Laboratório de Engenharia de Processos de Produtos Naturais, da

Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, e adquirido da Autoclave Engineers (Erie-PA, EUA) para extrações a pressões de até 37,2 MPa (370 bar) a 473,2 K (Figura IV.1). Os componentes mais importantes deste aparelho incluem bombas de deslocamento de líquidos para o transporte do solvente, extratores a alta pressão e três kitassatos em série usados como separadores. As vazões e os volumes acumulados de gás que passam no aparelho são controlados por válvulas micrométricas da Autoclave Engineers (Erie-PA, EUA) e medidas com um dispositivo de fluxo computadorizado da EG&G Instrument Flow Technology (Phoenix-AR, EUA). As fitas de aquecimento são usadas para manter a temperatura constante nas válvulas e evitar o congelamento do solvente ou a precipitação do soluto sólido devido à despressurização na seção de extração. As pressões em ambos os extratores são monitoradas com sistemas transdutores digitais da Heise Series 901A RTS da Dresser Industries (Stratford-CT, EUA) com precisão de $\pm 0,03$ MPa ($\pm 0,3$ bar). As temperaturas do extrator são controladas a $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

O equipamento de extração supercrítica utilizado neste trabalho é o mesmo empregado por Neves (1996), Socantaype (1996) e Saldaña (1997). De uma maneira mais detalhada, o aparelho pode ser dividido em três seções: de entrada, de extração e de saída (Figura IV.1).

i) Seção I: Entrada

Este módulo é constituído por quatro linhas paralelas que permitem a alimentação de solventes e co-solventes. Cada linha possui um trocador de calor de tipo casco e tubo antes da entrada de cada uma das quatro bombas. Encontram-se também um filtro de linha que impede a passagem de impurezas provenientes do solvente e do co-solvente que poderiam danificar as bombas e as válvulas de retenção que permitem o escoamento do fluido num só sentido.

Para introdução do solvente existem duas bombas de deslocamento positivo com pistão de safira (P-1, P-2) de marca Milton Roy, modelo 396-89, fornecidas pela Thermo Separation Products (Fremont-CA, USA). As bombas operam em paralelo com um fluxo individual de 46-460 mL/hora, e uma pressão de até 41 MPa. As pressões são indicadas por

dois manômetros de 0 a 68,95 MPa localizados na saída das bombas. As outras duas bombas de co-solventes (P-3, P-4), da mesma marca, operam em paralelo com fluxos de 16-160 mL/hora e uma pressão de até 41 MPa.

Para garantir o escoamento do solvente e do co-solvente no estado líquido, utilizou-se um refrigerador Neslab, modelo CFT-25, com indicação digital da temperatura do fluido refrigerante (uma mistura de etilenoglicol e água) que resfria as cabeças das bombas para manter o fluido bombeado na fase líquida.

ii) Seção II: Extração

Nesta parte do aparelho encontram-se dois extratores: um simples e o outro com agitação. Ambos são de aço inoxidável 316SS, com capacidade de 300 mL, projetados para resistir pressões de até 37,2 MPa na temperatura de 616,2 K. No interior de cada extrator encontra-se um termopar que registra a temperatura. Ao seu redor há cintas de aquecimento ligadas a um controlador de temperatura da Eurotherm (Reston-Virginia, USA).

O extrator com agitação possui um agitador do tipo MagneDrive II com sistema de refrigeração e uma janela que permite observar as duas fases em equilíbrio. Cada extrator possui uma entrada de fluidos na parte inferior e uma saída na parte superior.

A tubulação que une o módulo de entrada com os extratores possui válvulas de isolamento, permitindo a operação de cada extrator separadamente ou em série, e válvulas de segurança, com discos de ruptura para proteger os extratores. Nas tubulações de saída dos extratores encontram-se manômetros de 0 a 68,9 MPa fornecidos pela Autoclave Engineers e válvulas de amostragem da fase supercrítica.

iii) Seção III: Saída

O fluido proveniente do módulo de extração passa por uma válvula micrométrica, usada para regular a vazão do solvente e reduzir a pressão até aproximadamente a pressão atmosférica, ocorrendo a condensação/precipitação do material extraído no separador.

Uma fita de aquecimento em volta da válvula micrométrica e da tubulação evita a possibilidade de congelamento do CO₂ e obstrução, causada pela redução da temperatura em consequência da despressurização.

O separador está formado por três kitassatos em série, colocados em banhos à diferentes temperaturas, a saber: i) ambiente, ii) 60°C e iii) 0°C, para garantir que todo o soluto seja retido nos separadores. Na tubulação de saída do separador há um manômetro de 0 a 0,11 MPa que permite controlar a pressão no separador. Nesta mesma tubulação encontram-se dois filtros, um coalescente e outro de absorção de carvão, que impedem à passagem de impurezas ao totalizador de fluxo. A vazão do solvente é medida em litros por minuto, sendo os fluxos mínimo e máximo de operação de 0,5 e 5 L min⁻¹, respectivamente, nas C.N.T.P. O volume total é registrado em litros no *FTO turbine flowmeter, FC70A flow computer linealizer* e um *CA03 signal conditioner*, construídos pela EG&G Instruments (Phoenix-Arizona, USA).

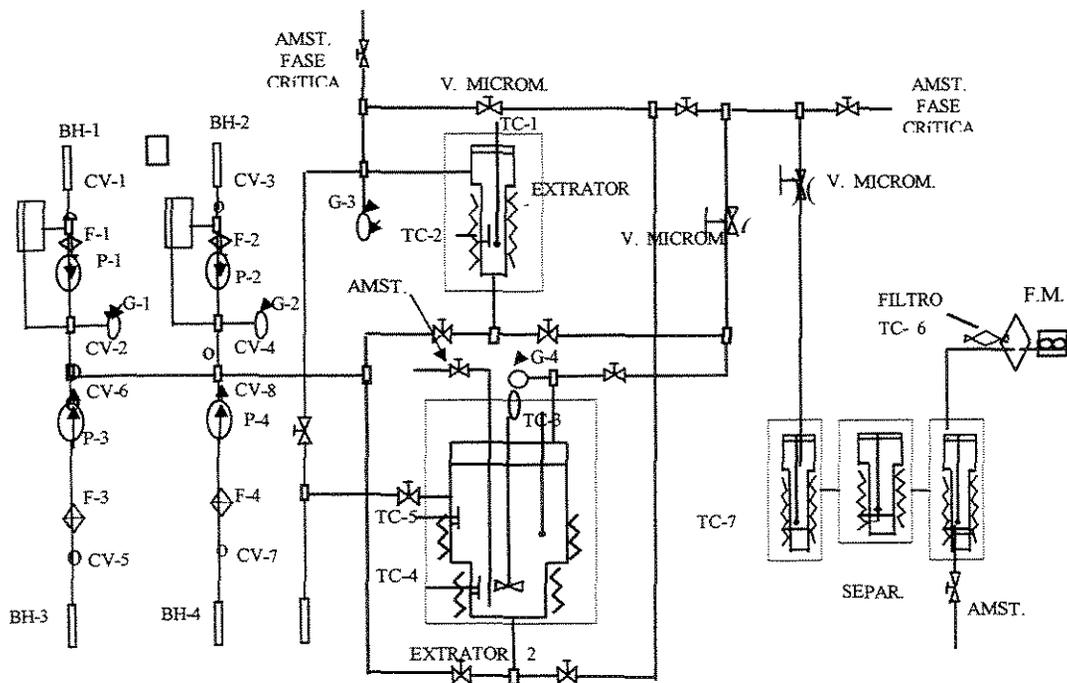


Figura IV.1. Aparelho Experimental

Fonte: Laboratório de Engenharia de Processos (FEQ/UNICAMP, Brasil)

BH(1-2) - solvente, BH(3-4) co-solvente, G(1-2-3-4) - manômetros, P(1-2-3-4) - bombas, F(1-2-3-4) - filtros, V. microm. - válvulas micrométricas, CV(1-2-3-4-5-6-7-8) - válvulas, TC(1-2-3-4-5-6-7) - termopares, Extrator 1 - extrator simples, Extrator 2 - extrator com agitação e janela, Separ.- kitassatos separadores, Amst.- amostra, FM - medidor de fluxo.

IV.2.2. APARELHO DE MICRO E MACRO-EXTRAÇÃO DA PLANTA PILOTO DA ALEMANHA

IV.2.2.1. Equipamento de Macro-extração

O aparelho experimental de macro-extração utilizado é um equipamento de alta pressão com fluxo semicontínuo projetado para operar pressões de até 100 MPa (Figura IV.2). Os principais componentes deste aparelho incluem três compressores para fornecimento do solvente - os quais podem ser usados em série ou em paralelo -, um extrator de alta pressão (4L) e um separador (2L). As vazões e os volumes acumulados de gás que passam no aparelho foram controlados com válvulas micrométricas e quantificados com um medidor de vazão, ambos da Nova-Swiss (Suíça). Banhos termostáticos foram usados para manter a temperatura constante nas seções de extração e separação, bem como nas válvulas a fim de evitar o congelamento do solvente ou a precipitação do soluto sólido após a despressurização. As pressões no extrator e separador foram monitoradas com indicadores de pressão Nova-Swiss (Suíça), a uma precisão de ± 2 MPa. As temperaturas do extrator e separador foram controladas em $\pm 3^\circ\text{C}$.

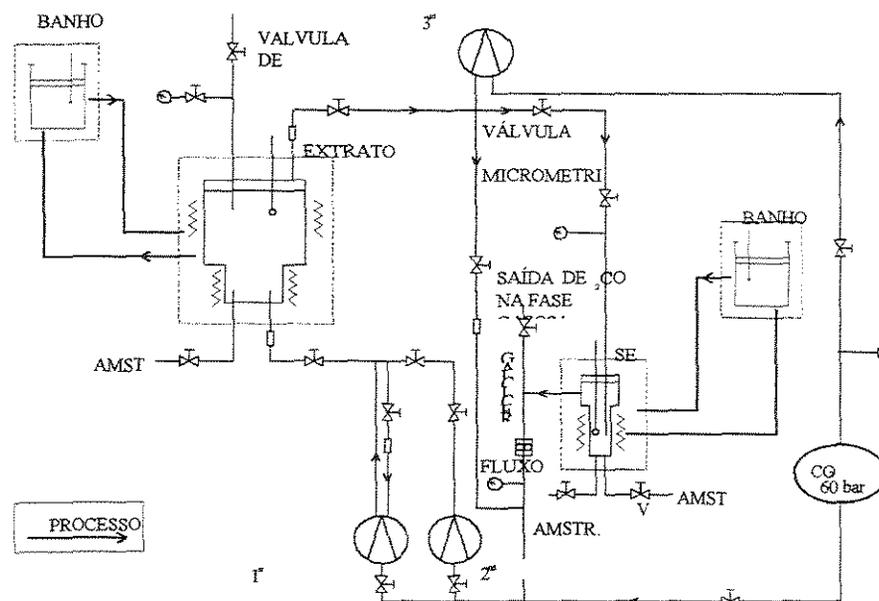


Figura IV.2. Fluxograma do sistema de macro-extração.

Fonte: Elaboração própria a partir da observação do equipamento do Laboratório de Processos Térmicos.

Banho: banho termostático, Válvula de segurança, Extrator, Válvula Micrométrica, Compressor: compressores, Fluxo, V: válvulas para amostragem, Sep.: separador, Reciclag.: reciclagem, CO₂: tanque de armazenamento do CO₂.

IV.2.2.2. Equipamento de Micro-extração

A planta de micro-extração (Figura IV.3) foi fabricada pela Applied Separation Inc. (Allentown-PA, EUA) e projetada para pressões e temperaturas de até 69 MPa e 523,2 K, respectivamente. Este aparelho permite extrações simples e eficientes em condições supercríticas com a flexibilidade de operar em ambos os modos, dinâmico (vazão contínua) ou estático (em que o dióxido de carbono é pressurizado num extrator fechado por um tempo determinado). A planta de micro-extração tem principalmente três módulos: uma bomba, uma estufa e um módulo de saída. O primeiro módulo é equipado por uma bomba com capacidade de 100 mL min⁻¹ de dióxido de carbono líquido ou 50 standard L min⁻¹ de gás expandido. O módulo da estufa contém quatro colunas de extração com capacidade de 50 cm³ por coluna. O módulo de saída permite o controle e a coleta da amostra e é formado por vias contendo vidros de 25 mL fechados com tampa e septo para recuperação dos produtos extraídos. Além disso, este módulo é também provido de válvulas micrométricas e um medidor de vazão da Applied Separation Inc. (Allentown-PA, EUA). As pressões e temperaturas são monitoradas e controladas nos três módulos com precisão de $\pm 0,3$ MPa e $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A vazão de dióxido de carbono é controlada a $\pm 0,25$ L min⁻¹.

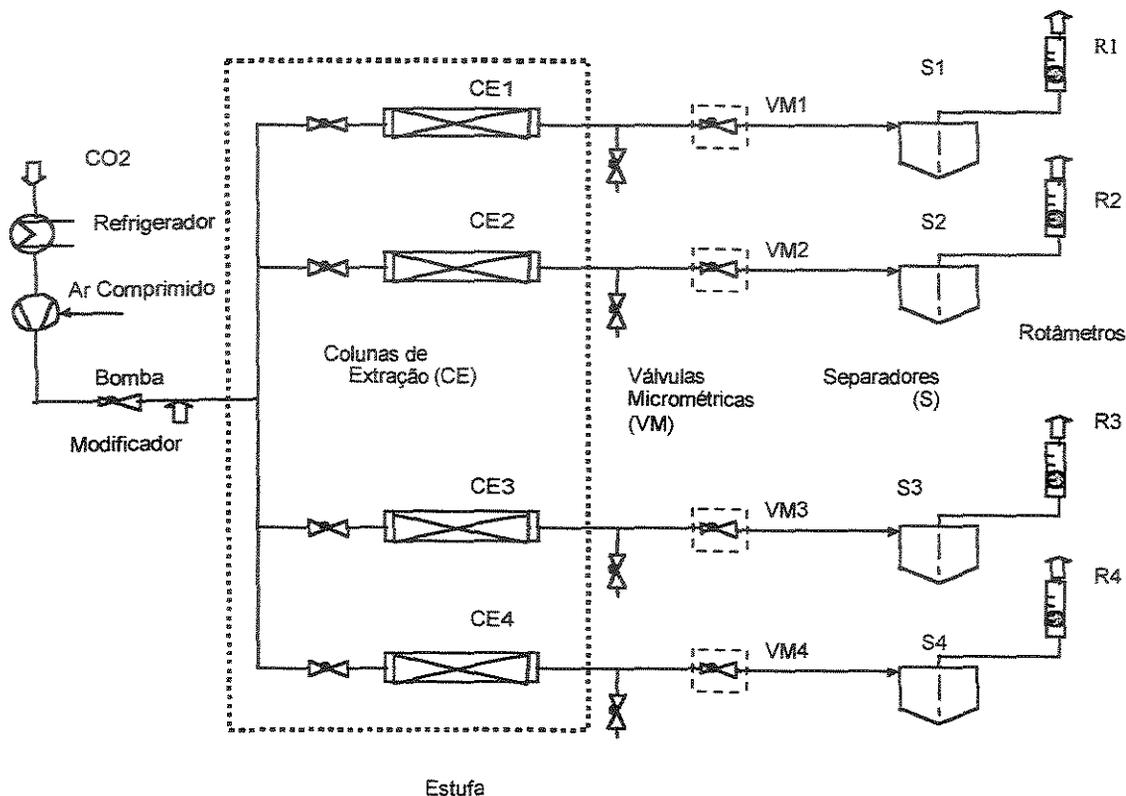


Figura IV.3. Fluxograma do sistema de micro-extração supercrítica.

Fonte: Planta piloto de micro-extração (TUHH, Alemanha)

CE: Colunas de extração, VM: válvulas micrométricas, S: separadores, R: rotâmetros

IV.2.3. APARELHO CAILLETET DO LABORATÓRIO DE TERMODINÂMICA APLICADA E EQUILÍBRIO DE FASES DA HOLANDA

O equipamento Cailletet - utilizado nos experimentos do sistema binário pilocarpina hidroclorada/CO₂ - permite visualizar as transições de fases e foi usado anteriormente por Peters (1986). Este aparelho pode operar a pressões e temperaturas de até 10 MPa e 450,2 K, respectivamente (Figura IV.4). O tubo Cailletet (C) é de vidro Pyrex de 500 mm de comprimento com diâmetro interno e externo de 3 e 10 mm, respectivamente. Um dos lados do tubo é fechado e o outro aberto, facilitando a sua montagem na autoclave de aço inoxidável. A pressão do fluido é transmitida à amostra (componente puro ou mistura) inserida na parte superior fechada do tubo Cailletet, usando mercúrio como selador. Na autoclave, a parte final aberta do tubo é imersa no mercúrio, separando a amostra do óleo

utilizado para gerar pressão com um equipamento hidráulico fora da autoclave. Uma peça de ferro revestida com vidro permite a agitação magnética da amostra na parte superior do tubo à alta pressão.

Uma balança Budenberg projetada para operar de $0,2$ até $10 \pm 0,001$ MPa é usada para medir as pressões por meio de manômetros Heise, mantendo-as constantes. Esta balança é controlada por uma bomba hidráulica pneumática.

As temperaturas no sistema são indicadas por um termômetro de resistência de platina de 100Ω ; e para alcançar a temperatura desejada nos experimentos realizados utilizou-se etanol ($260-273,2$ K) como fluido do banho termostático.

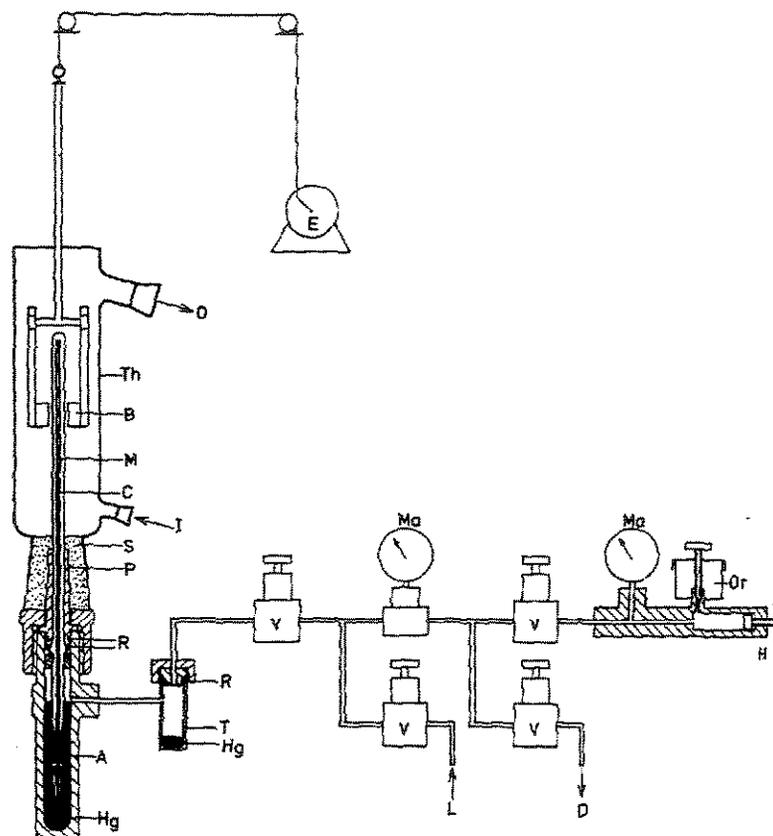


Figura IV.4. Fluxograma do aparelho Cailletet (Peters, 1986)

A-autoclave, B-magnetos, C-tubo Cailletet, D-drenagem, E-motor de agitação, H-bomba hidráulica, Hg-mercúrio, I-ingresso do termostato líquido, L-conexão com válvula de pressão, M-amostra ou mercúrio, Ma-manômetros, O-termostato líquido de saída, Or-reservatório de óleo, P-tampa, R-anéis, S-suporte de borracha de silicone, T-atrapador de mercúrio, Th-termômetro de vidro, V-válvula.

IV.3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

IV.3.1. MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA OBTENÇÃO DE DADOS DE SISTEMAS BINÁRIOS

O método de extração de cafeína com dióxido de carbono supercrítico foi previamente descrito por Saldaña (1997). Para a extração da teobromina e da teofilina com CO₂SC, descrito a seguir, o procedimento é o mesmo que para a cafeína.

IV.3.1.1. Determinação da solubilidade da metilxantina pura em CO₂

Para determinação da solubilidade da teofilina pura no CO₂SC, por exemplo, foi utilizado o método dinâmico com fluxo contínuo de 0,86-1,23 g min⁻¹. Esta vazão é a mesma utilizada por Saldaña (1997) para o sistema binário cafeína/CO₂SC, após terem sido testadas diferentes vazões e ter sido comprovada sua consistência com relação aos valores de solubilidade da literatura (Johannsen e Brunner, 1994). Experimentos foram realizados a 313,2; 323,2; 338,2 e 343,2 K e pressões variando de 14 a 24 MPa, utilizando-se o extrator simples, no qual foram colocadas 100 g de esferas de vidro com diâmetro de 4 mm misturadas com 12 g de teofilina, deixando a substância pura bem distribuída ao redor das esferas de vidro.

O dióxido de carbono foi transferido da garrafa de CO₂ por intermédio de um tubo sifonado. O CO₂ foi resfriado pelo menos até 272,2 K (-1,12°C) entre a saída da garrafa e a cabeça da bomba para prevenir sua vaporização durante o bombeamento. Uma vez resfriado e na fase líquida, o dióxido de carbono é bombeado e introduzido ao sistema. Este fluido é, então, aquecido até alcançar a temperatura desejada. Em seguida, a válvula V-5 é lentamente aberta, evitando assim o arraste da teofilina.

Com o CO₂ pressurizado e aquecido até chegar às condições de trabalho, as válvulas V-2 e V-3 são abertas lentamente. Para manter o equilíbrio, abre-se lentamente a válvula micrométrica V-13. A extração supercrítica é realizada quando o dióxido de carbono alcança um valor acima da pressão e temperatura crítica (acima de 7,38 MPa e 304,2 K). O

CO₂ saturado com a teofilina flui no sistema até totalizar uma massa de 246 gramas. Esta massa foi utilizada para que a análise do produto extraído seja confiável, minimizando o erro da medida de solubilidade. O material extraído é coletado por precipitação ao despressurizar a mistura de teofilina/CO₂. O dióxido de carbono gasoso continua fluindo até o medidor de vazão (flowmeter/totalizer) para, em seguida, sair à atmosfera. O separador está formado por três kitassatos em série, colocados em banhos termostáticos: i) de resfriamento, no caso do primeiro e do terceiro; e, ii) de aquecimento, no segundo, de modo a minimizar as perdas da substância extraída, as quais poderiam sair junto com o CO₂ (Ver Figura IV.5). Ao fim de cada extração foram realizadas lavagens da tubulação para garantir a recuperação total do soluto.

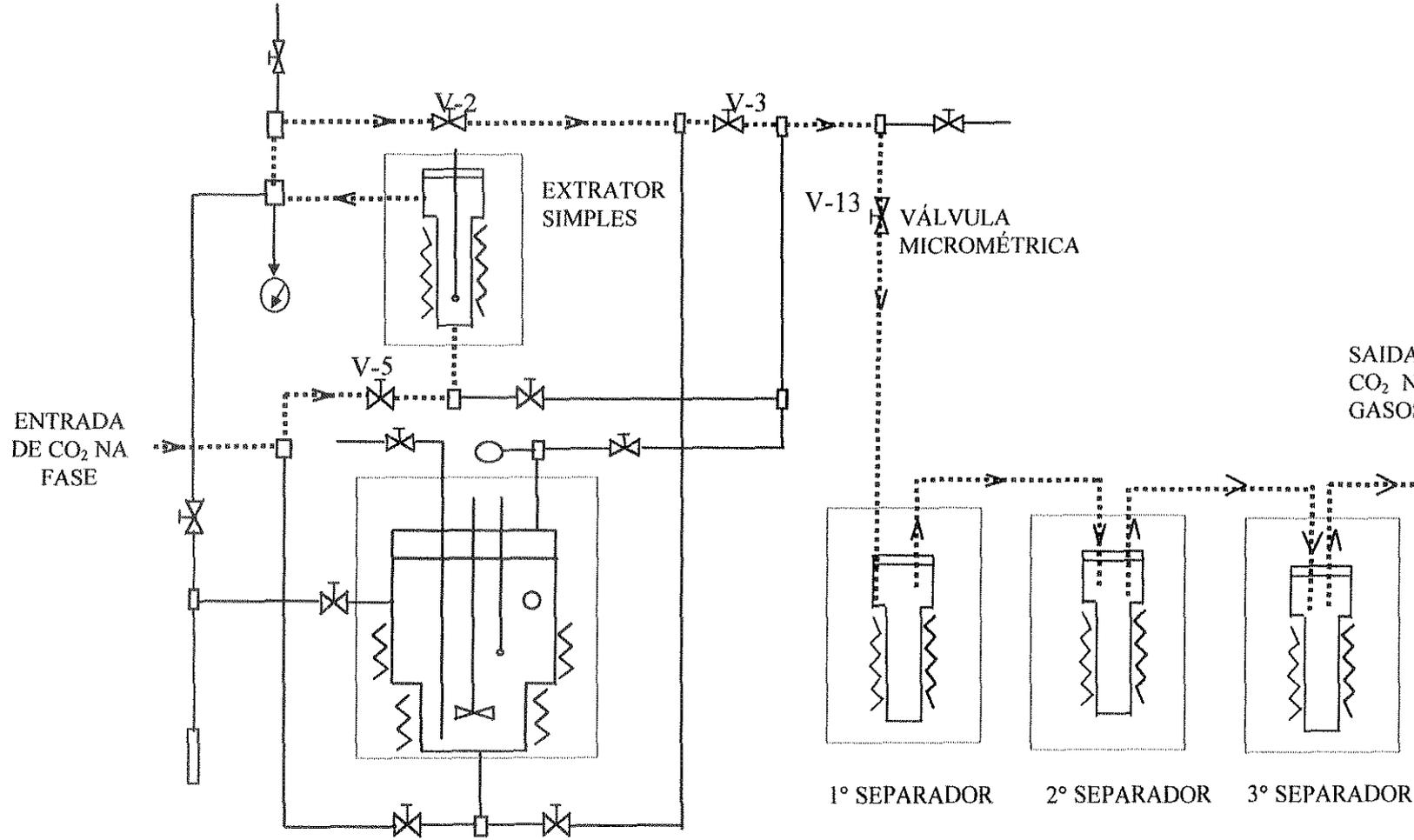


Figura IV.5. Sistema de operação para um sistema binário

IV.3.1.2. Procedimento experimental do comportamento de fases da pilocarpina hidroclorada usando CO₂ supercrítico como antisolvente num sistema quaternário

Os experimentos com sistemas binários: i) pilocarpina hidroclorada e CO₂ supercrítico, e ii) pilocarpina hidroclorada e fluorofórmio supercrítico, realizados de acordo com a metodologia proposta para extração supercrítica não apresentaram bons resultados. Portanto, optou-se pela técnica SAS, em que o sistema ternário pilocarpina hidroclorada/etanol com o dióxido de carbono atuando como anti-solvente foi inicialmente testado. Após alguns experimentos, escolheu-se, porém o sistema quaternário pilocarpina hidroclorada/etanol/água/CO₂, que apresentou melhores resultados por isso será descrito detalhadamente a seguir.

Para preparar uma amostra do sistema quaternário, uma massa conhecida de pilocarpina hidroclorada foi previamente dissolvida em concentrações conhecidas de etanol e água.

Utilizou-se um sistema de dosagem de gás para colocar o dióxido de carbono na amostra ternária no tubo Cailletet, este sistema foi várias vezes degasificado sob condições de alto vácuo. Uma quantidade determinada de massa da solução previamente preparada foi colocada no tubo Cailletet, fusionando-a com nitrogênio líquido. A seguir, uma quantidade conhecida de CO₂ e mercúrio foram colocados também no tubo Cailletet. Em seguida, o tubo Cailletet foi removido do aparelho de dosificação de gás e montado numa autoclave de aço inoxidável (Figura IV.4). A autoclave foi fechada e a pressão controlada com ajuda do sistema de pressão hidráulica. Uma vez colocada a amostra no tubo e este por sua vez na autoclave, coloca-se num banho que permite o controle de temperatura e um agitador magnético que permite a agitação constante da solução, mantendo-a homogênea. Em seguida, o comportamento de fases pode ser observado com ajuda de um microscópio óptico. Neste caso, a solução é resfriada gradativamente, mantendo a pressão constante até o aparecimento do primeiro cristal, o qual indica a mudança de fase; diminui-se então em 5°C menos até o aumento de cristais e começa-se a aumentar a temperatura gradualmente por um intervalo de tempo até observar o desaparecimento do primeiro cristal, o que indica a outra mudança da fase sólida à líquida.

Como o volume, a pressão e a temperatura do dióxido de carbono eram conhecidos, o número de moles foi facilmente calculado. Neste sistema quaternário devido à limitação de tempo desta Tese de Doutorado somente uma interface S-L (sólido-líquido) foi determinada. Esta apresentou uma tendência linear, sendo necessária a determinação da outra interfase L-V (líquido-vapor) em trabalhos futuros por outros pesquisadores.

IV.3.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SISTEMAS COMPLEXOS COM CO₂SC

Antes da extração e do fracionamento a partir das matrizes de plantas naturais foi necessário realizar um pré-tratamento das amostras (plantas naturais). As amostras de folhas e grãos foram granulometricamente classificadas usando peneiras. A amostra foi separada em frações, em função do tamanho da partícula. O conteúdo de umidade da amostra foi determinado por secagem a 105°C por 24 horas.

No caso do chá mate, a amostra comercial foi classificada granulometricamente e separada em quatro frações, levando em consideração o tamanho da partícula. Neste trabalho, uma fração dividida finamente com um diâmetro médio de 0,046 mm foi usada nos experimentos. O conteúdo de umidade da amostra comercial foi de 10%, enquanto que a amostra '*in natura*' foi colhida e classificada pelo tamanho das folhas (aproximadamente 4,5 x 9 cm), apresentando cerca de 55 a 60% umidade. Nos casos de guaraná e cacau, os materiais foram moídos, passados pelo conjunto de peneiras Taylor e classificados de 630 µm a 1 mm (sementes de guaraná) e de 315 µm a 2 mm (amêndoas de cacau). Os produtos naturais foram mantidos em sacolas de plástico e fechadas separadamente até seu respectivo uso.

IV.3.2.1. Extração de metilxantinas de folhas de chá mate comercial

Neste experimento, o CO₂ líquido foi bombeado ao extrator E1 que continha as amostras de folhas de mate (10g, 10% de umidade) até alcançar a pressão e a temperatura

de extração especificadas. Após um período de três horas para alcançar o equilíbrio, o fluido supercrítico saturado foi despressurizado, enquanto que a temperatura e a pressão foram mantidas constantes no extrator, e a fração precipitada foi coletada em kitassatos que atuavam como separadores colocados num banho de resfriamento mantido a 0°C. As amostras coletadas foram pesadas e analisadas usando CLAE para quantificação das metilxantinas. Os três kitassatos separadores foram trocados a intervalos conhecidos e as frações extraídas coletadas a cada 61,5 g de dióxido de carbono passando no extrator nas primeiras seis horas. Subseqüentemente, as frações foram coletadas para cada 369,2 g de CO₂ passados no extrator, já que havia sido extraído mais de 90% do material de interesse, resultando numa extração mais lenta para a recuperação dos 10% restantes. Um total de 20 frações foram continuamente coletadas durante o processo de extração a 25,5 MPa e 343,2 K. Esta pressão e temperatura de operação foram escolhidas devido às maiores solubilidades apresentadas previamente nos sistemas binários. Ao final de cada experimento utilizou-se clorofórmio na limpeza das tubulações e válvulas do aparelho.

A extração de metilxantinas de folhas de chá mate '*in natura*' (22,5g com 60% umidade) foi realizada nas seguintes condições: 14 e 25,5 MPa de pressão e temperaturas de 313,2 e 343,2 K. As amostras foram coletadas a cada 130 e 65g de dióxido de carbono, respectivamente. O procedimento foi o mesmo descrito acima para o chá mate comercial, utilizando o aparelho da Figura IV.1. Este procedimento foi também o mesmo para a extração da pilocarpina das folhas de jaborandi.

IV.3.2.2. Procedimento para extração de cafeína de sementes de guaraná usando a planta de micro-extração

Neste aparelho, foram obtidos dados a pressões de 10, 20 e 40 MPa, temperaturas de 313,2 e 343,2 K e vazões de 5,7 e 9,4 g min⁻¹ de dióxido de carbono. Para cada experimento, uma das colunas de extração foi empacotada com 3g (ou 5g) de sementes de guaraná moídas (saturadas com água até alcançar 40% umidade), misturada com 30 g de esferas de vidro (3mm de diâmetro). Utilizou-se lã de vidro na entrada e na saída da coluna para evitar qualquer arraste possível de material sólido. O conteúdo de cafeína nas sementes moídas e secas foi 4,82%, o que equivale a 144,6 e 241 mg de cafeína total em 3 e 5 g de

amostra de sementes de guaraná seco, respectivamente. Em outra coluna de extração, localizada antes da coluna contendo as sementes de guaraná, foram colocados 40 mL de água destilada para permitir a saturação do dióxido de carbono. Quando a temperatura de extração desejada foi alcançada em ambas as colunas, o dióxido de carbono foi bombeado à coluna contendo água e, em seguida, à coluna de extração até alcançar a pressão de extração desejada. Uma vez que o equilíbrio foi alcançado, a mistura de dióxido de carbono/soluto fluiu através da válvula micrométrica na qual aconteceu a separação/precipitação do soluto desejado. Após cada experimento, utilizou-se água quente e álcool a fim de assegurar a recuperação total de todo o material extraído nas linhas de transferência da válvula de saída e da válvula micrométrica.

O mesmo procedimento foi usado para a obtenção de metilxantinas de chá mate e amêndoas de cacau moídas.

IV.3.2.3. Procedimento de extração de cafeína de sementes de guaraná usando a planta de macro-extração

Num experimento típico usando a planta de macro-extração para extração das metilxantinas, o dióxido de carbono foi bombeado para o extrator E2 o qual continha 100 mL de água em sua parte inferior. Ademais, foi colocado na parte superior deste extrator um cesto contendo uma amostra de sementes de guaraná moídas (50g com 40% de umidade) e protegido com lã de vidro, com a finalidade de prevenir qualquer arraste da amostra inicial. Após um período de uma hora para alcançar o equilíbrio, o fluido supercrítico saturado com o produto extraído foi despressurizado com a válvula micrométrica aquecida, enquanto que a pressão foi mantida constante no extrator. Os efluentes da válvula aquecida (baixa pressão do dióxido de carbono, no estado gasoso, e o material extraído condensado) foram passados continuamente no separador, no qual a temperatura menor que a do extrator era mantida com um banho termostático para recuperar o material precipitado. As frações foram coletadas a intervalos de 1 hora até que aproximadamente 2kg de massa de dióxido de carbono tenha passado através do aparelho. A vazão foi mantida a aproximadamente 30g min⁻¹. O material coletado foi pesado e analisado para quantificar as metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A quantidade total de CO₂ usada foi

mensurada por um medidor de vazão. Após cada extração, a limpeza do sistema foi levada a efeito com etanol e água para garantir uma quantificação correta.

IV.3.2.4. Métodos experimentais para o fracionamento e a extração da manteiga de cacau, teobromina e cafeína com fluidos supercríticos

Para explorar a capacidade do etano na extração e fracionamento da manteiga de cacau das amêndoas de cacau moídas, foram realizados experimentos utilizando etano supercrítico a 323,2 e 343,2 K e pressões de 15,2, 24,8 e 28,3 MPa. Uma amostra de 30g de amêndoas de cacau (0,3-2 mm de diâmetro) foi misturada com esferas de vidro (4 mm de diâmetro) e colocada no extrator simples. O solvente foi bombeado para o extrator até alcançar a pressão de extração. O extrator foi aquecido à temperatura de extração e a válvula micrométrica localizada após o extrator foi lentamente aberta. Os efluentes do extrator (fluido supercrítico saturado com a manteiga de cacau, teobromina e cafeína) foram despressurizados pela válvula micrométrica a qual foi mantida apropriadamente aquecida para evitar o congelamento do solvente. O material extraído, precipitado após a despressurização, foi recuperado em kitassatos, colocados num banho de resfriamento. No último kitassato foi colocado hexano para garantir uma completa recuperação da manteiga de cacau e metilxantinas precipitadas. A análise quantitativa da manteiga de cacau extraída foi realizada por gravimetria após evaporação do solvente em uma estufa com circulação de ar. As frações foram coletadas em intervalos de tempo caracterizados pela passagem de 124g de etano no extrator determinado pelo medidor de vazão.

Foi retirada uma alíquota de 200 mg do produto extraído para as análises de teobromina e cafeína. A amostra foi dissolvida em clorofórmio. Foi retirada 1 mL desta amostra a qual foi transferida para tubos de Eppendorfs, os quais foram colocados abertos em uma estufa de circulação de ar a 60°C. Após a evaporação do solvente foi adicionado 1 mL de água, agitando-se constantemente por 30 min. A amostra foi então centrifugada, retirando-se 500 µL do sobrenadante que foi passado por um filtro e em seguida analisado por CLAE.

A identificação, separação e quantificação da teobromina e cafeína foram também realizadas por cromatografia de camada delgada (CCD). Este método, considerado tão preciso como o método espectroscópico, é também simples e conveniente. Além disso, pequenas quantidades de material são necessárias para cada determinação.

Nesta técnica, foram aplicados 70 μ l de um padrão de teobromina e cafeína (1,5 mg mL⁻¹) e 100 mg de amostra extraída com uma mistura n-butanol-ácido acético (3:1) em uma placa de sílica com indicador de fluorescência (Kieselgel 60F₂₅₄, Merck) de dimensões 20 x 20 cm. Como solvente de arraste foi usada uma mistura de clorofórmio-tetracloro de carbono-metanol (8:5:1) conforme descrito por Senanayake e Wijesekera (1968). Neste sistema, a teobromina foi claramente separada da cafeína em aproximadamente 1:40h em uma corrida de 15 cm, conforme mostrado na Figura IV.6.

As manchas foram visualizadas em ultravioleta (254 nm) ou com uma solução de iodo, e em seguida marcadas. A sílica foi raspada e colocada em tubos de eppendorf, em seguida dissolvida em etanol e centrifugada. A teobromina e cafeína do sobrenadante foram então analisadas e quantificadas por análise de espectrofotometria a 280 nm.

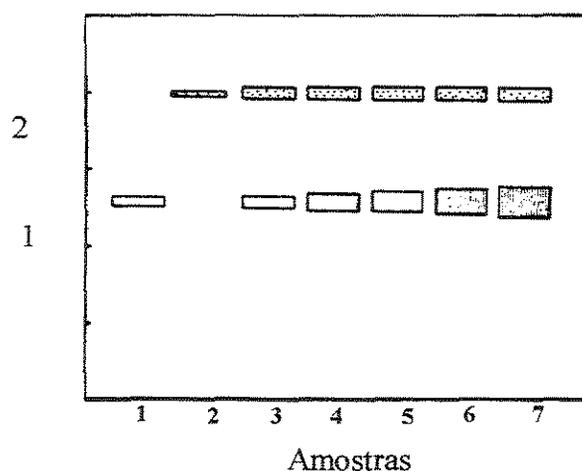


Figura IV.6. Cromatografia de Camada Delgada após a extração dos alcalóides: (1) cafeína, (2) teobromina e (3,4,5,6,7) amostras das amêndoas de cacau moídas.

IV.4. ANÁLISES DOS TEORES DOS ALCALÓIDES E ÁCIDOS GRAXOS, TRIGLICERÍDEOS USANDO CLAE E DE TEMPERATURAS E ENTALPIAS DE FUSÃO USANDO DSC

IV.4.1. ANÁLISES DOS TEORES DE METILXANTINAS

As purinas foram analisadas por CLAE. Na sua quantificação, usou-se o cromatógrafo Shimadzu LC-10 Shimadzu Corp. (Japão). Os solventes foram colocados a um fluxo de 1 mL min^{-1} e os compostos foram separados numa coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) ODS-hypersil da Supelco Inc. (EUA), utilizando-se como solvente isocrático 40% de metanol em 0,5% de ácido acético aquoso. Os compostos eluindo da coluna foram detectados por um monitor UV operando a 280 nm. Os sinais do detector UV foram integrados e comparados com os resultados de quantidades padrões conhecidos de teobromina, teofilina e cafeína pura da Sigma (EUA). Foram realizados dois cromatogramas para cada amostra, mostrando um desvio médio menor que 6%.

IV.4.2. ANÁLISE DO TEOR DE PILOCARPINA E ALGUNS PRODUTOS DE SUA DEGRADAÇÃO

A pilocarpina e isopilocarpina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na sua quantificação, usou-se um cromatógrafo Shimadzu da Shimadzu Corp. (Japão). Os solventes foram colocados a uma vazão de 1 mL min^{-1} e os compostos foram separados numa coluna simétrica C18 (8 x 100 mm x 5 μm) numa unidade de compressão radial da Waters Inc. (EUA), utilizando-se como solvente isocrático 3% de metanol em 5% de fosfato de potássio monobásico. O pH de 2,5 foi alcançado usando ácido fosfórico. Os compostos eluídos da coluna foram detectados por um monitor UV operando a 215 nm. Os sinais do detector UV foram integrados e comparados com os resultados de quantidades padrões conhecidas de pilocarpina pura da Sigma (EUA) e isopilocarpina doada pela Biosynth (Holanda). O ácido pilocárpico foi obtido usando 0,1N NaOH aquoso, utilizando CLAE para identificar o grau de conversão da pilocarpina em ácido pilocárpico.

IV.4.3. ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS NA MANTEIGA DE CACAU

Para a determinação da composição dos ácidos graxos da manteiga de cacau foi necessário uma prévia esterificação metílica. Cada amostra foi tratada segundo o método de Hartman e Lago (1973), que consiste na saponificação do óleo e conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos. A composição de ácidos graxos foi determinada por meio de um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Sigma 3B, equipado por um detector FID a 225°C. Foi empregada uma coluna empacotada Silar 10C (10% Cianopropilsiloxano em chromosorb W) 4m x 1/7". A temperatura no detector e injetor foi de 225°C e na coluna de 165°C. O gás de arraste foi o nitrogênio, numa vazão de 25 mL min⁻¹. A identificação foi conduzida comparando os tempos de retenção com um padrão conhecido. A quantificação foi realizada com o integrador através do *software Peak Simple for Windows*.

IV.4.4. ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DOS TRIGLICERÍDEOS NA MANTEIGA DE CACAU

Nas análises dos triglicerídeos foi usado um cromatógrafo líquido LC-10AD da Shimadzu corporation (Kyoto, Japão) equipado com um detector de índice de refração RID-10^A. A coluna (4,6 mm x 25 cm x 5μ) é empacotada com octadecil C18 e acondicionada num forno modelo CTO-10Avp que permite manter constante a temperatura da mesma. As áreas foram obtidas através de um integrador-registrador da Shimadzu corporation (Kyoto, Japão).

A manteiga extraída com fluido supercrítico foi dissolvida em 1mL de acetona grau CLAE. Em seguida 10 μL de solução filtrada foi injetada no aparelho de CLAE. O solvente de eluição foi composto da mistura de acetona/acetonitrila da Merck (EUA) num fluxo de 0,9 mL min⁻¹ mantido a 30°C.

A metodologia adotada para preparação da amostra foi a mesma adotada por Facioli e Gonçalves (1998) e, posteriormente, comparada com o cromatograma da gordura de cacau publicada por Defense (1983), Chaiseri et al. (1989) e Hernandez et al. (1991).

IV.4.5. ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DE PORCENTAGEM DE SÓLIDOS NA MANTEIGA DE CACAU POR CALORÍMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Para determinar o teor de sólidos e o comportamento térmico das frações de manteiga de cacau foi usado um calorímetro diferencial de varredura DSC-50 da Shimadzu corporation (Kyoto, Japão). Este aparelho usa o fluxo de calor na temperatura da fonte. Esse fluxo de calor na forma de energia constitui a curva de DSC. A diferença de temperatura entre a amostra e a referência pelas diferentes capacidades caloríficas é medida e assumida como linha base. Esta diferença é registrada e a temperatura da amostra plotada em função do tempo. Quando a amostra funde, a diferença da temperatura da amostra e da referência aumenta, pois a temperatura da amostra permanece constante enquanto que a temperatura da referência continua aumentando. O DSC-50 é muito sensível e detecta diferenças de entalpia da ordem de $10\mu\text{w}$. O equipamento está conectado a um micro-computador pelo *software Thermal analysis system TA-50WSI* da Shimadzu corporation (Kyoto, Japão).

Antes da determinação da curva de sólidos da gordura é necessário temperar a amostra, visando homogeneizar os seus cristais na forma adequada. O processo de temperagem consiste segundo a AOCS (16-b-93) em: i) fundir a gordura a 100°C , mantendo-a nesta temperatura por 15 minutos; ii) colocar esta gordura temperada em estufa a 60°C por 5 minutos; iii) levar ao banho termostático a 0°C por 90 minutos; iv) pôr em banho a 26°C por 40 horas; e, v) resfriar a 0°C por 90 minutos. Uma vez temperada a gordura coloca-se 5 a 10 mg de gordura estabilizada em cápsulas de alumínio de $40\mu\text{L}$, lacrando-se estas cápsulas. Em seguida, as cápsulas são resfriadas a -50°C no equipamento DSC e aquecidas de -50°C até 50°C a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{minutos}$. O percentual de sólidos é

obtido por determinação das áreas parciais do termograma em intervalos definidos de temperatura.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÕES

*Neste capítulo, apresentam-se os principais resultados obtidos dos experimentos realizados nos laboratórios de Engenharia de Processos de Produtos Naturais da Unicamp (Brasil), na planta piloto da Universidade Técnica de Hamburgo-Harburgo (Alemanha) e no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio de Fases da Universidade Técnica de Delft (Holanda). Apresentamos dados experimentais para os seguintes sistemas binários estudados são apresentados: i) sistema modelo teofilina pura/CO₂ supercrítico e ii) sistema modelo teobromina pura/CO₂ supercrítico. Em seguida são apresentados os dados obtidos na extração de metilxantinas das diferentes matrizes naturais, a saber, folhas de chá maté *Ilex paraguariensis*, sementes de guaraná *Paullinia cupana* e amêndoas do cacau *Theobroma cacao*, englobando-se nestes resultados efeitos das diversas variáveis do processo sobre a extração e fracionamento dos produtos. Apresenta-se também o sistema modelo quaternário pilocarpina hidroclorada/etanol/água e CO₂ supercrítico como anti-solvente, assim como a tentativa de recuperação da pilocarpina das folhas de jaborandi utilizando CO₂ supercrítico.*

V.1. SISTEMAS BINÁRIOS DE METILXANTINAS E CO₂ SUPERCRÍTICO

A utilização do sistema modelo (metilxantina e CO₂ supercrítico) justifica-se pela simplicidade e exatidão na descrição da composição (que pode ser controlada com precisão na faixa de interesse), simplificando a análise e a modelagem termodinâmica e permitindo um melhor entendimento dos mecanismos que governam o processo de extração.

A confiabilidade de dados de equilíbrio obtidos com o aparelho de alta pressão do Laboratório de Engenharia de Processos de Produtos Naturais da Unicamp foi conferida pela boa concordância entre os dados de solubilidade de cafeína a 313,2 K, obtidos por Saldaña (1997) em sua dissertação de Mestrado com aqueles apresentados por Johannsen e Brunner (1994), além dos trabalhos anteriores de Neves (1996) e Socantaype (1996).

V.1.1. SISTEMA TEOFILINA/CO₂SC

A solubilidade da teofilina pura no CO₂ supercrítico foi determinada a 313, 323, 338 e 343 K, e pressões que variaram de 14 a 24 MPa (Figuras V.1 e V.2). Os resultados de solubilidade obtidos de experimentos em quadruplicata apresentaram um desvio médio menor que 6%. É importante mencionar que foram realizados experimentos usando fluxos de 0,9 g min⁻¹ e 1,2 g min⁻¹ e que, em ambos os casos, o equilíbrio termodinâmico foi alcançado e mantido.

No estudo realizado com o sistema modelo cafeína/CO₂SC (Saldaña et al., 1997), observou-se uma sensível influência da temperatura (313,2 a 343,2 K) e pressão (10 a 24 MPa) na solubilidade da cafeína no CO₂. Portanto, em virtude da similaridade das estruturas das duas xantinas (cafeína e teofilina) foram utilizadas as mesmas condições de pressão e temperatura. Assim, foram obtidas quatro isotermas para o sistema teofilina/CO₂SC, das quais três constituem novas contribuições para a literatura.

Na Figura V.1 observa-se que a solubilidade da teofilina aumenta com a pressão para todas as isotermas investigadas, em concordância qualitativa com a tendência relatada na literatura (Johannsen e Brunner, 1994). O aumento da pressão à temperatura constante gera um aumento na densidade do solvente que em conseqüência resulta em aumento da solubilidade. Por outro lado, à pressão constante o aumento da temperatura gera uma redução na densidade. Neste caso, o aumento da pressão de vapor foi predominante para compensar esta redução na densidade, resultando no aumento da solubilidade.

A solubilidade da teofilina pura a 313,2 K foi obtida com o objetivo de compará-la aos dados da literatura. A comparação é apresentada na Tabela V.1 e os dados mostram um desvio bastante grande em relação aos dados de Johannsen e Brunner (1994). Li et al. (1991) usando o método dinâmico para as medidas de solubilidade observaram desvios semelhantes aos encontrados neste trabalho quando compararam seus dados de solubilidade de teobromina pura em CO₂ aos dados de Johannsen e Brunner (1994) obtidos com o método estático. Os dados de Li et al. (1991) foram duas a três vezes menores aos de Johannsen e Brunner (1994).

Johannsen e Brunner (1994) afirmaram que os métodos dinâmicos frequentemente tendem a subestimar as solubilidades de equilíbrio por não alcançar as condições de equilíbrio. Porém, as diferenças encontradas nos baixos valores de solubilidade de teofilina e teobromina reportados poderiam ser explicados pelas diferenças nos métodos de medida, na coleção de amostra e na análise. Neste trabalho foi utilizado um aparelho que possui uma janela que permite visualizar as interfaces.

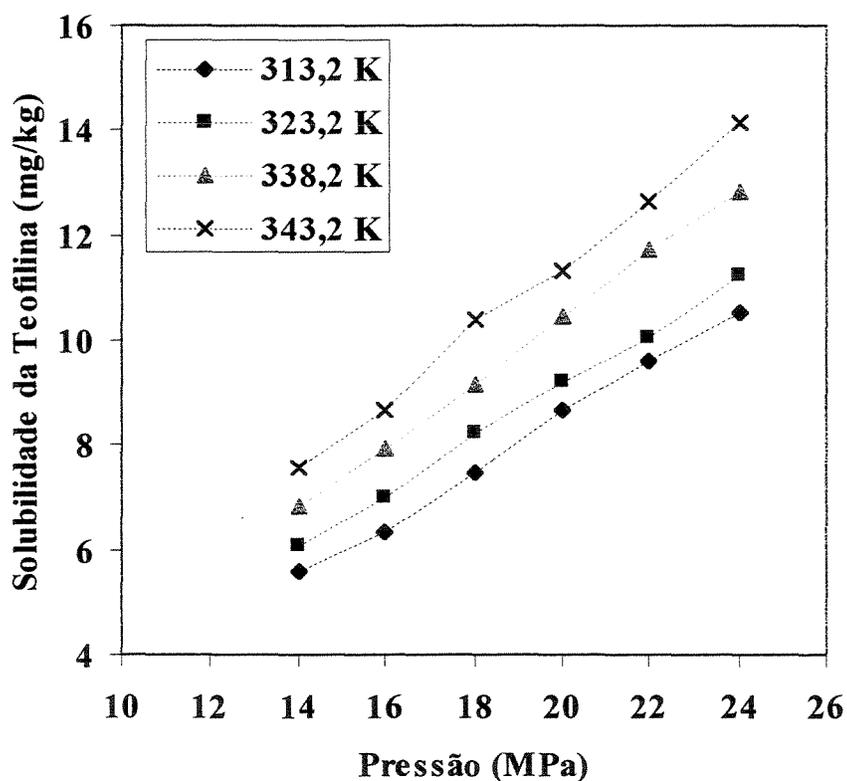


Figura V.1. Solubilidade da teofilina pura no CO₂ supercrítico.

Tabela V.1. Solubilidade da teofilina pura, com pureza de 99%, no CO₂ supercrítico a 313,2 K.

Pressão (MPa)	Solubilidade x 10 ² (g/kg)	
	Este Trabalho ¹	Johannsen e Brunner (1994) ²
20	0,87	4,4
22	0,96	4,2
24	1,05	4,4

¹usando o método dinâmico, ²usando o método estático

Na Figura V.2 mostram-se as solubilidades da teofilina pura no CO₂ supercrítico, em função da densidade reduzida. A densidade crítica do dióxido de carbono é de 0,468 g/cm³ (Rizvi et al., 1986). Observam-se isothermas quase paralelas em toda a faixa de trabalho (a partir de densidades próximas à densidade crítica, $\rho_r = 1$), consistentes com tendências observadas por Li et al. (1991), para o sistema cafeína/CO₂SC e por Johannsen e Brunner (1994), para o sistema teofilina/CO₂SC.

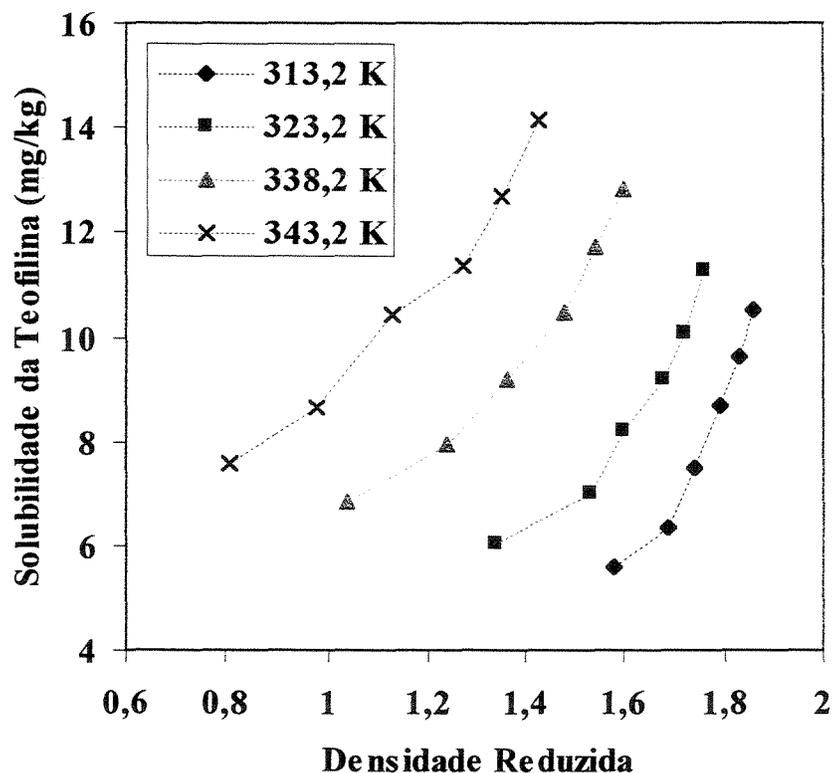


Figura V.2. Solubilidade da teofilina no CO₂SC como função da densidade reduzida.

O paralelismo é importante pois facilita a modelagem do sistema, do contrário, maiores ajustes serão necessários.

V.1.2. SISTEMA TEOBROMINA/CO₂ SUPERCRÍTICO

As solubilidades da teobromina pura em CO₂ a 313,2; 323,2; 338,2 e 343,2 K e pressões de 14 a 24 MPa são reportadas na Figura V.3. Os dados relatados representam médias de quatro experimentos independentes com desvio padrão de aproximadamente $\pm 6\%$. A solubilidade da teobromina foi menor do que a encontrada para a cafeína (Saldaña, 1997), aumentando com o aumento da pressão para todas as temperaturas estudadas. Para este sistema, o aumento da pressão de vapor devido ao aumento na temperatura compensa o decréscimo na solubilidade causada pela redução na densidade do fluido supercrítico.

As solubilidades da teobromina pura a 338,2 K estão em concordância com os valores reportados por Li et al. (1991), que usaram também o método dinâmico, obtendo, porém menores valores que os reportados por Johannsen e Brunner (1994), que empregaram o método estático. Dados obtidos a outras temperaturas representaram novas contribuições para a literatura.

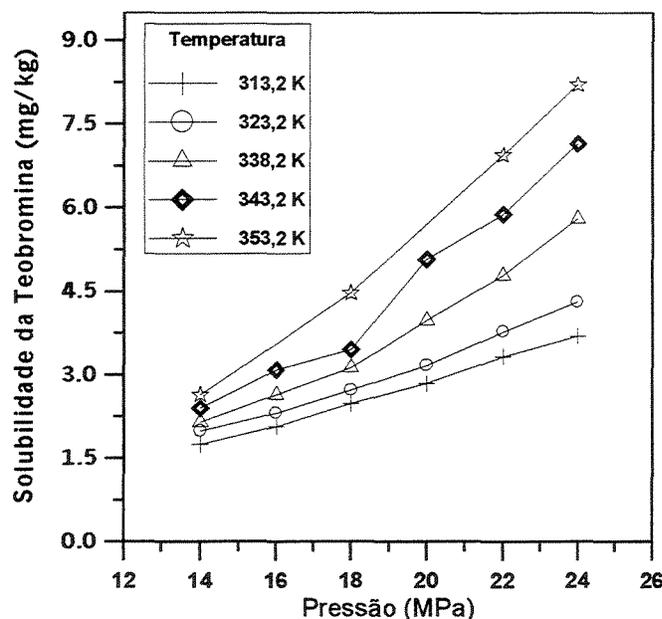


Figura V.3. Solubilidades da teobromina a diferentes pressões e temperaturas

Comparando-se as Figuras V.1, V.2 e V.3, pode-se concluir que as solubilidades da cafeína no dióxido de carbono supercrítico são maiores que as da teofilina e são aproximadamente duas ordens de magnitude maiores que as da teobromina. Conforme apontado por Martin et al. (1981), o comportamento ideal das metilxantinas em líquidos a 25°C indica que a cafeína é mais solúvel que a teofilina e ambas são uma ordem de magnitude mais solúveis que a teobromina. Este comportamento é qualitativamente similar ao observado no dióxido de carbono supercrítico e pode ser explicado analisando-se as diferenças das estruturas químicas destas metilxantinas (Figuras III.1). Pode-se observar que a cafeína possui três grupos metil enquanto que a teofilina e a teobromina possuem apenas dois grupos metil e uma molécula de hidrogênio ligado ao anel. Conforme apontado por Li et al. (1991), a presença de um átomo de hidrogênio (um aceptor de elétron), e grupos de carga negativa, nitrogênio e CO (doador de elétron) no anel, permite a formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de teobromina e entre as moléculas de teofilina. Segundo Agostino et al. (1994), esta interação intermolecular favorece a formação de camadas de moléculas (Figura V.4) que seriam menos solúveis no CO₂SC pela sua maior massa molecular. Os efeitos destas forças coesivas adicionais são manifestados macroscopicamente numa maior temperatura de fusão (547 e 621 K para teofilina e teobromina, respectivamente) e maior entalpia (7097 e 9819 cal mol⁻¹ para a teofilina e teobromina, respectivamente). A cafeína (com temperatura de fusão de 512 K e entalpia de 5044 cal mol⁻¹) é mais solúvel que a teofilina e teobromina em CO₂ supercrítico. As diferenças na temperatura de fusão, entalpia e na solubilidade em CO₂ supercrítico entre a teofilina e teobromina podem ser atribuídas à maior formação das pontes de hidrogênio pela localização do hidrogênio entre os dois grupos carbonila (CO) como pode ser observado na Figura V.5.

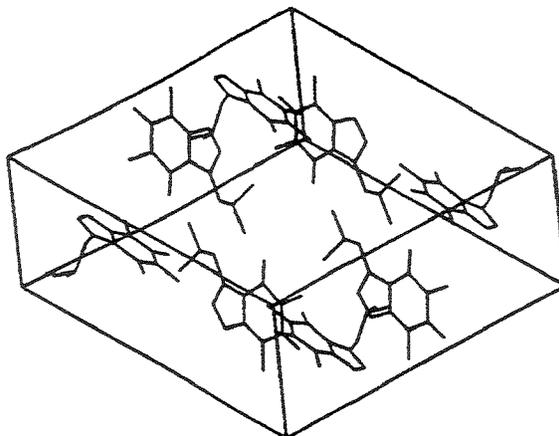
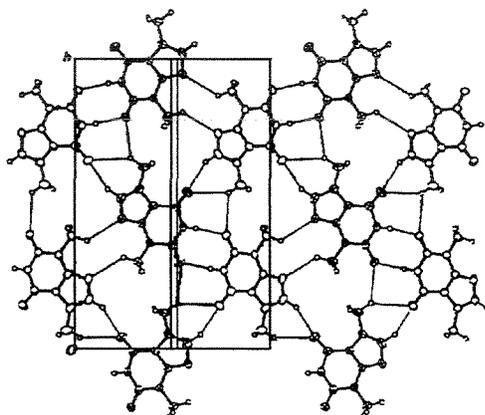
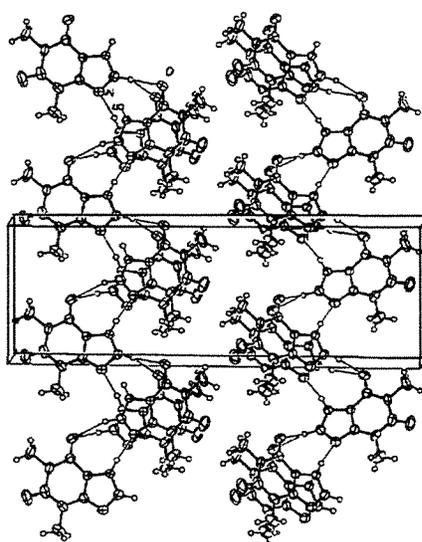


Figura V.4. Diagrama de empacotamento das moléculas de teofilina (Agostino et al., 1994)



(A)



(B)

Figura V.5. Associação das moléculas de: (A) teobromina (Ford et al., 1998) e, (B) teofilina (Ebisuzaki et al., 1997).

Foram realizados experimentos com produtos naturais (chá mate *Ilex paraguariensis*, guaraná *Paullinia cupana* e cacau *Theobroma cacao*) para aferir desvios dos comportamentos encontrados em sistemas modelos e em sistemas reais de interesse para a implementação industrial dos processos.

A seguir apresentam-se os resultados encontrados na extração de alcalóides a partir de produtos naturais usando fluidos supercríticos.

V.2. EXTRAÇÃO DE ALCALÓIDES DE PRODUTOS NATURAIS COM USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS E EFEITOS DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO

Conforme descrito no capítulo IV, foram realizados experimentos para exploração do processo de extração e fracionamento com fluidos supercríticos na remoção de metilxantinas de plantas naturais e da manteiga de cacau das amêndoas de cacau moídas. Nestes experimentos, foram analisados os efeitos de variáveis do processo: a temperatura, a pressão, a vazão e a natureza do solvente sobre o rendimento do processo. A matéria prima e as frações obtidas durante o fracionamento foram caracterizadas e analisadas conforme descrito no Capítulo IV.

Antes de começar a discussão sobre os fenômenos encontrados no processo de extração supercrítica e os efeitos de algumas variáveis no rendimento do processo, apresenta-se uma breve discussão sobre as análises das metilxantinas.

Para a análise dos extratos obtidos após a extração foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na Figura V.6 observa-se que o tempo de retenção (t_R) para a teobromina, teofilina e cafeína, identificadas pelo detector UV do cromatógrafo, estão a 3,5; 4,3 e 6 minutos, usando como fase móvel 40% metanol em água, seguindo a metodologia descrita no item IV.4.1. A ordem de eluição das metilxantinas pode ser explicada pela maior interação entre a fase móvel, numa coluna cromatográfica C18, e a teobromina, pois esta possui um radical hidrogênio na posição 1 e dois radicais metila nas posições 3 e 7, enquanto que a cafeína possui três radicais metila nas posições 1, 3 e 7. Baltassa et al. (1984) usou a mesma fase móvel metanol - água (40-60 v/v), obtendo picos muito similares aos obtidos neste trabalho (4; 4,7 e 6 min) e apresentando a mesma ordem de eluição em função do t_R (teobromina, teofilina e cafeína).

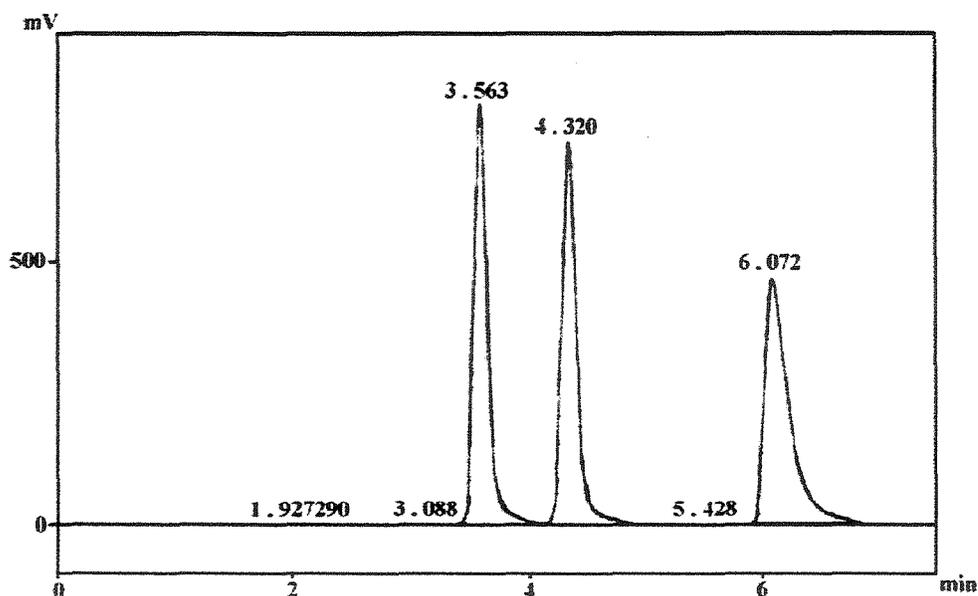


Figura V.6. Cromatograma da mistura de padrões de teobromina, teofilina e cafeína por CLAE

A seguir apresentam-se os resultados dos efeitos das variáveis do processo, temperatura, pressão, vazão e natureza do solvente sobre a extração de metilxantinas das diferentes matrizes de plantas e a manteiga de cacau das amêndoas de cacau moído.

V.2.1. EFEITO DA TEMPERATURA

Para mostrar o efeito da temperatura na extração de metilxantinas foram utilizados os sistemas reais: sementes de guaraná/ CO_2 supercrítico, folhas de chá mate/ CO_2SC e amêndoas de cacau/ CO_2SC .

Para verificar a reprodutibilidade dos dados experimentais obtidos no aparelho de micro-extração, duas extrações independentes foram realizadas para cada uma das condições mencionadas a seguir: 40 MPa, 343,2 K e $5,7 \text{ g min}^{-1}$ e 10 MPa, 343,2 K e $5,7 \text{ g min}^{-1}$. As quantidades acumuladas de cafeína extraídas das sementes de guaraná nestes experimentos independentes apresentaram concordância com um desvio médio menor que $\pm 5\%$.

Na Figura V.7, as curvas de extração para uma amostra de 5 g de sementes de guaraná, a 40 MPa e uma vazão de CO₂ de 9,4 g min⁻¹ obtidas a duas temperaturas diferentes de 313,2 e 343,2 K são apresentadas. A representação adimensional foi escolhida para que as informações fornecidas independam da quantidade de amostra utilizada na extração, e dessa forma facilitem as comparações e o *scale-up* do processo. A quantidade de cafeína extraída aumentou com o aumento na temperatura. Os dados indicaram que para um período de extração de 180 min a 343,2 K e 40 MPa, que corresponde ao uso de 335,8 kg CO₂/kg guaraná, 79% do conteúdo inicial de cafeína foi extraído, em comparação com a quantidade acumulada de 27,4 g cafeína/kg guaraná (57% da cafeína inicial) obtido a 313,2 K e a mesma pressão, vazão e tempo de extração. Os valores de densidade na pressão de 40 MPa com o aumento da temperatura de 313,2 a 343,2 K (956,73 e 856,9 kg/m³, respectivamente) apresentam um decréscimo de aproximadamente 10%. Por outro lado, o aumento da temperatura de 313,2 a 343,2 K nesta mesma pressão provoca um aumento na pressão de vapor da cafeína de 0,37 x 10⁻⁹ a 0,15 x 10⁻⁷ bar, respectivamente (mudança em duas ordens de magnitude). O efeito predominante neste sistema foi o da pressão de vapor e a quantidade de cafeína extraída aumenta com a temperatura apesar do decréscimo da densidade e a conseqüente queda correspondente no poder de solvatação do solvente.

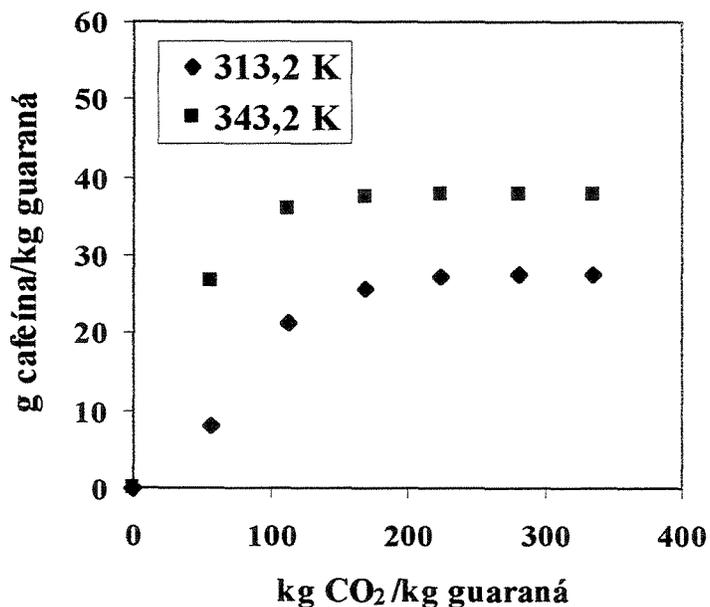


Figura V.7. Extração de cafeína de 5g de sementes moídas úmidas de guaraná, a 40 MPa e 9,4 g min⁻¹. Total: 48 g cafeína/kg guaraná.

A Figura V.7 mostra ainda altas taxas de remoção de cafeína das sementes moídas de guaraná nos primeiros estágios de extração, com as taxas diminuindo nos últimos estágios, como mostrados pelas mudanças na inclinação da curva de extração. Este comportamento é similar ao das curvas de extração encontradas na literatura quando outros produtos naturais moídos foram extraídos (Brunner, 1984; Catchpole et al., 1996; Saldaña et al., 1997; Saldaña et al., 1999). As curvas de extração mostram claramente as três regiões distintas descritas por Hedrick et al. (1992). A primeira região da curva dominada pela solubilidade foi observada nos primeiros 90 min (com o uso de 167,9 kg CO₂/kg guaraná) a 313,2 K em que 25,6 g cafeína/kg guaraná (53,3% cafeína nas sementes) foram extraídos das sementes de guaraná. A 343,2 K, esta mesma região foi observada nos primeiros 60 minutos (com o uso de até 111,9 kg of CO₂/kg guaraná), em que 35,9 g cafeína/kg guaraná (74,7% de cafeína) foram extraídos. Após estes períodos de tempo, a extração passou a ser controlada tanto pela difusão interna como pela difusão externa da cafeína nas sementes úmidas moídas de guaraná. As solubilidades experimentais da cafeína no CO₂ supercrítico saturado com água obtidas a partir da inclinação da parte linear das curvas de extração a 40 MPa e as temperaturas de 313,2 e 343,2 K foram de 3,7 e 9 x 10⁻⁵ em fração molar, respectivamente. Este efeito da temperatura no processo de extração é qualitativamente similar ao observado dos cálculos de solubilidade em sistemas binários de cafeína e CO₂ saturado com água, usando a correlação proposta por Lentz et al. (1986), pela qual pode-se estimar que as solubilidades da cafeína a 40 MPa são 3,79 e 7,39 x 10⁻⁴ a 313,2 e 343,2 K, respectivamente. Os valores de solubilidade da cafeína no CO₂ supercrítico saturado em água obtidos das curvas de extração das sementes de guaraná são aproximadamente uma ordem de magnitude menores que esses preditos usando a correlação proposta por Lentz et al. (1986) para o sistema binário cafeína/CO₂ supercrítico saturado com água. Este resultado é consistente com os apontados na extração de β-caroteno das cenouras usando CO₂ e N₂O supercrítico (Subra et al., 1998), extração da cafeína dos grãos de café usando CO₂ supercrítico (McHugh e Krukoniš, 1994; Saldaña et al., 1997), extração da cafeína das folhas de chá mate usando CO₂ supercrítico (Saldaña et al., 1999) e extração do óleo de sementes de *'fennel'* usando CO₂ supercrítico (Reverchon et al., 1999). Além disso, tendências qualitativas similares foram observadas quando são comparadas as solubilidades em sistemas binários, ternários e quaternários para ácidos graxos e triglicerídeos em CO₂SC (Bamberger et al., 1988). As solubilidades dos compostos em CO₂ supercrítico obtidos em

sistemas envolvendo matrizes naturais foram, porém, uma a duas ordens de magnitude menores que os valores correspondentes aos sistemas binários ou ternários. Estas discrepâncias em valores de solubilidades podem ser atribuídas a possíveis interações dos componentes (carboidratos, taninos, entre outros) encontrados na matriz natural.

Mehr et al. (1996) reportou dados de solubilidade para a cafeína no dióxido de carbono saturado em água que variavam de $7,6 \times 10^{-5}$ a $4,6 \times 10^{-4}$ para uma faixa estreita de temperatura (308,2-328,2 K) e pressão (13,7-27,5 MPa), obtidas dos experimentos de extração usando sementes de guaraná moídas (0,26 mm). Estes valores são maiores que os valores obtidos das curvas de extração neste trabalho, os quais variaram de $1,4 \times 10^{-7}$ a 9×10^{-4} para temperaturas de 313,2-343,2 K e pressões de 10-40 MPa. Enquanto que os dados de solubilidade deste trabalho foram obtidos das curvas de extração na região dominada pela solubilidade (o qual corresponde a tempos de extração que poderiam alcançar 90 min), Mehr et al. (1996) reportaram que seus dados de equilíbrio foram obtidos em menores tempos (15 min). Esta diferença no procedimento não deveria fazer nenhuma diferença nos dados de solubilidade reportados, porém, incertezas experimentais poderiam ser minimizadas usando períodos de tempo de extração prolongados. Em geral, as discrepâncias nos valores de solubilidade podem também ser atribuídas à pureza do solvente, métodos experimentais usados, origem da amostra, composição dos componentes principais na amostra e saturação do solvente. Os dados experimentais para o sistema deste trabalho- sementes de guaraná/CO₂ supercrítico- são consistentes quando comparados com os valores obtidos em sistemas binários, a não ser para os valores obtidos por Mehr et al. (1996), que são iguais ou maiores que os dados em sistemas binários.

O mesmo efeito de temperatura foi observado na extração ao usar quantidades iniciais menores de sementes de guaraná úmidos e moídos de 3g (Figura V.8). Neste caso, a quantidade extraída corresponde a 31,7 g cafeína/kg de sementes de guaraná a 343,2 K, 40 MPa, 55,9 kg CO₂/kg guaraná (em 30 min de extração). A quantidade extraída alcançou 46,6 g cafeína/kg guaraná (97% da cafeína inicial) em 210 min (que corresponde ao uso de 391,8 kg CO₂/kg guaraná). Em contraste, um máximo de 60,2% de cafeína nas sementes (29,01 g cafeína/kg guaraná) foi obtida na temperatura menor de 313,2 K (391,8 kg CO₂/kg

guaraná). A 343,2 K foi possível extrair 98% da cafeína inicial (47,2 g cafeína/kg guaraná) num período de 240 min (correspondendo ao uso de 447,8 kg de CO₂/kg guaraná).

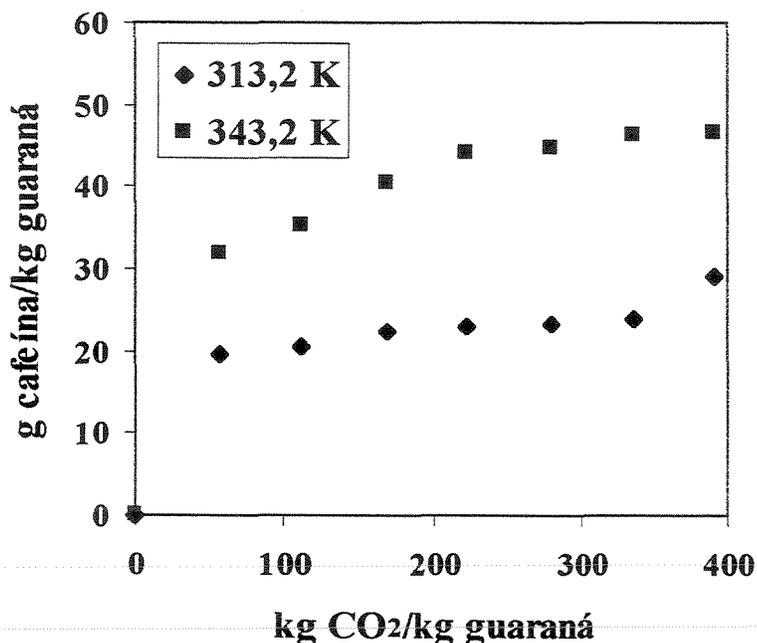


Figura V.8. Extração de cafeína de 3g de sementes de guaraná moídas, a uma pressão de 40 MPa e vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

Na Figura V.8, observa-se que a primeira região dominada pela solubilidade termina em 60 e 30 min de extração a 313,2 e 343,2 K, respectivamente. As quantidades de cafeína extraídas nestes períodos foram aproximadamente 43% (20,6 g cafeína/kg guaraná) e 66% (31,7 g cafeína/kg guaraná) para as temperaturas de extração de 313,2 e 343,2 K, respectivamente. Estes valores foram similares aos obtidos na Figura V.7 usando uma amostra de 5g e vazão de 9,4 g min⁻¹ e, portanto, mostraram ser independentes das quantidades iniciais de sementes moídas e úmidas de guaraná.

Analisando-se, ainda, a Figura V.8 observa-se que a relação custo - benefício foi maior extraindo-se à temperatura de 343,2 K por uma hora do que por quatro horas. Isto porque nos primeiros 60 minutos, 74,7% de cafeína total foi extraída enquanto que nas mesmas condições por 240 minutos foram extraídos 98% da cafeína inicial, ou seja, apenas 24% a mais, num período de tempo três vezes maior, usando 447,8 kg CO₂/kg guaraná que requer um consumo de energia considerável.

As curvas de extração da cafeína de uma amostra de 2g de folhas de chá mate moído obtidas a uma pressão de 40 MPa e utilizando uma vazão de $5,7 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2 são apresentadas na Figura V.9. Similarmente ao observado para a extração das sementes de guaraná, a quantidade de cafeína extraída aumenta com o aumento na temperatura. Num período de 400 min (correspondendo ao uso de $1080 \text{ kg CO}_2/\text{kg}$ folhas de mate), $15,5 \text{ mg}$ de cafeína (96% do conteúdo inicial que corresponde a $7,77 \text{ g}$ de cafeína/kg folhas de mate) e $11,4 \text{ mg}$ de cafeína (71% que corresponde a $5,73 \text{ g}$ de cafeína/kg folhas de mate) foram extraídos a $343,2 \text{ K}$ e $313,2 \text{ K}$, respectivamente.

Os resultados mostrados nas Figuras V.8 e V.9 também apontam a facilidade da extração de cafeína das sementes de guaraná em relação à extração da cafeína das folhas de chá mate. Enquanto que não há nenhuma diferença significativa nas matrizes das plantas envolvidas, já que ambos produtos foram usados na forma moída, a facilidade ou dificuldade de extração destas duas plantas, poderiam ser atribuídas a possíveis interferências dos constituintes de cada planta.

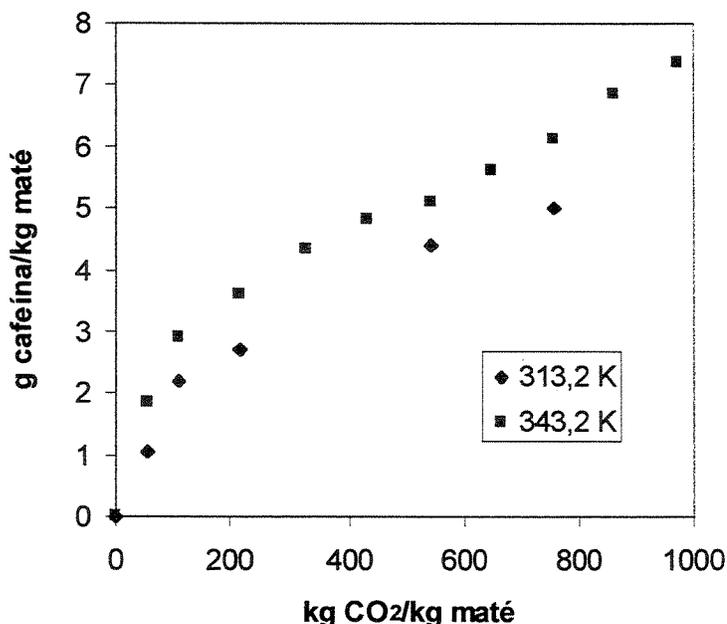


Figura V.9. Extração de cafeína de 2g de folhas de chá mate moídas e úmidas a uma pressão de 40 MPa e vazão de $5,7 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2 .

O efeito da temperatura foi também observado nas extrações realizadas a pressões mais elevadas que 90 MPa, utilizando o aparelho de macro-extração, em que, usando-se 250

kg CO₂/kg mate, a 313,2 K foram extraídas 3,07 g cafeína/kg mate e a 343,2 K foram extraídas 4,89 g de cafeína/kg mate (Figura V.10).

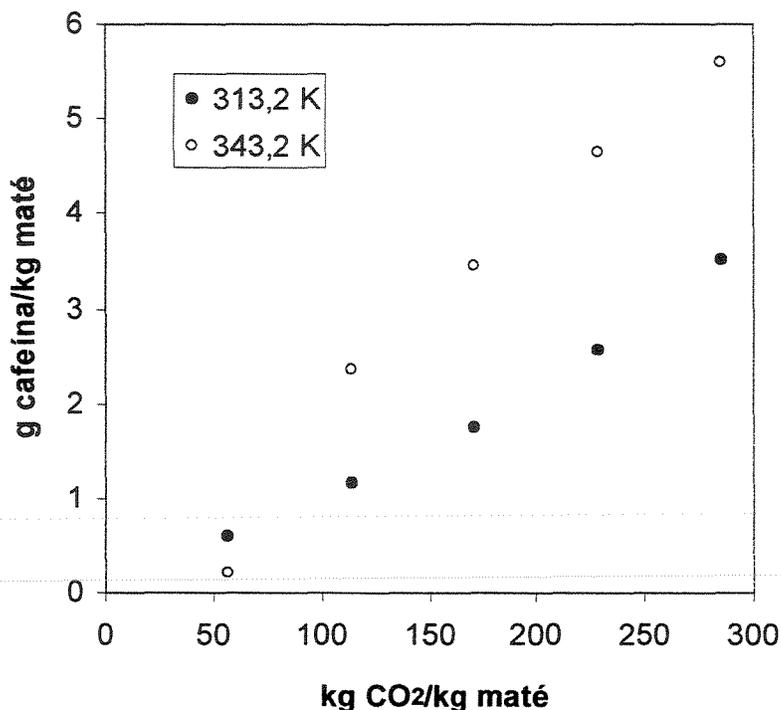


Figura V.10. Extração de cafeína de 30g de folhas de chá moídas e úmidas a uma pressão de 90 MPa e vazão de CO₂ de 30 g min⁻¹.

Os rendimentos de extração de teobromina de 3g de amostra de amêndoas de cacau a 40 MPa e usando uma vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂ seco nas temperaturas de 323,2 e 343,2 K são apresentados na Figura V.11. Foram requeridos períodos de extração mais prolongados para a remoção da teobromina de amêndoas de cacau, do que para a remoção de cafeína das sementes de guaraná e das folhas de chá mate. Mais de 380 min (684 kg CO₂/kg amêndoas de cacau) foram necessários para extrair 14 e 28% do conteúdo inicial de teobromina (1,74 e 3,49 g teobromina/kg amêndoas de cacau) a 323,2 e 343,2 K, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado considerando-se que a solubilidade de cafeína no CO₂ supercrítico é duas vezes maior que a da teobromina. Além disso, há também quantidades substanciais de lipídios nas amêndoas de cacau, os quais podem interferir na extração de teobromina da matriz da planta.

Os rendimentos de teobromina aqui reportados são similares aos obtidos por Sambarato (1984), que removeu 20% do conteúdo inicial de teobromina nas amêndoas de cacau usando CO_2 supercrítico a 45 MPa e 323,2 K. O efeito positivo da temperatura na extração de teobromina está também em concordância qualitativa com aquele obtido por Sebald et al. (1996).

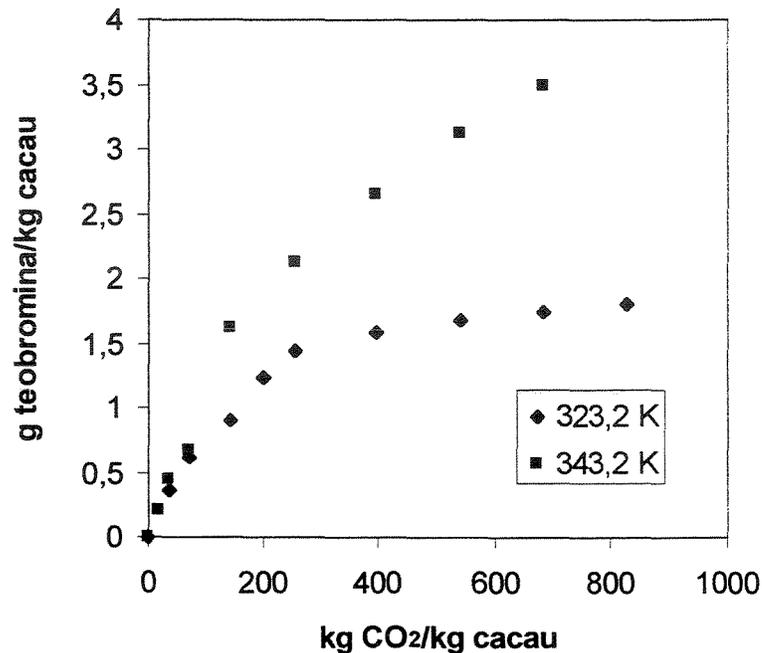


Figura V.11. Extração de teobromina de 3g de amêndoas de cacau a uma pressão de 40 MPa e uma vazão de $5,7 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2 .

Este efeito da temperatura foi também observado usando o aparelho de macro-extração a 40 MPa com uma vazão de 30 g min^{-1} de CO_2 (Figura V.12) e temperaturas de 313,2 e 343,2 K. Usando $66,67 \text{ kg CO}_2/\text{kg cacau}$ foram obtidos 0,044 e 0,055 g de teobromina/kg cacau a 313,2 e 343,2 K, respectivamente. Aumentando a massa de CO_2 para $333,3 \text{ kg CO}_2/\text{kg cacau}$ foram obtidos 0,26 e 0,36 g teobromina/kg cacau a 313,2 e 343,2 K, respectivamente.

Com uma quantidade fixa de $200 \text{ kg CO}_2/\text{kg cacau}$ a 343,2 K e 40 MPa foram obtidas 0,20 g teobromina/kg cacau usando uma vazão de 30 g min^{-1} no aparelho de macro-extração enquanto que nas mesmas condições de temperatura, pressão a uma vazão de $5,7 \text{ g min}^{-1}$

min^{-1} foram obtidas 2,0 g teobromina/kg cacau no aparelho de micro-extração. O menor rendimento de teobromina obtido no aparelho de macro-extração pode ser atribuído à maior vazão, ocasionando a passagem do fluido 'by-pass' por entre as amêndoas moídas de cacau, sem chegar à saturação.

O efeito de temperatura também foi observado na Figura V.13 usando o aparelho de macro-extração a 90 MPa e temperaturas de 313,2 e 343,2 K. Usando 66,67 kg CO_2/kg cacau foram obtidos 0,092 e 0,12 g de teobromina/kg cacau a 313,2 e 343,2 K, respectivamente. Aumentando a massa de CO_2 para 333,3 kg CO_2/kg cacau foram obtidos 0,45 e 0,60 g teobromina/kg cacau a 313,2 e 343,2 K, respectivamente.

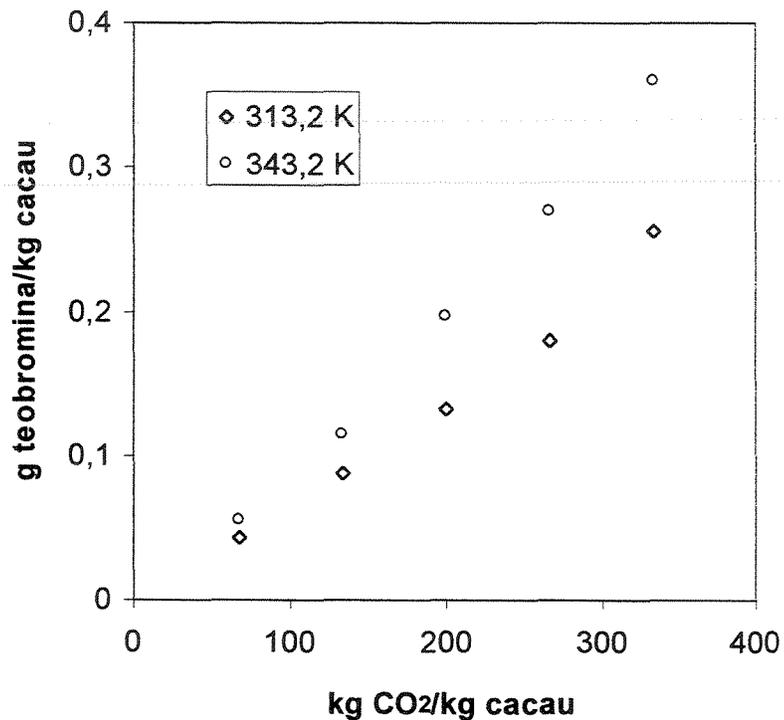


Figura V.12. Extração de cafeína 30 g de amêndoas de cacau moídas a 40 MPa e 30g min^{-1} .

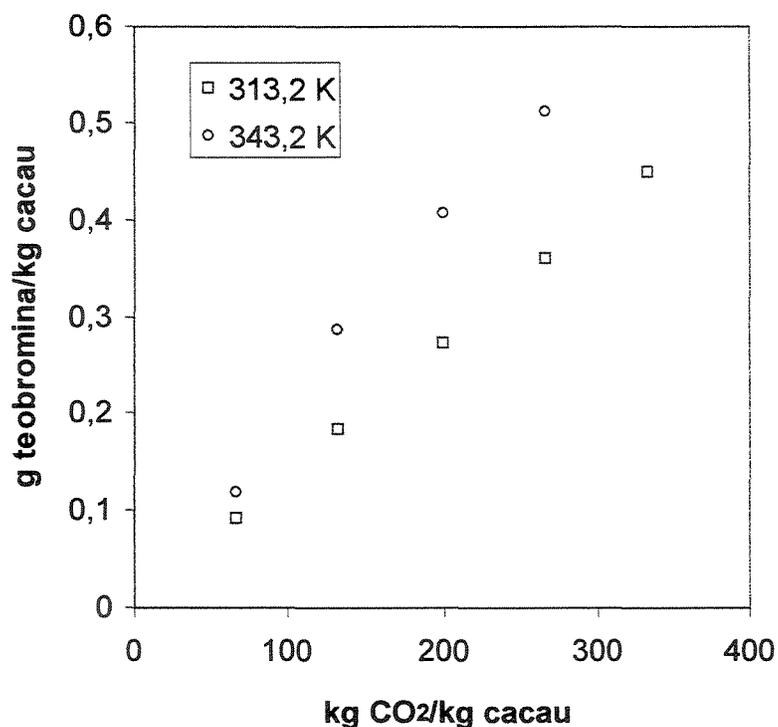


Figura V.13. Extração de cafeína de 30 g de amêndoas de cacau moídas a 90 MPa e 30 g min⁻¹.

Comparando os dados obtidos da extração de cafeína/teobromina das plantas naturais observa-se que ao usar o aparelho de micro-extração, as quantidades obtidas de cafeína/teobromina foram maiores que as quantidades obtidas usando o aparelho de macro-extração. Isto pode ser atribuído às vazões utilizadas, sendo que no aparelho de micro-extração foram utilizadas vazões de 5,7 e 9,4 g min⁻¹ e no aparelho de macro-extração foram utilizadas vazões maiores de 30 e 90 g min⁻¹. Neste último caso, o fluido poderia somente passar 'by-pass' por entre as matrizes sem chegar à saturação.

Para estes sistemas, nas condições estudadas, o aumento na pressão de vapor da cafeína/teobromina (devido ao aumento na temperatura) compensa o decréscimo na solubilidade causada pela redução na densidade do fluido supercrítico quando se aumenta a temperatura.

V.2.1.1. COMPORTAMENTO RETRÓGRADO

O comportamento retrógrado ocorre devido à existência de dois efeitos concorrentes quando se eleva a temperatura (McHugh e Krukonis, 1994): a densidade do solvente, à pressão constante, diminui quando é submetido a um aumento de temperatura. Como o poder de solvatação é função direta da densidade do solvente, a capacidade do fluido supercrítico de solubilizar o soluto diminui, resultando em uma diminuição da solubilidade. Por outro lado, a pressão de vapor do soluto se eleva, aumentando a solubilidade no fluido supercrítico. No entanto, o efeito predominante neste caso é a densidade.

A Figura V.14 apresenta o comportamento observado na extração de cafeína das sementes de guaraná usando dióxido de carbono saturado com água a 10 MPa e duas temperaturas de extração de 313,2 e 343,2 K, em que se pode, claramente, identificar uma quantidade maior de cafeína extraída a uma temperatura menor. Este é o comportamento retrógrado comumente encontrado nos sistemas de extração supercrítica. Especificamente para a cafeína, este comportamento é similar ao observado para o sistema binário cafeína/CO₂ (Stahl e Schilz, 1979; Saldaña et al., 1997), identificado a pressões menores que 19 MPa, apresentando um comportamento normal a altas pressões. Usando pressões menores que 17,2 MPa, Mehr et al. (1996) mostraram uma tendência similar à encontrada para as curvas de extração da cafeína das sementes de guaraná com CO₂ supercrítico. A diminuição da solubilidade deve-se à predominância do efeito da densidade com respeito à pressão de vapor. Neste caso, houve uma diminuição da densidade de 622,64 para 247,962 kg/m³ ao aumentar a temperatura de 313,2 a 343,2 K numa pressão constante de 10 MPa.

A extração de cafeína de folhas de chá mate usando CO₂ saturado com água a 10 MPa (Figura V.15) revela também um comportamento retrógrado semelhante ao encontrado no sistema anterior.

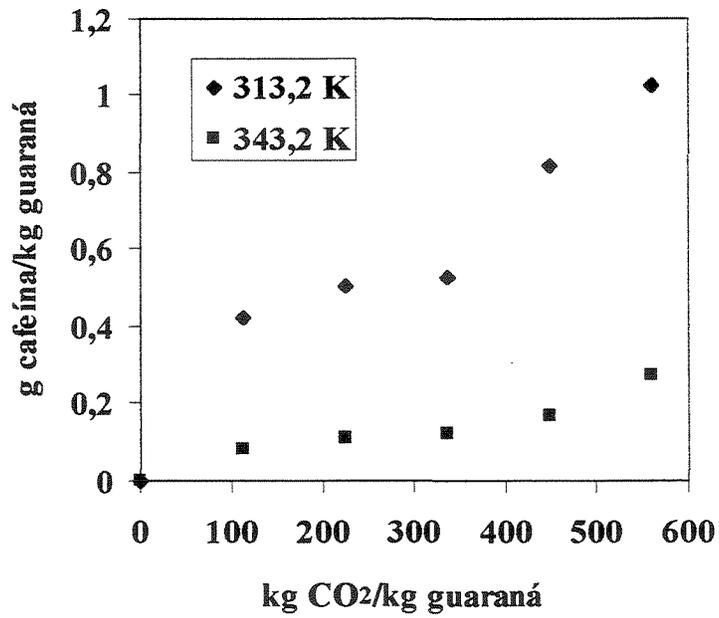


Figura V.14. Extração da cafeína de 3g de sementes de guaraná a uma pressão de 10 MPa e uma vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

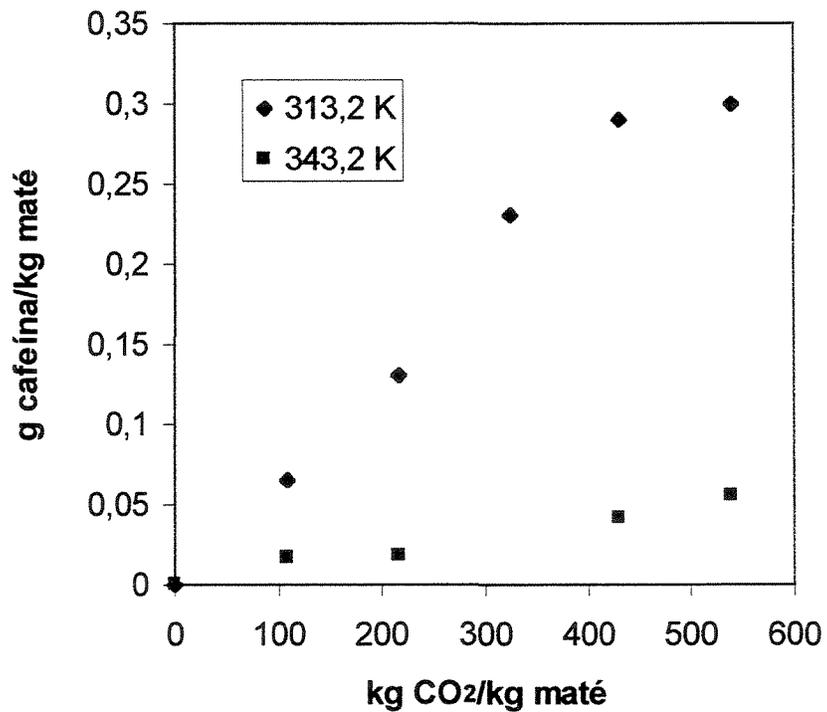
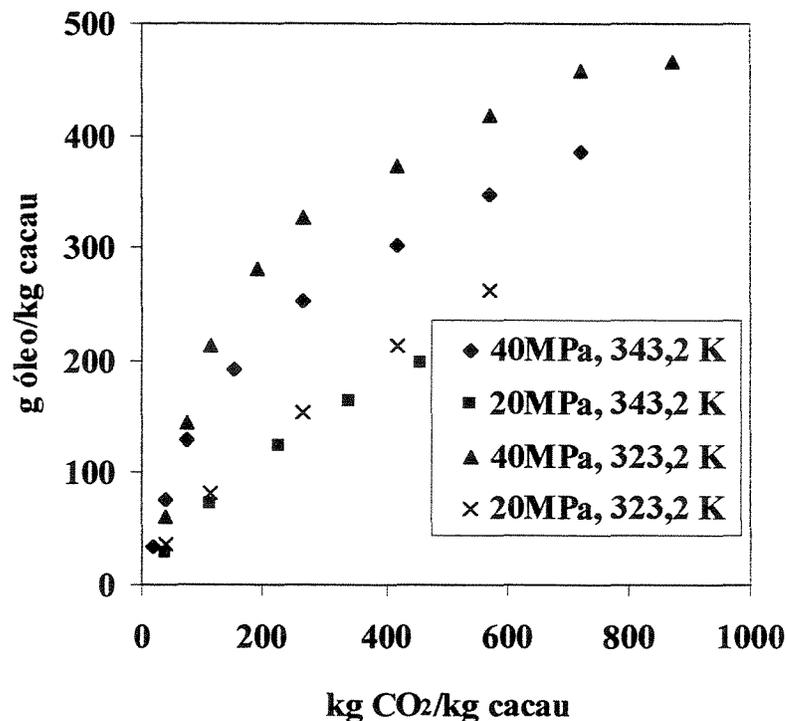
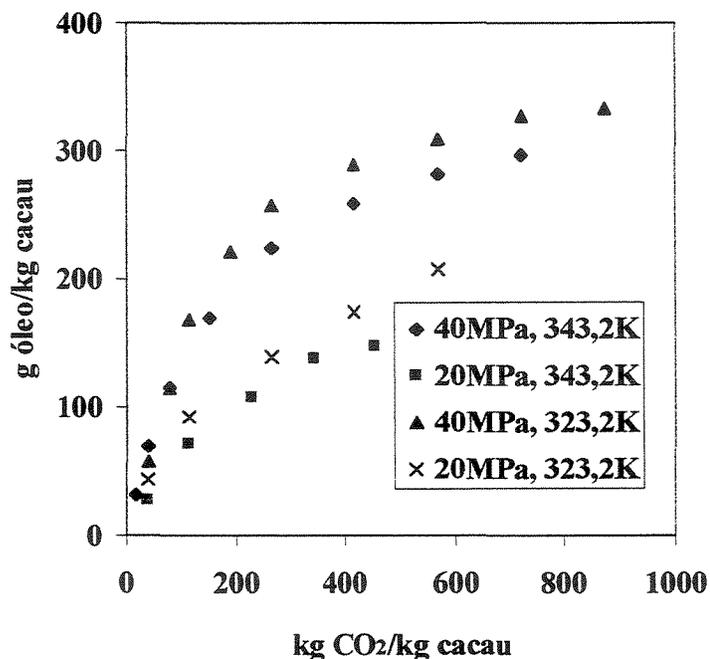


Figura V.15. Extração da cafeína de 2 g de folhas de chá mate a uma pressão de 10 MPa e uma vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

Na Figura V.16 são mostradas as curvas de extração da manteiga de cacau das amêndoas de cacau moído, em coordenadas adimensionais para os experimentos realizados utilizando CO₂ supercrítico seco e saturado com água, respectivamente, nas temperaturas de 323,2 e 343,2 K e pressões de 20 e 40 MPa. Os dados foram reproduzidos dentro de uma margem de $\pm 8\%$, o que é considerada dentro de uma faixa aceitável. Na Figura V.16 mostra-se o aumento nos rendimentos das extrações da manteiga de cacau usando dióxido de carbono supercrítico seco com o aumento da pressão a uma temperatura constante. Rendimentos de 39,7 e 85,3% de manteiga de cacau foram obtidos a uma temperatura constante de 323,2 K e pressões de 20 e 40 MPa, respectivamente. O efeito da temperatura sobre o rendimento da extração foi contrário ao da pressão, onde maiores rendimentos foram obtidos a temperaturas menores quando se opera a uma pressão constante. Rendimentos de 85,3 e 71,8% de manteiga de cacau foram obtidos a 40 MPa e temperaturas de 323,2 e 343,2 K, respectivamente. Esta variação foi muito pequena, considerando o erro experimental de 8%.



(A)

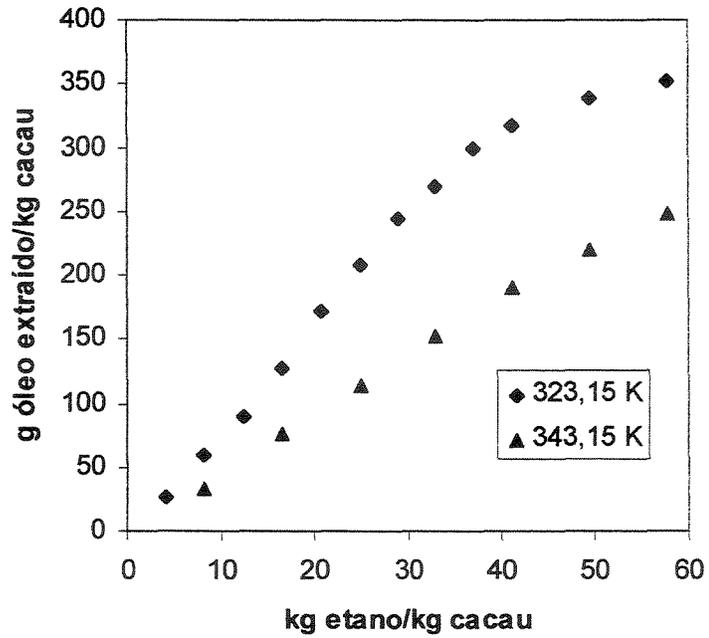


(B)

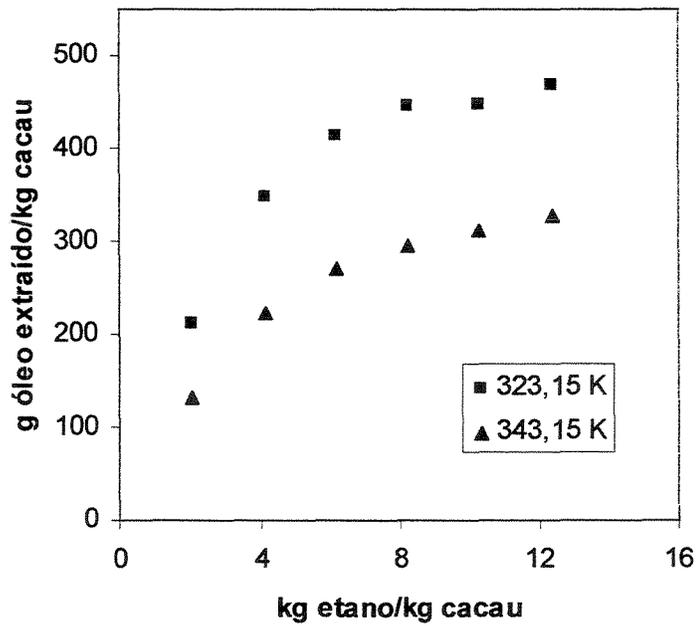
Figura V.16. Curvas de extração da manteiga de cacau a uma vazão de $5,67 \text{ g min}^{-1}$ com: (A) CO_2 supercrítico seco e (B) CO_2 supercrítico saturado com água, em base adimensional.

Total: 538 g óleo/kg cacau.

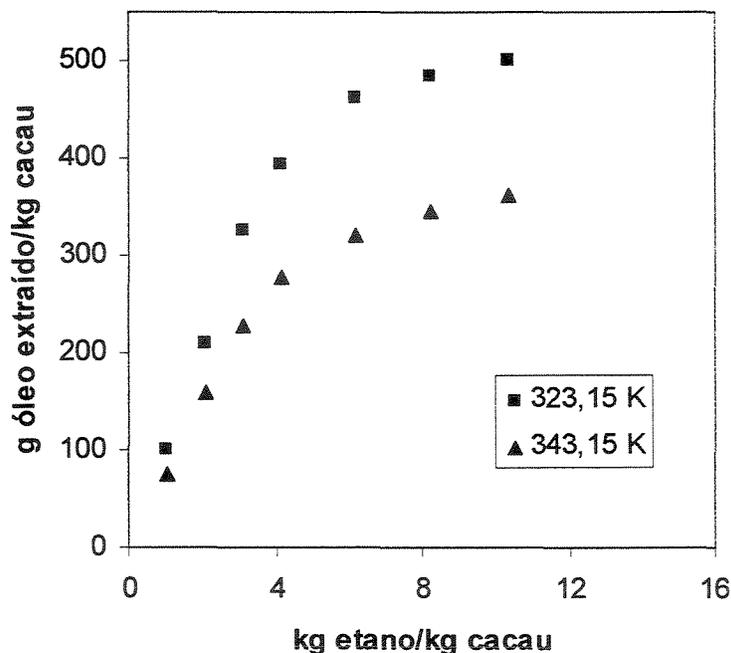
Na Figura V.17 é evidente o comportamento retrógrado para a extração da manteiga de cacau com etano supercrítico na faixa completa de pressão (15,2-28,3 MPa) para as temperaturas de 323,2 e 343,2 K. Observa-se uma diminuição no rendimento de 15 para 9%, 90 para 62% e 99 para 72% ao aumentar a temperatura de 323,2 a 343,2 K nas pressões de 15,2, 24,8 e 28,3 MPa, respectivamente, usando 0,31 kg de etano. Friedrich et al. (1982) reportou comportamentos similares para a extração de óleo de sementes de soja usando CO_2 supercrítico a 323,2 e 333,2 K e pressões de até 41,4 MPa. O mesmo comportamento foi observado por Li e Hartland (1996) ao trabalhar com o sistema modelo manteiga de cacau/ CO_2 supercrítico a pressões de 15 a 30 MPa e temperaturas de 313,2 e 333,2 K. Este comportamento foi também observado por Friedrich e Pryde (1984) e Stahl et al. (1980) na extração supercrítica de outros produtos que contém óleos.



(A)



(B)



(C)

Figura V.17. Curva de extração da manteiga de cacau em base adimensional a 323,2 e 343,2 K, e uma pressão de: (A) 15,2 MPa; (B) 24,8 MPa e (C) 28,3 MPa. Vazão de $0,87 \text{ g min}^{-1}$ com etano supercrítico. Total: 500 g óleo/kg cacau.

O comportamento retrógrado foi observado a uma pressão de 10 MPa e temperaturas de 313,2 e 343,2 K nos sistemas de sementes de guaraná/ CO_2SC , folhas de chá mate/ CO_2SC assim como no sistema manteiga de cacau/ CO_2SC e manteiga de cacau/etano supercrítico.

V.2.2. EFEITO DA PRESSÃO

A Figura V.18 mostra o efeito da pressão na extração de cafeína da matriz sólida de sementes de guaraná úmidas e moídas quando extraídas a 313,2 K. Em 60 minutos (111,9 kg CO_2 /kg guaraná), a extração a 313,2 K e $5,7 \text{ g min}^{-1}$ resultou na obtenção de 0,9; 4,2 e 43% de cafeína inicial (0,4; 2 e 20,7 g cafeína/kg guaraná) a pressões de extração de 10, 20 e 40 MPa, respectivamente. Para um tempo de extração de 180 minutos (correspondente ao

uso de 335,8 kg CO₂/kg guaraná), as quantidades extraídas foram 1,1; 28,4 e 49,4% que correspondem a 0,5; 13,7 e 23,8 g cafeína/kg guaraná, a 10, 20 e 40 MPa, respectivamente.

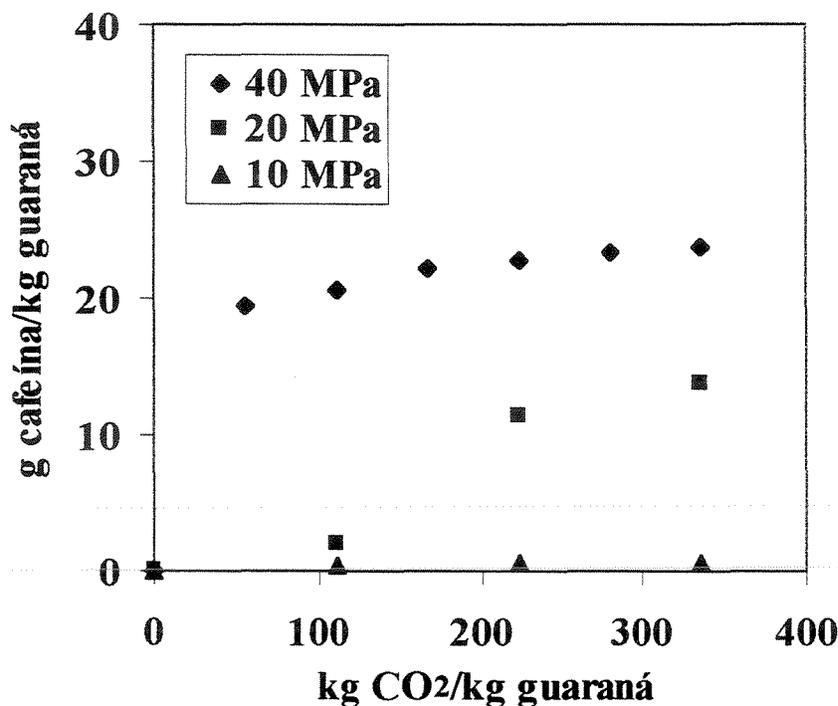


Figura V.18. Extração de cafeína de 3g de sementes de guaraná a uma temperatura de 313,2 K e vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

A Figura V.19 mostra mais uma vez a influência da pressão durante o processo de extração de cafeína das sementes de guaraná. A quantidade de cafeína extraída aumenta com a pressão, sendo que este efeito mais pronunciado a 343,2 K que a 313,2 K (Figura V.18). Isto se deve ao aumento da pressão de vapor em duas ordens de magnitude à temperatura maior, como já mostrado anteriormente no efeito da temperatura no processo de extração. A extração a 40 MPa e 343,2 K resultou na remoção de aproximadamente 73 e 96% de cafeína nas sementes originais (35,2 e 46,1 g cafeína/kg guaraná) em 60 e 180 min de extração (usando 111,9 e 335,8 kg CO₂/kg guaraná), respectivamente. O comportamento de extração em função do tempo a uma pressão de 20 MPa foi similar àquele observado para a pressão de 40 MPa mas com a remoção de 29 e 60% do conteúdo inicial de cafeína, equivalente a 14 e 28,7 g cafeína/kg guaraná, a 60 e 180 min de extração contínua. Nestes mesmos tempos de extração, somente 0,17 e 0,26% da cafeína original presente nas sementes (0,08 e 0,12 g cafeína/kg guaraná) foram obtidas a 10 MPa. Esta influência da pressão observada nas

quantidades de cafeína extraída é consistente com os valores de solubilidade de $1,11 \times 10^{-5}$; $5,27 \times 10^{-4}$ e $7,39 \times 10^{-4}$ obtidos da correlação de Lentz et al. (1986) e os valores de $0,14 \times 10^{-6}$; $2,7 \times 10^{-5}$ e 10×10^{-5} obtidos das curvas de extração para a cafeína no CO_2 úmido a 343,2 K e pressões de 10, 20 e 40 MPa, respectivamente. O incremento na solubilidade é maior quando se aumenta a pressão de 10 a 20 MPa que quando se aumenta a pressão de 20 a 40 MPa, de acordo com os resultados apresentados nas Figuras V.18 e V.19. A variação da densidade com o aumento da pressão de 10 MPa para 20 MPa, numa temperatura constante (343,2 K), foi de 410,651 kg/m^3 , enquanto que o aumento da pressão de 20 MPa para 40 MPa causou uma menor variação da densidade (198,29 kg/m^3), para uma variação na pressão duas vezes maior.

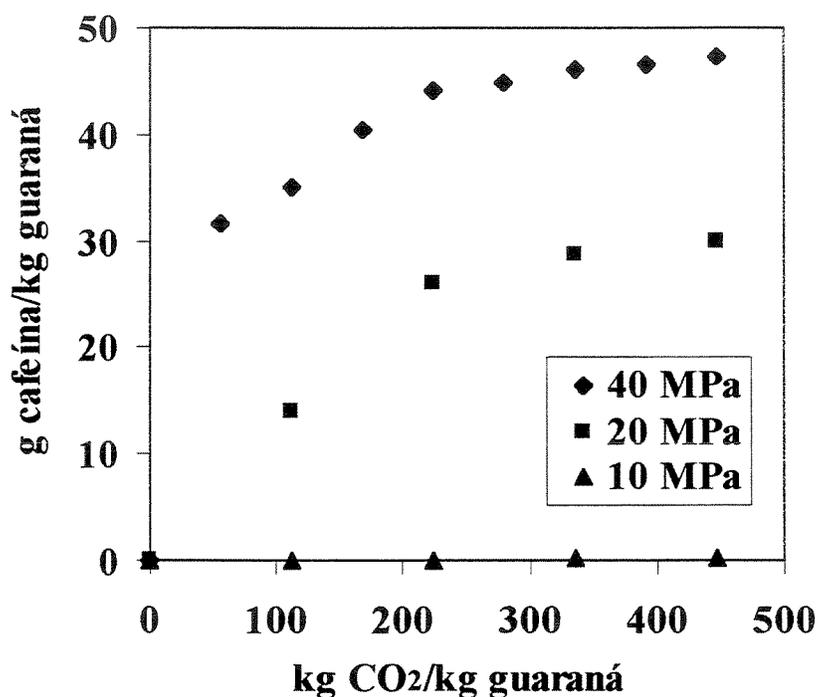


Figura V.19. Extração de cafeína de 3g de sementes de guaraná a uma temperatura de 343,2 K e vazão de $5,7 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2 .

O efeito do aumento da pressão de 40 para 90 MPa obtidos com o aparelho de macro-extração, à temperatura constante de 343,2 K, provocou um aumento da quantidade de cafeína extraída de 0,01 para 0,83 g cafeína/kg guaraná, usando 40 kg CO_2 /kg guaraná. Com o uso de 200 kg CO_2 /kg guaraná foram obtidos 17,55 e 28,72 g cafeína/kg guaraná a pressões de 40 e 90 MPa, respectivamente (Figura V.20)

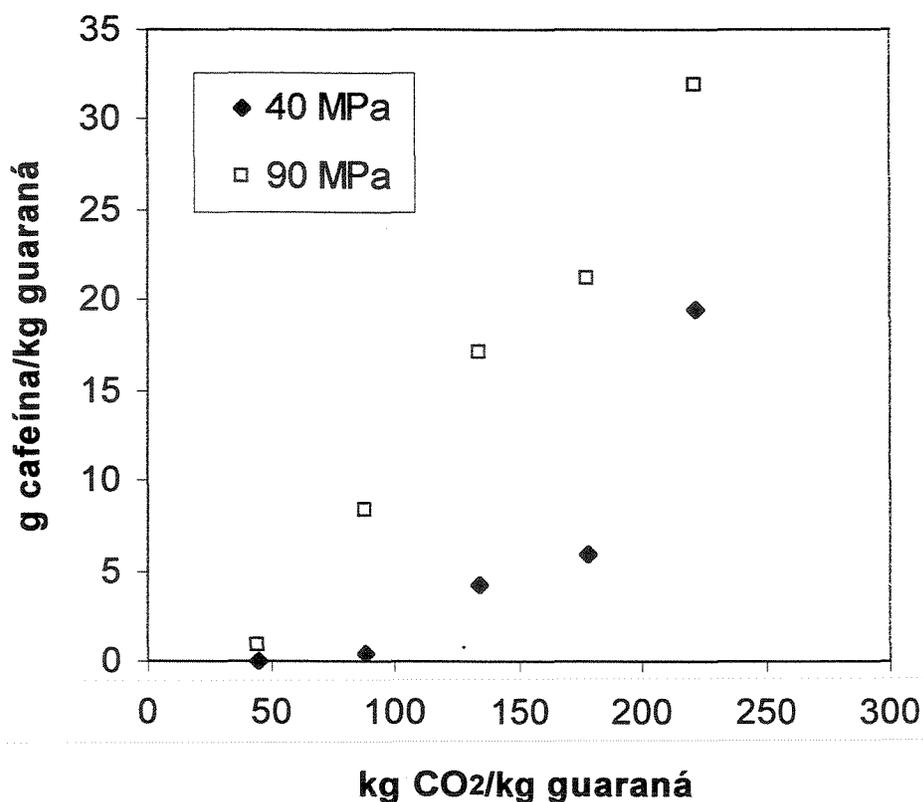


Figura V.20. Extração de cafeína de 50g de sementes de guaraná moídas e úmidas a uma temperatura de 343,2 K e 90 g min⁻¹ de CO₂.

Comparando-se as Figuras V.19 e V.20 para a extração de cafeína de 3g e 50g de sementes de guaraná moídas usando o aparelho de micro-extração e macro-extração, respectivamente, com vazões de 5,7 e 90 g min⁻¹ e 200 kg CO₂/kg guaraná, observa-se que a quantidade extraída com o aparelho de macro-extração é muito menor (11 g cafeína/kg guaraná) que a extraída com o aparelho de micro-extração (45 g cafeína/kg guaraná). Isto se deve provavelmente à diferença na vazão utilizada em cada experimento. No aparelho de macro-extração foi usada uma maior vazão e o solvente provavelmente passou por caminhos preferenciais 'by pass' por entre as sementes.

O uso de altas pressões melhora o rendimento da extração de cafeína de sementes de guaraná, pois modifica o parâmetro de solubilidade (Tabela V.2). Hildebrant e Scott (1950) propuseram uma correlação que relaciona o parâmetro de solubilidade com a pressão, baseada na combinação da equação de estado de van der Waals e os dados de solubilidade existentes. Esta equação foi modificada por Giddings (1968) assumindo uma equivalência de

gases e líquidos numa densidade conhecida. Desta suposição surge uma equação que descreve o parâmetro de solubilidade do solvente do estado supercrítico em função da pressão crítica e da densidade reduzida. Portanto, se se sabe o valor do parâmetro de solubilidade do soluto (que neste caso é a cafeína, e apresenta-se uma constante de $13 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$), podemos também encontrar o parâmetro de solubilidade do dióxido carbono supercrítico. Através de cálculos notamos que o aumento da pressão causa também um aumento da solubilidade. Por exemplo, a 40°C e 10 MPa obtem-se uma densidade reduzida de $1,307$ e um parâmetro de solubilidade de $5,25 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$. Se aumentarmos a pressão para 30 MPa à mesma temperatura obtemos uma densidade reduzida de $1,945$ e um parâmetro de solubilidade do dióxido de carbono de $7,81 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$. Portanto para conseguir uma extração eficiente precisamos aumentar o parâmetro de solubilidade até um valor máximo que se aproxime ao parâmetro de solubilidade da cafeína ($13 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$). Se aumentarmos a pressão até 70 MPa obteremos uma densidade reduzida de $2,233$ e um parâmetro de solubilidade igual a $8,97 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$. Se atingirmos 100 MPa à mesma temperatura obtemos uma densidade reduzida igual a $2,355$ e um parâmetro de solubilidade de $9,46 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$, que pode ser melhor visualizado na Tabela V.2.

Tabela V.2. Valores da densidade reduzida (ρ_r) e parâmetro de solubilidade (δ) para o CO_2 supercrítico a $313,2 \text{ K}$ e diferentes pressões.

Pressão (MPa)	ρ_r	$\delta \text{ (cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}\text{)}$
10	1,307	5,25
30	1,945	7,81
50	2,119	8,51
70	2,233	8,97
100	2,355	9,46

Na Figura V.21 mostra-se o efeito da pressão a uma temperatura constante de $343,2 \text{ K}$ e uma vazão de $5,7 \text{ g min}^{-1}$, usando $864 \text{ kg CO}_2/\text{kg}$ folhas de chá mate. Foram obtidos rendimentos de $0,08$; $3,24$ e $6,85 \text{ g cafeína/kg}$ folhas de chá mate a 10 , 20 e 40 MPa , respectivamente.

Na Figura V.21 mostra-se o efeito da pressão a uma temperatura constante de 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min⁻¹, usando 864 kg CO₂/kg folhas de chá mate. Foram obtidos rendimentos de 0,08; 3,24 e 6,85 g cafeína/kg folhas de chá mate a 10, 20 e 40 MPa, respectivamente.

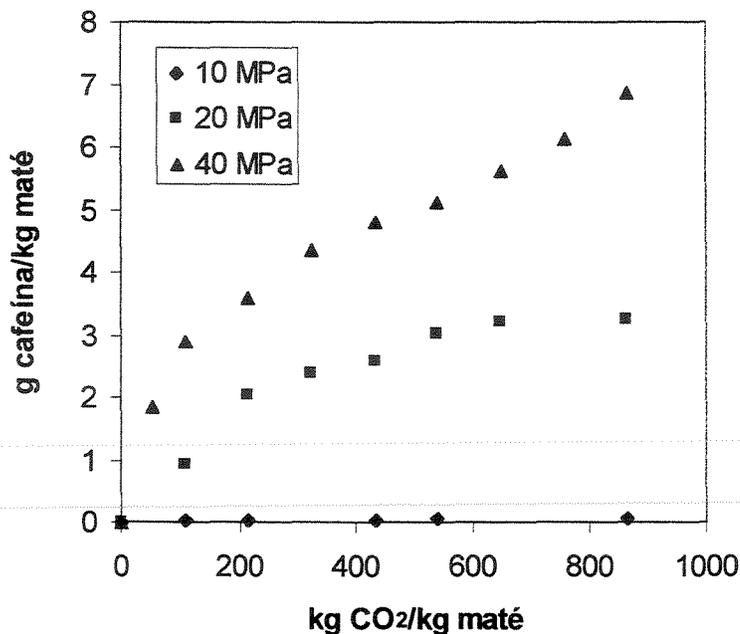


Figura V.21. Extração de cafeína de 2g de folhas de chá mate moídas e úmidas a uma temperatura de 343,2 K e 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

Na extração de teobromina das amêndoas de cacau foram obtidos rendimentos de 1,48 e 2,65 g teobromina/kg amêndoas de cacau a 20 e 40 MPa, respectivamente, com o uso de 396 kg CO₂/kg amêndoas de cacau (Figura V.22).

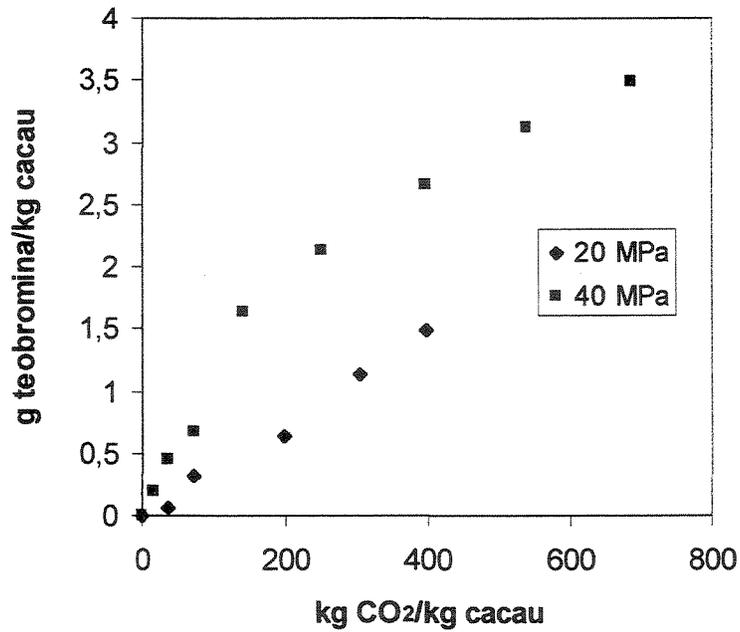


Figura V.22. Extração de teobromina de 3g de amêndoas de cacau a uma temperatura de 343,2 K e 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

A altas pressões ,40 e 90 MPa, 313,2 K e 30 g min⁻¹ de CO₂, foi possível extrair 0,044 e 0,092 g teobromina/kg cacau, usando 66,7 kg CO₂/kg cacau, respectivamente. O uso de 333,3 kg CO₂/kg cacau a pressões de 40 e 90 MPa, permitiu a extração de 0,256 e 0,449 g teobromina/kg cacau, respectivamente (Figura V.23).

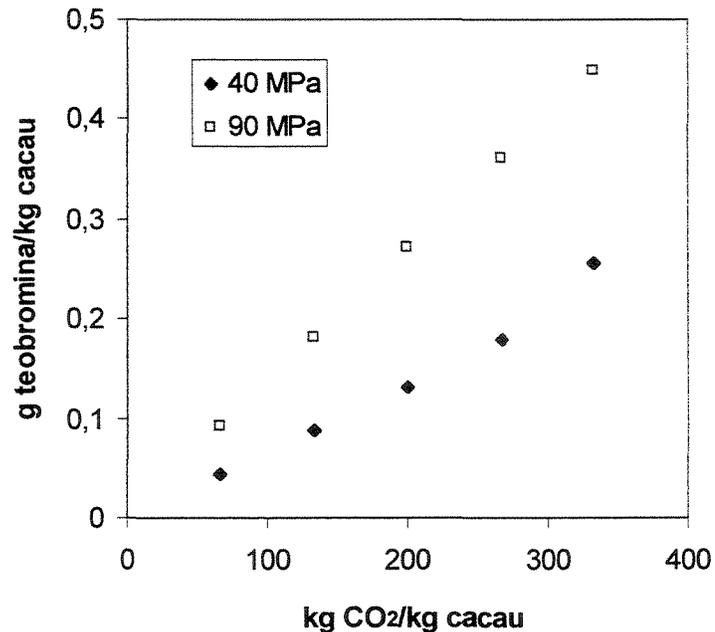


Figura V.23. Extração de teobromina de 30g de amêndoa de cacau a uma temperatura de 313,2 K e 30 g min⁻¹ de CO₂.

A Figura V.24 mostra o rendimento (g manteiga de cacau extraído/g manteiga inicial) do fracionamento da manteiga de cacau usando dióxido de carbono supercrítico a 323,2 K e duas pressões de 15,2 e 24,8 MPa. Observa-se que com a mesma quantidade de solvente (2,7 kg de dióxido de carbono), o aumento da pressão causa um aumento no rendimento de 4,5 para 13%, ou seja, três vezes maior. Ao extrair a manteiga de cacau com CO₂ supercrítico na temperatura de 313,2 K e pressões de 15 e 25 MPa, Li e Hartland (1992) também observaram um efeito similar da pressão no rendimento da extração, atribuído principalmente pelo aumento da densidade conforme mostrado para a extração de cafeína.

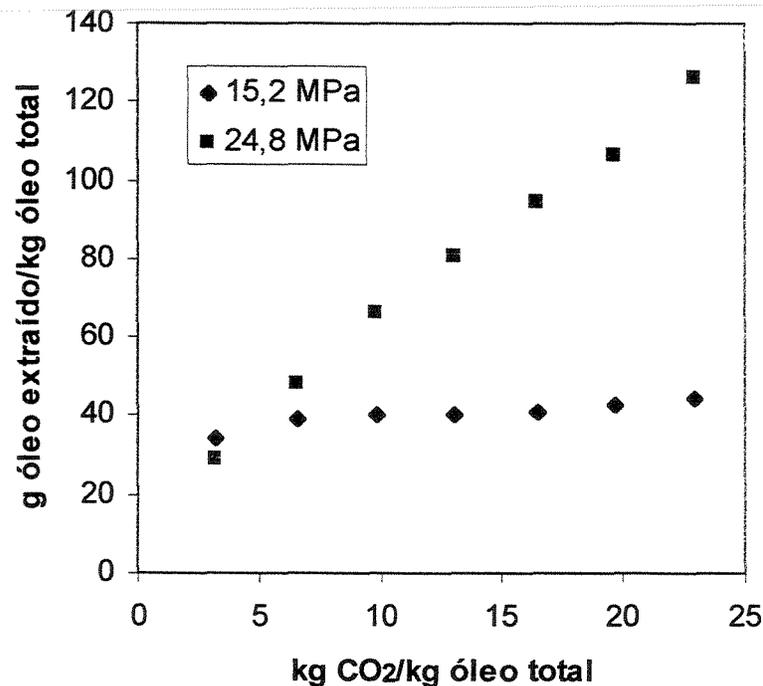
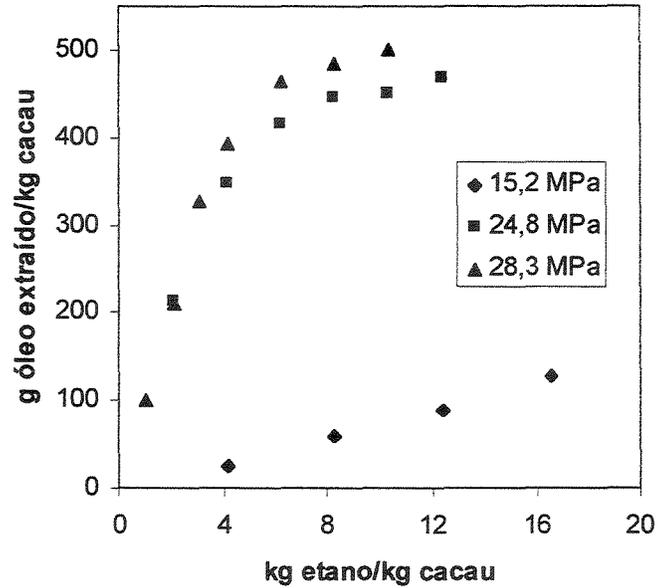


Figura V.24. Rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau a 323,2 K e duas pressões com CO₂ supercrítico. Total: 1000 g óleo extraído/kg óleo inicial.

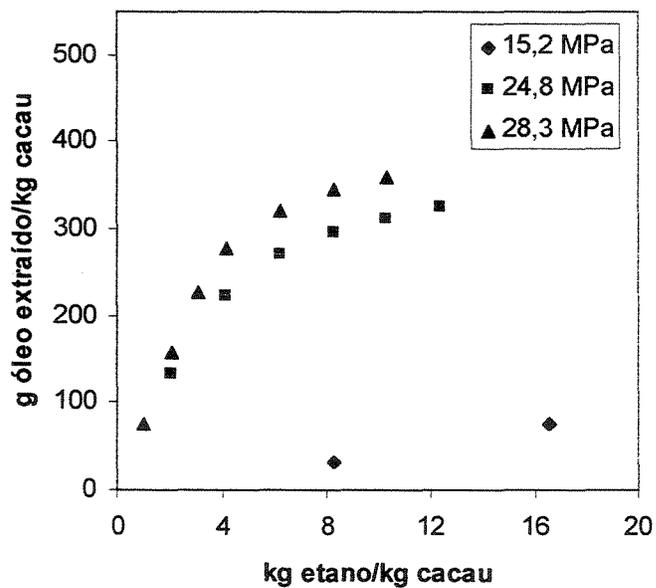
Os rendimentos das extrações da manteiga de cacau obtidas usando etano supercrítico a 323,2 e 343,2 K e pressões de 15,2, 24,8 e 28,3 MPa são mostrados na

Figura V.25. Usando 0,31 kg de etano, rendimentos de manteiga de cacau de 15, 90 e 99% foram obtidos a 323,2 K e pressões de 15,2, 24,8 e 28,3 MPa, respectivamente. A 343,2 K e para a mesma quantidade de solvente, os rendimentos da extração foram 9, 62 e 72% a 15,2, 24,8 e 28,3 MPa, respectivamente. Um aumento na pressão resultou num aumento no rendimento da extração como esperado devido ao aumento da densidade do solvente, ocasionando um aumento no poder de solubilização (McHugh e Krukonis, 1994). O aumento, porém foi menor na segunda faixa de pressão (de 24,8 a 28,3 MPa) devido ao aumento menor da densidade do solvente comparado ao encontrado na faixa de pressão de 15,2 a 24,8 MPa. O incremento de densidade observado com o aumento da pressão de 15,2 a 24,8 MPa na temperatura constante de 343,2 K foi de 321,96 para 371,85 kg/m³, respectivamente (uma diferença de 50 kg/m³) enquanto que na faixa de 24,8 a 28,3 MPa na mesma temperatura foi de 371,85 para 386,17 kg/m³, respectivamente (uma diferença de 14,3 kg/m³).

O aumento no rendimento de material extraído com o aumento da pressão foi também mostrado na literatura por Li e Hartland (1996) ao utilizar o sistema modelo manteiga de cacau/CO₂ supercrítico a pressões de 15-30 MPa e temperaturas de 313,2 e 333,2 K. Este comportamento foi também observado para a extração de outros óleos e gorduras vegetais a partir de sementes oleaginosas (Sovová et al., 1996; Temelli, 1992; Friedrich et al., 1984; Fiedrich et al., 1982). As curvas de extração, Figura V.25, obtidas para as temperaturas de 323,2 e 343,2 K mostram que a solubilidade (caracterizada pela inclinação da curva) aumenta com o aumento da pressão.



(A)



(B)

Figura V.25. Curvas de extração da manteiga de cacau a temperaturas de: (A) 323,2 K e (B) 343,2 K, e vazão de $0,87 \text{ g min}^{-1}$ com etano supercrítico em base adimensional. Total: 500 g óleo/kg cacau.

As curvas de extração mostram três regiões distintas em concordância com as conclusões apresentadas por Hedrick et al. (1992). Estas regiões estão relacionadas com o grau de ruptura dos tecidos nas amêndoas que armazenam os óleos e as gorduras. A quebra

desses tecidos e de suas estruturas através do pré-tratamento libera o óleo, formando os denominados óleos livres que ficam expostos ao fluxo de solvente. Quanto menor o tamanho da partícula ou seja o maior grau de ruptura dos tecidos, maior será a região de solubilidade e menor a região controlada pela difusão. A extração deste óleo livre é predominante no início da extração e é controlado diretamente pela solubilidade termodinâmica da manteiga no fluido supercrítico nas condições de extração, desde que a vazão não seja muito alta para que não ocorra limitações na transferência de massa ou arraste do soluto. A região intermediária é consequência do esgotamento do óleo livre em algumas seções do leito (Sovová, 1994). Esgotado o óleo livre, a difusão do óleo armazenado dentro das estruturas celulares passa a controlar o processo, representando a terceira etapa da curva de extração.

Em todos os casos a pressão exerceu um efeito positivo no rendimento da extração de metilxantinas de produtos naturais. À medida que a pressão aumenta o decréscimo da densidade do solvente é reduzida (Modell e Reid, 1983) e a pressão de vapor do soluto passa a exercer o efeito predominante nas pressões elevadas (Fattori et al., 1988).

V.2.3. EFEITO DA VAZÃO

As Figuras V.26 e V.27 mostram o efeito da vazão na extração de cafeína das sementes de guaraná para a mesma quantidade inicial de material (5g) e pressão de 40 MPa a 313,2 e 343,2 K. A Figura V.26 mostra as curvas de extração obtidas a 313,2 K, 40 MPa em duas vazões diferentes. Em 120 minutos (correspondente ao uso de 144,3 e 223,9 kg CO₂/kg guaraná para vazões de 5,7 e 9,4 g min⁻¹, respectivamente) as quantidades acumuladas de cafeína extraída foram levemente maiores para a vazão maior de CO₂. Esse aumento não foi proporcional, porém, ao aumento da quantidade de dióxido de carbono, particularmente na região controlada pela solubilidade.

Na Figura V.27 as curvas de extração a 343,2 K mostraram, no entanto, um incremento na quantidade de cafeína extraída com aumento da vazão. Na região controlada pela solubilidade termodinâmica (em 30 min, que corresponde ao uso de até 33,6 e 55,9 kg

de CO₂/kg guaraná para as vazões de 5,7 e 9,4 g min⁻¹, respectivamente), este aumento foi quase proporcional ao aumento na quantidade de dióxido de carbono, conforme o esperado nesta região. A taxa de extração de cafeína diminuiu após certo tempo quando a cafeína livre, que se encontrava na superfície da semente moída, foi removida. Para a remoção do restante da cafeína é necessária a difusão do soluto no interior da partícula (cafeína livre), o que aumenta a transferência de massa. De fato, seguindo um período de extração de 60 min, o uso de vazões maiores (9,4 g min⁻¹), o qual representa o uso de 111,9 kg CO₂/kg guaraná, resultou na extração de 36 g cafeína/kg guaraná (74,6% cafeína). Ao usar uma vazão menor (5,7 g min⁻¹), para o mesmo período de tempo que corresponde ao uso de 67,1 kg CO₂/kg guaraná, 56% da cafeína original presente nas sementes foi extraída (27 g cafeína/kg guaraná). Após um período de extração de 150 min foram extraídos 37,8 e 34,2 g cafeína/kg guaraná (78,4 e 71% de cafeína), usando a vazão maior (9,4 g min⁻¹) e menor (5,7 g min⁻¹), respectivamente. Se considerarmos o intervalo de tempo de extração completa, a menos que a extração esteja limitada pela região controlada pela solubilidade, o uso de vazões menores representa uma vantagem, pois resulta na diminuição no consumo de CO₂. Este resultado é similar ao obtido anteriormente por Oazer et al. (1996) para a extração de componentes de óleo essencial de folhas de menta. Uma possível explicação é que uma fração limitada do solvente supercrítico difunde-se na estrutura celular da semente de guaraná dissolvendo a cafeína, enquanto que o excesso de solvente simplesmente flui por caminhos preferenciais por entre as sementes sem entrar em contato (*by-pass*). Este resultado também indica que a resistência à transferência de massa externa não controla o processo já que a velocidade do solvente não exerce efeito na velocidade de transferência. Este fenômeno foi também matematicamente modelado por Serpil et al. (1997). Por esta razão na maioria dos experimentos foi usada a vazão de 5,7 g min⁻¹.

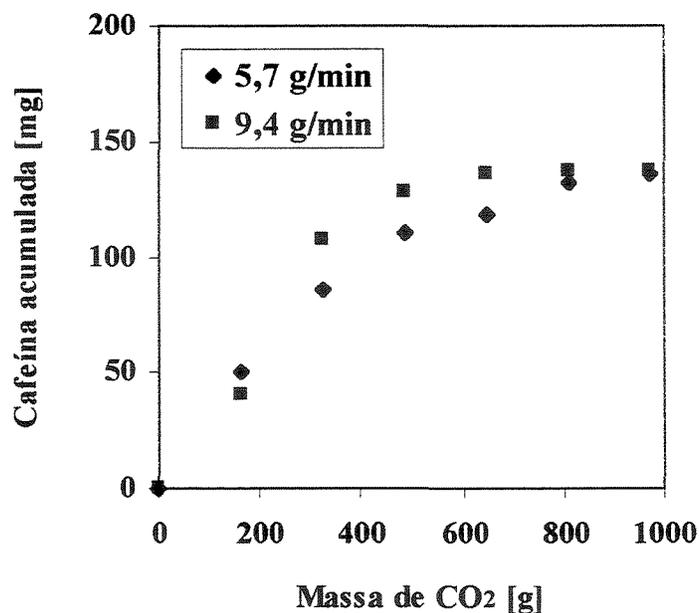


Figura V.26. Extração de cafeína de 5g de sementes de guaraná a uma pressão de 40 MPa e temperatura de 313,2 K.

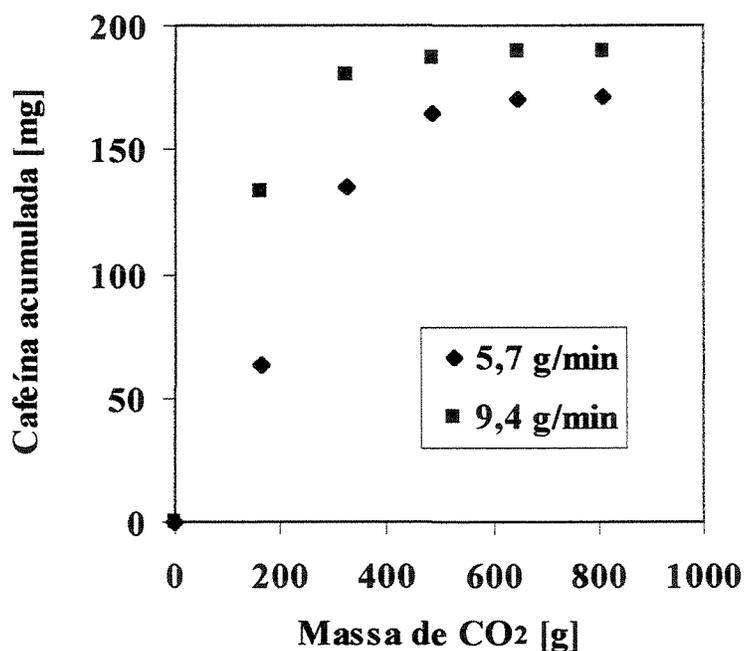


Figura V.27. Extração de cafeína de 5g de sementes de guaraná a uma pressão de 40 MPa e temperatura de 343,2 K.

Na Figura V.28 foi também observado um pequeno efeito da vazão no rendimento de extração com CO₂ supercrítico na extração da cafeína das folhas de chá mate a 40 MPa e 313,2 K. Usando vazões de 30 e 90 g min⁻¹ foram obtidos rendimentos de 0,63 e 0,69 g cafeína/kg mate com 50 kg CO₂/kg mate, respectivamente. Com o aumento de 250

kg CO₂/kg mate foram obtidos rendimentos de 3,44 e 3,69 g cafeína/kg mate para estas mesmas condições, respectivamente.

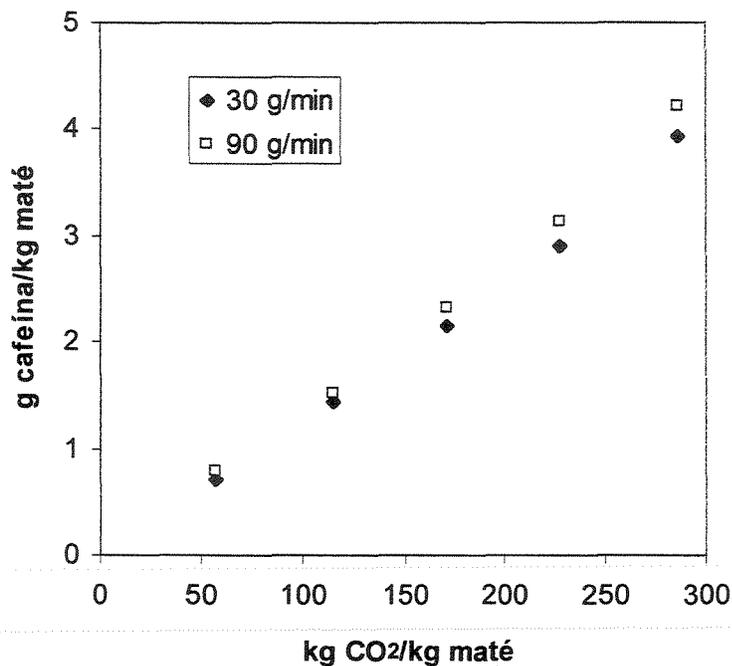


Figura V.28. Extração de cafeína de 40g de folhas de chá mate moídas a uma pressão de 40 MPa e temperatura de 313,2 K.

A Figura V.29 também mostra que o efeito da vazão foi mínima na extração da teobromina das amêndoas de cacau moídas. Neste caso, usando uma pressão de 90 MPa e uma temperatura de 313,2 K, foi possível extrair 0,092 e 0,12 g teobromina/kg cacau com vazões de 30 e 90 g min⁻¹, respectivamente, usando 66,7 kg CO₂/kg cacau. Com o aumento de 333,3 kg CO₂/kg cacau foram obtidos rendimentos de 0,45 e 0,58 g teobromina/kg cacau, com vazões de 30 e 90 g min⁻¹, respectivamente.

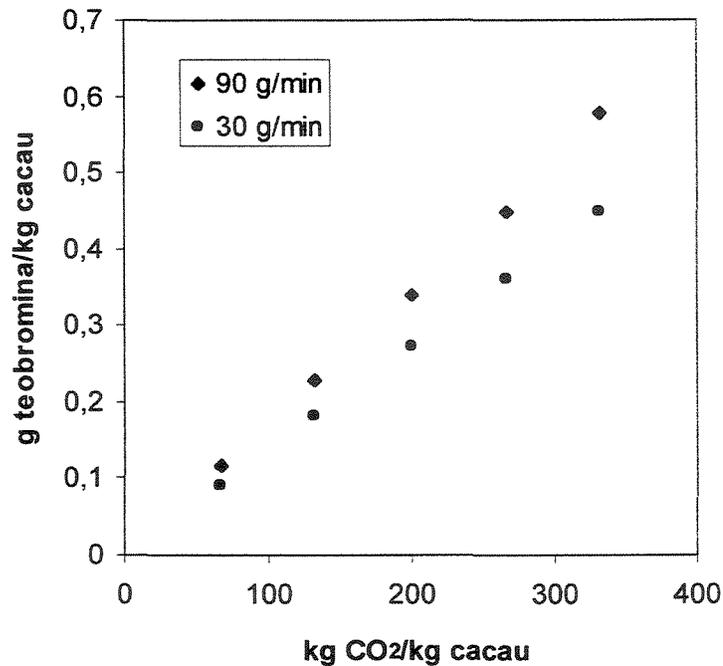


Figura V.29. Extração de teobromina de 30 g de amêndoas de cacau a uma pressão de 90 MPa e temperatura de 313,2 K.

O efeito da vazão pode ser observado nos estudos da extração da cafeína das sementes de guaraná, das folhas de chá mate e a extração de teobromina das amêndoas de cacau.

V.2.4. EFEITO DA NATUREZA DO SOLVENTE

Para ilustrar melhor o efeito da natureza do solvente, mostra-se a extração da manteiga de cacau com dois fluidos supercríticos diferentes, dióxido de carbono e etano. A manteiga de cacau foi o único produto natural extraído pelos dois solventes e por isso este é ainda um campo a ser explorado em estudos futuros.

A Figura V.30 mostra o rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau usando dióxido de carbono e etano supercrítico, a 323,2 K e uma pressão de 15,2 MPa. Observa-se que com a mesma quantidade de solvente (1,5 kg), foram obtidos rendimentos de 4 e 24% com CO₂ e etano, respectivamente, ou seja rendimentos seis vezes maiores com

etano supercrítico como solvente. Este resultado pode ser atribuído às maiores solubilidades dos triglicerídeos em etano, um resultado qualitativamente semelhante ao observado por Socantaype (1996) para o óleo de manteiga. Posteriormente, estes resultados serão analisados considerando-se os efeitos das forças intermoleculares.

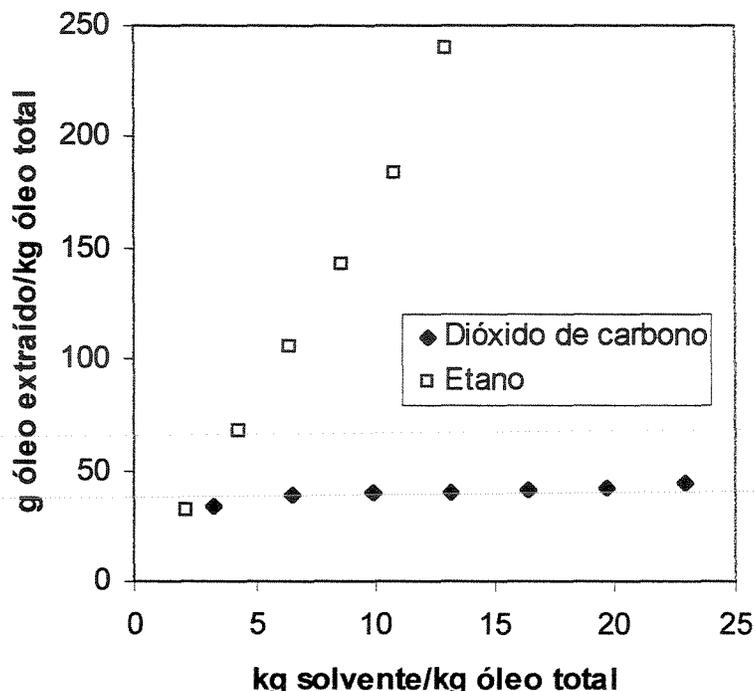


Figura V.30. Rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau a 323,2 K e 15,2 MPa usando CO_2 e etano supercrítico.

A Figura V.31 mostra os rendimentos dos fracionamentos da manteiga de cacau usando dióxido de carbono e etano supercrítico a 323,2 K e 24,8 MPa. Usando aproximadamente 1,2 kg de solvente supercrítico, foram obtidos rendimentos de 100 e 7%, com etano e CO_2 supercrítico, respectivamente, sendo o etano dez vezes mais eficaz que o dióxido de carbono supercrítico. Esta grande variação de solubilidade entre CO_2 e etano supercrítico poderia ser resultante da mudança da densidade ou da natureza do solvente. A curva de extração com etano supercrítico na Figura V.31 mostra claramente duas regiões distintas: a primeira que indica a solubilidade (saturação do solvente com o soluto) e a segunda região indica o esgotamento do soluto no extrator. No caso do CO_2 , os resultados mostram apenas a região de saturação do solvente dominada pela solubilidade. A solubilidade da manteiga de cacau no dióxido de carbono supercrítico encontrada dos

nossos dados experimentais na região dominada pela solubilidade é de aproximadamente 0,5-0,6%, valor similar ao reportado por Bhaskar et al. (1996), quem obteve um valor de 0,59% usando CO₂ supercrítico numa temperatura de 313,2 K e 23,2 MPa. A solubilidade da manteiga de cacau no etano supercrítico foi de 14% a 323,2 K e 24,8 MPa.

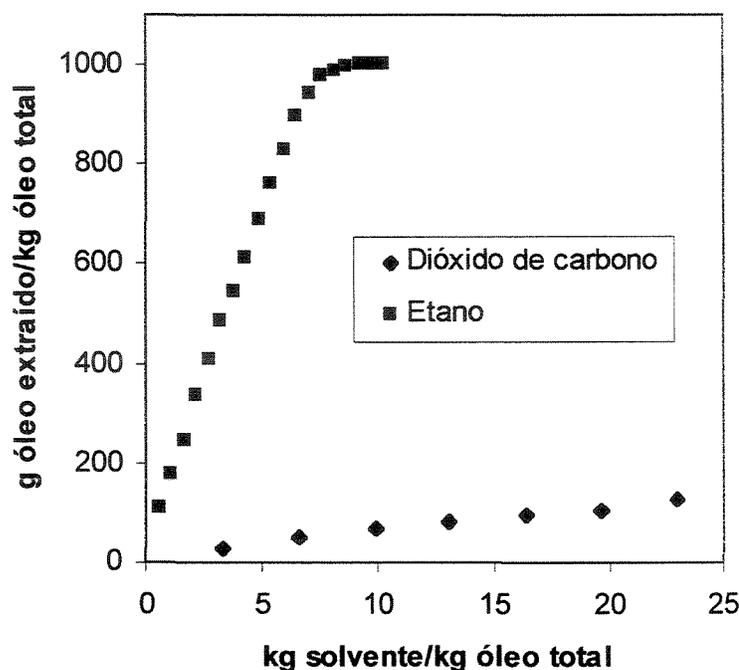


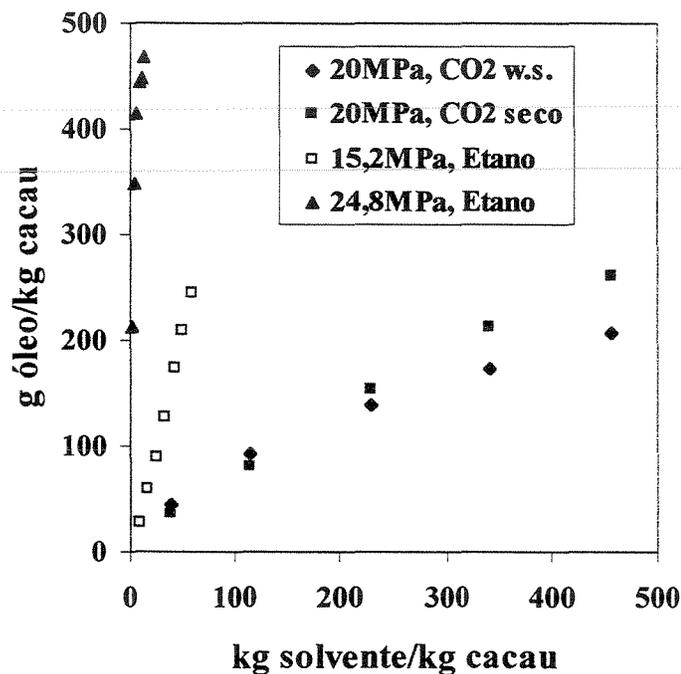
Figura V.31. Rendimento dos fracionamentos da manteiga de cacau a 323,2 K e 24,8 MPa usando fluidos supercríticos.

Para explicar as maiores solubilidades da manteiga de cacau no etano supercrítico com respeito ao dióxido de carbono resolveu-se analisar as forças intermoleculares atuando nos sistemas em questão, conforme apresentado no capítulo II.

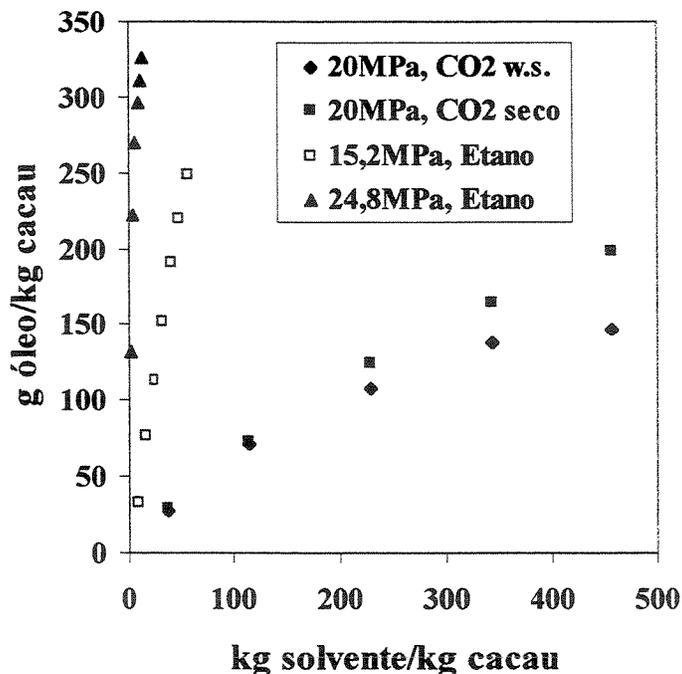
A Figura V.32 mostra as comparações entre as extrações realizadas com CO₂ e etano supercrítico nas temperaturas de 323,2 e 343,2 K, e pressões de 20 MPa (CO₂), 15,2 e 24,8 MPa (etano) e vazão de 5,86 g min⁻¹ (CO₂) e 0,87 g min⁻¹ (etano). Como se pode observar nesta Figura, para a extração de uma certa quantidade de manteiga quando o solvente utilizado é o dióxido de carbono, pressões elevadas assim como maiores quantidades de solvente e tempos de extração se fazem necessários. O etano mostrou-se um solvente mais eficiente para a extração da manteiga de cacau, permitindo portanto utilizar

pressões mais baixas que resultam em um menor gasto energético sem perda de rendimento no processo.

Analisando-se ainda a Figura V.32, observa-se nas inclinações de curvas de extração que a manteiga de cacau é cerca de 10 vezes mais solúvel em etano supercrítico que em CO₂ supercrítico para as mesmas condições de pressão e temperatura. A maior eficiência do etano supercrítico em comparação com CO₂ supercrítico foi também verificado por Mohamed et al. (2000) para o óleo de manteiga do leite, por Mendes et al. (1999) para o β -caroteno e por Singh et al. (1993) para o colesterol.



(A)



(B)

Figura V.32. Curva de extração da manteiga de cacau a 20 MPa (CO₂), 15,2 e 24,8 MPa (etano) e vazão de 5,86 g min⁻¹ (CO₂) e 0,87 g min⁻¹ (etano) em base adimensional a: (A) 323,2 K e, (B) 343,2 K. Total: 538 g óleo/kg cacau (CO₂). Total: 500 g óleo/kg cacau (etano).

A densidade do CO₂ supercrítico é duas vezes maior que a do etano nas mesmas condições de pressão e temperatura. Por exemplo, nas condições de: 323,2 K e 24,8 MPa, obtém-se densidades de 803,8 e 399,9 kg/m³ para o CO₂ e etano, respectivamente. Do mesmo modo, considerando uma massa de 360 g e 60 g de CO₂ e etano, respectivamente e a massa molecular do etano e CO₂ (30 e 44 g mol⁻¹ respectivamente), pode-se afirmar que o número de moles de CO₂ no extrator é maior que do etano. Portanto, a melhor eficiência do etano como solvente para a extração da manteiga de cacau não pode ser atribuída aos efeitos da densidade.

O comportamento de solubilidade de um soluto num fluido supercrítico pode ser também explicado pelo conhecimento das forças intermoleculares. Para explicar a razão da maior solubilidade da manteiga de cacau em etano supercrítico, as forças intermoleculares ou conhecidas também como forças de interação, existentes em cada sistema podem ser analisadas, calculando-se aproximadamente as suas magnitudes. Nas forças de orientação, o

polo positivo de uma molécula atrai o polo negativo da outra e vice-versa. Nas forças de indução um corpo neutro ao ser aproximado de um corpo carregado passa a apresentar um desequilíbrio das cargas elétricas na partícula, sendo dessa forma atraído pelo mesmo. Moléculas grandes podem facilmente deformar a nuvem eletrônica da molécula em torno do núcleo, e como conseqüência apresentar grandes polarizabilidades, como é o caso das moléculas de triglicerídeos. Quando uma molécula apolar é colocada na presença de outra molécula com momento dipolo, esta molécula passa a apresentar um dipolo induzido e sua força de interação dependerá da intensidade do momento dipolo. As forças de dispersão são forças comuns entre moléculas simétricas, apolares e até em moléculas monoatômicas, já que em um momento qualquer a nuvem eletrônica da molécula deixa de ser simétrica em relação ao núcleo.

Analisando os solventes utilizados nos sistemas estudados e de acordo com as suas características eletrônicas e suas forças moleculares, verifica-se que as moléculas de CO₂ não apresentam momento dipolo. Elas apresentam, porém momento quadrupolo de $-4,3 \times 10^{-26} \text{ erg}^{1/2} \text{ cm}^{5/2}$ e polarizabilidade igual a $2,9 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ (Prausnitz et al., 1986; Mendes et al., 1999). As moléculas de etano são moléculas que apresentam apenas um pequeno momento quadrupolo de $-0,65 \times 10^{-26} \text{ erg}^{1/2} \text{ cm}^{5/2}$ e polarizabilidade igual a $4,4 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ (Prausnitz et al., 1986; Mendes et al., 1999). A polarizabilidade do etano é duas vezes maior que a do CO₂.

Na literatura não foram encontrados valores das propriedades para as moléculas de triglicerídeos. Entretanto, algumas características da molécula podem ser avaliadas de acordo com a sua estrutura molecular. As moléculas dos triglicerídeos presentes na manteiga de cacau são moléculas grandes, possuindo nas suas extremidades cadeias carbônicas que apresentam de 16 a 20 átomos de carbono. As configurações espaciais possíveis para esse tipo de moléculas são em forma de garfo ou de cadeira (Neves, 1996). De acordo com Prausnitz et al. (1986), moléculas assimétricas possuem dipolos permanentes devido à distribuição desigual das cargas eletrônicas em torno de um núcleo carregado. A intensidade do dipolo é função do tamanho da molécula e da eletronegatividade dos átomos presentes. Para a molécula de triglicerídeos é esperado que o valor deste dipolo seja muito pequeno,

entretanto devido ao seu grande tamanho pode-se facilmente deformar a nuvem eletrônica em relação ao núcleo da molécula, resultando então uma maior polarizabilidade.

Com base nas definições e nas características das moléculas de CO₂, etano e triglicerídeos que compõem os sistemas estudados manteiga de cacau/fluido supercrítico pode-se estimar as magnitudes relativas das forças de interação entre as moléculas nos sistemas em questão.

Para verificar se as suposições realizadas estão de acordo com a teoria e como não existem valores das propriedades acima listadas para a molécula de triglicerídeos, foi considerando que estas apresentam grandes cadeias carbônicas e que suas propriedades de polarizabilidade e primeiro potencial de ionização são similares às moléculas de hidrocarbonetos. A maior molécula de hidrocarboneto para qual foram encontrados com facilidade os dados necessários foi o heptano, que foi, portanto escolhido para fins ilustrativos e de análises qualitativo, apesar de ser uma molécula menor que a molécula de triglicerídeos. A suposição é que as interações nos sistemas heptano-CO₂ e heptano-etano refletem o que aconteceria nos sistemas triglicerídeo-CO₂ e triglicerídeo-etano, respectivamente. Os valores das propriedades das moléculas são apresentados na Tabela V.3.

Tabela V.3. Algumas propriedades físicas dos compostos em estudo (Xu et al., 1998; CRC, 1989-1990; Prausnitz et al., 1986)

Composto	Estrutura	1°Potencial Ionização x 10^{-18} (J)	Polarizabilidade x 10^{-24} (cm ³)	Momento Dipolo (Debye)	Momento Quadrupolo x 10^{-26} (erg ^{1/2} cm ^{5/2})
Solvente					
CO ₂	CO ₂	2,206	2,91	0,0	-4,30
Etano	C ₂ H ₆	1,843	4,47	0,0	-0,65
Água	H ₂ O	2,020	1,59	1,8	-2,50
Soluto					
n-heptano	nC ₇ H ₁₆	1,586	13,70	0,0	0,00

Para uma possível explicação, examinam-se as diferenças nas forças intermoleculares que prevalecem entre o soluto-solvente nos dois casos. Assumindo o comportamento de moléculas de triglicerídeos (TGs) como o de hidrocarbonetos (considerados de cadeia curta devido à falta de dados na literatura para hidrocarbonetos de cadeia longa), as forças dominantes são as de dispersão são maiores no sistema etano-TGs do que no sistema CO₂-TGs, conforme apresentado na Tabela V.4. Observa-se, nesta Tabela, que as forças dispersivas (London) nos dois sistemas são maiores que as forças de indução.

Tabela V.4. Energias potenciais de interação intermoleculares

Sistema	Forças de interação de orientação (J cm ⁶)	F.i. de indução (J cm ⁸) x 10^{-81}	F.i. dispersiva (J cm ⁶) x 10^{-65}
Heptano-CO ₂	0	-3,80	-5,52
Heptano-etano	0	-0,086	-7,50

Outra forma de avaliar as interações dispersivas é se fazer uma extrapolação da faixa de aplicação do potencial de Lennard-Jones. Este tipo de potencial leva em consideração às

contribuições dispersivas das forças de interação atrativas e as forças repulsivas entre duas moléculas em dois termos distintos resultando em um valor de energia potencial de dispersão entre duas moléculas. Os valores das propriedades ϵ e σ para as interações são apresentados na Tabela V.5. Os resultados dos cálculos do potencial de Lennard-Jones mostram na Figura V.33 que para o par heptano-etano a magnitude do potencial atrativo é maior que no sistema heptano-CO₂. Isso significa que no primeiro as forças de interação dispersivas são mais fortes.

Os resultados aproximados sobre as forças intermoleculares justificam e explica a maior solubilidade dos triglicerídeos em etano supercrítico em comparação com a solubilidade em CO₂ supercrítico. Isto se deve às mais fortes interações do tipo dispersivas.

Tabela V.5. Parâmetros do potencial de Lennard-Jones (Cussler, 1984; Xu et al., 1998)

Par de Moléculas	ϵ/k (K)	σ (Å)
CO ₂ -CO ₂	133,30	2,465
Etano-Etano	175,07	3,502
Heptano-Heptano	186,46	3,288
Heptano-CO ₂	159,88	2,877
Heptano-Etano	180,77	3,395

Mohamed et al. (2000) explicaram a maior solubilidade do colesterol em etano supercrítico que em CO₂ supercrítico como função das interações mais fortes da molécula de etano com a parte apolar da molécula de colesterol constituída por uma cadeia carbônica semelhante ao argumentado neste trabalho. Mendes et al. (1999) relacionou a maior solubilidade de β -caroteno (molécula apolar e simétrica) em etano supercrítico com a maior polarizabilidade do etano ($4,4 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$) em relação ao CO₂ ($2,9 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$), ou seja, devido às forças de caráter dispersivo. As suposições realizadas por estes autores a fim de explicar a maior solubilidade dos compostos estudados em etano e CO₂ estão em concordância com as conclusões deste trabalho.

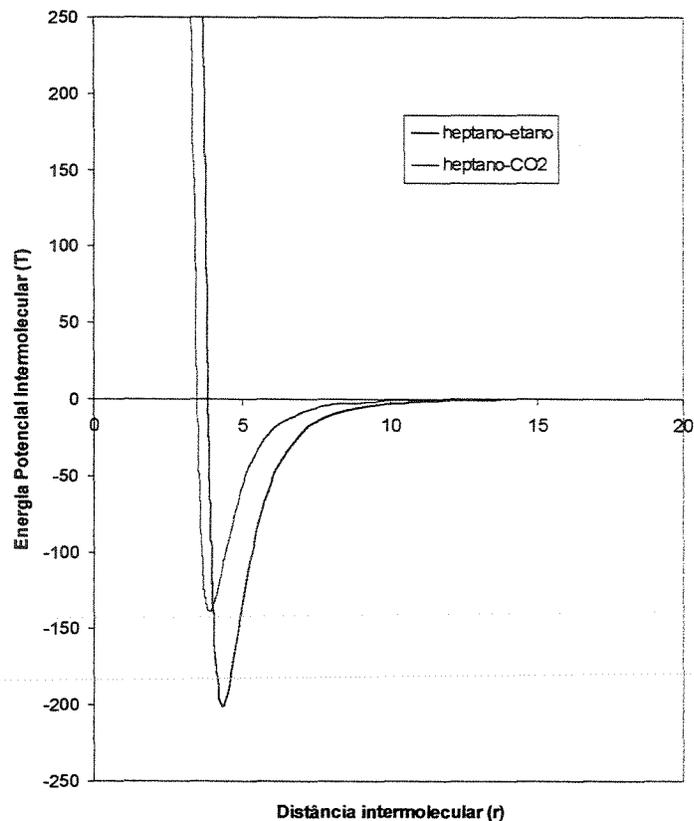


Figura V.33. Potenciais de Lennard-Jones

V.2.4.1. EFEITO DA SATURAÇÃO COM ETANOL

Para analisar o efeito da saturação do CO₂ supercrítico com etanol foram realizados experimentos com amêndoas de cacau para a extração de teobromina.

Nas Figuras V.34-39 apresenta-se o sistema de amêndoas de cacau moídas extraídas com dióxido de carbono saturado com etanol. A Figura V.34 apresenta dados para a extração de teobromina das amêndoas de cacau moídas usando CO₂ seco e CO₂ saturado com 150 mL de etanol (o CO₂ foi passado por um recipiente contendo 150 mL de etanol) a 90 MPa, 30 g min⁻¹ e 343,2 K. Com uma quantidade acumulada de 10 kg de dióxido de

carbono saturado em etanol (333,3 kg CO₂/kg cacau) foi possível a remoção de 5% de teobromina (0,60 g teobromina/kg cacau) enquanto que somente 2,5% de teobromina (0,30 g teobromina/kg cacau) foram extraídas usando dióxido de carbono seco.

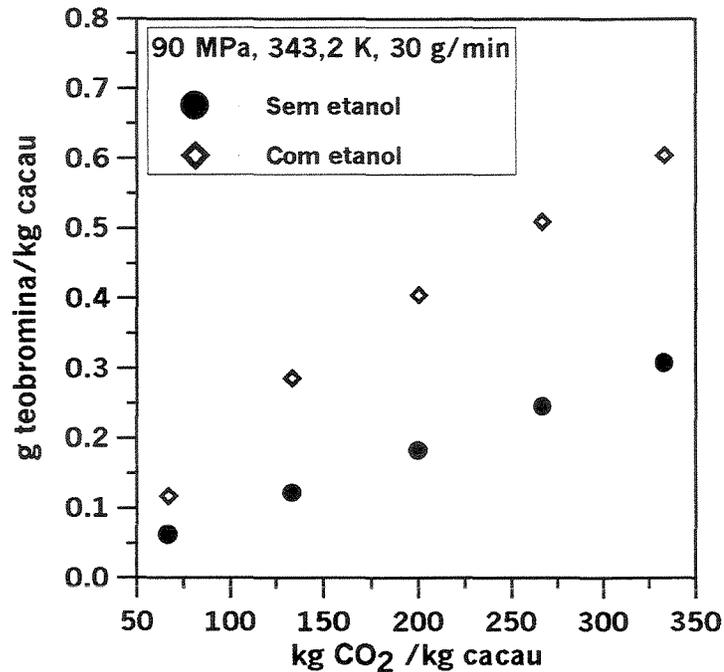


Figura V.34. Extração da teobromina das amêndoas de cacau usando dióxido de carbono seco e saturado com etanol. Total: 12,2 g teobromina/kg cacau.

A Figura V.35 mostra as curvas de extração para uma amostra de 30g de cacau moído a 40 MPa, vazão de 30 g min⁻¹ de CO₂ e temperaturas de 313,2 e 343,2 K. A quantidade de teobromina extraída (2,1 e 2,9% que corresponde a 0,26 e 0,36 g teobromina/kg cacau, respectivamente, usando 333,3 kg CO₂/kg cacau) foi quase igual em ambas as temperaturas de 313,2 e 343,2 K, na mesma pressão, vazão de CO₂ e usando 10 kg de dióxido de carbono saturado em etanol. Usando CO₂ seco nas mesmas temperaturas de 313,2 e 343,2 K foram obtidos somente 1,1 e 2,2 %, respectivamente.

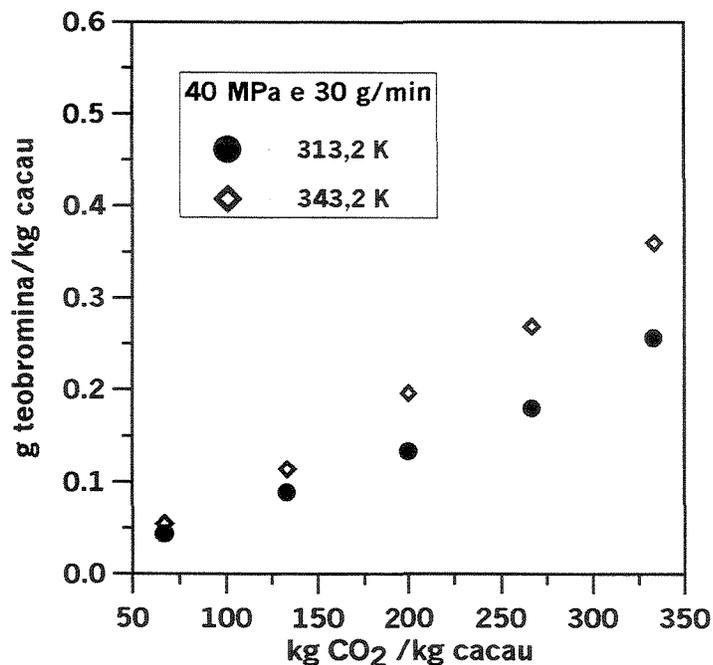


Figura V.35. Extração de teobromina das amêndoas de cacau - efeito da temperatura a 40 MPa e 30 g min⁻¹.

A mesma influência da saturação com etanol com o aumento da temperatura de 313,2 para 343,2 K foi observada na extração a 40 MPa, vazão de 90 g min⁻¹ e usando 10 kg de CO₂ saturado em etanol (2,4 e 3,0% teobromina, que corresponde a 0,30 e 0,36 g teobromina/kg cacau, respectivamente, usando 333,3 kg CO₂/kg cacau), em comparação aos de 1,1 e 1,4% de teobromina obtidos com dióxido de carbono seco. Este efeito positivo da temperatura na extração da teobromina pode ser atribuído à maior quantidade de etanol no CO₂. Este aumento da quantidade de etanol em relação ao CO₂ também foi observado de maneira análoga aumentando-se a temperatura, mantendo a pressão constante.

Na Figura V.36, a quantidade de teobromina extraída a 90 MPa, 30 g min⁻¹, temperaturas de 313,2 e 343,2 K e usando 10 kg de dióxido de carbono saturado em etanol é apresentada. Neste caso, a extração a 90 MPa resultou na remoção de aproximadamente 3,7 e 5,0% de teobromina (que corresponde a 0,45 e 0,60 g teobromina/kg cacau, respectivamente, usando 333,3 kg CO₂/kg cacau) quando o dióxido de carbono foi saturado em etanol enquanto que 1,6 e 2,5% de teobromina foram obtidos ao usar dióxido de carbono seco a 313,2 e 343,2 K, respectivamente.

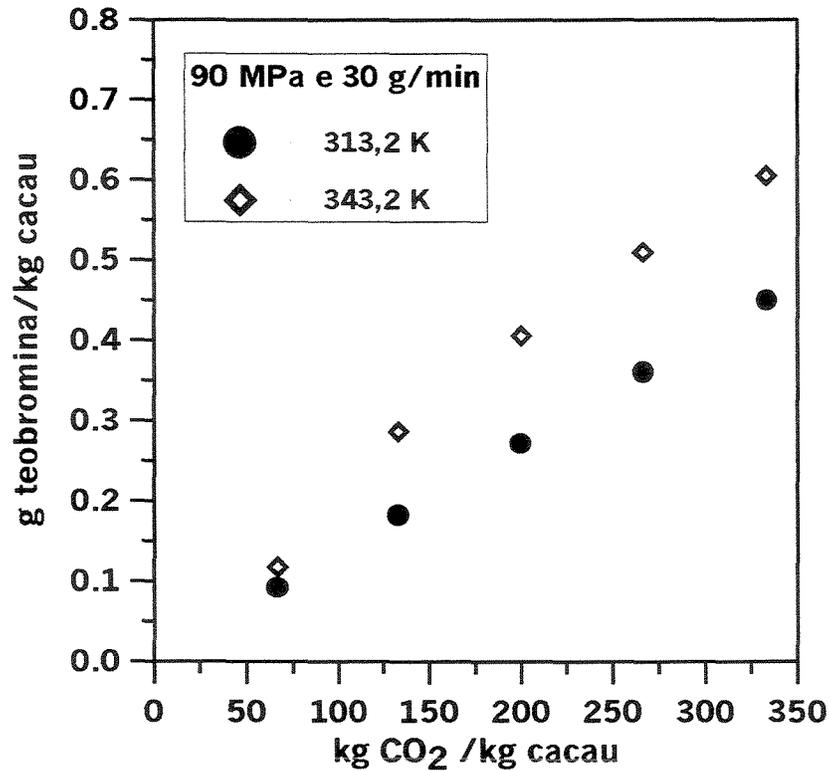


Figura V.36. Extração da teobromina das amêndoas de cacau – efeito da temperatura a 90 MPa e 30 g min⁻¹

Um comportamento similar foi observado na pressão de extração de 90 MPa e com 90 g min⁻¹ de vazão de CO₂ a temperaturas de 313,2 e 343,2 K, em que 4,7 e 5,3% da teobromina, (que corresponde a 0,58 e 0,65 g teobromina/kg cacau, respectivamente, usando 333,3 kg CO₂/kg cacau), foram removidos após 10 kg de dióxido de carbono saturado com etanol tem passado pelo extrator, enquanto que 2,2 e 2,5% da teobromina foram extraídos com 10 kg de dióxido de carbono seco, nas mesmas condições de temperatura, pressão e vazão.

As Figuras V.37 e V.38 mostram a extração da teobromina das amêndoas de cacau moídas, com uma vazão de 30 g min⁻¹ de CO₂ e temperaturas de 313,2 e 343,2 K. Na Figura V.37, a extração a 40 e 90 MPa resultou na remoção de aproximadamente 2,1 e 3,7% teobromina das amêndoas de cacau moídas usando 10 kg de CO₂, 313,2 K e uma vazão de 30 g min⁻¹, respectivamente (que corresponde a 0,26 e 0,45 g teobromina/kg cacau, respectivamente, usando 333,3 kg CO₂/kg cacau). Um comportamento similar foi observado na mesma vazão de CO₂ (30 g min⁻¹) e 343,2 K para pressões de extração de 40 e 90 MPa

(Figura V.38), em que 2,9 e 5,0% teobromina (que corresponde a 0,36 e 0,60 g teobromina/kg cacau, respectivamente, usando 333,3 kg CO₂/kg cacau) foram removidas numa extração contínua com 10 kg de CO₂.

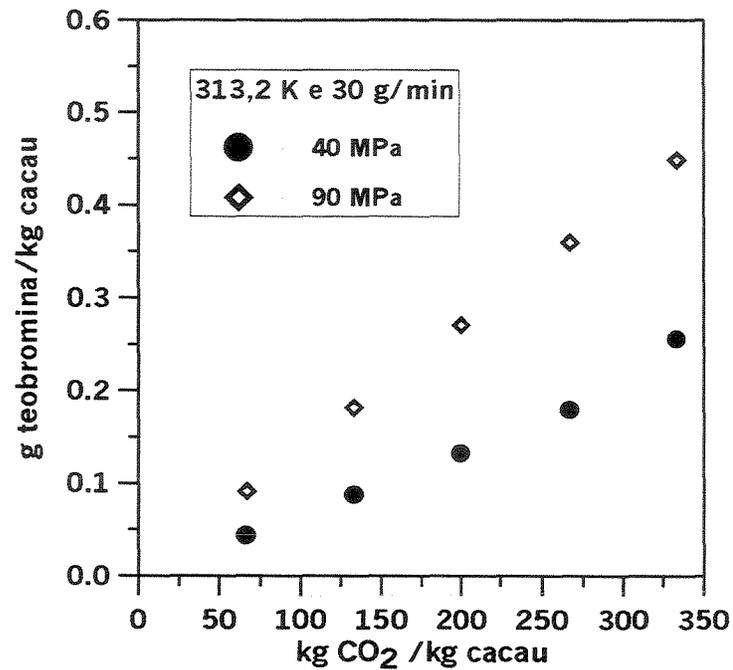


Figura V.37. Extração da teobromina das amêndoas de cacau – efeito da pressão a 313,2 K e 30 g min⁻¹

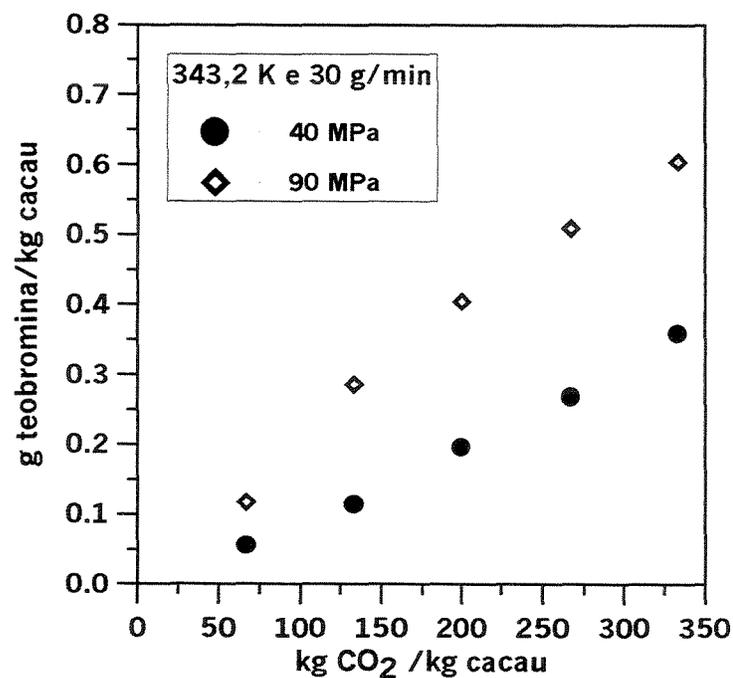


Figura V.38. Extração da teobromina das amêndoas de cacau – efeito da pressão a 343,2 K e 30 g min⁻¹

A Figura V.39 mostra o efeito de duas vazões: 30 e 90 g min⁻¹ de CO₂ supercrítico saturado com etanol na extração da teobromina das amêndoas de cacau. Em todas as curvas de extração, as quantidades acumuladas de teobromina extraída foram levemente maiores para 90 g min⁻¹ de vazão de CO₂ (5,3 % teobromina ou 0,65 g teobromina/kg cacau) que para 30 g min⁻¹ (5,0 % teobromina ou 0,60 g teobromina/kg cacau) usando 10 kg de CO₂ saturado em etanol. Ao considerar o intervalo completo de extração, nenhuma melhora visível no uso de diferentes vazões foi observado.

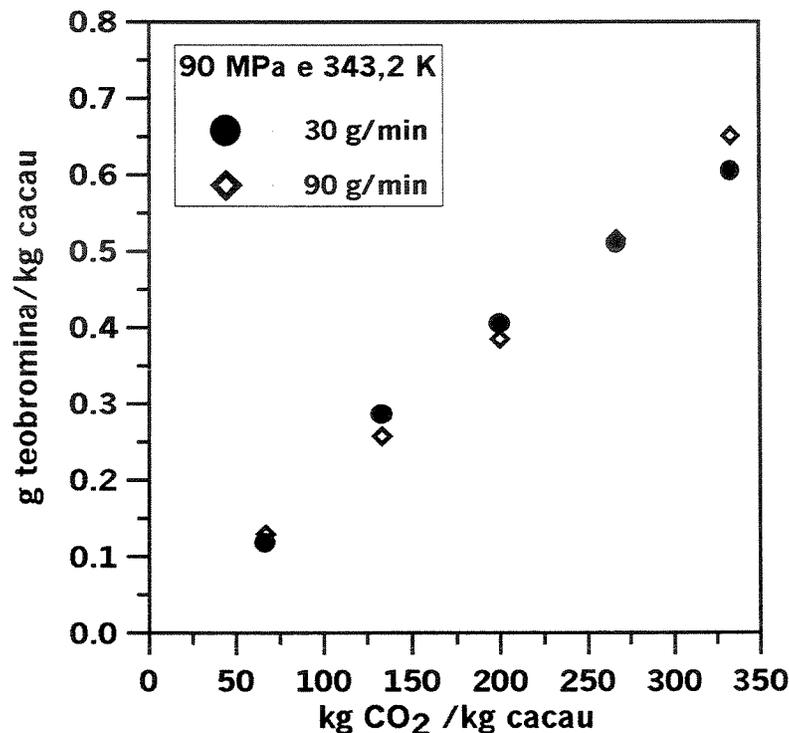


Figura V.39. Extração da teobromina das amêndoas de cacau moídas – Efeito das vazões a 90 MPa e 343,2 K

Conforme mostrado na Figura V.34 pode-se observar que o rendimento da extração da teobromina de amêndoas de cacau com CO₂ supercrítico seco foi extremamente baixo nas condições investigadas, obtendo-se uma melhora com o uso do CO₂ supercrítico saturado com etanol.

V.2.4.2. EFEITO DO CO-SOLVENTE

As Figuras V.42, V.43 e V.44 mostram a influência do etanol como co-solvente durante o processo de extração de xantinas de plantas naturais a 20 MPa, 343,2 K e 5,7 g min⁻¹ de CO₂. Para todas as extrações, a quantidade de cafeína ou teobromina extraída aumenta com o aumento da quantidade de etanol, sendo que este efeito é mais pronunciado a altas concentrações de etanol (CO₂ saturado com água <5% etanol <10% etanol).

As solubilidades em processos de extração supercrítica com CO₂ são relativamente baixas, sendo necessário o uso de quantidades grandes de solvente, aumentando com isso o custo operacional do processo. A adição de co-solvente proporciona um aumento de solubilidade devido a um aumento da interação do fluido com o soluto e aumento da densidade, ou seja, do poder de solvatação. Segundo Zhong (1997), o fator predominante depende da natureza química dos componentes bem como das condições experimentais de temperatura, pressão, e concentração.

Muitos trabalhos na literatura apontam a utilização de diversos co-solventes polares como isopropanol (Gani et al., 1997) e etanol (Rónyal et al., 1998), os quais modificam a polaridade do CO₂ e as propriedades do solvente supercrítico, melhorando o poder de extração de solutos polares. Zhong et al. (1997) estudaram o efeito do co-solvente etanol na solubilidade do ácido esteárico em CO₂SC. Os resultados indicam um aumento de solubilidade do ácido esteárico com o aumento da percentagem de etanol à mesma pressão. Segundo os autores este resultado se deve à formação de pontes de hidrogênio entre a hidroxila do etanol e o oxigênio da carboxila. Outro efeito importante é o aumento da densidade do fluido supercrítico com a adição do co-solvente, melhorando o poder de solvatação do FSC. Schaeffer et al. (1998) estudaram a variação da solubilidade do alcalóide monocatalina com a adição de etanol ao CO₂SC. Os resultados encontrados pelos autores indicam que a adição de 5% e 10% de etanol (fração molar) proporcionou um aumento da solubilidade de 6 e 12 vezes (para as varias pressões utilizadas), quando comparada com a solubilidade no CO₂SC puro. Os autores também relataram um aumento da solubilidade do soluto com o uso de etanol como co-solvente devido à modificação da polaridade do fluido

supercrítico (Ekart, 1993; Clifford, 1998). A Tabela V.6 apresenta as condições críticas de temperatura e pressão para diferentes frações molares de etanol.

Tabela V.6. Pressão crítica (P_c) e temperatura crítica (T_c) da mistura de CO_2 /etanol a diferentes concentrações de etanol.

Fração molar de etanol (%)	P_c mistura (MPa)	T_c mistura (K)
0,95	7,65	305,8
2,14	7,83	308,4
2,78	8,07	310,3
3,66	8,25	312,1
4,64	8,61	315,2
6,38	9,11	320,1
7,32	9,74	325,1

As possíveis ligações entre as moléculas de cafeína ou teobromina com solventes como o etanol, o CO_2 e a água são mostradas nas Figuras V.40 e V.41. Observa-se que ocorre uma maior interação do alcalóide com moléculas de etanol e água do que com somente dióxido de carbono. Isto poderia explicar a eficiência da água ou etanol como co-solventes na extração de cafeína/teobromina de produtos naturais.

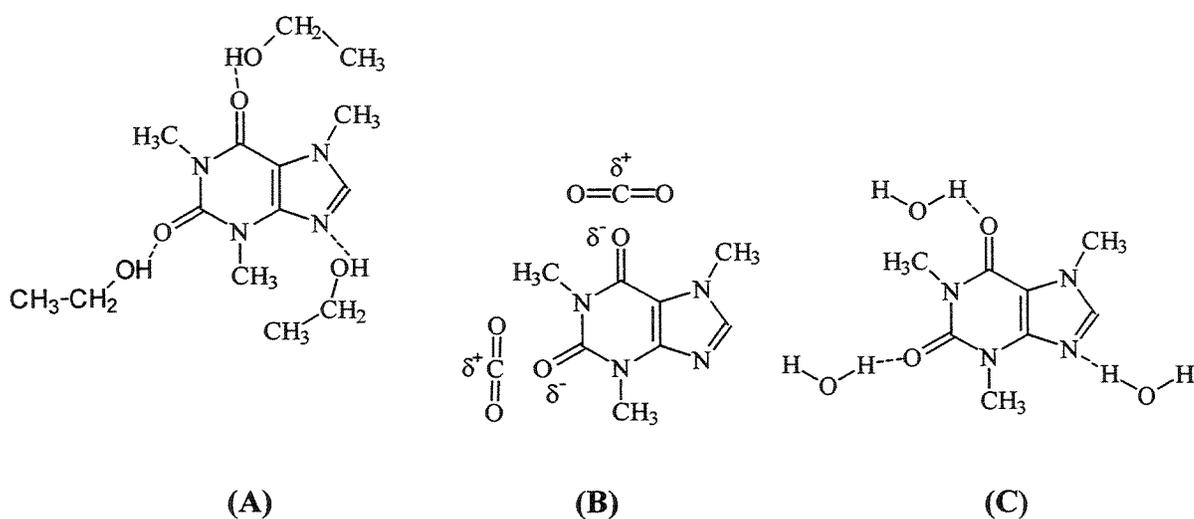


Figura V.40. Ligações da cafeína com: (A) etanol, (B) CO_2 e (C) água

período de 145 minutos, as quantidades de teobromina extraídas foram 7; 38; 74 e 82,56% com CO₂ seco e CO₂ saturado com água, 5 e 10% de etanol, respectivamente. O aumento da concentração de etanol no CO₂ acelera a remoção das xantinas consideravelmente. Tais comportamentos são similares aos apresentados por Sebald et al. (1996), que trabalharam a uma temperatura de 363,2 K, usando amostras inteiras e úmidas, com água e etanol como co-solventes a diferentes concentrações (5,2; 6,84 e 9,52%), extraíndo 70, 89 e 97% teobromina (%w/w), respectivamente.

Para a maioria dos sistemas, o aumento no poder de solvatação se deve ao aumento na densidade na mistura dos solventes. Este incremento na solubilidade é comparável ao incremento obtido com o solvente puro após manipulações de temperatura e pressão. No caso da extração da teobromina das amêndoas moídas de cacau, por exemplo, a pressão foi reduzida de 40 a 20 MPa e o tempo de 300 a 145 min para extrair 13 g teobromina com w.s. CO₂ e 5% etanol. Ao usar 10% etanol a uma pressão de 20 MPa e temperatura de 343,2 K, somente 45 min foram necessários para extrair a mesma quantidade de teobromina (Ver Figura V.44)

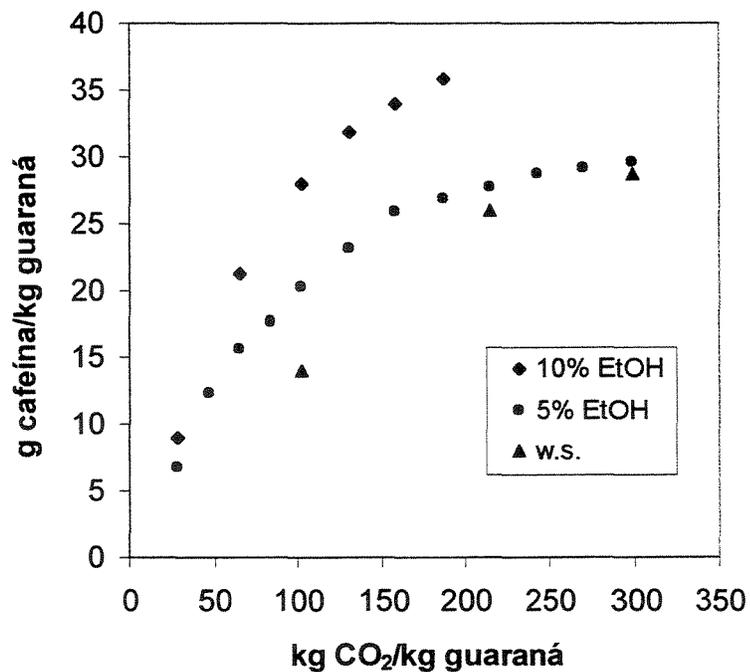


Figura V.42. Extração de cafeína de sementes de guaraná a 20 MPa, 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

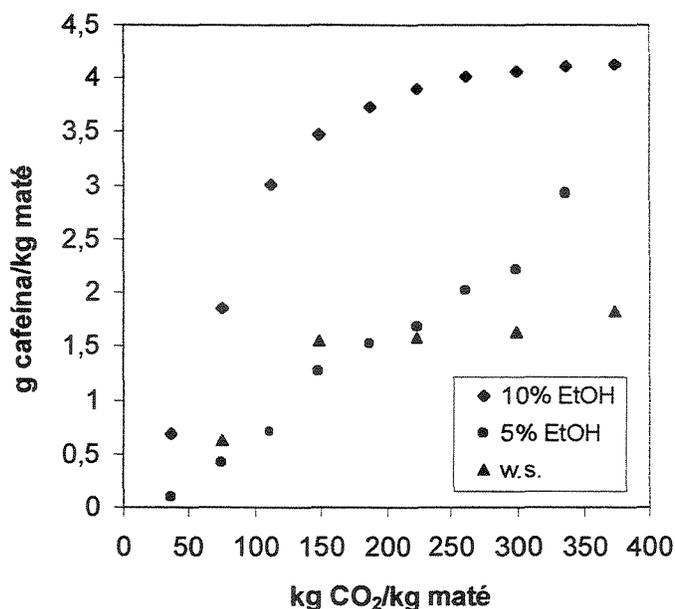


Figura V.43. Extração de cafeína de folhas de mate a 20 MPa, 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

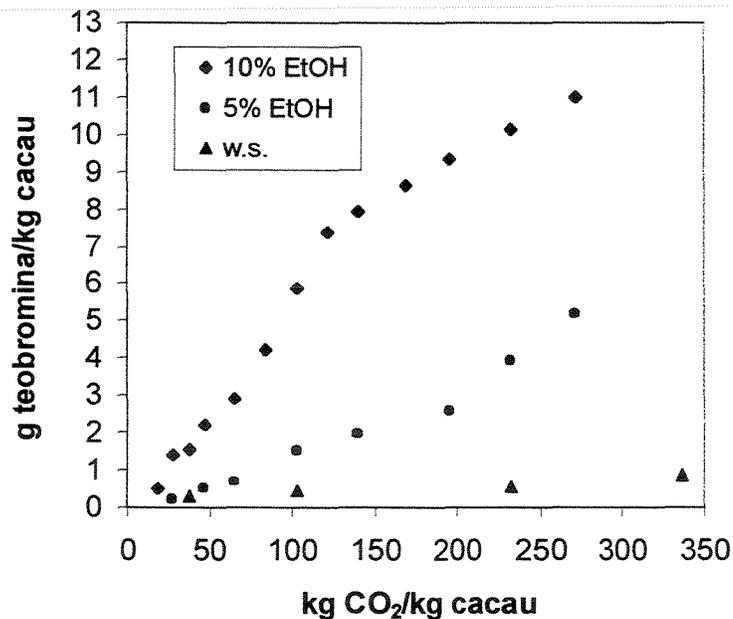


Figura V.44. Extração de teobromina de amêndoas de cacau a 20 MPa, 343,2 K e uma vazão de 5,7 g min⁻¹ de CO₂.

Este efeito co-solvente foi maior que o efeito de saturação com etanol usando CO₂ supercrítico nas mesmas condições utilizadas para a extração da teobromina das amêndoas de cacau moídas, pois a concentração de etanol utilizado na saturação foi menor que 5%.

V.2.5. SELETIVIDADE

Para explicar a seletividade do solvente foram utilizadas a extração de metilxantinas e gordura de cacau a partir das amêndoas de cacau moídas, e a extração de cafeína, teofilina e teobromina de chá mate moído.

Nas Figuras V.45 e V.46 mostram-se as curvas de extração obtidas para a manteiga de cacau, teobromina e cafeína com a extração realizada usando 3g de amostra de amêndoas de cacau com $5,7 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2 supercrítico seco e saturado com água a 343,2 K e pressões de 20 e 40 MPa, respectivamente.

Nestas figuras observam-se a recuperação da manteiga de cacau, teobromina e cafeína de 27 e 48%, 13,9 e 29,9% e 37,4 e 66,4% nas extrações a temperatura constante de 343,2 K e usando 418 kg CO_2/kg cacau a 20 e 40 MPa, respectivamente. Os resultados apontam claramente a facilidade relativa da extração da manteiga de cacau e cafeína das amêndoas de cacau em comparação à teobromina.

As solubilidades experimentais do sistema binário manteiga de cacau em CO_2 seco a 323,2 K e pressões de 15 e 24,8 MPa foram determinadas por Saldaña et al. (2002) que reportou valores de 0,4 e 0,6 wt% os quais foram maiores que as solubilidades de 0,06 e 0,17 wt% obtidos das inclinações de partes lineares das curvas de extração usando amêndoas de cacau moídas a 343,2 K e pressões de 20 e 40 MPa, respectivamente (Figura V.45). Os menores valores reportados aqui são provavelmente devido à presença de outros componentes da matriz que estariam formando complexos, dificultando a solubilização e extração.

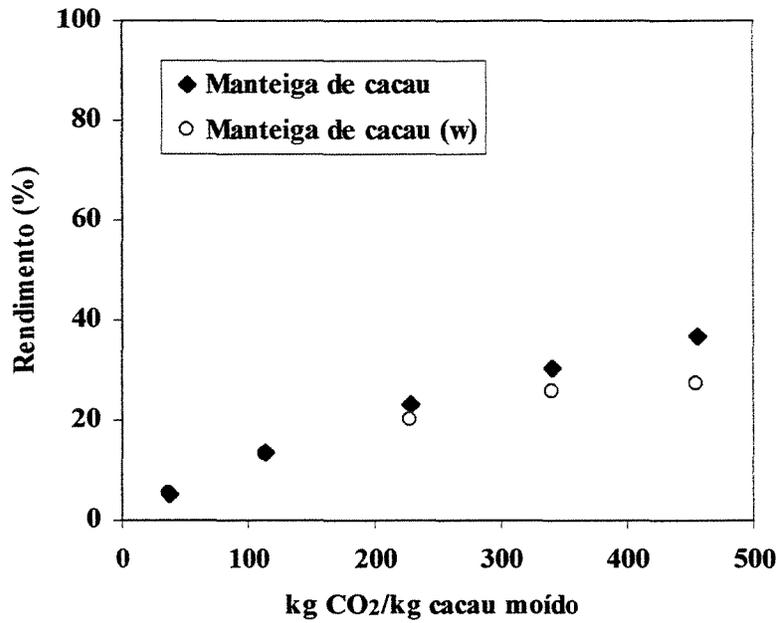
Os dados de solubilidade nos sistemas binários (Saldaña et al., 1999): i) cafeína e CO_2 , e ii) teobromina e CO_2 , revelam que a solubilidade da teobromina é aproximadamente duas ordens de magnitude menor que a cafeína, o que explica a dificuldade relativa

encontrada na extração da teobromina das amêndoas de cacau ainda a maiores pressões que as usadas no sistema binário. Estas grandes diferenças nas solubilidades da cafeína e teobromina no dióxido de carbono foram atribuídas à associação das moléculas de teobromina por ligações de ponte de hidrogênio, o que não acontece com as moléculas da cafeína (Li et al., 1991; Martin et al., 1981). Isto é provavelmente a razão para os maiores pontos de fusão e entalpia de sublimação da teobromina, 351-357°C e 9819 cal mol⁻¹, quando comparados com esses da cafeína, 238°C e 5044 cal mol⁻¹, respectivamente. A solubilidade de um soluto sólido num solvente líquido é representada pela relação (Reid et al., 1988):

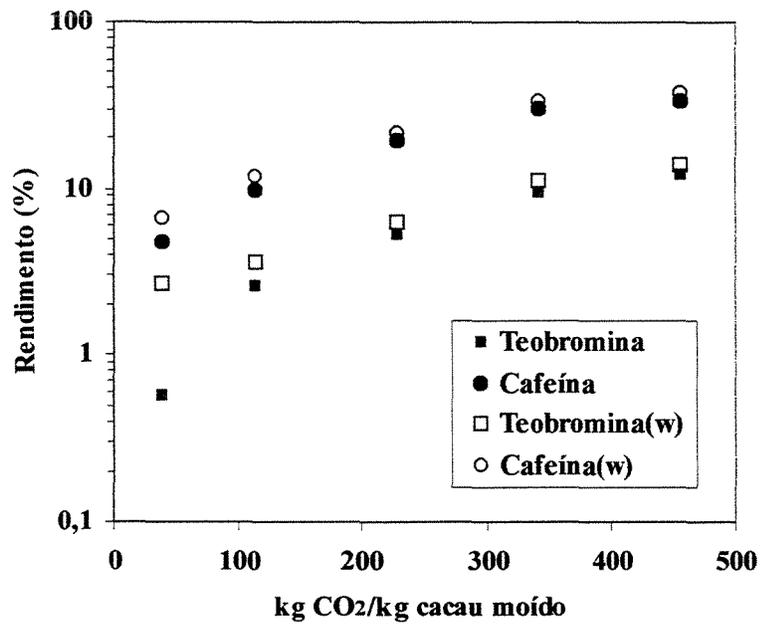
$$\ln(\gamma_2 x_2) = -(h_f/RT)(1-T/T_m) \quad [V.1]$$

no qual γ_2 é o coeficiente de atividade do soluto, x_2 é a solubilidade no solvente (fração molar) a uma temperatura do sistema T, T_m é a temperatura de fusão, h_f é a entalpia de fusão e R a constante do gás ideal. A uma temperatura constante pode-se concluir da relação V.1 que maiores temperaturas e entalpias de fusão resultam em menores solubilidades, x_2 . Cálculos simplificados usando esta equação revelam que a solubilidade ideal da teobromina é aproximadamente duas ordens de magnitude menor que a da cafeína.

Observa-se ainda na Figura V.45 que o uso de CO₂ supercrítico saturado com água provocou uma pequena diminuição na quantidade de óleo extraído na faixa de pressão explorada neste estudo (20 e 40 MPa) a uma temperatura constante de 343,2 K. A água e o óleo são imiscíveis nas condições ambiente devido à considerável diferença entre suas polaridades. Uma explicação para o pequeno efeito negativo no rendimento da extração da manteiga de cacau usando CO₂ supercrítico seria que a água começa a competir com o óleo na formação de interações com o CO₂. Este efeito de umidade está em concordância qualitativa com Snyder et al. (1984) que reportaram a extração de óleos de soja, algodão e amendoim com CO₂ supercrítico, utilizando umidade de até 12%. Na extração de metilxantinas houve um pequeno aumento no rendimento da extração usando CO₂ supercrítico saturado com água.

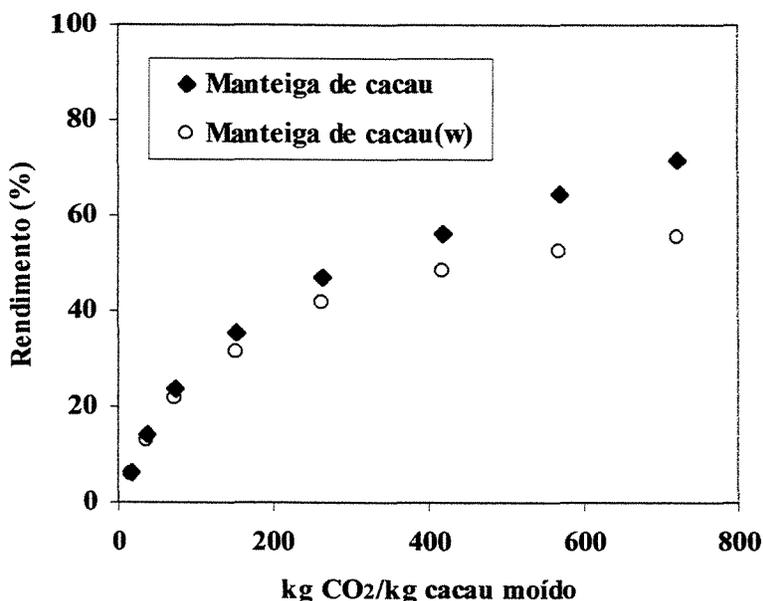


(A)

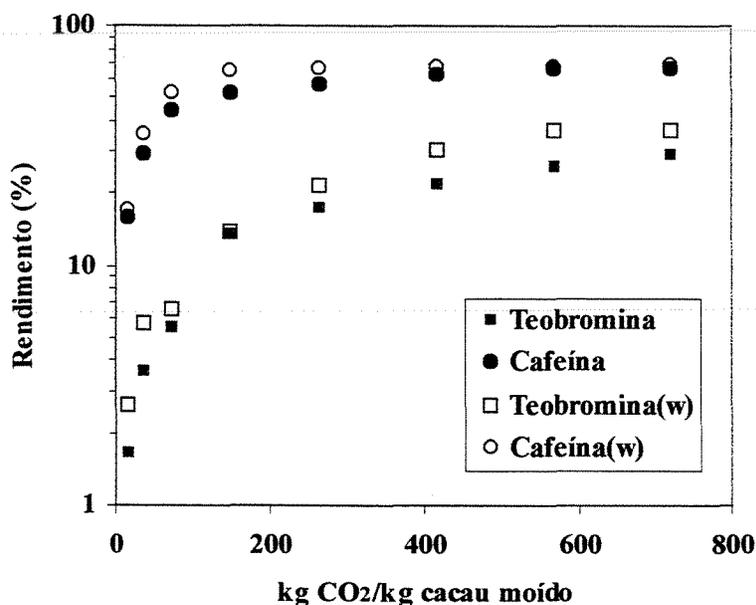


(B)

Figura V.45a. Extração de: (A) manteiga de cacau e, (B) teobromina e cafeína com CO₂ seco e saturado com água (w) a 343,2 K e pressão de 20 MPa.



(A)



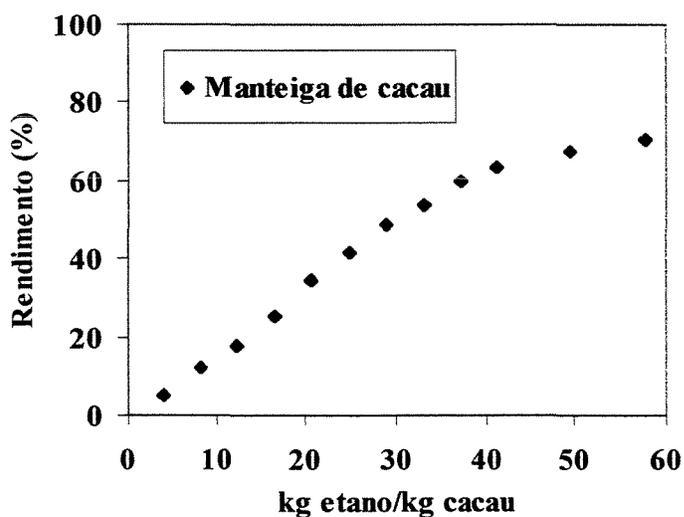
(B)

Figura V.45b. Extração de: (A) manteiga de cacau e, (B) teobromina e cafeína com CO₂ seco e saturado com água (w) a 343,2 K e pressão de 40 MPa.

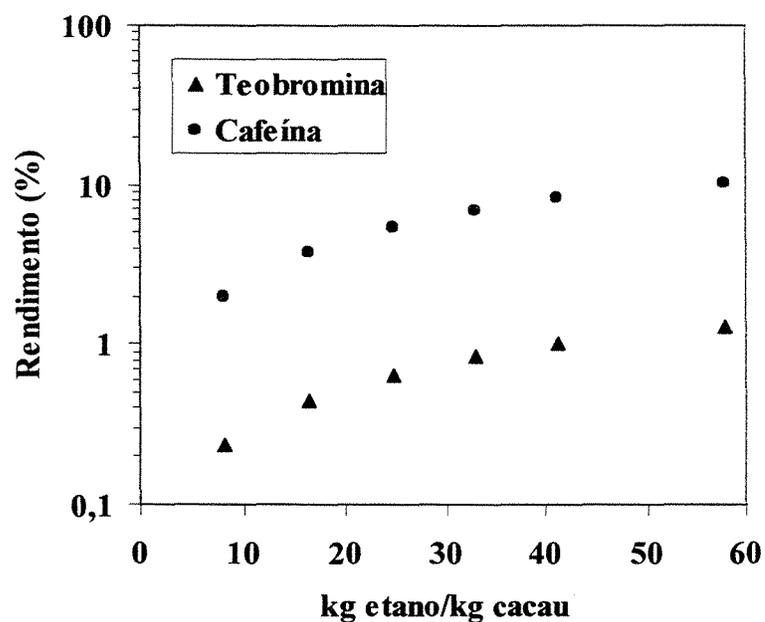
A Figura V.46 apresenta dados para as curvas de extração obtidas para a manteiga de cacau, teobromina e cafeína de uma amostra de 30g de cacau moído a 15,2, 24,8 e 28,3 MPa e uma temperatura de 343,2 K usando 0,86 g min⁻¹ de etano supercrítico. O comportamento das curvas de extração com respeito à pressão são qualitativamente

similares às encontradas para o CO₂. As extrações só foram realizadas com etano supercrítico seco, uma vez que o efeito da umidade foi encontrado ser pequeno nas extrações com CO₂.

A 343,2 K e usando 310 g de etano, os rendimentos da extração da manteiga de cacau de 9, 62 e 72% foram obtidos a 15,2, 24,8 e 28,3 MPa, respectivamente. Os rendimentos de cafeína e teobromina de 3,73 e 0,45%; 9,89 e 1,59%; 11,82 e 2,07% foram obtidos para a mesma quantidade de solvente a pressões de extração de 15,2, 24,8 e 28,3 MPa, respectivamente.

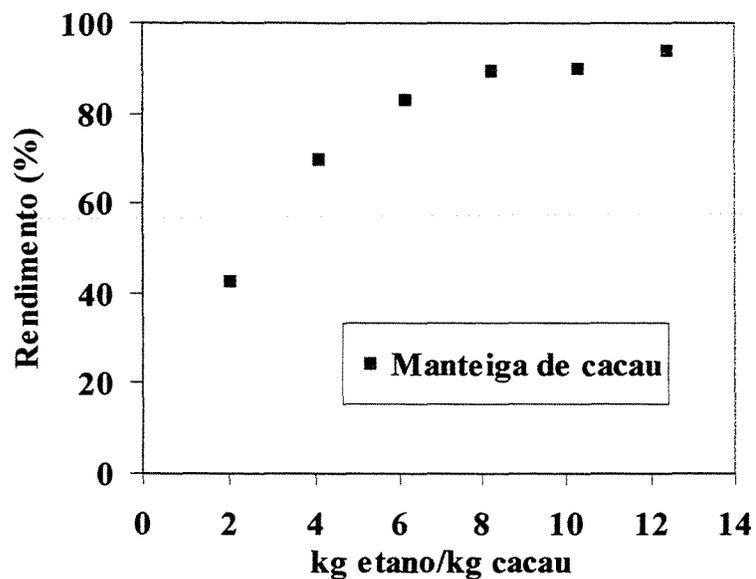


(A)

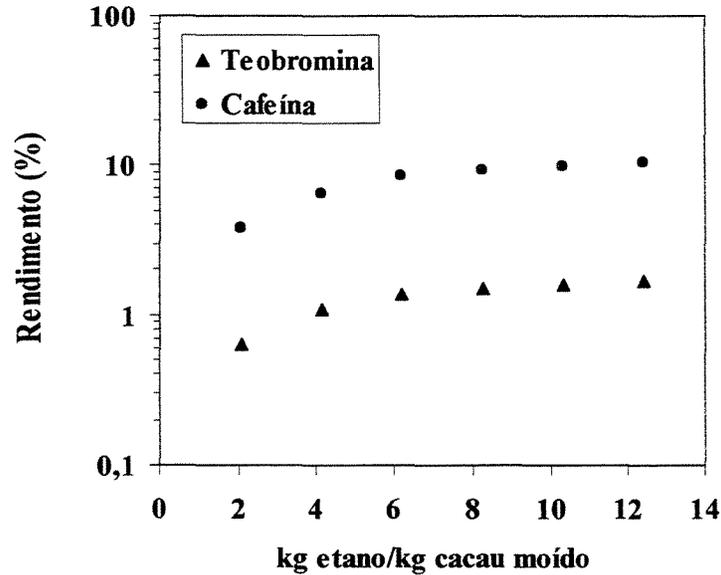


(B)

Figura V.46a. Extração: (A) manteiga de cacau, (B) teobromina e cafeína, com etano supercrítico a 323,2 K e pressão de 15,2 MPa.



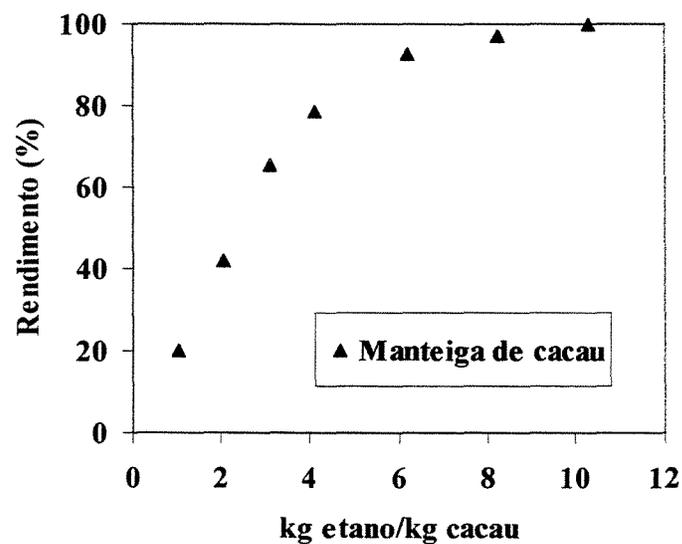
(A)



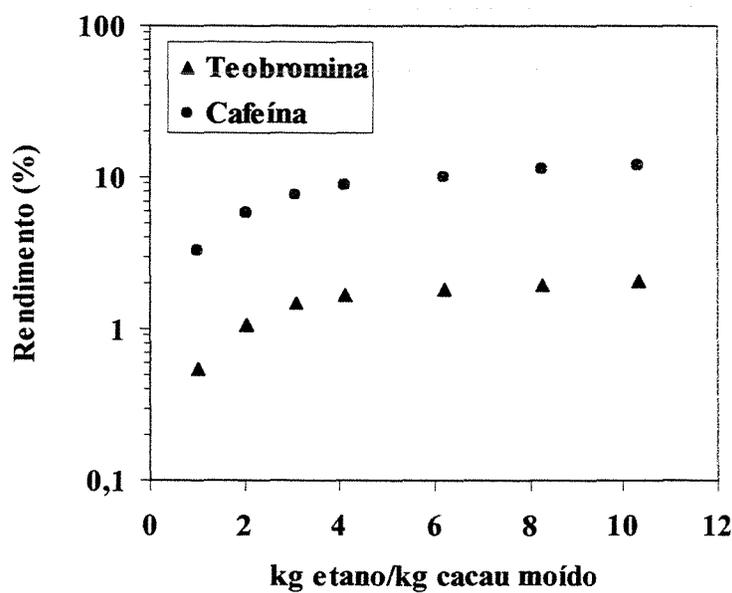
(B)

Figura V.46b. Extração: (A) manteiga de cacau, (B) teobromina e cafeína, com etano supercrítico a 323,2 K e pressão de 24,8 MPa.

Na Figura V.46 foi observado que a quantidade de manteiga de cacau e cafeína extraída foram maiores que os da teobromina apesar da quantidade de teobromina ser maior na matriz que a da cafeína. Nas mesmas condições de temperatura e pressão, o CO₂ mostrou maior seletividade pela cafeína que a teobromina em concordância com o reportado para o sistema binário (Johannsen e Brunner, 1994; Saldaña et al., 1999). Este comportamento pode ser atribuído a formação de aglomerados de moléculas de teobromina pelas ligações de hidrogênio, fazendo com que estas sejam mais pesadas e mais difíceis de extrair.



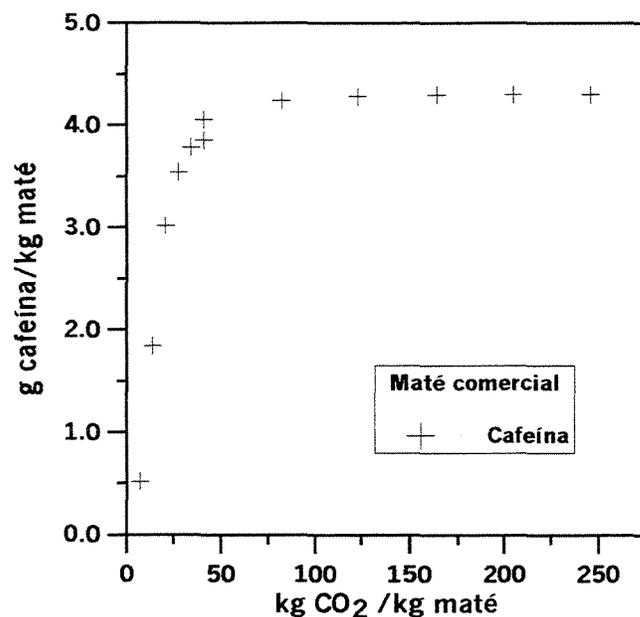
(A)



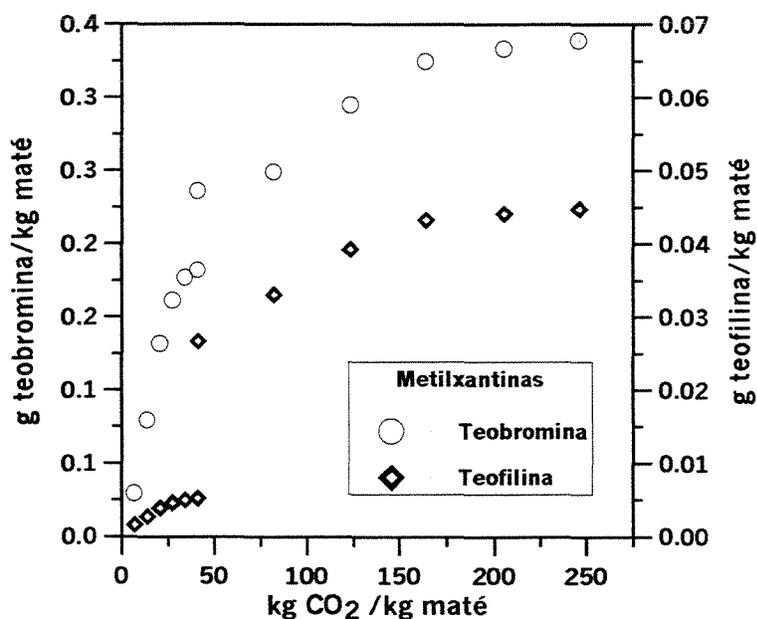
(B)

Figura V.46c. Extração: (A) manteiga de cacau, (B) teobromina e cafeína, com etano supercrítico a 323,2 K e pressão de 28,3 MPa.

A curva de extração supercrítica do chá mate comercial a 343,2 K e 25,5 MPa, representa as quantidades acumuladas de cafeína, teofilina e teobromina extraídas como função das quantidades acumuladas de dióxido de carbono usados, como mostrados na Figura V.47



(A)



(B)

Figura V.47. Curvas de extração: (A) cafeína e (B) teobromina e teofilina, durante o fracionamento do maté comercial a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO₂ de 0,9-1,2 g min⁻¹. Total: 4,31 g cafeína/kg maté comercial; 0,36 g teobromina/kg maté comercial e 0,049 g teofilina/kg maté comercial.

Uma observação mais detalhada da Figura V.47 mostra maiores seletividades do CO₂ para a cafeína seguida pela teobromina e pela teofilina. Após 7 horas de extração, 94, 68 e 57% de toda a cafeína, teobromina e teofilina na matriz da planta, respectivamente, foram extraídas a 343,2 K e 25,5 MPa. Pela décima primeira fração, 99,9% de cafeína, 96% de teobromina e 95% de teofilina foram extraídas. As frações obtidas nos últimos estágios

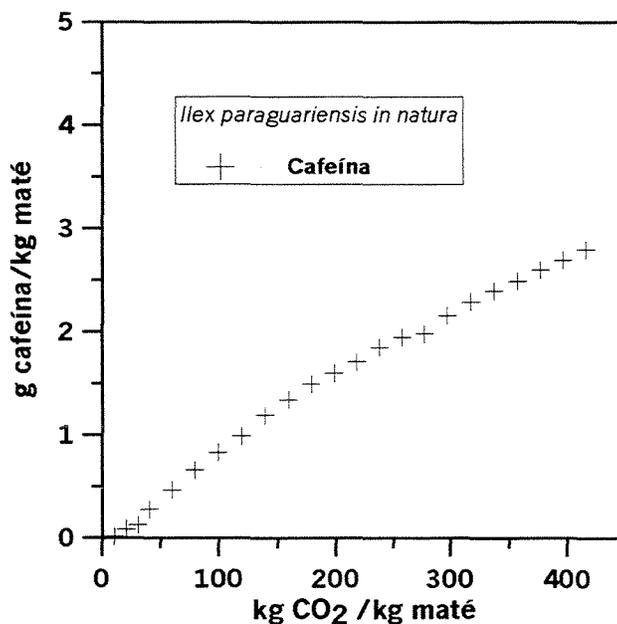
chegaram a ser cada vez mais ricas em teobromina e teofilina e mostram a possibilidade da separação de metilxantinas extraíveis em frações de concentrações variadas.

Pode-se observar também que o benefício em relação ao custo seria maior se o processo de extração fosse terminado na sétima fração, que corresponde à extração de 94, 68 e 57% das quantidades originais de cafeína, teobromina e teofilina, respectivamente. O custo para uma extração completa de aproximadamente 99% é alto, injustificável e desnecessário. Cabe também ressaltar que as velocidades de extração foram maiores até a quarta fração no caso da cafeína e até a décima fração para as dimetilxantinas. A obtenção da décima fração, porém, requer maior consumo de energia e solvente, obtendo-se um leve incremento na extração da cafeína. No caso das dimetilxantinas, seria interessante realizar esta extração até a décima fração em que mais de 95% de rendimento foi obtido.

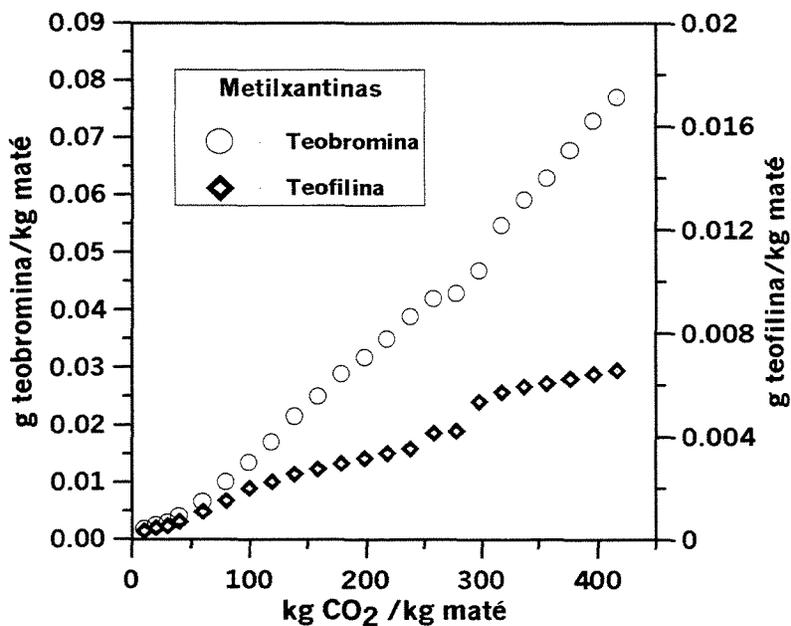
Outra observação interessante é com respeito às solubilidades das metilxantinas em sistemas binários de dióxido de carbono/metilxantina e nos sistemas complexos de dióxido de carbono/chá mate nas mesmas condições (343,2 K e 25,5 MPa). As solubilidades binárias de 2047,6; 14,13 e 7,15 mg de cafeína, teofilina e teobromina por kg CO₂, respectivamente (Saldaña et al., 1999), são substancialmente maiores que aquelas obtidas durante a extração do chá mate (94,1; 0,13 e 4,44 mg de cafeína, teofilina e teobromina por kg CO₂, respectivamente) na região dependente da solubilidade, conforme obtida usando a parte linear da curva de extração. Esta discrepância pode ser atribuída às interações dos componentes, em misturas de ocorrência natural, e demonstra a dificuldade do uso de dados binários para prever a extração destas substâncias de produtos naturais de estruturas complexas.

Na Figura V.48 mostram-se dados experimentais do fracionamento de folhas de chá mate '*in natura*' a uma pressão e temperatura de 13,8 MPa e 313,2 K, respectivamente. Nesta figura, observa-se que as seletividades do CO₂ são maiores para a cafeína seguida pela teobromina e teofilina. Com aproximadamente 3,7 kg de dióxido de carbono, foram extraídas somente 38, 30 e 22% de toda a cafeína, teobromina e teofilina na matriz da planta. Por esta razão, realizou-se outro fracionamento a maiores temperatura e pressão.

A Figura V.49 apresenta os resultados da extração das metilxantinas no fracionamento do chá mate in natura a 343,2 K e 25,5 MPa. Pela décima sexta fração, 84,5% de cafeína, 70,4% de teobromina e 63,0% de teofilina foram extraídas do total. A quantidade total de metilxantinas extraídas de 9g de folhas inteiras de chá mate seco foram 67,27; 2,33 e 0,27 mg de cafeína, teobromina e teofilina, respectivamente.

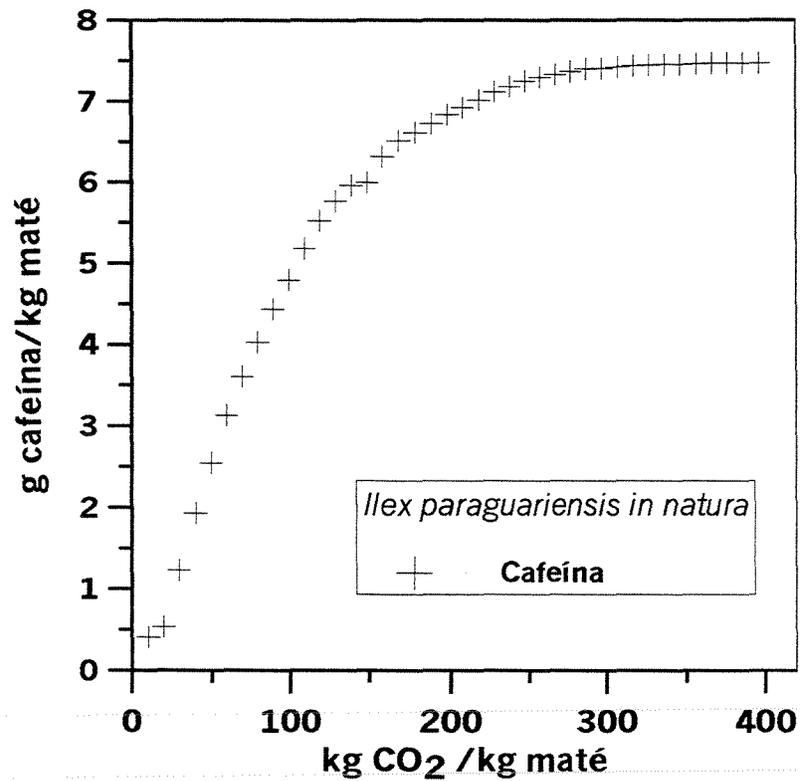


(A)

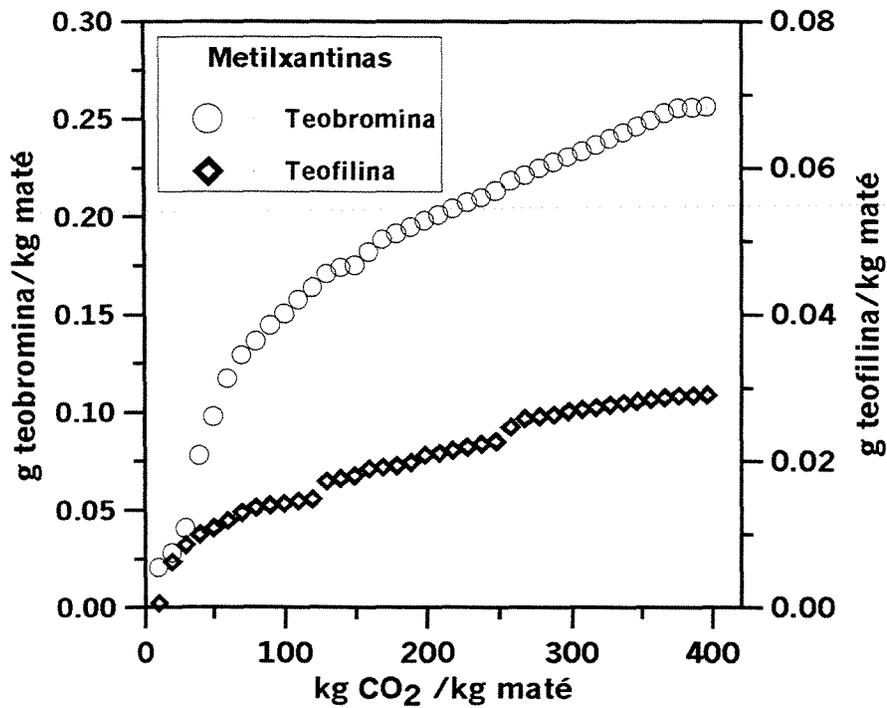


(B)

Figura V.48. Curvas de extração da: (A) cafeína e (B) teobromina e teofilina, no fracionamento do chá mate *in natura* a 313,2 K e 13,8 MPa e vazão de CO₂ de 1,2-1,8 g min⁻¹
 Total: 7,47 g cafeína/kg maté *in natura*; 0,26 g teobromina/kg maté *in natura* e 0,03 g teofilina/kg maté *in natura*.



(A)



(B)

Figura V.49. Curva de extração: (A) cafeína e (B) teobromina e teofilina, no fracionamento do chá mate 'in natura' a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO₂ de 1,2-1,8 g min⁻¹.

Total: 7,47 g cafeína/kg maté *in natura*; 0,26 g teobromina/kg maté *in natura* e 0,03 g teofilina/ kg maté *in natura*.

As solubilidades binárias de 2047,6; 14,13; 7,15 mg de cafeína, teofilina e teobromina por kg CO₂, respectivamente (Saldaña et al., 1999), são substancialmente maiores que essas obtidas durante a extração do chá mate *in natura* (48,46; 1,51 e 0,14 mg de cafeína, teofilina e teobromina por kg CO₂, respectivamente) e do chá mate comercial (98,9; 5,8 e 0,65 mg de cafeína, teobromina e teofilina por kg CO₂, respectivamente).

V.2.6. EFEITO DA MATRIZ

Para discutir o efeito da matriz no processo de extração de alcalóides com fluidos supercríticos realizaram-se experimentos utilizando as folhas de chá mate comercial moídas e as folhas de chá mate ‘in natura’ inteiras.

A curva de extração supercrítica do chá mate comercial a 343,2 K e 25,5 MPa, representa as quantidades acumuladas de cafeína extraídas como função das quantidades acumuladas de dióxido de carbono usados, como mostrados na Figura V.47a. As altas taxas de remoção de cafeína são obtidas nos primeiros estágios. As taxas de extração diminuem com aumento nas quantidades acumuladas de CO₂ como mostrado pelas mudanças na inclinação da curva de extração.

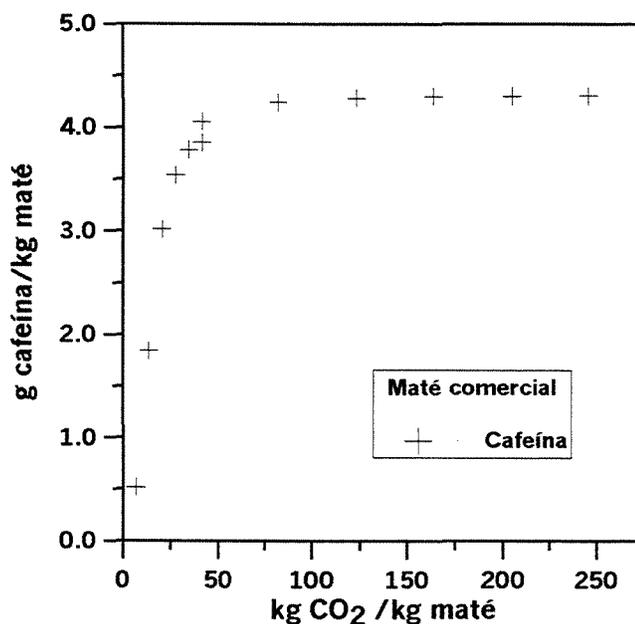


Figura V.47a. Curvas de extração da cafeína durante o fracionamento do maté comercial a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO₂ de 0,9-1,2 g min⁻¹. Total: 4,31 g cafeína/kg maté comercial.

A quantidade total de cafeína extraída de 9g de chá mate seco utilizando uma quantidade acumulada de 2,95 kg de CO₂ foi 38,77 mg de cafeína.

A Figura V.49a apresenta os resultados da extração das metilxantinas no fracionamento do chá mate in natura a 343,2 K e 25,5 MPa. Nesta Figura observam-se três regiões: a que depende da solubilidade, a intermediária e a controlada pela difusão, em concordância qualitativa com o comportamento apontado por Hedrick et al. (1992). A 1ª região dominada pela solubilidade é formada pelas 10 primeiras frações, a região intermediária é formada das frações 11-16 e, das frações 17-40 formam a 3ª região dominada pelo fenômeno da difusão.

A quantidade total de cafeína extraída de 9g de folhas inteiras de chá mate seco foi de 67,27 mg de cafeína. Esta quantidade corresponde a 7474,4 mg de cafeína por kg de chá mate seco.

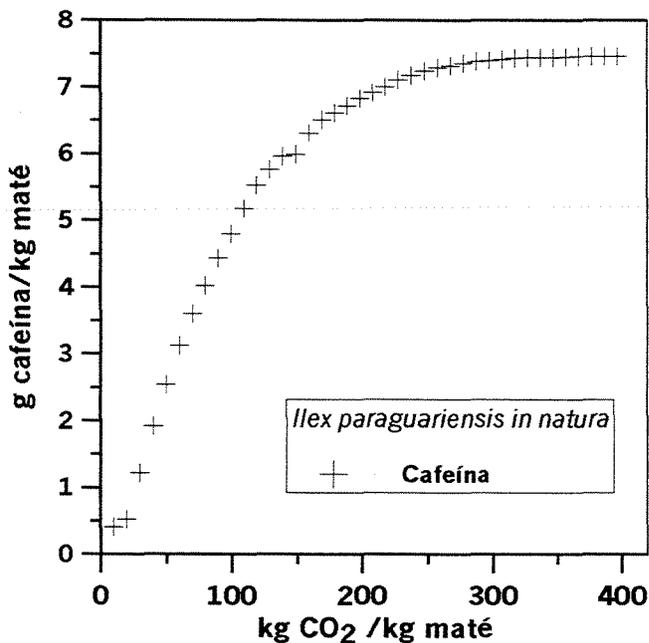


Figura V.49a. Curva de extração da cafeína no fracionamento do chá mate ‘in natura’ a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO₂ de 1,2-1,8 g min⁻¹. Total: 7,47 g cafeína/kg maté in natura.

Na Figura V.50 apresenta-se os resultados da extração da cafeína obtidas de matrizes diferentes (folhas inteiras ‘in natura’ e folhas moídas comerciais). Comparando as

extrações realizadas com as matrizes de chá mate comercial moído (10g, 10% de umidade, o que resulta em 9g de material seco) e folhas de chá mate *in natura* inteiras (22,5 g, 55-60% de umidade, que corresponderia também a 9g de material seco) pode-se dizer que neste caso a natureza da matriz sólida foi muito mais importante que o teor de umidade, pois apesar de ter um teor menor de água, a extração de maté moído foi mais eficiente

Em relação à umidade é difícil obter uma conclusão a partir das informações apresentadas nesta Figura, pois as matrizes utilizadas foram diferentes (folhas inteiras e moídas). No entanto, em outras matrizes como grãos de café foi possível identificar o efeito da umidade no processo de extração. McHugh e Krukonis (1986) provaram que o diclorometano seco não pode ser usado para descafeinar eficientemente os grãos de café secos, comportando-se de maneira mais eficiente com os grãos de café umedecidos. Sabemos que a cafeína poderia estar quimicamente ligada à estrutura do ácido clorogênico presente nos grãos de café, portanto, a água de alguma forma atua como um agente químico liberando a cafeína de sua forma ligada na matriz de café, em ambos processos com diclorometano e CO₂. Também Peker et al. (1992) afirmam que os grãos de café devem ser primeiro umedecidos em água até alcançar um conteúdo de 45 wt %. Este pré-tratamento é essencial para a extração já que influencia na textura das paredes das células dos grãos, facilitando a difusão da cafeína. Portanto, considera-se a umidade um fator importante na velocidade de extração.

A Figura V.50 mostra que nas primeiras frações a extração é mais rápida na matriz de chá mate moído, pois não existe resistência à transferência de massa, enquanto a folha inteira apresenta uma maior resistência à transferência. Esta figura indica, ainda, que a matriz parece ser um fator mais importante que a umidade na extração, pois a cafeína foi extraída com maior facilidade no mate comercial (moído) que possui um conteúdo de umidade menor do que nas folhas inteiras que apresentam um conteúdo de umidade maior.

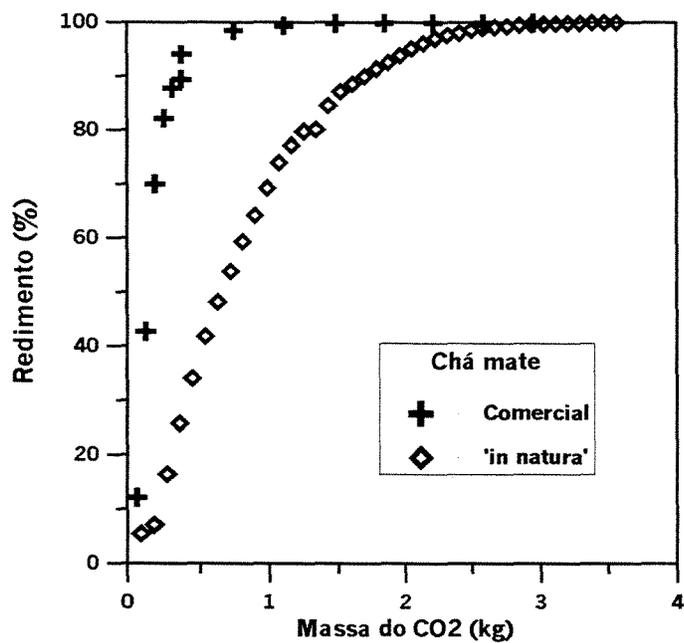


Figura V.50. Comparação das curvas de extração da cafeína no fracionamento do chá mate comercial e *in natura* a 343,2 K e 25,5 MPa e vazão de CO₂ de 0,9-1,8 g min⁻¹

O estudo de efeito de matriz apresenta resultados limitados a um produto natural. Por isso, futuras pesquisas poderão ser estendidas para os outros produtos. Em relação à utilização de outras matrizes como sementes e frutos pode-se dizer que o custo de sua utilização seria bem maior uma vez que possuem estruturas que dificultam a penetração do CO₂ supercrítico quando comparadas as matrizes de folhas. A forma moída dessas matrizes, porém, poderia contribuir para um aumento na velocidade de extração.

V.2.7. EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO E O EFEITO ANTISOLVENTE

O efeito anti-solvente de fluidos supercríticos foi considerado no estudo da pilocarpina. Neste item são apresentados os resultados dos experimentos de equilíbrio sólido-líquido para o sistema pilocarpina hidrocloreada/CO₂ supercrítico, realizados com o objetivo de avaliar a utilização do CO₂ supercrítico como anti-solvente para a recuperação da pilocarpina do jaborandi. Inicialmente, são apresentados resultados das análises cromatográficas por CLAE da pilocarpina hidrocloreada e dos produtos de sua degradação.

Para realizar a análise dos extratos obtidos após a extração supercrítica foi necessário estabelecer o método correto de identificação qualitativa e quantitativa da pilocarpina hidrocloreada pura, assim como de seus produtos de degradação (isopilocarpina, ácido pilocárpico e ácido isopilocárpico). Foram testadas algumas colunas mencionadas na literatura para análise de pilocarpina. As colunas, porém apresentaram defeitos como baixa eficiência e má resolução. Dentre as várias colunas testadas, escolheu-se trabalhar com a coluna descrita no item III.4.2 nas condições especificadas nesse mesmo item. Usando o método descrito na literatura não foram obtidos resultados satisfatórios, por isso foram modificados alguns parâmetros, como comprimento de onda, pH da fase móvel e tipo de coluna cromatográfica. Com este método adaptado obtivemos uma alta resolução e maior eficiência na obtenção dos cromatogramas comparando com os métodos descritos na literatura (Noordam et al., 1978; van Ackeren et al., 1984; Fan et al., 1996).

No Apêndice A são mostrados os cromatogramas dos padrões das amostras de pilocarpina hidrocloreada e isopilocarpina hidrocloreada. Na Figura V.51 apresenta-se o cromatograma da mistura pilocarpina ($t_R=29$ min) e isopilocarpina hidrocloreada ($t_R=26,5$ min) para avaliar a diferença nos tempos de retenção detectados nos padrões e com o intuito de poder também identificar nos nossos extratos estes dois componentes.

Com o objetivo de investigar uma possível degradação da pilocarpina também foi realizada uma análise por CLAE da solução de pilocarpina hidrocloreada em etanol (Apêndice A). Mostramos neste mesmo Apêndice o cromatograma após causar a conversão da pilocarpina hidrocloreada em ácido pilocárpico hidrocloreado e o cromatograma da solução oftalmológica colírio, com 2% pilocarpina.

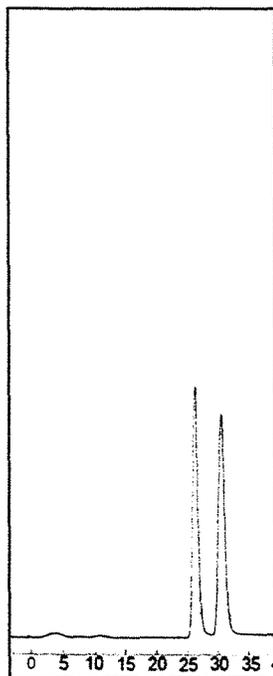


Figura V.51. Cromatograma da mistura pilocarpina hidrocloreada e isopilocarpina hidrocloreada como função do tempo de retenção (t_R) em minutos.

Na Figura V.52 apresenta-se um cromatograma do extrato de jaborandi após realização da extração com uma mistura de metanol e água. Observa-se neste cromatograma a presença de dois picos correspondentes a pilocarpina e isopilocarpina, com tempos de retenção similar aos obtidos na Figura V.51 usando a mistura dos padrões e aos apresentados nos Apêndices A.1 e A.2 usando os padrões individuais respectivos. A identificação da pilocarpina e isopilocarpina hidrocloreada presente no jaborandi no mesmo tempo de retenção de seus padrões puros respectivos se deve a que em ambos casos as amostras foram retidas seletivamente pela fase estacionária, pois foram usadas as mesmas condições: coluna, fluxo de solvente e fase móvel. Este cromatograma da Figura V.52 mostra que ocorreu reação de isomerização da pilocarpina na planta. Isto pode ter ocorrido devido ao longo tempo de armazenamento do produto nas instalações do fornecedor. Para confirmar esta hipótese seria necessário realizar testes com folhas de jaborandi coletadas recentemente.

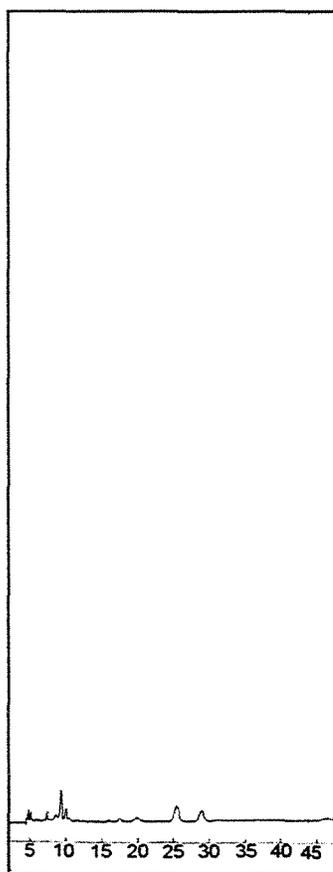


Figura V.52. Cromatograma de um extrato de jaborandi contendo isopilocarpina e pilocarpina por CLAE

Após o estabelecimento do método de análises da pilocarpina hidroclorada por CLAE foi realizada uma extração supercrítica usando o sistema binário: pilocarpina hidroclorada pura/ CO_2 supercrítico a uma temperatura de 323,2 K e uma pressão de 6,5 MPa. A pilocarpina hidroclorada manteve-se insolúvel em dióxido de carbono supercrítico nas condições de temperatura e pressão usadas (343,2 K e 6,9 MPa; 348,2 K e 8,6 MPa; 353,2 K e 8,6 MPa). A fração molar da pilocarpina hidroclorada foi de 1,45% enquanto que a do CO_2 foi de 98,5%. O dióxido de carbono, considerado um solvente apolar com um momento quadripolo, não foi capaz de solubilizar a pilocarpina hidroclorada. Devido à pequena fração molar de pilocarpina hidroclorada utilizada (1,45%) no CO_2 , pressões muito maiores ocasionariam um alto consumo de energia para a sua solubilização ideal.

Pela conformação química da molécula de pilocarpina hidroclorada (Figura II.2) decidiu-se usar um solvente bastante polar, o fluorofórmio, nas mesmas condições de temperatura e pressão utilizadas no sistema anterior. As frações molares de pilocarpina

hidroclorada e fluorofórmio foram de 1,45 e 98,5%, respectivamente. Neste experimento, concluiu-se, portanto, que a pilocarpina hidroclorada pura também não foi solúvel em fluorofórmio supercrítico.

Pelo comportamento mostrado da pilocarpina hidroclorada no CO₂ e no fluorofórmio contemplou-se como possível solução o uso da técnica SAS (fluido supercrítico como anti-solvente do inglês *Supercritical Antisolvent*). Nesta técnica se faz necessário o uso de outro solvente que dissolva a pilocarpina hidroclorada e sua recuperação é por precipitação do alcalóide pela ação anti-solvente do gás. Para uso desta técnica é importante realizar o teste de polaridade da pilocarpina hidroclorada pura a condições ambiente. Os solventes testados foram: éter de petróleo, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, acetona, álcool etílico e água com ordem crescente de polaridade. Observou-se que a pilocarpina hidroclorada pura era extremamente solúvel na água, seguida pelo etanol absoluto, sendo insolúvel nos outros solventes. Foram testados também solventes como tetrahydrofurano, dimetilformamida, e dioxano, sendo a pilocarpina hidroclorada um pouco solúvel no dimetilformamida e insolúvel no tetrahydrofurano e dioxano.

Após os testes de solubilidade da pilocarpina hidroclorada em diferentes solventes químicos, optou-se por utilizar o sistema ternário formado por pilocarpina hidroclorada/etanol e dióxido de carbono como anti-solvente. Desta maneira evita-se a degradação da pilocarpina hidroclorada pela hidrólise com água. Porém, já que a solubilidade da pilocarpina hidroclorada é muito menor no etanol que na água é necessário o estudo de sistemas mais complexos, como o sistema quaternário: pilocarpina hidroclorada/água/etanol e CO₂ supercrítico como anti-solvente.

O efeito anti-solvente pode ser explicado pela Figura V.53 para o sistema ternário: CO₂/1-propanol/ácido salicílico em função da fração molar do CO₂ e temperatura a uma pressão constante. Esta Figura mostra que com o aumento da fração molar do CO₂, a temperatura na qual o ácido salicílico precipita diminui primeiro (co-solvente), alcançando um mínimo, e em seguida aumenta, efeito anti-solvente.

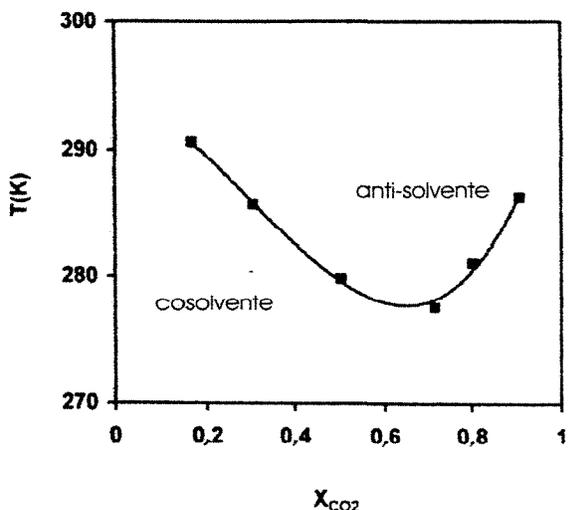


Figura V.53. Temperatura de precipitação do sistema CO_2 /1-propanol/ácido salicílico como função da fração molar de dióxido de carbono a 7 MPa.

Para um melhor entendimento do equilíbrio de fases mostramos na Figura V.54 o diagrama de fases em função da temperatura e pressão a uma composição constante. Nesta Figura são indicadas claramente as diversas fases no equilíbrio. Num ponto M a uma temperatura T_1 e uma pressão P_1 , a solução se encontra na fase líquida. A interfase S+L (M_1) é alcançada ao aumentar a pressão de P_1 para P_2 , iniciando a formação de cristais. Aumentando a temperatura de T_1 para T_2 a uma pressão constante de P_2 é possível fundir o sólido, passando novamente à fase líquida.

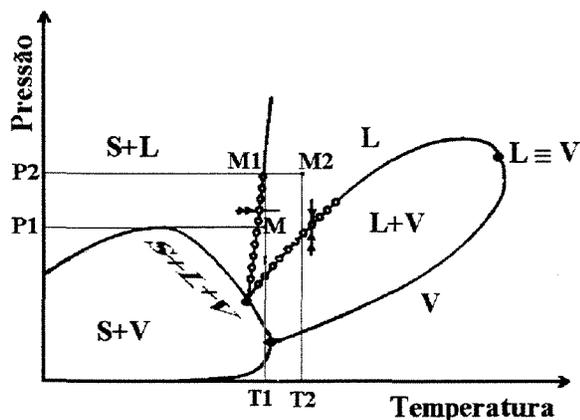


Figura V.54. Interfases S-L, L-V, S-V e o equilíbrio das três fases S-L-V a diferentes temperaturas e pressões (Peters, 1986).

Neste trabalho com o uso do processo SAS foi obtida uma isopleta sólido-líquido (Figura V.55) para o sistema quaternário: pilocarpina hidrocloreada-etanol-água e dióxido de carbono, sendo que este último atuou como anti-solvente. A curva apresenta uma tendência linear positiva para pressões variando de 4 a 9 MPa com uma variação de temperatura de 1 K, de maneira similar à interfase S-L mostrada na Figura V.55. A uma pressão de 6 MPa e uma temperatura de 300,5 K, o sistema se encontra na fase líquida (M1). Aumentando a pressão de 6 para 7 MPa a temperatura constante de 300,5 K formam-se cristais na interfase S+L (M2). Aumentando porém a temperatura de 300,5 para 300,7 K fusionamos o sólido (M3), sendo necessário uma maior pressão de 7,55 MPa para precipitar a pilocarpina novamente (M4). Para precipitar a pilocarpina à temperatura de 300,85 K é necessário aumentar a pressão até 8,05 MPa, mantendo a concentração constante.

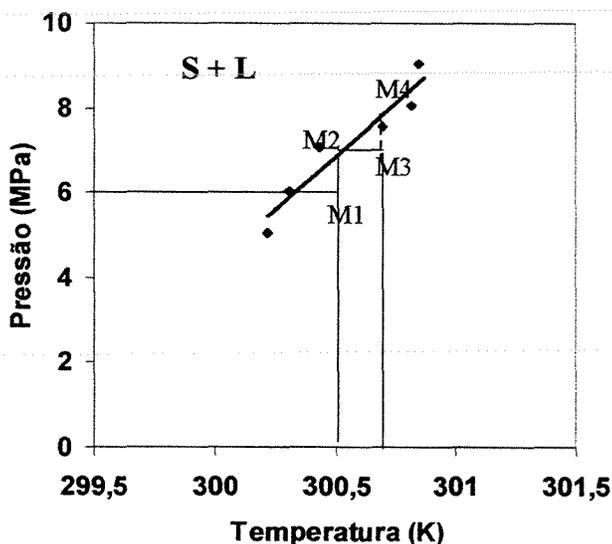


Figura V.55. Isopleta sólido-líquido para a composição constante no sistema de 0,09% de pilocarpina, 6,52% de água, 25,51% de etanol e 67,88% de dióxido de carbono.

Na Figura V.56 encontra-se um exemplo das interfases S-L e L-V para o sistema n-eicosano-etano a diferentes temperaturas, pressões e concentrações. Realizando-se mais experimentos a diferentes concentrações de pilocarpina hidrocloreada/etanol/água/CO₂ como anti-solvente, poderiam ser geradas curvas similares às apresentadas na Figura V.56. Com estes dados seria possível determinar a interfase S-L-V em função da composição, já que este é obtido pela interseção das duas interfases L-V e S-L. Este comportamento de fases

168

permite saber como uma fração molar de pilocarpina hidrocloreada se comporta numa dada temperatura e pressão e também se é miscível nessas condições.

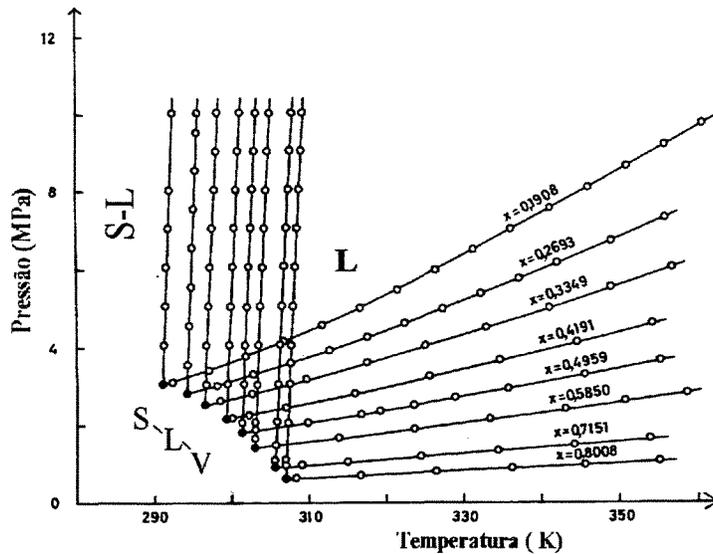


Figura V.56. Dados experimentais das interfases S-L e L-V (círculos vazios) e o equilíbrio das três fases S-L-V (círculos preenchidos) a diferentes concentrações, temperaturas e pressões para o sistema n-icosano-etano (Peters, 1986).

Foi realizado o estudo de fracionamento usando CO_2/SC com o objetivo de extrair a pilocarpina presente na matriz de folhas moídas de jaborandi, *P. microphyllus*. Extrações foram realizadas nas condições de 25,5 MPa, 343,2 K e $1,2 \text{ g min}^{-1}$ de dióxido de carbono, usando água para saturar as folhas de jaborandi moídas no segundo extrator. As quantidades acumuladas de pilocarpina extraídas nestes experimentos foram extremamente pequenas (traços), sendo que a maior parte da pilocarpina não foi coletada nos separadores, mas foram extraídas das células das folhas moídas, permanecendo no extrator. Isto foi comprovado por análises de CLAE dos extratos obtidos no separador e do extrato que permaneceu no extrator após o processo de extração.

V.2.8. FRACIONAMENTO DA MANTEIGA DE CACAU

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos do fracionamento da manteiga de cacau com CO_2 e etano supercríticos assim como a caracterização das frações de manteiga de cacau obtidas durante o processo de fracionamento. Inicialmente são apresentados e discutidos os resultados relativos à composição de ácidos graxos,

composição de triglicerídeos, bem como o comportamento térmico durante a fusão das amostras.

A. Ácidos graxos das frações obtidas do fracionamento da manteiga de cacau

Na Tabela V.7 apresentam-se os resultados obtidos das análises por cromatografia gasosa dos ácidos graxos na manteiga de cacau inicial obtida da Cardill Ltda. (Bahia, Brasil), os quais apresentam boa concordância com os dados da literatura.

As frações foram examinadas em termos de sua aparência visual. Todos os extratos foram sólidos a temperatura ambiente de cor amarelo claro, típico da gordura de cacau. Todas as amostras apresentaram também aroma agradável.

Tabela V.7. Composição dos ácidos graxos da manteiga de cacau

Nº de carbono	Ac. Graxo	Manteiga de cacau¹	Manteiga de cacau²	Manteiga de cacau³
C14:0	Mirístico	0,1-0,3	0,18	0,1
C16:0	Palmítico	25,0-28,0	26,05	26,0
C16:1	Palmitoleico	0,4-0,7	0,46	0,3
C18:0	Estearico	33-37	32,61	34,4
C18:1	Oleico	31-35	32,86	34,8
C18:2	Linoleico	2-3,5	3,24	3,0
C18:3	Linolênico	0,2	0,16	0,2
C20:0	Araquídico	0,6-1,0	0,09	1,0
C22:0	Beênico	0,1	0,17	-
Saturados		66,4-60,6	59,36	61,7
Insaturados		33,6-39,4	40,63	38,3

¹Silva (1988), ²Saldaña (2001), ³Salgado (1999)

A Tabela V.8 mostra as composições dos ácidos graxos em frações obtidas a uma pressão de 24,8 MPa e uma temperatura de 323,2 K. As frações foram obtidas usando 0,4

kg de CO₂ (A), 0,25 kg de etano (B) e 0,74 kg de etano (C). A análise das duas frações (A) e (B) obtidas usando dois fluidos supercríticos diferentes revela que estas frações contêm os ácidos graxos até C20, nas mesmas proporções relativas encontradas na manteiga original. Observa-se, porém nestas frações a ausência de ácidos graxos C22. A fração coletada com 0,74 kg do etano se distingue por uma composição bastante diferenciada, principalmente por conter maiores quantidades de ácidos C20 e C22. A composição varia devido ao aumento dos ácidos graxos araquídico e behênico o que demonstra que as últimas frações são mais ricas em compostos pesados, ocasionando a diminuição de ácidos graxos leves (ácido graxo palmítico).

Tabela V.8. Composição dos ácidos graxos na manteiga do cacau (Saldaña, 2001)

Nº de carbono	Manteiga de cacau ¹	^{2*} CO ₂	^{3*} Etano	^{4*} Etano
C12:0	0,24	-	0,11	-
C14:0	0,18	0,13	0,14	0,07
C16:0	26,05	28,84	27,52	22,03
C16:1	0,46	0,53	0,48	0,49
C18:0	32,61	31,91	32,77	29,96
C18:1	32,86	33,76	34,42	29,68
C18:2	3,24	3,71	3,30	3,28
C18:3	0,16	0,22	0,19	0,18
C18:4n-3	0,91	0,81	0,89	1,02
C20:0	0,09	0,07	-	5,06
C22:0	0,17	-	-	-
C22:5n-3	-	-	-	0,07
C22:6n-3	2,97	-	0,10	8,08
Saturados	59,36	60,96	60,57	57,15
Insaturados	40,63	39,03	39,42	42,84

¹ Manteiga de cacau original, amostra 2 (uso de 0,4 kg de CO₂ supercrítico), amostra 3 (fração obtida com 0,25 kg de etano supercrítico), amostra 4 (fração obtida com 0,74 kg de etano supercrítico). * Condições de 24,8MPa e 323,2 K

B. Composição de triglicerídeos das frações obtidas do fracionamento da manteiga de cacau

Na Tabela V.9 são apresentados os triglicerídeos identificados na manteiga de cacau extraídos com o solvente orgânico, éter de petróleo. Os triglicerídeos (TGs) presentes em cada fração foram determinados conforme o procedimento descrito na seção IV.4.4. A reprodutibilidade dos dados experimentais para as análises, determinado através da realização de duplicatas foi de $\pm 4\%$.

Tabela V.9. Composição de triglicerídeos da manteiga de cacau extraída com solvente orgânico

Triglicerídeos	Carbono	Composição (%)	
		Loisel et al. (1998)	Este trabalho
PLiO	C52	0,5	0,8
PLiP	C50	1,6	2,6
OOO	C54	0,4	0,6
POO	C52	2,8	4,5
PLiS	C52	1,4	4,8
POP	C50	17,0	18,5
SOO	C54	3,4	6,0
POS	C52	36,6	37,4
OOA	C56	-	0,7
SOS	C54	27,3	22,0
PSS	C52	1,1	0,6
SOA	C56	1,9	1,0

A Tabela V.10 mostra as quantidades de triglicerídeos nas frações obtidas das amêndoas de cacau com etano supercrítico. As frações foram coletadas a diferentes pressões de 15,2, 24,8 e 28,3 MPa e temperaturas de 323,2 e 343,2 K. Nesta Tabela verifica-se que as composições dos TGs nas frações obtidas a diferentes temperaturas e pressões variaram aleatoriamente. Portanto, o etano supercrítico mostrou pouca seletividade para um determinado TG. Os resultados obtidos estão em concordância com as observações de Rossi (1996) que verificou pouca seletividade do CO₂ em relação aos triglicerídeos presentes na manteiga de cacau.

Neves (1996) englobou os triglicerídeos do óleo de manteiga de leite em várias famílias de acordo com o total de átomos de carbonos presentes nas cadeias carbônicas dos ácidos graxos presentes nas moléculas. Esse autor separou os triglicerídeos do óleo de manteiga em três frações: leves, intermediários e pesados utilizando CO₂SC. Os triglicerídios da manteiga de cacau distribuem-se em famílias que englobam a faixa dos C50 a C56 (Tabela V.9). Verifica-se que as faixas de tamanho e massa molecular são bastante estreitas, resultando em compostos de características semelhantes, o que dificulta o seu fracionamento.

Tabela V.10. Triglicerídeos obtidos a partir de amêndoas de cacau moído com etano supercrítico a diferentes pressões e temperaturas.

TGs	24,8 MPa & 323,2 K	28,3 MPa & 323,2 K	24,8 MPa & 343,2 K	28,3 MPa & 343,2 K
PLiO	0,74	0,84	0,44	0,56
PLiP	1,76	1,42	1,54	1,17
POO	0,42	0,56	0,44	0,29
PLiS	4,35	4,67	4,09	3,71
POP	19,84	20,51	19,64	19,98
SOO	5,27	5,72	4,63	4,22
POS	40,16	40,64	40,67	42,31
OOA	0,35	0,32	0,38	0,32
SOS	26,77	24,47	26,39	26,97
PSS	0,33	0,84	0,25	0,47
SOA	0,1	0,1	1,53	-

Nas Figuras V.57 e V.58 mostram-se o percentual de triglicerídeos presentes nas frações da manteiga de cacau pura extraída com solventes supercríticos. Observa-se que os triglicerídeos variam aleatoriamente nas frações, tanto com CO₂ quanto com etano supercrítico.

Observando a Figura V.57 pode-se afirmar que no início do processo de extração, usando etano supercrítico, o triglicerídeo leve POP (C50) é mais facilmente extraído enquanto que as últimas frações foram mais ricas em TG SOS (C54). Porém a diferença da última fração com respeito a primeira fração destes dois TGs se mostra muito pequena. Arul et al. (1987) e Neves (1996) relataram tendências mais claras e nítidas no caso do fracionamento da gordura do leite e do óleo de manteiga. Eles dividiram os triglicerídeos em três grupos (leves, médios e pesados), mostrando a diminuição e aumento destes triglicerídeos como função do tempo de extração.

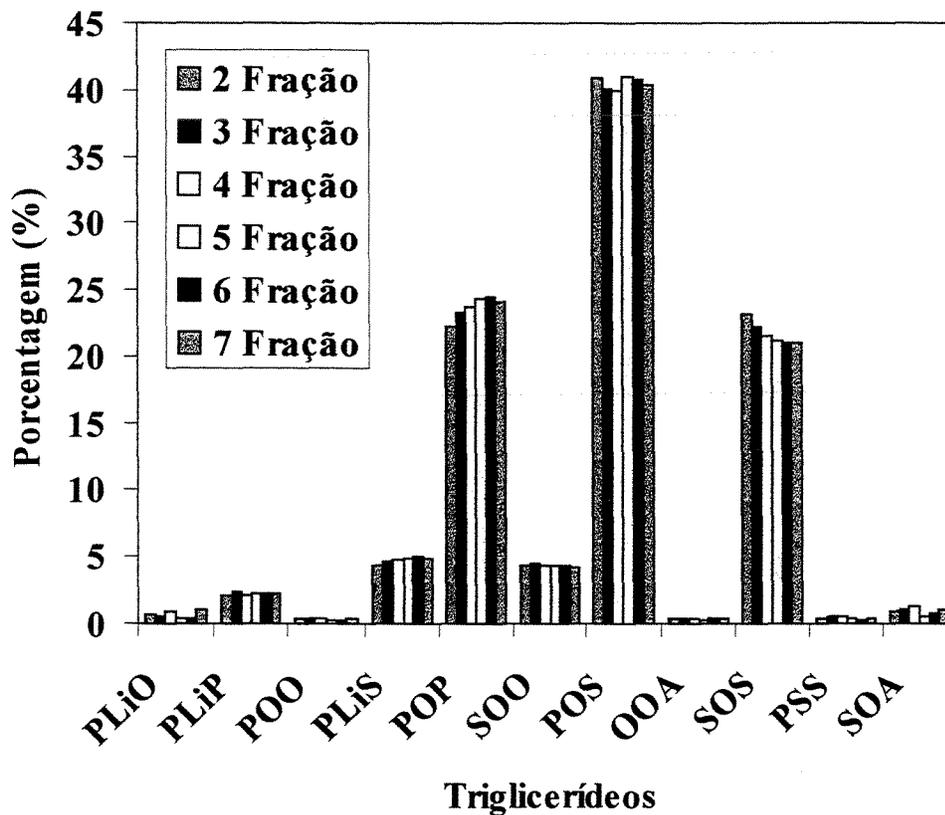


Figura V.57. Percentual dos TGs nas frações extraídas a 24,3 MPa e 323,2 K com CO₂SC. Cada fração foi obtida com 377 g de CO₂.

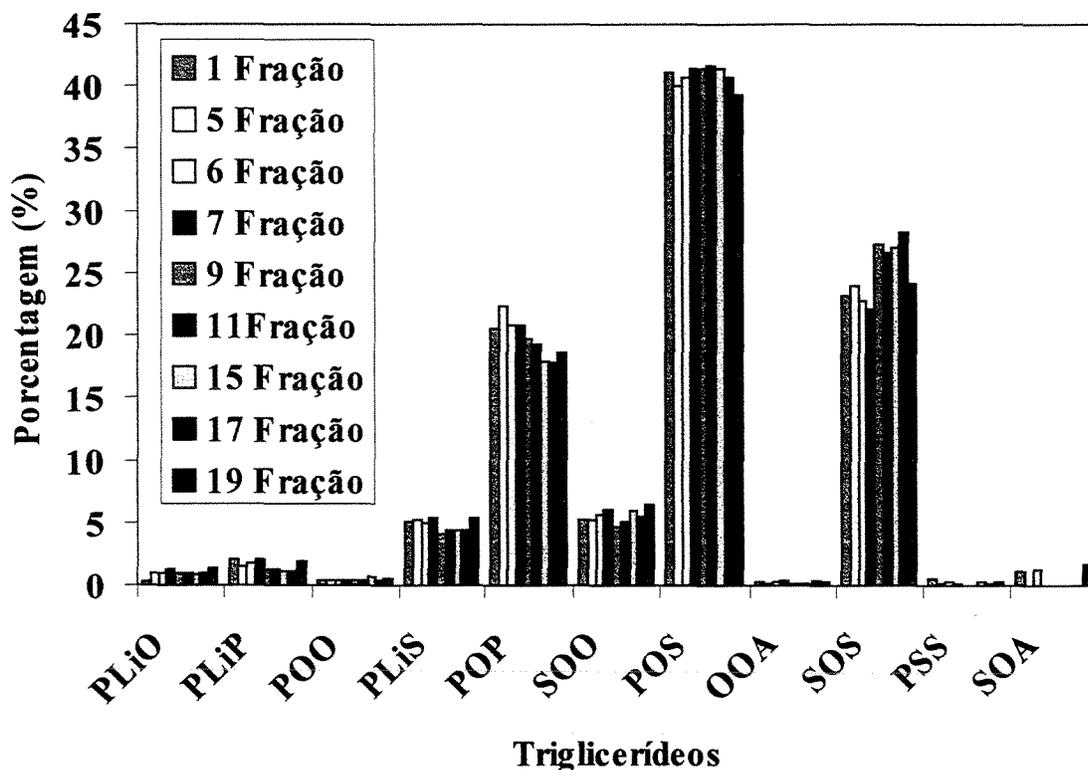


Figura V.58. Percentual dos TGs nas frações extraídas a 323,2 K com etano supercrítico. Cada fração foi obtida com 61,95g de etano.

C. Comportamento térmico das frações obtidas do fracionamento da manteiga de cacau

As determinações do comportamento térmico das frações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita na seção IV.4.5. As análises foram realizadas em duplicatas e a reprodutibilidade experimental envolvida na determinação da entalpia de fusão (ΔH_{fus}) das frações foi de 5% e para a determinação do percentual de sólidos foi de 10%.

A Tabela V.11 apresenta o conteúdo de sólidos na manteiga de cacau extraída com etano supercrítico a 323,2 e 343,2 K e pressões de 24,8 e 28,3 MPa. A Figura V.59 mostra a curva de sólidos da manteiga de cacau nas frações obtidas com CO₂ e etano supercrítico a 24,8 MPa e 323,2 K. Na Tabela V.11 e Figura V.59, a análise do comportamento térmico a

manteiga de cacau apresenta um alto índice de gordura sólida (98-99%) a 10°C. Aumentando-se a temperatura para 25°C, este valor decresce para 90-93%. Na faixa de temperaturas de 25 a 35°C esta variação é ainda maior (aproximadamente 60 a 70%). Esses resultados demonstram que tanto a manteiga de cacau obtida por prensagem mecânica quanto aquela obtida por extração com fluidos supercríticos apresentam percentuais de sólidos similares à temperatura de 10 e 25°C, sendo ambas manteigas totalmente fundidas a temperatura maior que 36°C. Isto indica que a extração com fluidos supercríticos não modifica esta importante propriedade da manteiga de cacau visando uma posterior utilização em formulações e processamento de produtos como o chocolate.

De acordo com Leissner et al. (1993), o teor de gordura sólida a temperaturas inferiores a 25°C representa a dureza ou o caráter quebradiço de uma gordura. Um dos dados mais importantes e práticos utilizados industrialmente para avaliar a manteiga de cacau e outras gorduras alternativas a manteiga de cacau é a diferença no teor de sólidos da gordura na faixa de 25 a 35°C, denominado de ΔS (25 a 35°C), já que representa o perfil de fusão da gordura na boca, o qual está associado diretamente à sensação de frio e ao desprendimento de sabor (Luccas, 2001).

A presença de sólidos em temperaturas superiores a 35°C é uma característica de cera, que é facilmente detectada durante a degustação. Assim para que uma gordura possa ser usada na fabricação de chocolate para o consumo em climas tropicais ela deve ser dura e quebradiça à temperatura ambiente (alto valor de sólidos a 25°C), deve apresentar boas propriedades de fusão na boca (alto valor de ΔS , 25°C-35°C), além de não apresentar residual ceroso (sólidos acima de 35°C). A Tabela V.12 apresenta os valores das frações obtidas da extração com etano supercrítico, satisfatórios para as três condições para uma boa gordura de cacau: alta dureza a temperatura ambiente, boas propriedades de fusão e valores baixos a temperaturas maiores que 35°C.

Tabela V.11. Conteúdo de sólidos na manteiga de cacau extraída com prensa mecânica e com etano supercrítico a diferentes temperaturas e pressões.

T (°C)	Prensa mecânica ¹	24,8 MPa & 323,2 K ²	28,3 MPa & 323,2 K ²	24,8 MPa & 343,2 K ³	28,3 MPa & 343,2 K ³
0	100	100	100	100	100
10	98,42	99,45	99,46	98,91	99,19
20	87,19	96,47	93,96	96,47	93,09
25	84,63	93,35	90,09	92,57	89,8
30	67,13	82,9	72,8	79,68	73,37
35	19,87	33,36	20,05	30,99	20,11
40	6,2	9,05	3,51	8,3	5,63

¹Lucas (2001): extraída com prensa mecânica, ²uso de 123,9 g etano supercrítico e ³uso de 247,8 g etano supercrítico

Tabela V.12. Conteúdo de sólidos na manteiga de cacau extraída das amêndoas de cacau moídas com prensa mecânica e com etano supercrítico, a diferentes temperaturas e pressões.

	Prensa mecânica ¹	24,8 MPa & 323,2 K ²	28,3 MPa & 323,2 K ²	24,8 MPa & 343,2 K ³	28,3 MPa & 343,2 K ³
S (25°C)	84,63	93,35	90,09	92,57	89,8
ΔS (25°C-35°C)	64,76	59,99	70,04	61,58	69,69
S (37,5°C)	6,2	9,05	3,51	8,3	5,63

¹Lucas (2001): MCB-manteiga de cacau Brasileira extraída com prensa mecânica, ²uso de 123,9 g etano supercrítico e ³uso de 247,8 g etano supercrítico

Na Figura V.59 são mostradas as curvas de sólidos da manteiga de cacau extraídas com prensa mecânica (p.m) e frações extraídas com solventes supercríticos (CO₂ e etano) a uma temperatura de 323,2 K e pressão de 24,8 MPa. Em todos os casos, as frações de manteiga de cacau apresentam percentuais de sólidos similares em relação à manteiga de cacau obtida por prensa mecânica, exceto na faixa de 10 a 26°C onde a manteiga de cacau obtida com fluidos supercríticos apresenta um maior teor de sólidos. Em chocolates este valor maior representa uma boa dureza à temperatura ambiente, que é uma grande vantagem em regiões de climas quentes (tropicais) ou em estações de verão.

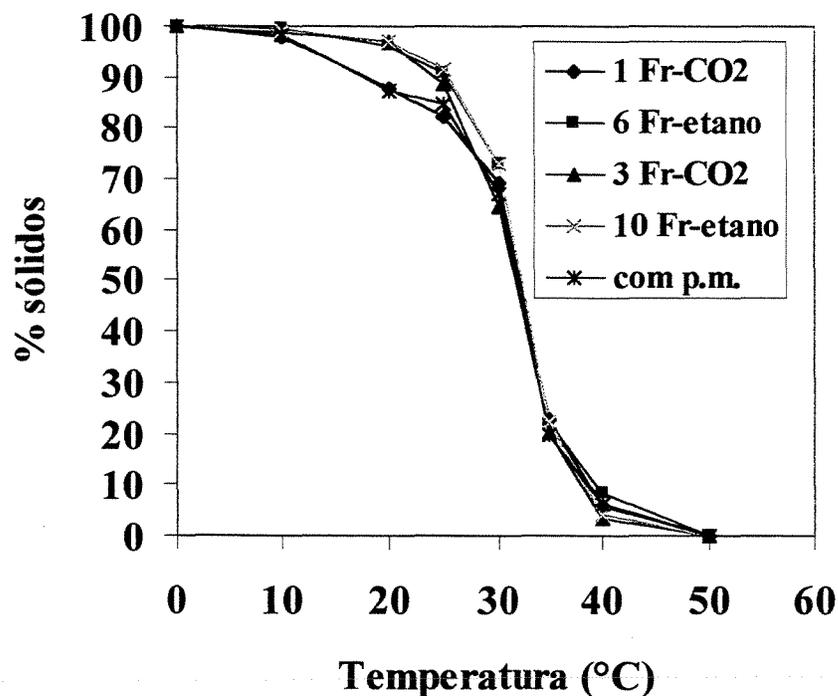


Figura V.59. Curva de sólidos da manteiga de cacau pura por prensa e as frações obtidas com CO₂ e etano supercrítico a 24,8 MPa e 323,2 K. Cada fração (Fr) de CO₂ foi obtida com 377 g enquanto que com etano foi 61,9 g

No processo com prensa mecânica foi necessária, também, a extração com hexano para uma recuperação total do óleo. Além disso, este processo tem uma influência negativa devido ao uso de altas temperaturas, que poderiam degradar a manteiga de cacau.

As análises térmicas das frações indicam que a pequena variação na composição das frações de manteiga de cacau com respeito aos TGs da manteiga original, (Tabelas V.9 e V.10) parece resultar numa pequena modificação do comportamento térmico destas frações (Tabela V.9).

A Tabela V.13 apresenta os resultados da análise de entalpia com desvio médio experimental de 5% de algumas frações selecionadas e coletadas durante a extração/fracionamento a pressões de 24,8 e 28,3 MPa e temperaturas de 323,2 e 343,2 K usando etano supercrítico. Sabariah et al. (1998) num estudo das características físicas e químicas de várias gorduras mostraram que as manteigas de cacau substitutas (CBS)

apresentam o maior valor de entalpia de fusão (143,1 J/g), seguida pela manteiga de cacau da Malaysia MCB (138,8 J/g), uma fração de gordura do leite HMF42 (97,1 J/g) e a gordura do leite anhidra AMF (72,9 J/g). Eles atribuíram a variação do calor de fusão do HMF42 com respeito à AMF ao maior conteúdo de ácidos graxos saturados que insaturados. Em trabalhos prévios (Saldaña et al., 2002) foi observado que não há uma diferencia marcante entre os ácidos graxos saturados e insaturados nas diferentes frações coletadas após a extração/fracionamento da manteiga de cacau das amêndoas de cacau moído (Tabela V.13).

Tabela V.13. Entalpia de fusão correspondente ao fracionamento da manteiga de cacau usando etano supercrítico a diferentes pressões e temperaturas.

Pressure (MPa)	Temperature (K)	ΔH_{fus} (J/g)
24,8	323,2	125,8
24,8	343,2	117,5
28,3	323,2	121,4
28,3	343,2	118,8

Pelos resultados experimentais apresentados neste trabalho determinou-se que utilizando fluidos supercríticos ou processos convencionais de extração (prensa mecânica) não são alteradas as características da manteiga de cacau como por exemplo o teor de ácidos graxos, a composição de triglicerídeos e a entalpia de fusão. No caso da temperatura de fusão observou que as frações obtidas com fluidos supercríticos apresentam maior conteúdo de sólidos a temperaturas baixas, o que seria um parâmetro físico-químico importante em climas tropicais durante o verão pois este valor indica a dureza da manteiga de cacau.

Na extração de cafeína de sementes moídas de guaraná e chá mate foram usados como solventes a água e o clorofórmio. As extrações foram realizadas por 10 h usando 200 mL de solvente e 20g de amostra. No caso do guaraná observou-se que os extratos aquosos apresentaram, açúcares e cafeína, enquanto que com o clorofórmio foram obtidos, cafeína e

um material oleoso de cor laranja-escuro. No caso do mate o extrato obtido apresentou uma grande quantidade de clorofila, bem como de cafeína. O clorofórmio extraiu completamente o óleo e a teobromina das amêndoas de cacau moído. Todos os experimentos foram realizados a uma temperatura de 60°C à pressão atmosférica, usando um aparelho soxhlet.

CAPÍTULO VI

MODELAGEM TERMODINÂMICA

A modelagem termodinâmica é importante na engenharia de processos pois poderá fornecer informações - através de predições, interpolações e extrapolações - sobre variáveis de interesse em condições onde dados experimentais não estão ou não podem estar disponíveis devido às diversas limitações experimentais. Como se sabe, experimentos são dispendiosos e demandam ensaios prolongados e onerosos. No caso de extração de alcalóides com fluidos supercríticos, é possível estimar a solubilidade bem como determinar sua variação com a mudança da pressão e/ou a temperatura do sistema.

Neste capítulo, é descrita uma modelagem termodinâmica utilizada na correlação de dados de equilíbrio dos sistemas binários cafeína/CO₂ supercrítico, teofilina/CO₂ supercrítico e teobromina/CO₂ supercrítico que considera a fase fluida como um gás comprimido. Para o desenvolvimento do modelo, foi utilizada a equação de Peng-Robinson pela sua capacidade na descrição do comportamento volumétrico a altas pressões, combinada com diferentes regras de misturas: de van der Waals, de Panagiotopoulos & Reid, e de Mohamed & Holder. Para a utilização desta equação, é necessário conhecer as propriedades críticas do solvente e do soluto. Por não serem disponíveis na literatura, as propriedades do soluto foram determinadas por métodos de contribuição de grupos: Two, Joback, Somayajulu e Constantino & Gani. Além disso foi determinado o fator acêntrico de Pitzer e a pressão de sublimação das metilxantinas. Outra forma de obter valores de solubilidade do alcalóide no CO₂ supercrítico é utilizar correlações baseadas na densidade, como a proposta por Chrastil, e no fator de melhoramento, como propostas por Reid e Schmitt (1985) e Li et al. (1991).

VI.1. SOLUBILIDADES DOS ALCALÓIDES

Para correlacionar os dados de solubilidade do alcalóide no CO₂ supercrítico (y) considerou-se o equilíbrio termodinâmico entre as fases sólida e supercrítica que estabelece a igualdade das fugacidades nestas fases, para cada componente na mistura. Chega-se, então, à seguinte expressão para o cálculo de 'y' (McHugh e Krukoniš, 1987):

$$y_i = \frac{P_i^{\text{sub}}(T) \cdot \Phi_i^{\text{sub}}(T, P_i^{\text{sub}}) \cdot \exp \left[\int \left(\frac{v_i^{\text{OS}}}{RT} \right) dP \right]}{\Phi_i^{\text{SCF}} \cdot P} \quad [\text{VI.1}]$$

na qual $P_i^{\text{sub}}(T)$ é a pressão de sublimação do sólido puro numa dada temperatura, v_i^{OS} é o volume molar do sólido puro, $\phi_i^{\text{sub}}(T, P_i^{\text{sub}})$ é o coeficiente de fugacidade do sólido nas condições de T e P_i^{sub} , e $\phi_i^{\text{SCF}}(T, P)$ é o coeficiente de fugacidade do fluido supercrítico. Devido ao fato da pressão de sublimação do sólido ser muito pequena, assume-se que o $\Phi_i^{\text{sub}} \approx 1$ e, desta forma, a integral pode ser calculada nos limites de pressão de zero à pressão P. O volume do sólido é aproximadamente constante com a pressão, possibilitando, então, integrar e reescrever a equação [V.1] como:

$$y_i = \frac{P_i^{\text{sub}}(T) \cdot \exp \left(\frac{P \cdot v_i^{\text{OS}}}{RT} \right)}{\Phi_i^{\text{SCF}} \cdot P} \quad [\text{VI.2}]$$

Para o cálculo do coeficiente de fugacidade do alcalóide na fase supercrítica, foi usada a equação de Peng-Robinson (Peng & Robinson, 1976).

$$P = \left(\frac{RT}{V - b} \right) - \left[\frac{a(T)}{V(V + b) + b(V - b)} \right] \quad [\text{VI.3}]$$

na qual V é o volume molar, 'a' é o parâmetro atrativo que leva em consideração as interações entre as espécies numa mistura e 'b' é o parâmetro que representa a correção do volume, considerando as diferenças de tamanho entre as espécies numa mistura.

As regras de mistura são necessárias para o cálculo dos parâmetros ‘a’ e ‘b’ em função de sua composição (frações molares do soluto e do solvente), assim como a interação entre as espécies. As regras de mistura fornecem a correção dos efeitos causados pela presença de cada espécie numa mistura, através de uma equação de estado, nas variáveis termodinâmicas PVT. Nesta tese, três regras de mistura foram testadas. O primeiro modelo utiliza a regra de van der Waals, no qual os parâmetros, ‘a_m’ e ‘b_m’ são dados nas equações [VI.4] e [VI.8]. Esta regra de mistura é expressa como:

$$a = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N x_i x_j a_{ij} \quad [VI.4]$$

$$a_{ij} = (1 - k_{ij}) \sqrt{a_i \cdot a_j} \quad [VI.5]$$

na qual ‘a’ é o parâmetro energético da equação de estado, x_i é a fração molar, e k_{ij} é o parâmetro de interação binária que descreve o desvio da média geométrica dos componentes puros ‘i’ e ‘j’. O valor de k_{ij} pode ser estimado com uma regressão não linear de dados de equilíbrio experimental (especificamente para interações binárias entre componentes ‘i’ e ‘j’ numa mistura). O parâmetro volumétrico ‘b’ é obtido da expressão:

$$b = \sum_i^N \sum_j^N x_i x_j b_{ij} \quad [VI.6]$$

$$b_{ij} = (1 - \eta_{ij}) \left(\frac{b_i + b_j}{2} \right) \quad [VI.7]$$

na qual η_{ij} representa o parâmetro de ajuste do tamanho (obtida de dados de equilíbrio experimental). McHugh e Krukoni (1994) baseado nos dados experimentais afirmam que os parâmetros k_{ij} e η_{ij} apresentam valores absolutos menores que um; k_{ij}, geralmente, apresenta valores menores que 0,15, podendo ser negativo, o que indicaria a presença de interações químicas específicas na mistura, como a ligação de hidrogênio; η_{ij} pode ser positivo ou negativo, sendo ambos parâmetros de ajuste empírico. Segundo McHugh e Krukoni (1994) é necessária a regressão de mais dados experimentais para prever as tendências destes parâmetros, principalmente deste último.

Uma equação cúbica leva em conta as forças de dispersão entre os componentes da mistura, e não as forças químicas. Peng e Robinson (1976) assumiram $\eta_{ij} = 0$, o que reduz a equação [VI.7] a:

$$b = \sum_i^N x_i b_i \quad \text{[VI.8]}$$

k_{ij} e η_{ij} são usados quando os componentes na mistura binária diferem consideravelmente em estrutura, tamanho e polaridade, situação especificamente encontrada na modelagem de processos de extração com fluidos supercríticos.

O segundo modelo usa a equação de Panagiotopoulos & Reid (1986), que é uma modificação de Peng-Robinson e inclui um coeficiente de interação k_{ij} . A regra baseia-se nas interações entre as moléculas 'i' e 'j', resultando em duas situações: uma onde as moléculas 'i' estão rodeadas por moléculas tipo 'j' (diluição infinita do componente 'i') e outra onde a molécula 'j' é completamente cercada por moléculas 'i'. A interação i-j na condição termodinâmica intermediária de acordo de Panagiotopoulos & Reid é dada pela seguinte regra de mistura:

$$a_{ij} = \sqrt{a_i \cdot a_j} \cdot [1 - k_{ij} + (k_{ij} - k_{ji})x_i] \quad \text{[VI.9]}$$

Se $k_{ij} = k_{ji}$, a regra se reduz a sua forma original. Nas regras de mistura de Panagiotopoulos k_{ij} e k_{ji} são parâmetros de interação binária entre os componentes 'i' e 'j', e são determinados por minimização do erro entre os valores da pressão experimental e calculada.

O terceiro modelo considera a dependência da densidade nas regras de mistura, proposta por Mohamed & Holder (1987). Esta regra foi inspirada pela sugestão intuitiva em relação à dependência das interações moleculares em função da distância entre as moléculas,

a qual pode ser representada em função da densidade da mistura. O termo binário foi considerado como dependente da densidade pela relação:

$$k_{ij} = \alpha_{ij} + \beta_{ij} \cdot \rho \quad [\text{VI.10}]$$

e portanto, tem-se: $a = a^1 - c - d/v$, e,

$$a^1 = \sum_i \sum_j x_i x_j \sqrt{a_i \cdot a_j} \quad [\text{VI.11}]$$

$$c = \sum_i \sum_j x_i x_j \sqrt{a_i \cdot a_j} \cdot \alpha_{ij} \quad [\text{VI.12}]$$

$$d = \sum_i \sum_j x_i x_j \sqrt{a_i \cdot a_j} \cdot \beta_{ij} \quad [\text{VI.13}]$$

Com a dependência da densidade a equação chega a ser de quarta ordem em volume:

$$P = \frac{RT}{v-b} - \frac{a^1 - c - \frac{d}{v}}{v(v+b) + b(v-b)} \quad [\text{VI.14}]$$

A equação pode ser reduzida à equação original de Peng-Robinson quando $\beta_{ij} = d = c = 0$, e para componentes puros quando α_{ij} e β_{ij} desaparecem.

Os parâmetros para todas as regras de mistura foram obtidos a partir da minimização da função objetivo do desvio relativo médio entre a solubilidade calculada pelo modelo e a solubilidade experimental, descrita na equação VI.15:

$$\text{F. O.} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\frac{y_i^{\text{calculado}} - y_i^{\text{experimental}}}{y_i^{\text{experimental}}} \right)^2$$

[VI.15]

na qual N é o número de pontos experimentais.

VI.2. CÁLCULO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DAS METILXANTINAS PARA A MODELAGEM DO SISTEMA SÓLIDO/SCF

O cálculo da solubilidade da metilxantina no CO₂ supercrítico pode ser feito através de uma equação de estado, sendo necessária a predição de algumas das propriedades das metilxantinas como a pressão de sublimação, propriedades críticas e o fator acêntrico. A seguir apresenta-se a determinação da pressão de sublimação da cafeína, teofilina e teobromina, respectivamente.

VI.2.1. DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO DE SUBLIMAÇÃO DAS METILXANTINAS

A. PRESSÃO DE SUBLIMAÇÃO DA CAFEÍNA

As pressões de sublimação da cafeína a 313,2; 323,2; 338,2; 343,2 e 353,2 K foram calculadas anteriormente por Saldaña (1997) pela equação apresentada por Bothe & Cammenga (1979) e são apresentadas na Tabela VI.1.

$$\text{LogP}^{\text{sub}}(\text{Pa}) = -(A/T) + B \quad [\text{VI.16}]$$

Tabela VI.1. Pressão de sublimação da cafeína (Saldaña, 1997)

Temperatura (K)	Pressão de sublimação (bar)
313,2	3,74 x 10 ⁻⁹
323,2	1,39 x 10 ⁻⁸
338,2	8,66 x 10 ⁻⁸
343,2	1,54 x 10 ⁻⁷
353,2	0,46 x 10 ⁻⁶

B. PRESSÃO DE SUBLIMAÇÃO DAS DIMETILXANTINAS

Não foram encontrados na literatura disponível (Perry, 1999; CRC, 1991 e Prausnitz et al., 1986), dados de pressão de sublimação para a teofilina. Li et al. (1991) apresentam valores de pressão de vapor para a teobromina para as temperaturas de 333,2, 353,2 e 363,2 K. Portanto, para a obtenção das pressões de sublimação destas dimetilxantinas, foi necessário realizar uma estimativa através de métodos preditivos. A literatura apresenta muitas equações e correlações para estimar a pressão de vapor. Em geral, o cálculo da pressão de vapor requer informação de pelo menos três das seguintes propriedades: temperatura crítica, pressão crítica, calor de vaporização e/ou algum dado de pressão de vapor a uma temperatura de referência.

Grain (1990) propôs dois métodos para o cálculo da pressão de vapor: o primeiro método é utilizado para o cálculo da pressão de vapor de líquidos e têm como base a equação de Antoine, e o segundo método permite o cálculo da pressão de vapor de sólidos baseado na correlação modificada de Watson. Esta correlação é a mesma utilizada por Li et al. (1991) para determinação da pressão de sublimação da teobromina. Grain (1990) apresenta as pressões de vapor calculadas usando ambos os métodos e as compara com dados experimentais obtidos na literatura, conseguindo resultados satisfatórios. O segundo método, usado para estimar a pressão de sublimação de sólidos, foi utilizada para compostos como a anilina, o 4,6 dinitro-cresol, entre outros.

As equações que relacionam a pressão de vapor com a temperatura são comumente desenvolvidas a partir da equação de Clausius-Clapeyron (Grain, 1990), que é aplicada ao equilíbrio sólido-vapor:

$$\frac{d \ln P^{VP}}{dT} = \frac{\Delta H_V}{\Delta ZRT^2} \quad (\text{VI.17})$$

sendo P^{VP} a pressão de vapor (ou, no caso, de sublimação), ΔH_V o calor de vaporização ou sublimação, e ΔZ o fator de compressibilidade. De acordo com esta abordagem, considera-

se que $H_v = H_{\text{sub}}$ uma boa estimativa. Se essa equação for integrada assumindo-se que $\Delta H_v/\Delta Z$ é independente da temperatura, resultados pouco precisos de pressão de vapor serão obtidos. No caso de sólidos pouco voláteis, a pressão de vapor é muito baixa, então são necessários resultados que se encontrem, ao menos, na mesma ordem de magnitude do valor real. Se a dependência da temperatura de ΔH_v for adequadamente expressa, a integração dará melhores resultados. Uma correlação satisfatória é a modificação proposta por Watson em 1943:

$$\Delta H_v = \Delta H_{vb} \left(\frac{1 - T / T_c}{1 - T_b / T_c} \right)^m \quad (\text{VI.18})$$

em que T_b é a temperatura de ebulição, T_c é a temperatura crítica, 'm' é uma constante e ΔH_{vb} é o calor de vaporização na temperatura de ebulição. O calor de vaporização na temperatura de ebulição é calculado a partir da seguinte equação de Fishtine em 1963:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8,75 + R \ln T_b) \quad (\text{VI.19})$$

K_F é um valor tabelado, e leva em consideração os momentos de dipolo de moléculas polares e apolares. A teofilina e a teobromina se encaixam na classificação de compostos nitrogenados, como amina terciária. O valor tabelado de K_F para essa classificação é 1,01. Na equação VI.18, a aproximação $T_c \approx 3 T_b/2$ pode ser usada, resultando em:

$$\Delta H_v \approx \Delta H_{vb} (3 - 2T_{\rho b})^m \quad (\text{VI.20})$$

e $T_{\rho b} = T/T_b$. Com isso, a integração de VI.17, por partes, resulta em:

$$\ln P^{vp} \approx - \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b} \left[\left(\frac{(3 - 2T_{\rho b})^m}{T_{\rho b}} + 2m(3 - 2T_{\rho b})^{m-1} \ln T_{\rho b} \right) \right]_1^{T_{\rho b}} - 4m(m-1) \int_1^{T_{\rho b}} (3 - 2T_{\rho b})^{m-2} \ln T_{\rho b} dT_{\rho b} \quad (\text{V.21})$$

Precisão suficiente é alcançada se o termo integral em VI.21 é desprezado, resultando na seguinte equação:

$$\ln P^{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b RT_b} \left[\left(1 - \frac{(3 - 2T_{pb})^m}{T_{pb}} - 2m(3 - 2T_{pb})^{m-1} \ln T_{pb} \right) \right] \quad (\text{VI.22})$$

Assume-se que $\Delta Z_b = 0,97$. O valor de ‘m’ depende do estado físico e da temperatura de interesse. Para todos os líquidos, $m = 0,19$. No caso de sólidos como a teobromina e a teofilina, os valores são:

$$T_{pb} > 0,6; m = 0,36$$

$$0,6 > T_{pb} > 0,5; m = 0,8$$

$$T_{pb} < 0,5; m = 1,19$$

B.1. Cálculo da pressão de sublimação da teobromina

Tomando-se em consideração a temperatura de ebulição (750,8 K) dada por Li et al. (1991) e utilizando as equações acima descritas por Grain (1990), calculam-se as pressões de sublimação a temperaturas de 313,2; 323,2; 338,2; 343,2 e 353,2 K.

Para a temperatura de 313,2 K tem-se:

(1) $K_F = 1,01$ – valor apresentado por Grain (1990) para uma amina terciária.

(2) $T_{pb} = T/T_b = 0,42$

(3) $m = 1,19$ para m sólido.

(4) Da eq. VI.19:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8,75 + R \ln T_b) = 1,01(8,75 + 1,987 \ln 750,8 \text{ K}) = 22,125 \text{ cal/mol K}$$

(5) Da eq. VI.22: Sabendo-se que $\Delta Z_b = 0,97$

$$\ln P^{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b RT_b} \left[\left(1 - \frac{(3 - 2T_{pb})^m}{T_{pb}} - 2m(3 - 2T_{pb})^{m-1} \ln T_{pb} \right) \right]$$

$$\ln P^{vp} = 22,125/(0,97)(1,987)[1-(3-2x0,42)^{1,19}/0,42 - 2x1,19 (3-2x0,42)^{1,19-1} \ln 0,42]$$

$$P^{vp} = 1,69 \times 10^{-13} \text{ bar}$$

Para a temperatura de 323,2 K e usando os mesmos parâmetros (1), (3) e (4). Tem-se que a $T_{pb} = 0,43$. Usando (5) resulta a $P^{vp} = 7,812 \times 10^{-13}$ bar. A Tabela VI.2 mostra os valores para as diversas temperaturas do sistema.

Os valores de pressão de sublimação relatados na Tabela VI.2 estão em concordância com os valores apresentados por Li et al (1991) para temperaturas de 333,2; 353,2 e 368,2 K ($0,15 \times 10^{-11}$; $0,5 \times 10^{-10}$ e $0,57 \times 10^{-9}$, respectivamente).

Tabela VI.2. Pressão de sublimação da teobromina

Temperatura (K)	T_{pb}	Pressão de sublimação (bar)
313,2	0,42	$1,69 \times 10^{-13}$
323,2	0,43	$0,78 \times 10^{-12}$
338,2	0,45	$1,30 \times 10^{-11}$
343,2	0,46	$3,22 \times 10^{-11}$
353,2	0,47	$1,59 \times 10^{-10}$

B.2. Cálculo da pressão de sublimação da teofilina

Não foi encontrada a temperatura de ebulição na literatura disponível (Perry, 1999 e CRC, 1991), a qual foi determinada pelo método de contribuição de grupos de Joback (Reid et al., 1988), resultando em um valor de 737,2 K. As pressões de sublimação foram estimadas as temperaturas de 313,2; 323,2; 338,2; 343,2 e 353,2 K, utilizando as equações descritas anteriormente para o caso da teobromina por Grain (1990).

Para a temperatura de 313,2 K temos:

(1) Da Tabela apresentada por Grain (1990) temos: $K_F = 1,01$

(2) $T_{\rho b} = T/T_b = 0,42$

(3) $m = 1,19$

(4) Da eq. VI.19:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8,75 + R \ln T_b) = 1,01(8,75 + 1,987 \ln 737,21 \text{ K}) = 22,089 \text{ cal/mol K}$$

(6) Da eq. VI.22: Sabendo que $\Delta Z_b = 0,97$

$$\ln P^{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b RT_b} \left[\left(1 - \frac{(3 - 2T_{\rho b})^m}{T_{\rho b}} - 2m(3 - 2T_{\rho b})^{m-1} \ln T_{\rho b} \right) \right]$$

$$\ln P^{vp} = 22,089 / (0,97)(1,987) [1 - (3 - 2 \times 0,42)^{1,19} / 0,42 - 2 \times 1,19 (3 - 2 \times 0,42)^{1,19-1} \ln 0,42]$$

$$P^{vp} = 1,77 \times 10^{-13} \text{ bar}$$

Para a seguinte temperatura de 323,2 K e usando os mesmos parâmetros (1), (3) e (4). Temos que a $T_{pb} = 0,44$. Usando (5) resulta a $P^{vp} = 3,46 \times 10^{-12}$ bar. A Tabela VI.3 mostra os valores para as diversas temperaturas do sistema.

Tabela VI.3. Pressão de sublimação da teofilina

Temperatura (K)	$T_{\rho b}$	Pressão de sublimação (bar)
313,2	0,42	$1,77 \times 10^{-13}$
323,2	0,44	$3,46 \times 10^{-12}$
338,2	0,46	$4,89 \times 10^{-11}$
343,2	0,47	$1,65 \times 10^{-10}$
353,2	0,48	$0,52 \times 10^{-9}$

A Tabela VI.4 apresenta as pressões de sublimação para as três metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina).

Tabela VI.4. Pressão de sublimação das metilxantinas (bar)

Temperatura (K)	Cafeína (Saldaña, 1997)	Teofilina	Teobromina
313,2	$3,74 \times 10^{-9}$	$1,77 \times 10^{-13}$	$1,69 \times 10^{-13}$
323,2	$1,39 \times 10^{-8}$	$3,46 \times 10^{-12}$	$0,78 \times 10^{-12}$
338,2	$8,66 \times 10^{-8}$	$4,89 \times 10^{-11}$	$1,30 \times 10^{-11}$
343,2	$1,54 \times 10^{-7}$	$1,65 \times 10^{-10}$	$3,22 \times 10^{-11}$
353,2	$0,46 \times 10^{-6}$	$0,52 \times 10^{-9}$	$1,59 \times 10^{-10}$

A pressão de vapor tende a aumentar a medida que a temperatura de ebulição diminui. Isto é verificado nos compostos cafeína, teofilina e teobromina. Para as temperaturas de ebulição a ordem crescente é cafeína, teofilina e teobromina, enquanto que para a pressão de sublimação a ordem crescente resulta ser inversa (teobromina, teofilina e cafeína). Estes valores encontrados estão em concordância com a literatura (Li et al., 1991 e Johannsen e Bruner, 1994).

VI.2.2. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES CRÍTICAS DAS METILXANTINAS

Para estimar as propriedades críticas utilizaram-se quatro correlações disponíveis na literatura: a correlação de Twu (1984), o método de contribuição de grupos de Joback (Reid et al., 1988), o procedimento de estimativa de constantes críticas de Somayajulu (1989) e o método de Constantinou & Gani (1994).

No método de Joback, Constantinou & Gani e no procedimento de Somayajulu, é preciso conhecer a estrutura da molécula do composto (que é dividida em grupos) (Figura II.1), assim como o seu ponto de ebulição (Tabela II.2). As propriedades críticas são encontradas pela soma das 'temperaturas críticas, pressões críticas ou outras propriedades dos grupos'. Por outro lado, a relação de Twu precisa da temperatura de ebulição mostrada no capítulo II. Estas correlações são descritas a seguir:

i) Primeira Correlação de Twu: Para o cálculo das propriedades críticas utilizam-se as seguintes expressões (Twu, 1984):

* Para a Temperatura Crítica: (T_c)

$$T^{\circ}c = T_b (0,533272 + 0,191017 \times 10^{-3} \times T_b + 0,779681 \times 10^{-7} \times T_b^2 - 0,284376 \times 10^{-10} T_b^3 + 0,959468 \times 10^{28}/T_b^{13})^{-1}$$

* Para o Volume Crítico: (V_c)

$$V^{\circ}c = [1 - (0,419869 - 0,505839 \times \& - 1,56436 \times \&^3 - 9481,70 \times \&^{14})]^{-8}$$

* Para a Pressão Crítica: (P_c)

$$P^{\circ}c = (3,83354 + 1,19629 \&^{1/2} + 34,8888 \& + 36,1952 \&^2 + 104,193 \&^4)^2$$

ii) Segunda Correlação de Twu: Esta correlação tenta melhorar a precisão considerando parâmetros de ajuste (Twu, 1984).

$$T_c = T_c^{\circ} [(1+2f_T)/(1-2f_T)]^2$$

$$V_c = V_c^{\circ} [(1+2f_V)/(1-2f_V)]^2$$

$$P_c = P_c^{\circ} (T_c/T_c^{\circ})(V_c^{\circ}/V_c) [(1+2f_P)/(1-2f_P)]^2$$

iii) Modificação de Joback: Para estimar as propriedades críticas, com o método de contribuição de grupos de Joback é necessário conhecer primeiro o número de átomos envolvidos no composto, em seguida saber a separação adequada dos grupos para a quantificação e soma de suas propriedades individuais que resultaram no total da propriedade requerida, como mostrado na Tabela VI.6 (Reid et al., 1988). Para o caso específico da cafeína, Saldaña (1997) encontrou seis grupos, sendo que a molécula de cafeína esta formada por 24 átomos: $n_A = 8+10+4+2 = 24$

Este método prediz também outras propriedades como a temperatura de ebulição, temperatura de fusão, entalpia e outros. A temperatura crítica, pressão crítica e volume crítico são expressas por:

** Temperatura Crítica: (Tc)*

$$T_c = T_b [0,584 + 0,965 \cdot \sum \Delta T - (\sum \Delta T)^2]^{-1}$$

** Pressão Crítica: (Pc)*

$$P_c = (0,113 + 0,0032 n_A - \sum \Delta P)^{-2}$$

** Volume Crítico: (Vc)*

$$V_c = 17,5 + \sum \Delta V$$

Para o cálculo da temperatura de ebulição da teofilina usou-se a tabela de contribuição de grupos de Joback e a fórmula seguinte: $T_b = 198 + \sum T_b$. Em que T_b (K), resultando para a teofilina $T_b = 737,2$ K.

Tabela VI.5. Determinação das propriedades críticas da cafeína pelo método de Joback (Saldaña, 1997)

GRUPOS	Nº	Tc	Pc	Vc	Tb
-CH ₃ (não anel)	3	0,0141	-0,0012	65	23,58
-N- (anel)	3	0,013	0,0114	29	52,82
>C=O (anel)	2	0,0284	0,0028	55	94,97
>C= (anel)	2	0,0143	0,0008	32	31,01
=CH-(anel)	1	0,0082	0,0011	41	26,73
-N= (anel)	1	0,0085	0,0076	34	57,55
Total		0,1834	0,0465	531	565,44

Nota. -N- (anel) foi usado como >NH- (anel)

Tabela VI.6. Determinação das propriedades críticas da teofilina pelo método de Joback.

GRUPOS	Nº	Tc	Pc	Vc	Tb
-CH ₃ (não anel)	2	0,0141	-0,0012	65	23,58
-N- (anel)	2	0,013	0,0114	29	52,82
>C=O (anel)	2	0,0284	0,0028	55	94,97
>C= (anel)	2	0,0143	0,0008	32	31,01
=CH-(anel)	1	0,0082	0,0011	41	26,73
-N= (anel)	1	0,0085	0,0076	34	57,55
>NH (não anel)	1	0,0295	0,0077	35	50,17
Total		0,1834	0,0465	472	539,21

Nota. -N- (anel) foi usado como >NH- (anel)

Tabela VI.7. Determinação das propriedades críticas da teobromina pelo método de Joback.

GRUPOS	Nº	Tc	Pc	Vc	Tb
-CH ₃ (não anel)	2	0,0141	-0,0012	65	23,58
-N- (anel)	2	0,013	0,0114	29	52,82
>C=O (anel)	2	0,0284	0,0028	55	94,97
>C= (anel)	2	0,0143	0,0008	32	31,01
=CH-(anel)	1	0,0082	0,0011	41	26,73
-N= (anel)	1	0,0085	0,0076	34	57,55
>NH (não anel)	1	0,0295	0,0077	35	50,17
Total		0,1858	0,044	472	539,21

Nota. -N- (anel) foi usado como >N- (anel)

iv) *Método de Raam Somayajulu:* Este método, ao igual que o método de contribuição de grupos de Joback, apresenta uma extensa tabela de grupos funcionais predizendo melhor as propriedades críticas de diversas funções (Somayajulu, 1989). Na Tabela VI.9 apresentamos os grupos presentes na cafeína e seus respectivos valores (Saldaña, 1997).

Usando as fórmulas apresentadas a seguir:

$$G_t = T_b / (T_c - T_b) = a_t + b_t \cdot N_t \quad (a)$$

em que as constantes a_t e b_t são 1,242 e 0,138, respectivamente.

Para a Pressão Crítica:

$$G_p = (M/P_c)^{1/2} = a_p + b_p \cdot N_p \quad (b)$$

em que: $a_p = 0,339$ e $b_p = 0,226$

Tabela VI.8. Estimativa das propriedades críticas da cafeína pelo método de Somayajulu (Saldaña, 1997)

Grupos	Nº	n_t	n_p	n_v
-CH ₃	3	1,000	1,000	1,000
>CO (anel)	2	3,300	1,540	1,100
>C= (anel)	2	0,542	0,681	0,653
>N- (anel)	3	0,050	0,260	0,580
-N= (geral)	1	0,542	0,355	0,580
=CH- (anel)	1	0,542	0,681	0,672
Total		11,918	9,258	9,498

Tabela VI.9. Estimativa das propriedades críticas da teofilina pelo método de Somayajulu.

Grupos	Nº	n_t	n_p	n_v
-CH ₃	2	1,000	1,000	1,000
>CO (anel)	2	3,300	1,540	1,100
>C= (anel)	2	0,542	0,681	0,653
>N- (anel)	2	0,050	0,260	0,580
-N= (geral)	1	0,542	0,355	0,580
=CH- (anel)	1	0,542	0,681	0,672
-NH- (anel)	1	1,000	0,26	0,58
Total		11,868	8,258	8,498

Tabela VI.10. Estimativa das propriedades críticas da teobromina pelo método de Somayajulu.

Grupos	Nº	n _t	n _p	n _v
-CH ₃	2	1,000	1,000	1,000
>CO (anel)	2	3,300	1,540	1,100
>C= (anel)	2	0,542	0,681	0,653
>N- (anel)	2	0,050	0,260	0,580
-N= (geral)	1	0,542	0,355	0,580
=CH- (anel)	1	0,542	0,681	0,672
-NH- (anel)	1	1,000	0,260	0,580
Total		11,868	8,258	8,498

v) *Método de Constantinou & Gani*: Este método preditivo é muito usado para estimar propriedades críticas (T_c , P_c , V_c), sendo considerado de maior precisão devido à separação dos parâmetros em dois grupos, fornecendo mais informações sobre a estrutura molecular da substância (Constantinou e Gani, 1994).

As expressões são:

$$f(x) = \sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j \quad (A)$$

Na função, o primeiro termo é de primeira ordem e o outro de Segunda ordem.

* *Temperatura Crítica: (T_c)*

$$\exp\left(\frac{T_c}{t_{co}}\right) = \sum_i N_i t_{cli} + \sum_j M_j t_{c2j} \quad (a)$$

* *Pressão Crítica: (P_c)*

$$(P_c - p_{cl})^{-0,5} - p_{c2} = \sum_i N_i p_{cli} + \sum_j M_j p_{c2j} \quad (b)$$

* *Volume Crítico: (V_c)*

$$V_c - v_{co} = \sum_i N_i v_{cli} + \sum_j M_j v_{c2j} \quad (c)$$

* Ponto de Ebulição Normal: (T_b)

$$\exp\left(\frac{T_b}{t_{bo}}\right) = \sum_i N_i t_{bi} + \sum_j M_j t_{bj} \quad (d)$$

Tabela VI.11. Propriedades críticas encontradas para a cafeína pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani (Saldaña, 1997)

Grupos de 1º Ordem	Nº	T _c	P _c	V _c	T _b
C=C	1	11,3764	0,002044	0,07618	1,8881
CHNH	1	7,2121	-0,000462	0,09165	1,5780
CH ₃ N	1	7,6924	0,015874	0,12598	2,1647
CON(CH ₃) ₂	2	36,1403	0,040149	0,25031	7,6904
-CH ₃	2	1,6781	0,019904	0,07504	0,8894
Grupos de 2º Ordem	Nº	T _c	P _c	V _c	T _b
5 membros	1	-0,6785	0,000424	-0,00866	0,1919
6 membros	1	0,8479	0,002257	0,01636	0,1957
C=O	2	2,9571	0,003818	-0,01966	0,5580
CH _{cic=0} NH ₀ CH _{cic=1}	1	2,1345	-0,005947	-0,01380	0,2499

Tabela VI.12. Propriedades críticas encontradas para a teofilina pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani.

Grupos de 1º Ordem	Nº	T _c	P _c	V _c	T _b
C=C	1	11,3764	0,002044	0,07618	1,8881
CON(CH ₃) ₂	2	36,1403	0,040149	0,25031	7,6904
-CH ₃	2	1,6781	0,019904	0,07504	0,8894
CHNH	1	7,2121	-0,000462	0,09165	1,5780
*CNCH ₂	1	20,3781	0,036133	0,15831	5,0525
Grupos de 2º Ordem	Nº	T _c	P _c	V _c	T _b
5 membros	1	-0,6785	0,000424	-0,00866	0,1919
6 membros	1	0,8479	0,002257	0,01636	0,1957
C=O (cíclico)	2	2,9571	0,003818	-0,01966	0,5580
CH _{cic=0} NH ₀ CH _{cic=1} CH _{cic=0} NH ₁ CH _{cic=1}	2	2,1345	-0,005947	-0,01380	0,2499

T_c = 864,48K

P_c = 33,34 bar

T_b = 650,52 K

Tabela VI.13. Propriedades críticas encontradas para a teobromina pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani

Grupos de 1º Ordem	Nº	T _c	P _c	V _c	T _b
C=C	1	11,3764	0,002044	0,07618	1,8881
CH ₃ N	1	7.6924	0.015874	0.12598	2.1647
CON(CH ₃) ₂	1	36,1403	0,040149	0,25031	7,6904
-CH ₃	1	1,6781	0,019904	0,07504	0,8894
CHNH	1	7,2121	-0,000462	0,09165	1,5780
*CONH ₂	1	65.1053	0.004266	0.14431	10.3428
Grupos de 2º Ordem	Nº	T _c	P _c	V _c	T _b
5 membros	1	-0,6785	0,000424	-0,00866	0,1919
6 membros	1	0,8479	0,002257	0,01636	0,1957
C=O (cíclico)	2	2,9571	0,003818	-0,01966	0,5580
CH _{cic.=0} NH _o CH _{cic.=1}	1	2,1345	-0,005947	-0,01380	0,2499

T_c = 887,23K

P_c = 47,93 bar

T_b = 654 K

Tabela VI.14. Propriedades das purinas encontradas pelo uso do método de Constantinou e Gani (1994)

Propriedade	Cafeína (Saldaña, 1997)	Teofilina	Teobromina
T _c (K)	840,00	864,48	887,23
P _c (bar)	39,22	33,34	47,93
T _b (K)	622,00	650,52	654,00
ω	0,24	0,39	0,91

Os quatro métodos apresentam diferenças, sendo que a cafeína pode ser tratada pelos 4 métodos enquanto que a teofilina e a teobromina apresentam problemas pela presença do mesmo número de átomos e mesma conformação, portanto, para este último caso não se recomendam os métodos de Joback (Reid et al., 1988) e o de Somayajulu (1989).

Para a temperatura crítica da cafeína, observa-se que a correlação de Joback, o método de Somayajulu e o método de Constantinou & Gani apresentam valores mais próximos. Para a pressão crítica, o método de Somayajulu, a 2º correlação de Twu e o

método de Constantinou & Gani apresentam menor diferença como pode ser observada na Tabela VI.15.

Tabela VI.15. Propriedades críticas encontradas para a cafeína pelo uso de diferentes correlações (Saldaña, 1997).

Propriedade Crítica	1º Correlação de Twu	2º Correlação de Twu	Correlação de Joback	Método de Somayajulu	Método de Constantinou e Gani
Tc (K)	777,63	912,63	863,69	845,82	840,00
Pc (bar)	10,69	28,29	48,69	32,85	39,22

No caso da teofilina só pode ser usado o método de Constantinou e Gani (1994) pela falta da temperatura de ebulição. No entanto, os valores resultam ser muito menor aos estimados pela 2º correlação de Twu e correlação de Joback. Para a Pc a 2º correlação de Twu resulta ser mais coerente.

Tabela VI.16. Propriedades críticas encontradas para a teofilina pelo uso de diferentes correlações.

Propriedade Crítica	1º Correlação de Twu	2º Correlação de Twu	Correlação de Joback	Método de Somayajulu	Método de Constantinou e Gani
Tc (K)	859,63	1016,99	1011,57	993,20	864,48
Pc (bar)	6,84	23,55	53,91	37,05	33,34

Para a teobromina observaram-se valores similares para a temperatura crítica, usando a 2º correlação de Twu e a correlação de Joback. Para a pressão crítica a 2º correlação de Twu é mais coerente.

Tabela VI.17. Propriedades críticas encontradas para a teobromina pelo uso de diferentes correlações.

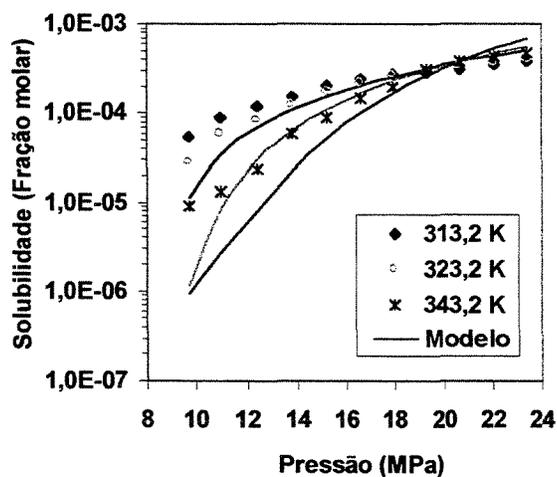
Propriedade Crítica	1º Correlação de Twu	2º Correlação de Twu	Correlação de Joback	Método de Somayajulu	Método de Constantinou e Gani
Tc (K)	869,35	1036,77	1030,22	1011,51	887,23
Pc (bar)	6,46	22,37	53,91	37,05	47,93

VI.3. SISTEMA METILXANTINA PURA/CO₂ SUPERCRÍTICO USANDO A EQUAÇÃO CÚBICA DE PENG-ROBINSON COM A REGRA DE MISTURA DE VAN DER WAALS

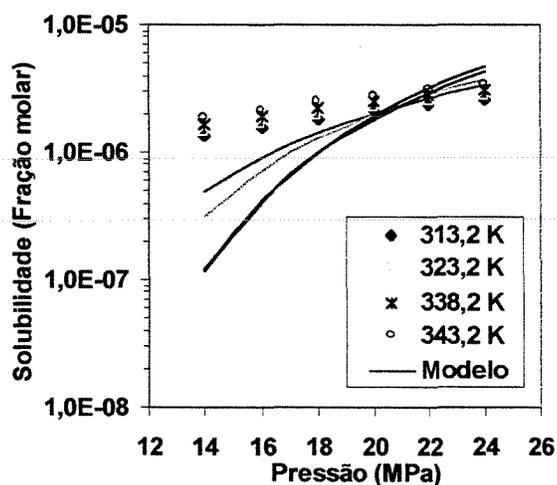
A Figura VI.1 mostra as correlações dos dados de sistemas cafeína pura/CO₂, teofilina pura/CO₂ e teobromina pura/CO₂ supercrítico, respectivamente, utilizando a equação cúbica de Peng-Robinson com a regra de mistura de van der Waals para representar o comportamento volumétrico a diferentes temperaturas e pressões.

As regras de mistura são empregadas para prever as propriedades termodinâmicas de uma mistura de componentes. Diferentes regras de mistura são usadas para diferentes sistemas, considerando as peculiaridades de cada um, como por exemplo, interações moleculares, que por sua vez podem ser dependentes da distância entre as moléculas.

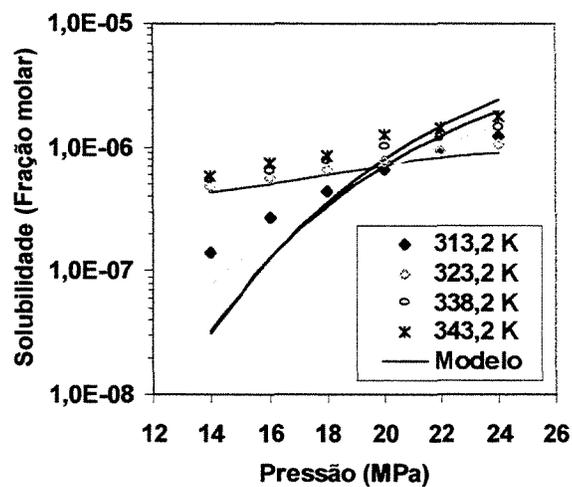
A solubilidade do alcalóide no CO₂ supercrítico foi calculada usando as propriedades críticas preditas por cinco métodos propostos por diferentes pesquisadores (Apêndice B). O método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani (1994) apresentaram bons resultados para o cálculo das propriedades críticas das metilxantinas. Este método apresentou concordância com os dados de solubilidade experimental uma vez que ele forneceu maior informação sobre a estrutura molecular da substância para o cálculo da propriedade. As propriedades críticas encontradas pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani (1994) foi usado para os sistemas de cafeína/CO₂, teofilina/CO₂ e teobromina pura/CO₂. A uma temperatura de 313,2 K, o desvio relativo médio calculado pela equação [VI.14] e o parâmetro de interação binária (k_{ij}) foram de 14,2% e -0,16; 12,9% e -0,31; e 15,0% e -0,14, respectivamente, para os sistemas cafeína/CO₂, teofilina/CO₂ e teobromina pura/CO₂, respectivamente.



(A)



(B)



(C)

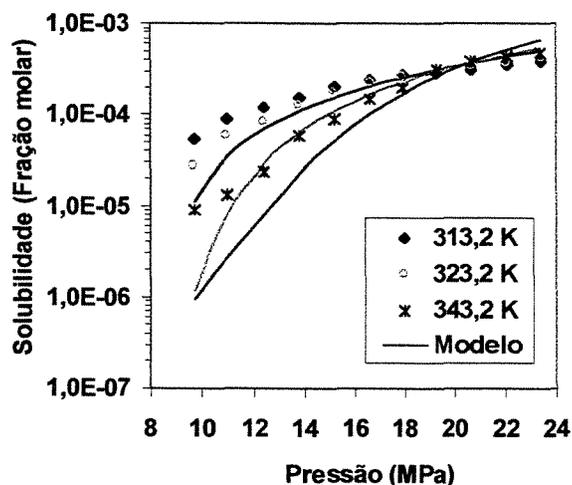
Figura VI.1. Ajuste dos dados experimentais dos sistemas: (A) cafeína pura/ CO_2 , (B) teofilina pura/ CO_2 , e (C) teobromina pura/ CO_2 supercrítico, respectivamente, com a regra de mistura de van der Waals a diferentes temperaturas e pressões.

Visando melhorar as correlações de solubilidade das metilxantinas no CO₂ supercrítico, subseqüentemente, foi utilizada a mesma equação cúbica de Peng-Robinson com a regra de mistura de Panagiotopoulos & Reid.

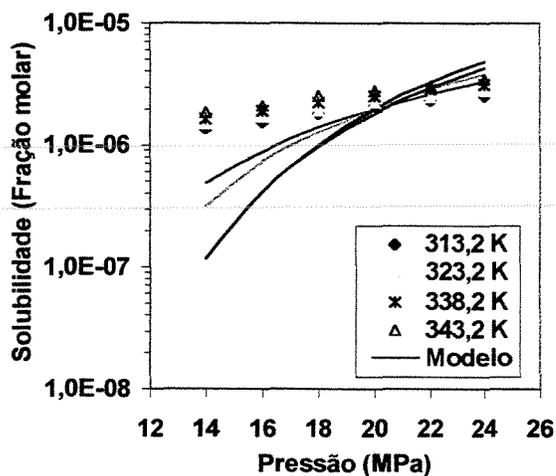
VI.4. SISTEMA METILXANTINA PURA/CO₂ SUPERCRÍTICO USANDO A EQUAÇÃO CÚBICA DE PENG-ROBINSON COM A REGRA DE MISTURA DE PANAGIOTOPOULOS & REID

Na Figura VI.2, os dados dos sistemas cafeína pura/CO₂, teofilina pura/CO₂ e teobromina pura/CO₂ supercrítico foram correlacionados utilizando a mesma equação cúbica de Peng-Robinson com a regra de mistura de Panagiotopoulos & Reid. Observa-se que os pontos experimentais melhoraram muito pouco em comparação à regra de mistura de van der Waals (Figura VI.1).

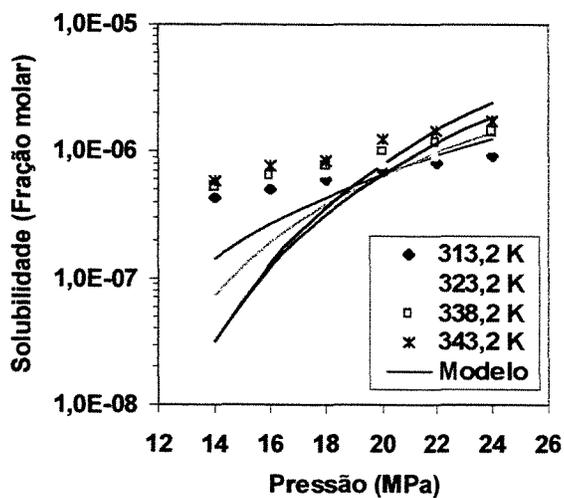
Para o sistema cafeína/CO₂ supercrítico, as propriedades críticas foram calculadas pelo método de Constantinou e Gani (1994), encontrando-se um erro quadrático de 13,3% e parâmetros de interação binária (k_{ij}) de -0,16 e (k_{ji}) de 0,56 a 313,2 K. No sistema teofilina pura/CO₂ as propriedades críticas foram encontradas pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani (1994), resultando num desvio relativo médio de 12,9% e parâmetros de interação binária (k_{ij}) de -0,40 e (k_{ji}) de -0,31 a 313,2 K. Enquanto que para o sistema teobromina pura/CO₂ as propriedades críticas foram calculadas pelo método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani (1994), com desvio relativo médio de 15% e parâmetros de interação binária (k_{ij}) de 0,56 e (k_{ji}) de -0,14 a 313,2 K.



(A)



(B)



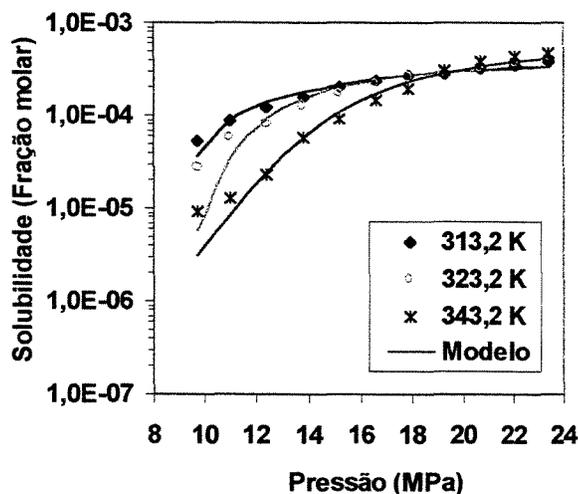
(C)

Figura VI.2. Ajuste dos dados experimentais dos sistemas binários: (A) cafeína pura/ CO_2 , (B) teofilina pura/ CO_2 , e (C) teobromina pura/ CO_2 supercrítico, com a regra de mistura de Panagiotopoulos & Reid.

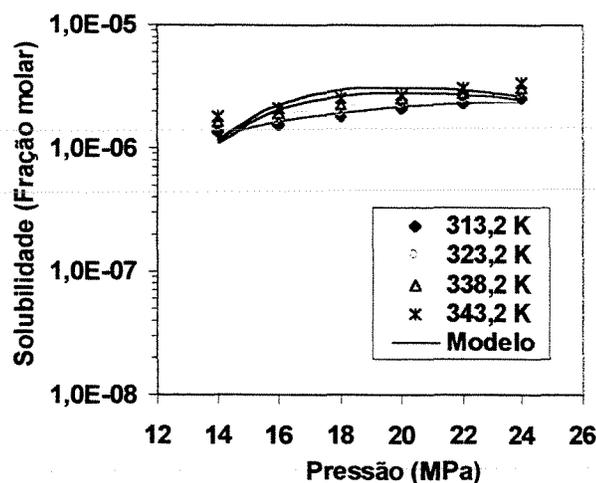
Observa-se que os modelos para a metilxantina/CO₂ que usam tanto a regra de mistura de van der Waals (Figura VI.1) como a regra de mistura de Panagiotopoulos & Reid (Figuras VI.2) não correlacionaram de maneira efetiva os dados experimentais obtidos. Visando a melhora do modelo foi usada uma terceira regra de mistura de Mohamed e Holder (1987).

VI.5. SISTEMA METILXANTINA PURA/CO₂ SUPERCRÍTICO USANDO A EQUAÇÃO DE QUARTA ORDEM COM A REGRA DE MISTURA DE MOHAMED E HOLDER

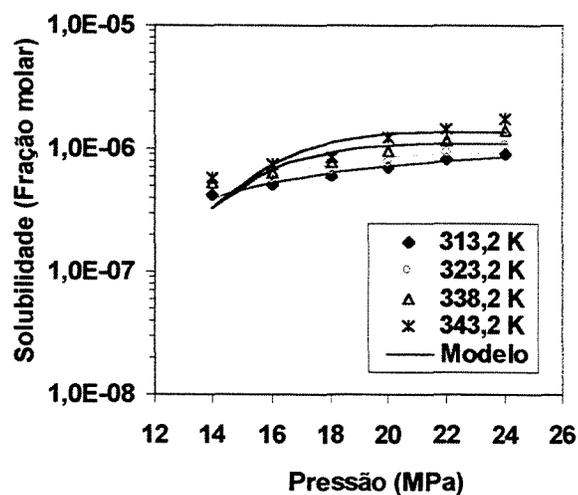
Nas isotermas da Figura VI.3 para os sistemas cafeína pura/CO₂, teofilina pura/CO₂ e teobromina pura/CO₂ supercrítico, observa-se que a curva ajustada tem melhor concordância a pressões altas. Para pressões baixas, o ajuste apresenta uma apreciável diferença com os dados experimentais. Para o sistema cafeína/CO₂, os dados correlacionados pelo modelo de quarta ordem com a regra de mistura de Mohamed e Holder e as propriedades críticas encontradas pelo método de Constantinou e Gani (1994) apresentam um desvio relativo médio de 1,4%, com parâmetros de interação binária de k_{ij} igual a -0,41 e η_{ij} de 30,18 a 313,2 K. Os dados correlacionados do sistema teofilina/CO₂ pelo modelo apresentam um desvio relativo médio de 0,34% com parâmetros de interação binária k_{ij} de -0,64 e η_{ij} de 38,69, utilizando-se as propriedades críticas pelo método de Constantinou e Gani (1994). Entretanto, o modelo teobromina pura/CO₂ a 313,2 K, utilizando-se as propriedades críticas encontradas pelo método de Constantinou e Gani (1994) apresenta um desvio relativo médio de 0,28%, com parâmetros de interação binária k_{ij} de -0,50 e η_{ij} de 42,39. A diferença do modelo em relação aos dados experimentais é maior a temperaturas altas de 323,2; 338,2 e 343,2 K.



(A)



(B)



(C)

Figura VI.3. Correlação das solubilidades dos sistemas binários: (A) cafeína/ CO_2 , (B) teofilina/ CO_2 , e (C) teobromina pura/ CO_2 supercrítica, utilizando as regras de mistura de Mohamed & Holder.

A porcentagem do desvio relativo médio obtido com o uso de equações cúbicas e regras de misturas de van der Waals (Peng & Robinson, 1976) e Panagiotopoulos & Reid (1987) são comparados com as equações de quarta ordem usando as regras de misturas de Mohamed & Holder (1987), para os sistemas cafeína pura/CO₂, teofilina pura/CO₂ e teobromina pura/CO₂ supercrítico mostrados nas Tabelas VI.18, VI.19 e VI.20, respectivamente. Observa-se que o modelo de Peng-Robinson de quarta ordem apresenta erros muito menores aos outros, sendo satisfatório para todos os sistemas de metilxantina/CO₂. Este modelo também correlacionou com êxito os dados de solubilidade do colesterol puro em CO₂ e na mistura de CO₂/etano supercrítico (Saldaña et al., 1997; 1999).

Tabela VI.18. Sistema cafeína pura/CO₂ supercrítico a 313,2 K usando as propriedades críticas de Constantinou e Gani (1994).

Equação	Regras de Mistura	Função objetivo (%)
Peng-Robinson Cúbica	van der Waals (Peng-Robinson, 1976)	14,2
Peng-Robinson Cúbica	Panagiotopoulos & Reid. (1987)	13,3
Peng-Robinson de Quarta Ordem	Mohamed & Holder (1987)	1,4

Tabela V.19. Sistema teofilina pura/CO₂ supercrítico a 313,2 K usando as propriedades críticas de Constantinou e Gani (1994).

Equação	Regras de Mistura	Função objetivo (%)
Peng-Robinson Cúbica	van der Waals (Peng-Robinson, 1976)	1,62
Peng-Robinson Cúbica	Panagiotopoulos & Reid. (1987)	1,62
Peng-Robinson de Quarta Ordem	Mohamed & Holder (1987)	0,73

Tabela V.20. Sistema teobromina pura/CO₂ supercrítico a 313,2 K usando o método de contribuição de grupos de Constantinou e Gani (1994).

Equação	Regras de Mistura	Função objetivo (%)
Peng-Robinson Cúbica	van der Waals (Peng-Robinson, 1976)	15,02
Peng-Robinson Cúbica	Panagiotopoulos & Reid. (1987)	15,00
Peng-Robinson de Quarta Ordem	Mohamed & Holder (1987)	0,28

VI.6. CORRELAÇÃO DE SOLUBILIDADES DE SOLUTOS EM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Os modelos baseados na densidade para sistemas binários são uma outra forma de correlacionar dados experimentais. Li et al. (1992) e Gurdial et al. (1989) realizaram comparações de modelos baseados na densidade na correlação de solubilidade de uma ampla variedade de solutos orgânicos de diferentes polaridades em CO₂ supercrítico. Neste trabalho, serão discutidas as aplicabilidades destes modelos baseados na densidade.

VI.6.1. Solubilidade usando a equação de Chrastil: $\log c$ vs $\log \rho$

Baseado no ponto de vista de associação, Chrastil (1982) derivou uma relação logarítmica entre a concentração do soluto (c , g/L) e a densidade do fluido supercrítico (ρ , em g/L).

De acordo com o ponto de vista da associação, num caso ideal, uma molécula de um soluto A pode-se associar com k moléculas de solvente B, formando uma molécula complexa de solvato AB_k , a qual se encontra em equilíbrio no seu meio. Por isso, a lei de ação de massas pode ser usada para calcular a concentração de equilíbrio.



[VI.15]

$$K = [AB_k]/([A] [B]^k) \quad [VI.16]$$

$$\ln [AB_k] = \ln K + \ln [A] + k \ln [B] \quad [VI.17]$$

em que [A] é a concentração do vapor molar do soluto, [B] é a concentração molar do gás e [AB_k] é a concentração molar do soluto no gás. K é a constante de equilíbrio, a qual pode ser representada como:

$$\ln K = \left(\frac{\Delta H_{\text{solv}}}{RT} \right) + q_s \quad [VI.18]$$

em que ΔH_{solv} é o calor de solvatação e q_s é uma constante. Da equação aproximada de Clausius-Clapeyron, a concentração de vapor do soluto [A] pode ser escrita como:

$$\ln [A] = \left(\frac{\Delta H_{\text{vap}}}{RT} \right) + q_v \quad [VI.19]$$

em que ΔH_{vap} é o calor de vaporização do soluto e q_v é uma constante. Quando as unidades da concentração e da densidade do gás são expressos em g/L, então:

$$[B] = \rho/M_1 \quad [VI.20]$$

$$e [AB_k] = \frac{c}{(M_2 + kM_1)} \quad [VI.21]$$

em que c é a concentração do soluto no gás (g/L), ρ é a densidade do gás (g/L), M_1 e M_2 são as massas molares do solvente gasoso e do soluto, respectivamente. Desde que [A] é muito menor que [AB_k], combinando as equações VI.18 a VI.21 temos VI.22:

$$c(g/L) = \rho^k \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad [VI.22]$$

Esta equação VI.22 relaciona a concentração do soluto diretamente á densidade do solvente e inversamente a temperatura do sistema. Uma expressão equivalente é derivada por Gurdial et al. (1989) quando c é expresso como fração molar:

$$c(\text{fração molar}) = \rho^{k+1} (M_2/M_1) \exp(a/T+b) \quad [VI.23]$$

ou

$$\log c = (k+1) \log \rho + (\log (M_2/M_1) + a/T + b) \quad [VI.24]$$

em que:

$$a = (\Delta H_{\text{solv}} + \Delta H_{\text{vap}})/R \quad [\text{VI.25}]$$

$$b = \ln (M_2 + k M_1) + q_s + q_v - k \ln M_1 \quad [\text{VI.26}]$$

em que 'a' é uma constante que depende do calor total de solvatação. As constantes 'a' e 'b' podem ser determinadas das interseções das isotermas.

A equação VI.24 sugere o gráfico do $\log c$ vs $\log \rho$, que mostra linhas retas e quase paralelas a diferentes temperaturas acima de uma faixa ampla de densidades. As Figuras VI.4, VI.5 e VI.6 representam os sistemas cafeína/ CO_2 , teofilina/ CO_2 e teobromina/ CO_2 , a inclinação $(k+1)$ e suas interseções são reportadas nas Tabelas VI.21, VI.22 e VI.23. Pode-se observar que a linearidade é boa para o sistema cafeína/ CO_2 (com coeficiente de regressão de $R > 0,97$). Para o sistema teofilina/ CO_2 , é ainda bom ($R > 0,93$) e não tão boa para o sistema teobromina/ CO_2 ($R > 0,90$). No entanto, o fato de que a inclinação das isotermas de solubilidade do sistema cafeína/ CO_2 diminuem com aumento da temperatura a 343,2 K indica que as constantes de associação k são função da temperatura como indicados por Wells et al. (1990). Também se observa que existe uma maior associação a temperaturas menores na qual o parâmetro k é maior. As linhas para os sistemas teofilina/ CO_2 e teobromina/ CO_2 são quase paralelas e o valor de k é menor que o apresentado pela cafeína/ CO_2 , sugerindo que a teofilina e teobromina não se associam tão bem como a cafeína com o CO_2 para formar um complexo de solvatação de cafeína com CO_2 . Gurdial et al. (1989) encontrou que somente compostos de baixa polaridade apresentam isotermas de solubilidade paralelas e lineares. Portanto, à medida que a polaridade do soluto aumenta, as linhas são menos paralelas. Os momentos de dipolo da cafeína, teofilina e teobromina são aproximadamente 3,83; 3,13 e 3,11 Debye, respectivamente, indicando que suas polaridades são grandes.

Tabela VI.21. Constantes de associação k e interseção para a cafeína/ CO_2 determinado pela equação VI.24.

Temperatura (K)	Inclinação (k+1)	Interseção	R (coef. de regressão)
313,2	5,55	-19,70	0,97
323,2	4,01	-15,10	0,98
343,2	4,49	-16,10	0,97

Tabela VI.22. Constantes de associação k e interseção para a teofilina no CO_2 determinado pela equação VI.24.

Temperatura (K)	Inclinação (k+1)	Interseção	R (coef. de regressão)
313,2	3,97	-17,30	0,96
323,2	2,25	-12,15	0,93
328,2	1,45	-9,70	0,96
343,2	1,27	-9,10	0,96

Tabela VI.23. Constantes de associação k e interseção para a teobromina/ CO_2 determinado pela equação VI.24.

Temperatura (K)	Inclinação (k+1)	Interseção	R (coef. de regressão)
313,2	4,62	-19,70	0,96
323,2	2,79	-14,15	0,90
328,2	2,22	-12,30	0,92
343,2	2,24	-12,22	0,93

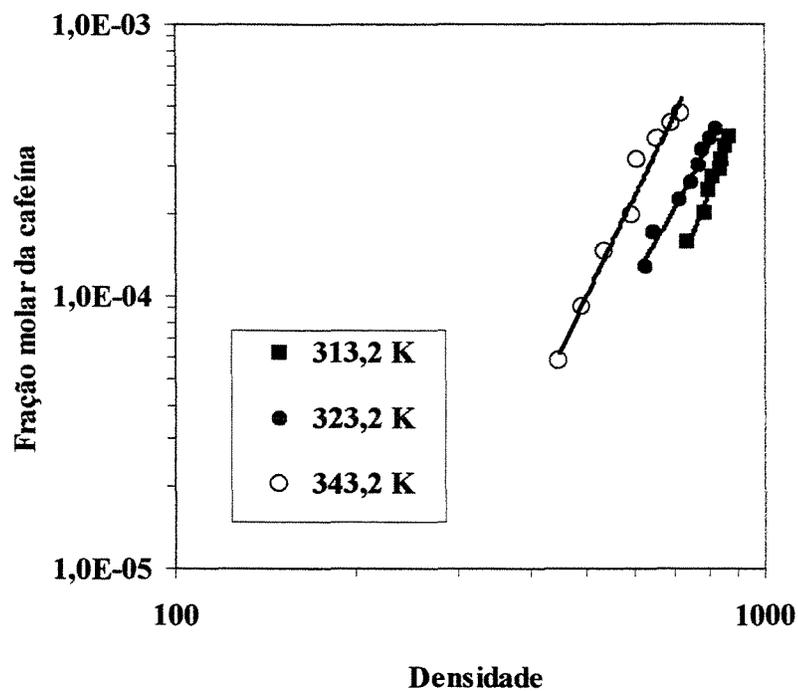


Figura VI.4. Correlação log-log para a solubilidade da cafeína no CO₂ com a densidade.

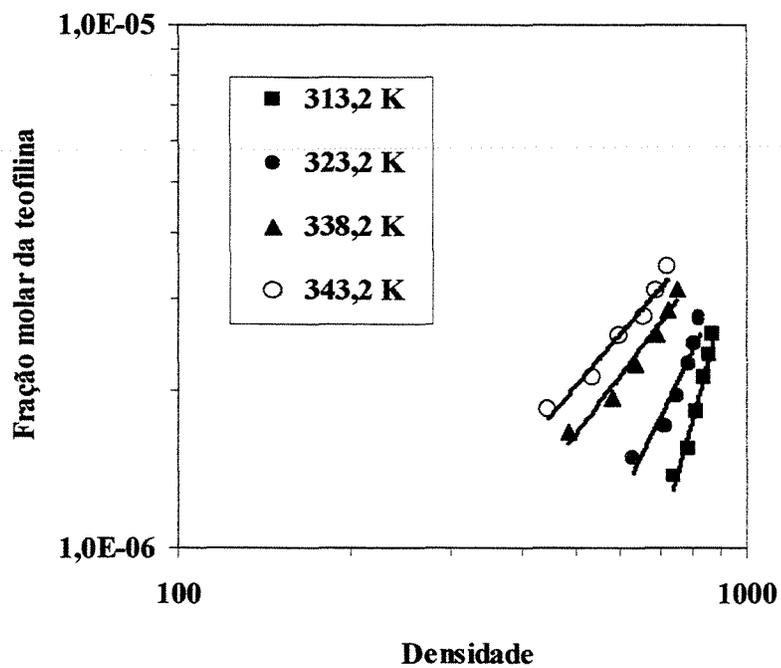


Figura VI.5. Correlação log-log para a solubilidade da teofilina no CO₂ com a densidade.

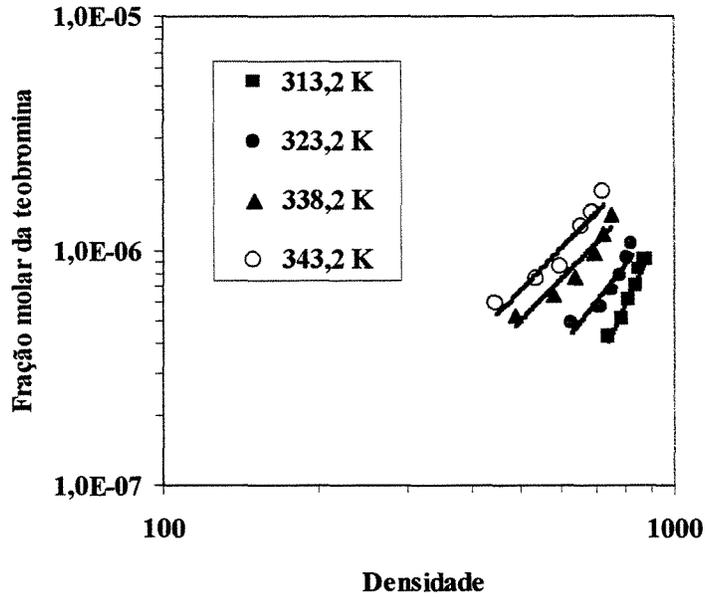


Figura VI.6. Correlação log-log para a solubilidade da teobromina no CO₂ com a densidade.

Observou-se que os parâmetros k e as constantes do termo exponencial da equação VI.22 não podem ser generalizados para as diferentes condições, já que a equação não se ajusta bem à faixa toda de temperatura. Optou-se, então, em obtê-la na forma de temperatura constante. Simplificando o termo da equação VI.22, e considerando a concentração, C , como a solubilidade, S , dentro da exponencial tem-se:

$$S = \rho^k \exp(A) \quad \text{[VI.27]}$$

na qual A é o parâmetro que depende apenas da temperatura. Pelos gráficos $\log \rho$ versus $\log S$ é possível determinar os parâmetros k e A como mostrados nas Tabelas VI.24, VI.25 e VI.26, em função da temperatura.

Tabela VI.24. Parâmetros da equação de Chrastil em função da temperatura para a cafeína.

Temperatura (K)	k	A	R^2
313,2	6,68	-38,89	0,98
323,2	5,08	-38,32	0,99
343,2	5,59	-37,48	0,98

Tabela VI.25. Parâmetros da equação de Chrastil em função da temperatura para a teofilina.

Temperatura (K)	k	A	R ²
313,2	5,09	-26,73	0,98
323,2	3,36	-26,29	0,97
338,2	2,12	-25,60	0,99
343,2	1,93	-25,31	0,99

Tabela VI.26. Parâmetros da equação de Chrastil em função da temperatura para a teobromina.

Temperatura (K)	k	A	R ²
313,2	5,77	-1,29	0,97
323,2	4,02	-1,52	0,94
338,2	3,35	-1,97	0,96
343,2	3,35	-2,14	0,97
353,2	2,98	-2,52	0,99

As Figuras VI.7, VI.8 e VI.9 mostram o ajuste dos dados da solubilidade da cafeína, teofilina e teobromina pura, respectivamente.

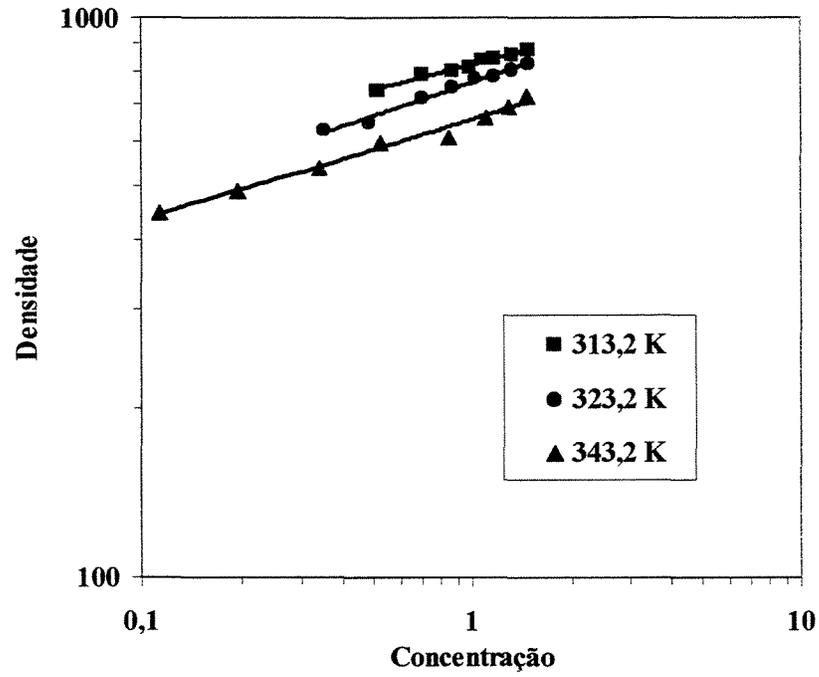


Figura VI.7. Solubilidade da cafeína pura pela equação de Chrastil com dados experimentais

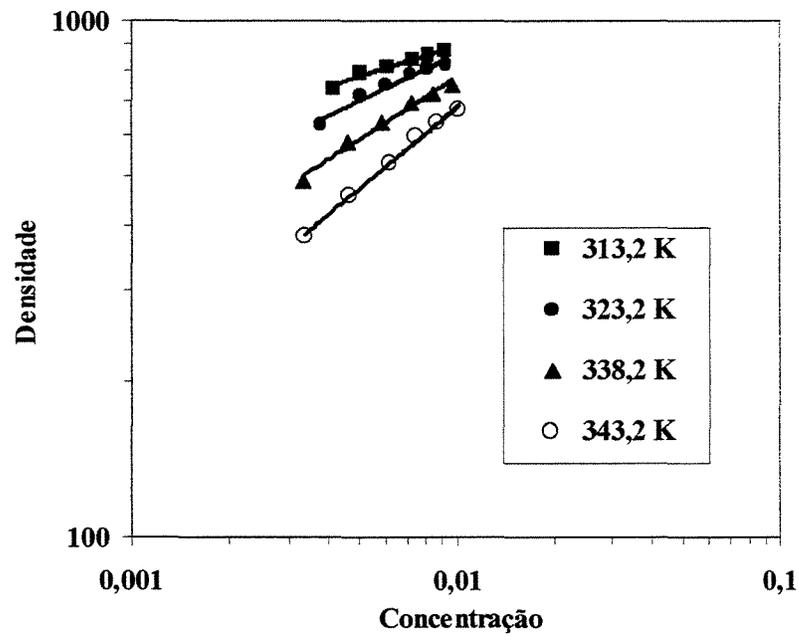


Figura VI.8. Correlação das solubilidades no sistema binário (teofilina/CO₂) utilizando a equação de Chrastil.

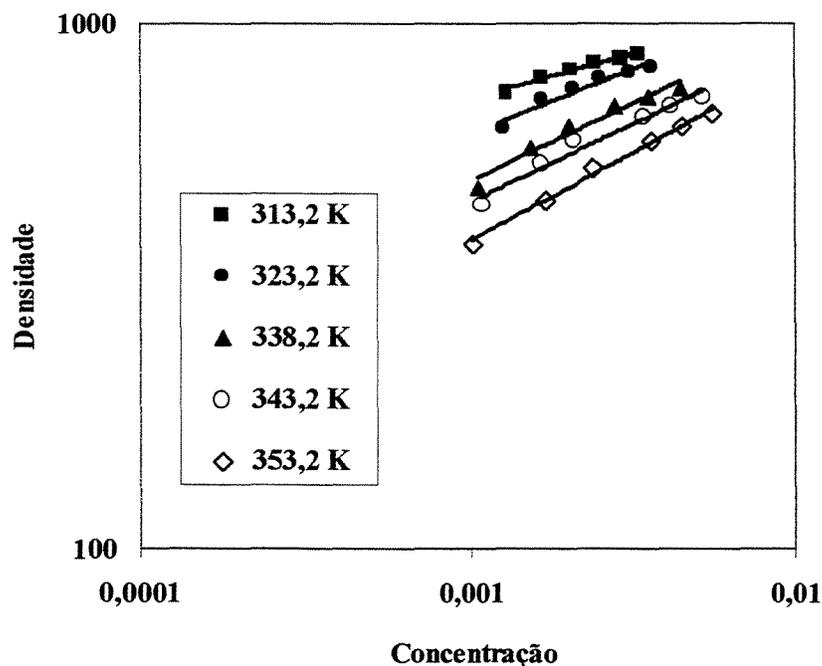


Figura VI.9. Correlação das solubilidades no sistema binário (teobromina/CO₂) utilizando a equação de Chrastil.

Foram plotados também o parâmetro k em função da temperatura e A em função do inverso da temperatura, tanto para a cafeína (Figura VI.10), quanto para as dimetilxantinas, teobromina (Figura VI.11) e teofilina (Figura VI.12). Este procedimento foi adotado para obter um melhor ajuste aos dados de solubilidade, introduzindo modificações na equação original de Chrastil (eq. VI.22), onde T e A não são funções de temperatura.

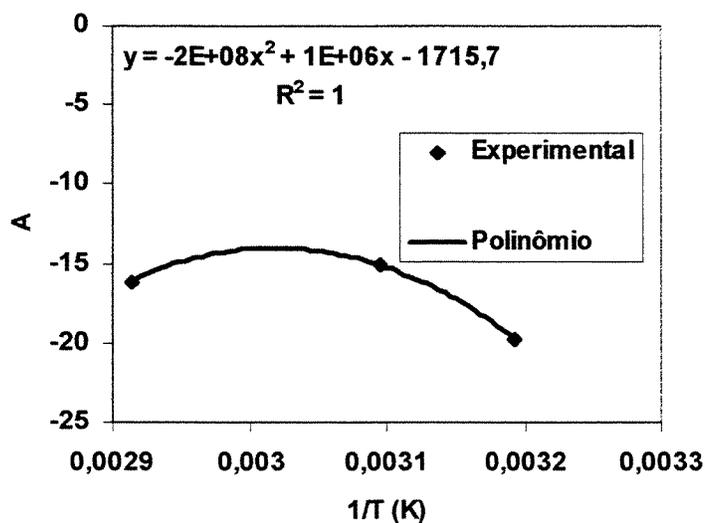
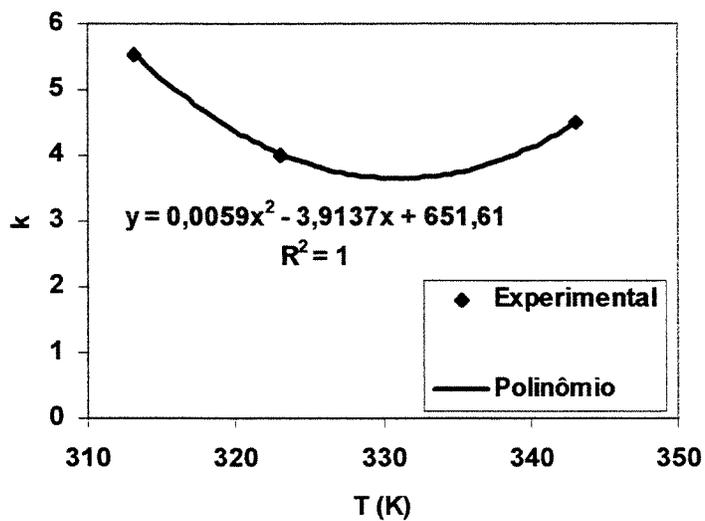


Figura VI.10. Relação entre os parâmetros k vs T e A vs $1/T$ para a cafeína/ CO_2 utilizando a equação de Chrastil.

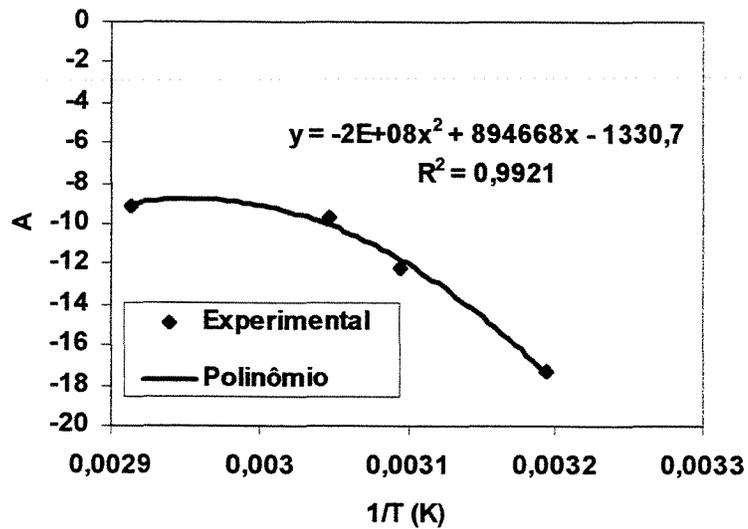
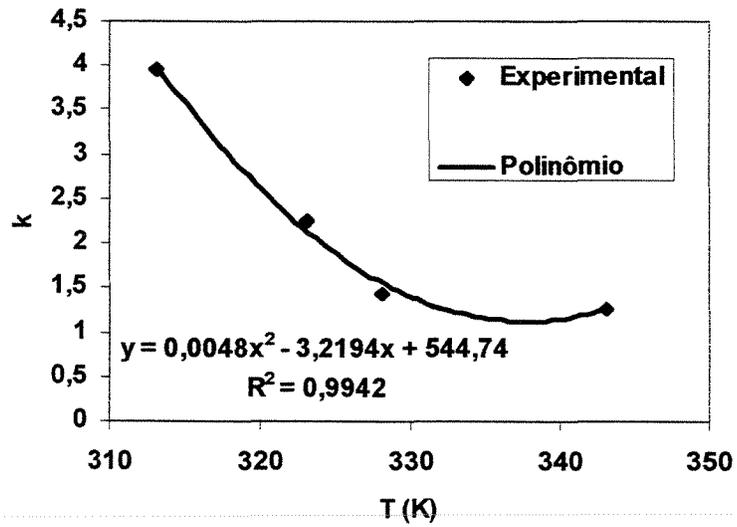


Figura VI.11. Relação entre os parâmetros k vs T e A vs $1/T$ para a teofilina/ CO_2 utilizando a equação de Chrastil.

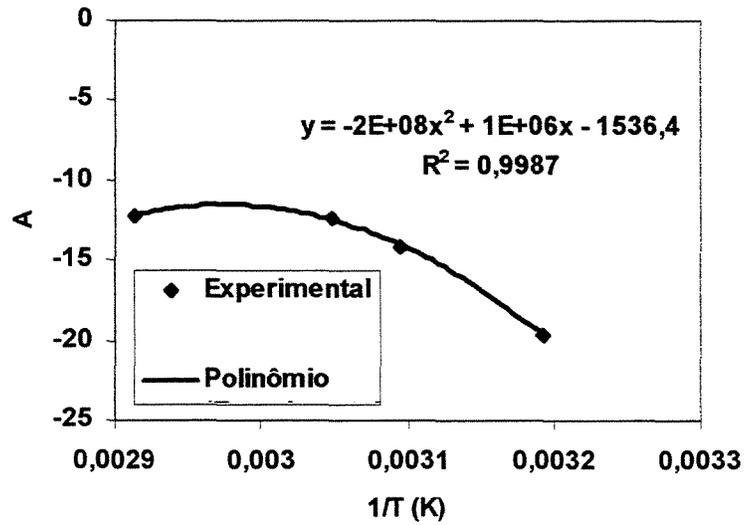
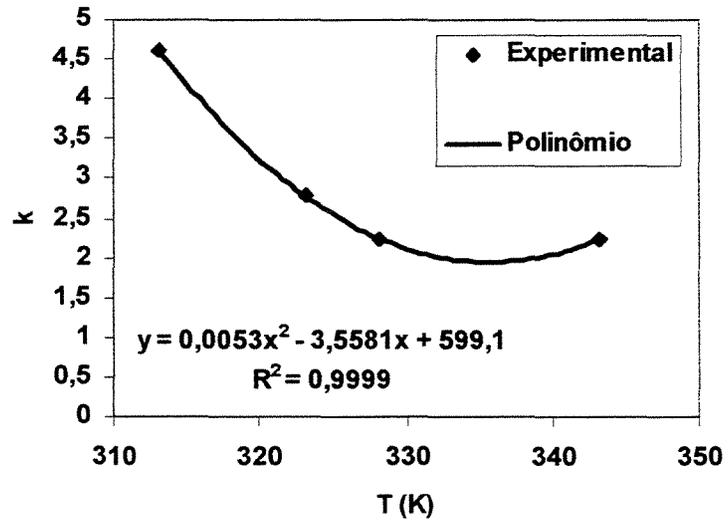


Figura VI.12. Relação entre os parâmetros k vs T e A vs $1/T$ para a teobromina/ CO_2 utilizando a equação de Chrastil.

Com esta abordagem, espera-se que o ajuste melhore com relação ao ajuste da equação original de Chrastil (eq. VI.22). Esta equação de Chrastil pode também ser modificada numa segunda abordagem, considerando o parâmetro k uma função quadrática da temperatura que depende da densidade, como no termo que depende da pressão de vapor. A equação resulta:

$$S = \rho^{(a_1 T^2 + b_1 T + c_1)} \exp\left(\frac{a_2}{T^2} + \frac{b_2}{T} + c_2\right) \quad [\text{VI.28}]$$

onde S é a solubilidade do soluto no fluido, dado em g soluto/L solução, ρ é a densidade do fluido dado em g/L, T é a temperatura do sistema em K, os parâmetros a_1 , b_1 , c_1 , a_2 , b_2 e c_2 são determinados por ajuste da equação aos dados experimentais de solubilidade. Numa segunda abordagem foi considerado o parâmetro k uma função quadrática com a temperatura e o parâmetro A uma função quadrática do inverso da temperatura tem:

$$k = a_1 T^2 + b_1 T + c_1 \quad [\text{VI.29}]$$

e

$$A = a_2/T^2 + b_2/T + c_2 \quad [\text{VI.30}]$$

Os parâmetros a_1 , b_1 , c_1 , a_2 , b_2 e c_2 foram ajustados através dos parâmetros k e A obtidos fazendo o ajuste para a solubilidade das metilxantinas em todas as condições de temperatura e pressão. Com esta abordagem o ajuste melhorou em relação ao ajuste da equação original de Chrastil.

VI.7. Log E vs correlação da ρ

Outra abordagem sugerida por Li et al. (1992) pode ser usada em função do fator de melhoramento e da densidade. A partir da seguinte equação:

$$y_i = \left(\frac{P_i^{sub}}{P}\right) \cdot E \quad [\text{VI.31}]$$

Esta equação pode ser rescrita da seguinte forma:

$$E = \frac{y_2}{\left(\frac{P^{sub}}{P}\right)} \quad [VI.32]$$

Desta equação, o fator de melhoramento pode ser considerado como uma proporção da solubilidade de equilíbrio observada (y_2) com respeito à solubilidade ideal no gás ($y_2=P^{sub}/P$). Os fatores de melhoramento para a cafeína, teofilina e teobromina no CO₂ a diferentes pressões e temperaturas estão mostrados nas Tabelas VI.27, VI.28 e VI.29, onde a pressão de sublimação para a cafeína foi calculada de acordo com a equação de Bothe e Cammenga (1979) e para a teofilina e teobromina pelo método de Watson (1982).

Uma correlação puramente empírica de log E vs ρ é dada por Reid e Schmitt (1985) e esta baseada na observação do gráfico de log E vs densidade do solvente puro, os que mostram tendências lineares e paralelas. A correlação é dada por:

$$\log E = \alpha\rho_r + \beta + \sigma (T-T_{ref}) \quad [VI.33]$$

na qual α e β representam a inclinação e a interseção a uma temperatura de referência $T=T_{ref}$ e σ é uma constante isotérmica que pode ser determinada do gráfico log E vs temperatura a uma densidade de solvente reduzida determinada.

Tabela VI.27. Fator de melhoramento para o sistema caféina/CO₂

Temperatura (K)	Pressão (bar)	Densidade (g/L)	Fração molar x 10 ⁻⁴	Fator de melhoramento
313,2	13,8	740,70	1,562	5,80E+06
	15,2	791,04	2,012	8,23E+06
	16,6	800,00	2,457	1,10E+07
	17,9	815,89	2,725	1,31E+07
	19,3	840,77	2,893	1,50E+07
	20,7	845,01	3,163	1,76E+07
	22,1	857,24	3,537	2,10E+07
	23,4	873,70	3,871	2,44E+07
323,2	13,8	629,71	1,269	1,26E+06
	15,2	649,10	1,706	1,87E+06
	16,6	715,13	2,233	2,68E+06
	17,9	750,21	2,621	3,39E+06
	19,3	775,53	2,988	4,16E+06
	20,7	785,31	3,418	5,11E+06
	22,1	806,02	3,752	5,99E+06
	23,4	826,70	4,085	6,90E+06
343,2	13,8	447,72	0,576	5,20E+04
	15,2	490,20	0,903	8,98E+04
	16,6	536,67	1,449	1,57E+05
	17,9	598,71	1,987	2,33E+05
	19,3	610,00	3,152	3,98E+05
	20,7	660,78	3,783	5,12E+05
	22,1	692,80	4,288	6,20E+05
	23,4	724,76	4,637	7,10E+05

Tabela VI.28. Fator de melhoramento para o sistema teofilina/CO₂

Temperatura (K)	Pressão (bar)	Densidade (g/L)	Fração molar x 10 ⁻⁵	Fator de melhoramento
313,2	14	740,70	0,1363	1,08E+09
	16	791,04	0,1555	1,41 E+09
	18	815,89	0,183	1,86 E+09
	20	840,77	0,2115	2,39 E+09
	22	857,24	0,2345	2,91 E+09
	24	873,70	0,257	3,48 E+09
323,2	14	629,71	0,148	5,99E+07
	16	715,13	0,171	7,91E+07
	18	750,21	0,195	1,01E+08
	20	785,31	0,224	1,29E+08
	22	806,02	0,246	1,56E+08
	24	826,70	0,275	1,91E+08
338,2	14	487,28	0,167	4,78E+06
	16	580,35	0,1935	6,33E+06
	18	636,72	0,224	8,25E+06
	20	693,11	0,2555	1,04E+07
	22	722,09	0,286	1,29E+07
	24	751,02	0,313	1,54E+07
343,2	14	447,72	0,1847	1,57E+06
	16	536,67	0,2115	2,05E+06
	18	598,71	0,2545	2,78E+06
	20	660,78	0,277	3,36E+06
	22	692,80	0,3093	4,12E+06
	24	724,76	0,345	5,02E+06

Tabela VI.29. Fator de melhoramento para o sistema teobromina/CO₂

Temperatura (K)	Pressão (bar)	Densidade (g/L)	Fração molar x 10 ⁻⁶	Fator de melhoramento
313,2	14	740,70	0,43	3,56E+08
	16	791,04	0,51	4,83E+08
	18	815,89	0,61	6,50E+08
	20	840,77	0,7	8,28E+08
	22	857,24	0,82	1,07E+09
	24	873,70	0,91	1,29E+09
323,2	14	629,71	0,49	8,79E+07
	16	715,13	0,57	1,17E+08
	18	750,21	0,67	1,55E+08
	20	785,31	0,78	2,00E+08
	22	806,02	0,93	2,62E+08
	24	826,70	1,06	3,26E+08
338,2	14	487,28	0,53	5,71E+06
	16	580,35	0,65	8,00E+06
	18	636,72	0,77	1,07E+07
	20	693,11	0,98	1,51E+07
	22	722,09	1,18	2,00E+07
	24	751,02	1,43	2,64E+07
343,2	14	447,72	0,59	2,57E+06
	16	536,67	0,76	3,78E+06
	18	598,71	0,85	4,75E+06
	20	660,78	1,25	7,76E+06
	22	692,80	1,45	9,91E+06
	24	724,76	1,76	1,31E+07

Na Figura VI.13, são mostrados os gráfico de log E vs densidade do solvente para o sistema cafeína/CO₂, no qual os dados regredidos são tomados para $\rho > 447$ (g/L). Pode ser visto que as isotermas de solubilidades a 313,2; 323,2 e 343,2 K são quase paralelas. No entanto, alguns desvios ocorrem como mostrados nesta Figura.

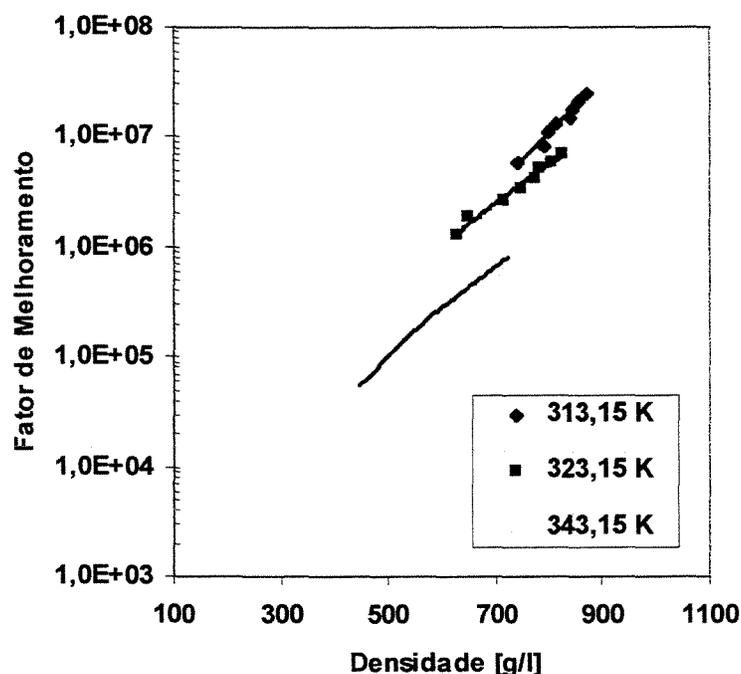


Figura VI.13. Correlação semi-log para a solubilidade do fator de melhoramento da cafeína no CO₂ com os dados de densidade, a partir de densidades do solvente de 447 g/L.

Os gráficos para o sistema teobromina/CO₂ são mostrados na Figura VI.14. Pode ser observado que a solubilidade das isotermas a 313,2 e 323,2 K são quase paralelas assim como as isotermas a 328,2 e 343,2 K, as quais se desviam das anteriores. As observações empíricas de Schmitt e Reid (1985) são limitadas não só a poucas substâncias orgânicas não polares mas também a uma pequena faixa de temperatura e densidade de solvente. Eles não correlacionam satisfatoriamente esses solutos os quais apresentam uma polaridade alta ou uma faixa ampla de temperaturas e densidades.

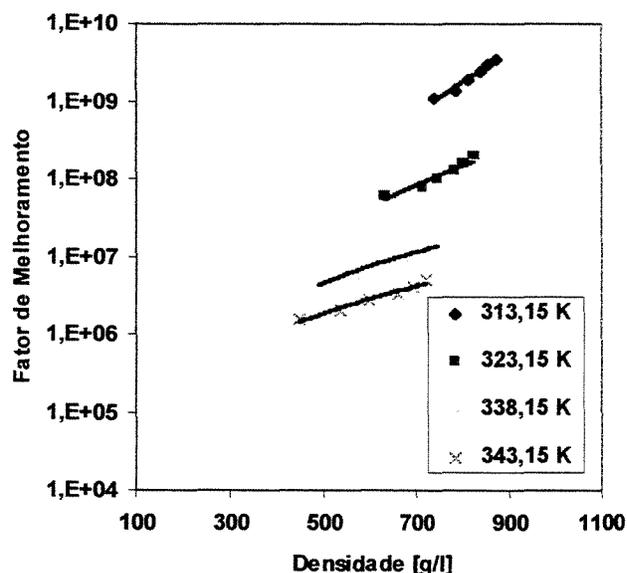


Figura VI.14. Correlação semi-log para a solubilidade do fator de melhoramento da teofilina no CO_2 com os dados de densidade, a partir de densidade do solvente de 447 g/L.

Se $\log c$ vs densidade é plotado para o sistema binário teobromina/ CO_2 , um conjunto de linhas paralelas podem também ser obtidas (Figura VI.32). Este comportamento é muito similar ao apresentado para o sistema teofilina/ CO_2 mais não para o sistema cafeína/ CO_2 . Isto indica que a aplicabilidade de uma correlação puramente empírica semi-log depende do sistema selecionado.

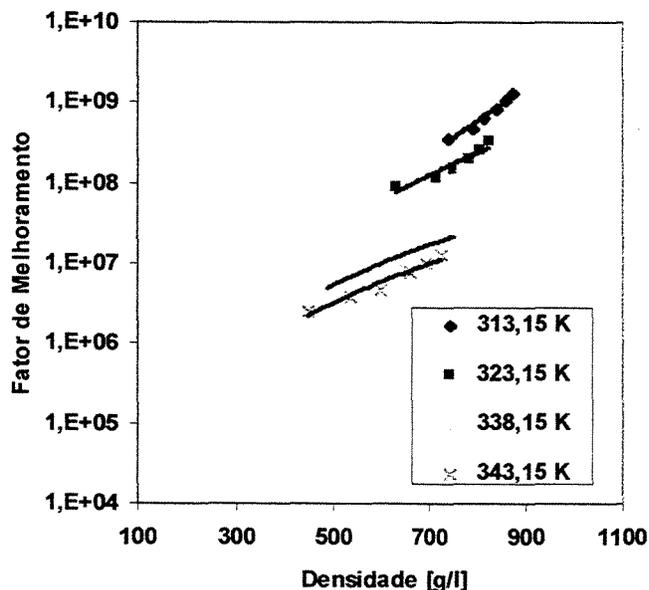


Figura VI.15. Correlação semi-log para a solubilidade do fator de melhoramento da teobromina no CO_2 com os dados de densidade, a partir de densidade de 447 g/L.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

VII.1. CONCLUSÕES

- Pelos dados experimentais obtidos nesta tese de Doutorado, dos sistemas binários: cafeína/CO₂ supercrítico, teobromina/CO₂ supercrítico e teofilina/CO₂ supercrítico, podemos concluir que as solubilidades da cafeína no dióxido de carbono supercrítico são maiores que as da teofilina e são aproximadamente duas ordens de magnitude maiores que as da teobromina. De acordo com a literatura, o comportamento ideal das metilxantinas em líquidos a 25°C indica que a cafeína é mais solúvel que a teofilina e ambas são uma ordem de magnitude mais solúveis que a teobromina. Este comportamento é qualitativamente similar ao observado no dióxido de carbono supercrítico e pode ser explicado analisando-se as diferenças das estruturas químicas destas metilxantinas e a formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de teobromina e teofilina.
- Na extração e fracionamento das metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina), a partir dos produtos naturais (folhas de chá mate, sementes de guaraná e amêndoas de cacau), usando fluidos supercríticos foram obtidos novos dados, podendo ser utilizados como base para desenvolvimentos de modelos teóricos termodinâmicos, cinéticos e de transferência de massa, assim como para o desenvolvimento industrial de processos de extração destes produtos. Estes dados experimentais também constituem uma base sólida para estudos de implementação de plantas industriais, já que na metodologia comercial, as extrações são realizadas somente pelo método convencional usando solventes orgânicos.

- Conforme encontrado na literatura, as curvas de extração de metilxantinas de diferentes produtos naturais manifestaram a existência de três regiões distintas: a primeira, dependente da solubilidade termodinâmica, a segunda intermediária e a terceira controlada pela difusão.
- Uma extração completa do alcalóide demanda um custo muito alto devido à baixa velocidade de extração nos últimos estágios por razões de esgotamento do soluto livre na superfície e limitações de transferência de massa pelas resistências internas na matriz da planta.
- As solubilidades de metilxantinas em sistemas binários de CO₂/metilxantina foram maiores que as solubilidades encontradas durante a extração de metilxantinas dos produtos naturais, demonstrando a dificuldade do uso de dados binários para prever o comportamento de multicomponentes, mesmo para o produto moído. Estas diferenças nos valores de solubilidade podem ser atribuídas a possíveis interações dos componentes encontrados na matriz natural.
- As influências da temperatura na extração das metilxantinas dos produtos naturais foram significativas, pois nestes sistemas o aumento na pressão de vapor da cafeína/teobromina (devido ao aumento na temperatura) compensa o decréscimo na solubilidade causada pela redução na densidade do fluido supercrítico quando se aumenta a temperatura.
- O comportamento retrógrado foi observado tanto em sistemas binários como na extração de alcalóides de produtos naturais.
- A extração de metilxantinas e manteiga de cacau de produtos naturais revelaram as grandes influências da pressão devido às mudanças relativamente grandes de compressibilidade do solvente nas condições investigadas neste estudo.
- Na extração de metilxantinas de matrizes de plantas naturais se considerarmos o intervalo de tempo de extração completa, a menos que a extração esteja limitada pela

região controlada pela solubilidade, o uso de vazões menores representa uma vantagem pela diminuição no consumo de CO₂. Uma possível explicação deste comportamento é que uma fração limitada do solvente supercrítico difunde-se na estrutura celular da matriz moída dissolvendo o alcalóide, enquanto que o excesso de solvente simplesmente passa por entre a matriz moída. Este resultado também indica que a resistência à transferência de massa externa não controla o processo de extração já que a velocidade do solvente não exerce efeito na velocidade de transferência.

- O uso de pequenas quantidades do co-solvente polar etanol melhora o processo de extração de alcalóides com fluidos supercríticos significativamente devido ao aumento no rendimento e/ou redução da pressão.
- A seletividade por um dos compostos numa matriz complexa usando CO₂SC foi observado. As velocidades de extração foram maiores para um dos componentes até uma determinada fração enquanto que a outra fração foi mais concentrada no outro componente. As frações obtidas nos últimos estágios chegaram a ser mais ricas em outros compostos provando ser uma forma interessante de separação de metilxantinas em frações com diferentes concentrações.
- Na extração de óleos e gorduras, o etano mostrou-se um solvente mais eficiente que o CO₂. Esta diferença na extração usando dióxido de carbono e etano supercrítico pode ser atribuída às forças intermoleculares. Em escala industrial, no entanto, a escolha do solvente deve levar em consideração o elevado preço do etano em relação ao CO₂.
- De acordo com os resultados experimentais apresentados neste trabalho determinou-se que a utilização de fluidos supercríticos ou processos convencionais de extração (prensa mecânica) não altera as características da manteiga de cacau extraída e fracionada como, por exemplo, o teor de ácidos graxos, a composição de triglicérides e a entalpia de fusão. Porém, observou-se nas frações obtidas com fluidos supercríticos um maior conteúdo de sólidos a temperaturas baixas, o que

constitui um parâmetro físico-químico interessante em climas tropicais, pois reflete a dureza da manteiga de cacau.

- Usando o método convencional de extração com solventes orgânicos foi possível extrair e identificar a pilocarpina e a isopilocarpina nas folhas moídas de jaborandi, enquanto que usando fluidos supercríticos tais como CO₂ e fluorofórmio puro não foi possível extrair a pilocarpina pela sua insolubilidade nestes fluidos supercríticos. O uso da técnica de anti-solventes com fluidos supercríticos para a extração da pilocarpina hidrociorada apresentou bons resultados na cristalização da pilocarpina, sendo necessário o estudo do sistema quaternário: pilocarpina hidrociorada/álcool/água e dióxido de carbono como anti-solvente.

- Foi estimada a solubilidade do alcalóide no fluido supercrítico usando equações de estado e correlações em função da densidade e o fator de melhoramento. A escolha da abordagem a ser utilizada depende do sistema a ser estudado, bem como da estimativa das propriedades termodinâmicas do soluto e do solvente.

VII.2. RECOMENDAÇÕES

- Realizar estudos com sistemas modelos: ternários e quaternários para se aproximar aos sistemas complexos. Sistemas ternários formados por cafeína / teobromina / CO₂SC, cafeína / teofilina / CO₂SC, teofilina / teobromina / CO₂SC e sistemas quaternários formados por cafeína/teofilina/teobromina/CO₂SC.
- Realizar estudos mais completos de efeitos da matriz no processo de extração de alcalóides das diferentes plantas vegetais, considerando sua implicação no aspecto econômico do processo.
- Usar o etanol como co-solvente em diferentes concentrações bem como o uso de outros co-solventes como o iso-propanol e butanol para melhorar a eficiência do processo de extração de metilxantinas a partir de produtos naturais.
- Recomenda-se também o estudo e a análise de todos os componentes presentes no extrato obtido após o fracionamento usando fluidos supercríticos para avaliar a seletividade.
- Realizar análise sensorial dos extratos obtidos após a extração de alcalóides dos produtos naturais usando fluidos supercríticos, garantindo a aceitação do produto no mercado.
- Realizar análises econômicas para apreciar a probabilidade de instalar uma planta de extração de alcalóides a partir de produtos naturais do Brasil já que este é um País com vastos recursos naturais.
- Formular um modelo matemático na extração de metilxantinas, considerando aspectos de transferência de massa, estudos dos efeitos dos parâmetros cinéticos (vazão do solvente) e estrutura das matrizes em estudo para modelagem cinética das curvas de extração com o objetivo de obter dados para o desenvolvimento de um processo em escala industrial.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOLA, S.S. AND TEWE, O.O. Chemical evaluation of cocoa by-products. *Trop. Agric.* (Trinidad), v. 68, n. 4, October 1991, p. 335-336.
- AGOSTINO, O. BONACCHI, G.; DAPPORTO, P.; AOLI, P.; POGLIANI, L. Structure and dynamics of theophylline derivatives by X-ray, NMR and molecular mechanics studies. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1994) 1061-1063.
- ALIKARIDIS, F. Constituintes naturais do *Ilex* espécies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 20, 1987, p. 121-144.
- AMARU-GONZÁLES, D., MABE, G., ZABALOY, M., BRIGNOLE, E.A. Gas antisolvent crystallization of organic salts from aqueous solutions, *Journal of Super. Fluids*. 17:249-258, 2000.
- ANDRADE-NETO, M., MENDES, P.H. AND SILVEIRA, E.R. Na imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*, *Phytochemistry*, vol. 42, n°3, pp. 885-887, 1996.
- AREMU, C.Y. AND ABARA, A.E., Hydrocyanate, oxalate, phytate, calcium and zinc in selected brands of Nigerian cocoa beverage, *Plant Food for Human Nutrition*, 42: 231-237, 1992.
- AROMDEE, CHANTANA, FAWCETT, J. P., FERGUSON, M.M. AND LEDGER, R., Serum Pilocarpina Esterase Activity and Response to Oral Pilocarpina, *Biochemical and Molecular Medicine*, 59, 1996, 57-61.
- ARUL, J., BOUDROU, A., MAKHLOUF, J., TARDIF, R., SAHASRABUDHE, M.R. Fractionation of anhydrous milk fat by supercritical carbon dioxide, *Journal of Food Science* 52(5): 1231-1236, 1987.
- BADOLATO, E.S.G., MAIO, F.D., RAVARES, M. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais comestíveis comercializados no estado de São Paulo, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2):51-62, 1992.

- BALDO S. A., Beneficiamento e Industrialização da Erva Mate, <http://www.bsi.com.br/~baldo16/mate3-p.html>, 1998.
- BALTASSA, F., CARBOUR, N., FERRY, S. Étude du contenu purique de drogues a caféine: I.-Le Maté: *Ilex paraguayensis* Lamb. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 1984, 18(4), 195-203.
- BAMBERGER, T. ERICKSON, J.C. COONEY C.L. AND KUMAR, S.K. Measurement and model prediction of solubilities of pure fatty acids, pure triglycerides and mixtures of triglycerides in supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Eng. Data*, 33:327-333, 1988.
- BATTERSBY, A.R. AND OPENSHAW, H.T. *The Imidazol alkaloids*. In: Manske, R.H.F. AND HOLMES, H.L. Editors, *The alkaloids: chemistry and physiology*, vol. III, Academic Press Inc. publishers, New York, USA, 206-246, 1953.
- BAUMANN, T., SCHULTHESS, B.H. AND HÄNNI, K. Guaraná (*Paullinia Cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. *Phytochemistry*, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.
- BAYNE, W.F. CHU, L.C. AND TAO, F.T. Subnanogram assay for pilocarpine in biological-fluids. *Journal of Pharm. Sci.* 65(12): 1724-1728, 1976.
- BEASLEY AND FRAUNFELDER, 1979. IN: Gilman, A.G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Editora Guanabara Koogan, 1991, p. 1232.
- BENIGNI, R., CAPRA, C., CATTORINI, P.E. Pianta medicinale. *Clinica Farmacologica e Terapia*, v. 1, Inverni e Della Beffa- Milano, Italia, p. 712-714, 1962.
- BENTLEY, K.W. *The alkaloids*-Part II, *The chemistry of natural products*, vol. VII, 1965, Interscience Publishers John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- BERNA, A.; CHÁFER, A., MONTÖN, J.B. High-pressure solubility data of the system resveratrol (3)+ ethanol (2)+CO₂ (1). *Journal of Supercritical Fluids*, 19(2): 133-139, 2001.
- BHASKAR, R., RIZVI, S.S.H. AND BERTOLI, C. *Cocoa butter fractionation with supercritical carbon dioxide*, In: *Process technology proceedings 12, High pressure chemical engineering*, edited by R. von Rohr and Ch. Trepp, Elsevier, 1996, New York.
- BLACK, O.F., KELLY, J. W. AND STOCKBERGER, W.W. *Am. J. Pharm.* 95, 4, 1923.
- BOTHE, H. AND CAMMENGA, H.K., Phase Transition and Thermodynamic Properties of Anhydrous Caffeine, *Journal of Thermal Analysis*, v. 16, 1979, p. 267-275.
- BOTHE, H. AND CAMMENGA, H.K., *Physical Properties and Behaviour of Caffeine and its Aqueous Solutions*, Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität

- Braunschweig Hans - Sommer - Str. 10, D - 3300 Braunschweig, F. R. G., ASIC, 9^o Colloque, Londres, 1980, p. 135-144.
- BOURCET, P., Bull. Sci. pharmacol., 36, 26, 1929.
- BRENNECKE, J. F. New applications of supercritical fluids. *Chemistry & Industry*, November 4th, 1996, p. 831-834.
- BRENNECKE, J. F.; SCURTO A.M; LUBBERS C.M; BLANCHARD L.A; ANTHONY J.B and MAGINN. Environmental applications of supercritical fluids, In the 4th. Braz. Meeting on Supercritical Fluids, Bahia-Brazil, 11-14 Setembro, 2001, p. 23.
- BRENNECKE, J.F. AND ECKERT, C.A. Fluorescence Spectroscopy Studies of Intermolecular Interactions in Supercritical Fluids, Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 406, 1989.
- BROCHMANN-HANSEN, E., SCHMID, P AND BENMAMAN, J. D. Quantitative determination of pilocarpina in ophthalmic solutions, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1965, 783-784.
- BRUNETTI, M.L., DAGHETTA, A., ZANDERIGHI, A. Tecnologie di Estrazione con Fluidi Supercritici. *Industria Alimentari*, luglio-Agosto, 1985, p. 593-603.
- BRUNNER G. *Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*. In: H Baumgärtel, EU Franck, W Grünbein. Topics in physical chemistry. Germany. vol 4, 1994, pp. 3-248.
- BRUNNER, G. Mass transfer from solid material in gas extraction. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1984, 88, 887-891.
- BUCOLO, C AND MANGIAFICO, P. Pharmacological profile of a new topical pilocarpina formulation. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, 15(6): 567-573, Dez, 1999.
- BURG, A.W. Effects of Caffeine on the Human System, Tea and Coffee Trade Journal, New York, v. 147, n. 1, 1975, p. 40-41, 88.
- CARPENTER, D. R.; HAMMERSTONE, J. F.; ROMANCZYK, L.J.; AITKEN, W. M. Lipids composition of harrania and theobroma seeds. *JAOCs*, v.71, n.8 p.845-851, 1994.
- CASTANEDA-ACOSTA, J., CAIN, A.W., FISCHER, N.H., KNOPF, F.C. Extraction of bioactive sesquiterpene lactones from *Magnolia-grandiflora* using supercritical carbon-dioxide and near-critical propane, Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(1): 63-68, Jan. 1995.

- CATCHPOLE, O.J., GREY J.B. AND SMALLFIELD, B.M. Near-critical extraction of sage, celery and coriander seeds, *Journal of Supercritical Fluids*, 9: 273-279, 1996.
- CHASERI, S, ARRUDA, D.H., DIMICK, P.S. AND ENRIQUEZ, G.A., Thermal characteristics and composition of fats from Theobroma species, *Turrialba*, 39(4): 468-472, Trimestre: Octubre-diciembre, 1989.
- CHASERI, S.; ARRUDA, D. H.; DIMICK, P. S.; ENRIQUES, G. A. Thermal characteristics and composition of fats from theobroma species. *Turrinalba*, v.39, n.4, p.468-472, Trimestre: Octubre-Diciembre, 1989.
- CHEMNITIUS, F. Zur Darstellung des Pilocarpins, *Journal fur Praktische Chemie*, 118, 20-25, Leipzig-Germany, 1928.
- CHENG J.S.; TANG M. and CHEN Y.P. Correlation solubility for biological compounds in supercritical carbon dioxide: Comparative study using solution model and other approaches. p. 73. In the Ninth International Conference on Properties and Phase Equilibria for Product and Process Design. May 20–25, 2001, Kurashiki-Japan.
- CHIMOWITZ, E. H. AND PENNISI, K. J. 'Process Synthesis Concepts for Supercritical Gas Extraction in the Crossover Region'. *AIChE Journal*, v. 32, n. 10, 1986, p. 1665-1676.
- CHOI, A., LAURITO, C. E. AND CUNNINGHAM, F.E. *Pharmacologic management of postdural puncture headache*. The Annals of pharmacotherapy, v. 30, p. 831-839, July/August 1996.
- CHRASIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *J Phys Chem.*, v.86, p.3016-3021, 1992.
- CHUNG, P-H, CHIN, T-F. AND LACH, J.L. Kinetics of the hydrolysis of pilocarpina in aqueous solution, *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 59, n° 9, 1970:1300-1306.
- CLIFFORD, M. & RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acid and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, v. 35, 1990, p. 13-21.
- CLIFFORD, T. *Fundamentals of Supercritical Fluids* Published by the Oxford University Press, 1998.
- CLUSSER, E. L. *Diffusion mass transfer in fluid systems*. New York, USA: Cambridge University Press, 1984, Capítulo 5.
- COCERO M. J.; CALVO, L. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. *JAACS*, v.73, n.11, p.1573-1578, 1996.
- COMPAGNONE, R.S. AND RAPOPORT, H. Chiroselective synthesis of (+)-pilocarpina, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 1713-1719.

- CONSTANTINO, L. AND GANI, R., New Group Contribution Method for Estimating Properties of Pure Compounds, *AIChE Journal*, 40(10): 1697-1710, 1994.
- CORDELL, G.A. *Introduction to alkaloids*. New York, 1981, p. 116, 853-959.
- COSTA, A. F. *Farmacognosia*, Capítulo 4, 3^{ra} Edição, Lisboa, 1975, p. 371-437.
- COWNLEY, A.J. reported by E.M. Holmes, *Pharm. J.* [4], 18, 54, 1904, chem. Centr., 75, I, 464, 1904.
- CRC Handbook of chemistry and physics, 70th ed., Weast, R.C. ed., CRC press: Cleveland, OH, 1989.
- CRC Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters, 1989-1990. (1991).
- CRC *Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*, 1989-1990.
- CUSSLER, E.L., *Diffusion mass transfer in fluid systems*. New York, USA, Cambridge University Press, 1984, cap. V.
- DE LOOS, T.W., POOT, W. AND DIEPEN, G.A.M. Fluid phase equilibrium in the system polyethylene+ethylene I. Systems of linear polyethylene+ethylene at high pressure. *Macromolecules* 16(1): 111-117, 1983.
- DEBENEDETTI, P.G., LIM, G.B., PRUD'HOMME, R.K. European patent ep 0.542.314, 1992.
- DEFFENSE, E. Tirtiaux fractionation: analitical data of end-products through HPLC, *JAOCS*, 60(2):474, 1983.
- DEFFENSE, E. Tirtiaux fractionation: analitical data of end-products through HPLC. *JAOCS*, v.60, n.2, p.474, february 1983.
- DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.27, p.1551-1553, 1988.
- DENER, J.M., ZHANG, L-H. AND RAPOPORT, H. An effective chirospecific synthesis of (+)-pilocarpina from L-aspartic acid. *J. Org. Chem.* 58, 1159-1166, 1993.
- DIEPEN, G.A.M. AND SCHEFFER, F.E.C. The solubility of naphthalene in supercritical ethylene. *J. Am. Chem. Soc.* 70:4085, 1948.
- DOPKE, W. AND D'HEUREUSE, G. Zum mechanismus der pilocarpina-isolmerisierung. *Tetrahedron Letters*, Pergamon Press, n° 15, 1807-1808, 1968.
- DUNN DL, SCOTT BS, DORSEY ED. Analysis of pilocarpine and isopilocarpine in ophthalmic solutions by normal-phase high-performance liquid-chromatography, *Journal of pharmaceutical sciences* 70(4): 446-449, 1981.

- DUNN, C.L. AND THOMPSON, R.E. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation for pilocarpina and isopilocarpina using radial compression columns, *Journal of chromatography*, 264, 264-271, 1983.
- EBEL, S., MIKULLA, W. D. AND WEISEL, K.H. *Dtsch. Apoth. Ztg*, 111, 931, 1971, CA75, 80317v, 1971.
- EBELING, H. AND FRANCK, E.U. Spectroscopic determination of caffeine solubility in supercritical carbon dioxide. Ber. *Bunsenges Phys. Chem.*, v. 88, p. 862-865, 1984.
- EBISUZAKI, Y.; BOYLE, P. D.; SMITH, J. A. Methylxanthines I. Anhydrous Theophylline. *Acta Cryst.* (1997) C53, 777-779.
- EGGERS, R. *Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products*. In: Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry, edited by King, J.W and List, G. AOCS Press, chapter 3, 1996.
- EGGERS, R., SIEVERS U. AND STEIN, W. High pressure extraction of oilseed, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62 (1985) 1222.
- EKART, M. P.; BENNET, K. L.; EKART, S. M.; GUARDIAL G. S.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C.A. Cosolvent interactions in supercritical fluid solutions. *AIChE Journal*, v.39 p.235-248, 1993.
- ELMASRY S, SOLIMAN R New spectrophotometric assay for pilocarpine. *J ASSOC OFF ANA CHEM* 63: (4) 689-691 1980.
- ESPINOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 1997, 55, 223-239.
- FACIOLI, N. L. E.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática do óleo de piqui. *Química Nova*, v.21 p.16-19, 1998.
- FACIOLI, N.L.E. AND GONZALVES, L.A.G., 1998, Modificação por via enzimática do óleo de piqui, *Química Nova*, vol. 21, 16-19, 1998.
- FAN, T.Y., WALL, G.M., STERNITZKE, K., BASS, L., MORTON, A.B. AND MUEGGE, E., Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpina and its degradation products in ophthalmic solutions Importance of octadecylsilane column choice, *J. of Chromatography A*, 740:289-295, 1996.
- FATTORI, M., BULLEY, N.R., MEISEN, A. Carbon dioxide extraction of canola seed-oil solubility and effect of seed treatment, *JAACS*, vol. 65, no6, 968-974, 1988.

- FIEAM – Federação da Indústrias do Estado do Amazonas. Investimentos no Amazonas – Guaraná,
- FLOTTER, E., DE LOOS, T.W., ARONS, J.D. High pressure solid-fluid and vapour-liquid equilibria in the system (methane plus tetracosane), *Fluid phase equilibria* 127(1-2): 129-146, Jan. 15, 1997.
- FORD, K. A.; EBISUZAKI, Y.; BOYLE, P. D. Methylxanthines II. Anhydrous Theobromine. *Acta Cryst.* (1998) C54, 1980-1983.
- FOSTER, N.R.; GURDIAL, G.S.; YUN, J.S.L.; et al. Significance of the crossover pressure in solid supercritical fluid phase-equilibria. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39(2): 235-248, 1993.
- FREGERSLEV, S. AND RASMUSSEN, S.E. The crystal structure of pilocarpina-trichlorogermanate (II) hemihydrate, *Acta Chemica Scandinavica* 22 (8), 2541-2556, 1968.
- FRIEDRICH, J. P., SNYDER, J.M., CHRISTIANSON, D.D. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with Supercritical CO₂. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 61(12), 1851-1856, 1984.
- FRIEDRICH, J.P. AND PRYDE, E.H. Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 61 (1984) 223.
- FRIEDRICH, J.P., LIST G.R. AND HEAKIN, A.J. Petroleum-free extraction of oil from soybean with supercritical CO₂, *JAACS*, 59 (1982) 282-292.
- GAHRS, H. J. Applications of atmospheric gases in high pressure extraction. *Ber. Bunsenges Phy. Chem.*, v. 88, 1984, p. 894-897.
- GALLAGHER, P.M., COFFEY, M.P., KRUKONIS, V.J. AND KLASUTIS, N. Gas anti-solvent recrystallization: new process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids, In: *Supercritical fluids Science and Technology*, ACS Symp. Series 406, American Chemical Society: Washington, DC, 1989, p. 334.
- GANI, R.; HYTOFT, G.; JAKSLAND C. Design and analysis of supercritical extraction processes. *Applied Thermal Engineering*, 17(8-10): 889-899, 1997.
- GILMAN, A. G.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; 8^{va} edição; Guanabara Koogan Copyright S.A.; Rio Janeiro; 1991; p. 409.
- GNAYFEED, M.H., DAOOD, H.G., ILLES, V., BIACS, P.A. Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of pungent paprika and quantification of carotenoids, tocopherols, and capsaicinoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 2761-2766, Jun. 2001.

- GÓMEZ, A. M.; LÓPEZ, C. P.; DELA OSS, E. M. Characterization del aceite de semilha de uva extraído com dióxido de carbono supercrítico. *Grazas e Aceites*, v.46, v.1, p.29-34, 1995.
- GONZALES, F.B., BAZ, J.P. AND ESPINA, M.I.R. Synthesis of (+)-pilocarpina analogs with a 2-oxazolidone structure, *Tetrahedron Letters*, vol. 30, nº 16, 2145-2148, 1989.
- GOUY, M. *Sur la fonction electrocapillaire*. *Anales de Chimie et physique*, [8], 9, 118-119, 1906.
- GRAHAM, H.N. Maté. *Progress in chemical and biological research*, v. 158, 1984, p. 179-183.
- GRAIN, C.F. *Vapor Pressure*, Capítulo 14, p. 14-1 a 14-20, In: Lyman, W.J., Reehl, W.F. and Rosenblatt, D.H., Handbook of chemical property estimation methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, *American Chemical Society*, Washington D.C., 1990.
- GRIEVE, M. *A modern herbal*, Peguin books, England, p. 405-407, 609.
- GRIFFITHS, R.R.; WOODSON, P.P. Caffeine physical dependence: a review of human and laboratory animal studies. *Psychopharmacology (Berl)* 94(4): 437-451, 1988.
- GUIMARÃES DA COSTA, S. *A erva-mate*. *Scietia et labor*, Editora UFPR, Curitiba-Brasil, 85 p., 1989.
- GURDIAL, G.S., WELLS, P.A., FOSTER, N.R., AND CHAPLIN, R.P., 1989, The role of polarity in correlations of solid-supercritical fluid phase systems, *Journal of Supercritical Fluids*, 2:85-89.
- HAASE, J. AND KUSSATHER, E. *Kristallographische Daten von Pilocarpin-Chloroaurat, Neostigmin-Chloroaurat und Hyoscyaminbromid*. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil b, Anorganische Chemie, Organische chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie*, p. 212, 1972.
- HAMILTON, R. J. E.; BHATI, A. Recent advances in chemistry and technology of fats and oils. London and New York: *Elsevier Applied Science*, 1987.
- HAMMERSTONE, J. F.; ROMANCZYK, L. J.; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution with *herrania* and *theobroma*. *Phytochemistry*, v.35, n.5, p.1237-1240, 1994.
- HANNAY, J. B. AND HOGARTH, J.; On the Solubility of Solids in Gases; *Proc. Roy. Soc.*; v. 29; London; 1879; p. 324.
- HARDY, E. *BULL. Soc. Chim. France*, [2], 24, 497, 1875
- HARTMAN, L. AND LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Prac.*, 22, 1973, p. 475-76.
- HASEGAWA, R., CHUJO, T., SAI-KATO, K., UMEMURA, T., TANIMURA, A. AND KUROKAWA, Y. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Fd. Chem. Toxic.*, v. 33, n. 11, p. 961-970, 1995.

- HAUPTSCHOTT, J., LENTZ, H. Combining of a simple subcritical or supercritical extraction with common methods of analysis, *Monatsh Chem.* 124(11-12):1083-1087, Nov.-Dec., 1993
- HAWTHORNE, S.B., RIEKKOLA, M.L., SERENIUS, K., HOLM, Y., HILTUNEN, R., HARTONEN, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants, *Journal of Chromatography* 634 (2): 297-308, Mar. 1993.
- HEATON, D.M., BARTLE, K.D., RAYNER, C.M., CLIFFORD, A.A., Application of supercritical-fluid extraction and supercritical-fluid chromatography to the production of taxanes as anticancer drugs HRC, *Journal of High Resolution Chromatography* 16(11): 666-670, Nov. 1993.
- HEDRICK, J.L., MULCAHEY, L.J. AND TAYLOR, L.T. Fundamental Review: Supercritical Fluid Extraction. *Mikrochim Acta*, vol. 108, 1992, p. 115-132.
- HEDRICK, J.L., MULCAHEY, L.J. AND TAYLOR, L.T. Fundamental Review: Supercritical Fluid Extraction. *Mikrochim Acta*, vol. 108, 1992, p. 115-132.
- HENMAN, A. *Vida Natural: O guaraná*. Global Editora e Distribuidora Ltda., Setembro 1986, 77 p., Rio de Janeiro, Brasil.
- HERBSTEIN, F. H.; KAPON, M. I_{16}^{4-} ions in crystalline (theobromine) $_2$.H $_2$ I $_8$; X-ray structure of (theobromine) $_2$.H $_2$ I $_8$. *J. C. S. Chem. Comm.* (1975) 677.
- HERNANDEZ, B., CASTELLOTE, A.I. Triglyceride analysis of cocoa beans from different geographical origins. *Food Chemistry*, vol. 41: 269-276, 1991.
- HERZFELD, H. *Ilex paraguensis* or la yerba maté. *Pharm. Era*, v. 53, 1920, p. 353-354.
- HILDEBRAND, J.H., J.M., SCOTT, R.L.: Regular and related Solutions. Van Nostrand Reinhold, New York, Vol. 22 (1970).
- HILDEBRAND, J.H., J.M., SCOTT, R.L.: Regular Solutions. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall 1962.
- HILDEBRAND, J.H., J.M., SCOTT, R.L.: The solubility of Nonelectrolytes. New York: Van Nostrand Reinhold 1950.
- HILL, R.K. AND BARCZA, S. Stereochemistry of the jaborandi alkaloids, *Tetrahedron*, 1966, vol. 22, pp. 2889-2893.
- HONG, T., ZHILAN, M., LIJUN, L. Alkaloid extraction from plants with liquid membranes. *Water Treatment*, v. 5, 1990, p. 214-221.

- HOOKER, J. D. *Pilocarpus Jaborandi*: Native of Pernambuco. *Botanical Magazine*, vol. LII, 4p, London-England, 1896.
- <http://www.fieam.org.br/invest/guarana.htm>. Versão novembro de 2001.
- <http://www.ibge.gov.br/>. Versão out/2001
- HUBERT, P. AND VITZTHUM, O. G. Fluid extraction of hops, spices, and tobacco with supercritical gases. *Angew. Chem. Int.*, Ed. Engl., v. 17, 1978, p. 710-715.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola – Guaraná. 1994-1998
- INAGAKE, M., YAMANE, T., KITAO, Y., OYA, K., MATSUMOTO, H., KIKUOKA, N., NAKATANI, H., TAKAHASHI, T., NISHIMURA, H. AND IWASHIMA, A. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Jpn. J. Cancer Research*. v. 86, p. 1106-1111, November 1995.
- International Tea Committee, Annual Bulletin of Statistics, 1990.
- JAMES, J.E. Caffeine and health. Academic Press Inc., San Diego, 1991.
- JOHANNSEN, M. AND BRUNNER, G., Solubility of the Xanthines Caffeine, Theophylline and Theobromine in Supercritical Carbon Dioxide, *Fluid Phase Equilibria*, v. 95, 1994, p. 215-226.
- JOHNSTON, K. P. AND PECK, D. G.; Modeling Supercritical Mixtures: How Predictive Is It?, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 28, n. 8, 1989, p. 1115-1125
- JOWETT, H.A.D. *Pilocarpina* and the alkaloids of *Jaborandi* leaves, *Journal of the chemical society transactions*, 1900, vol. 77, London, 473-498.
- JOWETT, H.A.D. *Year-book of pharmacy*, 435, 1899.
- KALMAN, J. TOTH, K. AND KUTTEL, D. *Acta Pharm. Hung.* 41, 267, 1971, CA76, 500037, 1972.
- KATIYAR, S.D., ELMETS, C.A., AGARWAL, R. AND MUKHTAR, H. Protection against ultra violet-B radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema responses in C₃H/HeN mice by green tea polyphenols. *Photochemistry and Photobiology*, v. 62, n. 5, p. 855-861, 1995.
- KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*, 5ta edição, Capítulo 3, Editora Guanabara Koogan, Brasil, p. 29, 1994.
- KENNEDY, J.M. AND McNAMARA, P.E., High-performance liquid chromatographic analysis of pilocarpina hydrochloride, isopilocarpina, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in eye-drop preparations, *Journal of chromatography*, 212, 331-338, 1981.

- KING, C. J.; The Utility of Chemical Engineering Principles in Coffee Processing Technology. IN: Colloque International Sur La Chimie Des Cafes Verts, Torrefies et Leurs Derives. Paris, 1980. *Association Scientifique Internationale du Café*. P 237-250.
- KRASKA, T.; LEONHARD, K.; TUMA, D. and SCHNEIDER, M. Correlation of the solubility of low-volatile organic compounds in near and supercritical fluids: Applications to disperse red 60 and two disubstituted anthraquinones. p. 72. In the Ninth International Conference on Properties and Phase Equilibria for Product and Process Design. May 20–25, 2001, Kurashiki-Japan.
- KRUKONIS, V.J. AND KURNIK, R.T. Solubility of the solid aromatic isomers in carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* 30:247, 1985.
- KURNIK, R.T., HOLLA, S.J. AND REID, R.C. Solubility of solids in supercritical carbon dioxide and ethylene. *Journal of Chem. Eng. Data* 26(1): 47-51, 1981.
- KUSHNICK, H., LIEBMANN, J.M. AND RITCH, R. Systemic pilocarpine toxicity from ocusert leakage, *Arch. Ophthalmol.*, vol. 114, Nov., 1996, 1432.
- LACK, E. AND SEIDLITZ, H. *Commercial scale decaffeination of coffee and tea using supercritical CO₂*, In: King, M. B. and Bott, T. R. Extraction of natural products using near-critical solvents, U.K., 1993, p. 101-139.
- LAIBOVITZ, R., BOYLE, J., SNYDER, E., STROHMAIER, K., ADAMSONS, I. Dorzolamide versus pilocarpine as adjunctive therapies to timolol: A comparison of patient preference and impact on daily life. *Clinical therapeutics*, 18(5): 821-832, 1996.
- LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. E.; SILVA, I. C. E. Seed oil extraction with supercritical carbon dioxide modified with pentane. *Chromatographia*, v.39, n.11/12, p.687, 1994.
- LEBLOND, E. *Étude physiologique et thérapeutique de la caféine*. Paris, O. Doin, 1883, 173 p., Citado por Mazzafera, P. and Carvalho, A. 'A Cafeína do Café'. Instituto Agronômico de Campinas, 1991.
- LEE, S. The Role of Caffeine in Modern Beverages; *Tea and Coffee Trade Journal*; New York; 141(4):11; p. 23-25; 1971; Citado por Mazzafera, P. & Carvalho, A.; A Cafeína do Café; Instituto Agronômico de Campinas; 1991.
- LEHRIAN, D.W. AND KEENEY, P.G., Triglyceride characteristics of cocoa butter from cacao fruit matured in a microclimate of elevated temperature, *JAACS*, 66-69, 1980.
- LEISSNER, R; HOGENBIRK, G; NILSSON, F; PETERSSON, B; ALANDER, F; HELMBRING, G; STENMYR, C; LINGHEDE, M; GUNNERDAL, F. Cocoa butter alternatives. *Handbook of Karlsamns Oils and Fats academy*, vol 3, 135 p.,1993.

- LENTZ, H., GEHRIG, M., AND SCHULMEYER, J. Dynamic solubility measurements of caffeine in carbon dioxide and in carbon dioxide saturated with water. *Phys. B*, v. 139/140, 1986, p. 70-72.
- LEVINE, J. AND HORROCKS, E., The determination of pilocarpina, *Journal of the AOAC*, 43(2): 233-234, 1960.
- LI, S. AND HARTLAND S.A., Influence of Co-Solvents on Solubility and Selectivity in Extraction of Xanthines and Cocoa Butter from Cocoa Beans with Supercritical Carbon CO₂, *J. Supercritical Fluids*, v. 5, 1992, p. 7-12.
- LI, S. AND HARTLAND, S.A., A new process for extracting Cocoa Butter and xanthines with Supercritical Carbon CO₂, *JAOCs*, v. 73(4):423-429, 1996.
- LI, S., BERGER, J. AND HARTLAND, S. UV spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans. *Analytica Chimica Acta*, v. 232, 1990, p. 409-412.
- LI, S., VARADARAJAN, G.S. AND HARTLAND S.A., Solubilities of Theobromine and Caffeine in Supercritical Carbon Dioxide: Correlation with Density-based Models, *Fluid Phase Equilibria*, v. 68, 1991, p. 263-280.
- LIBERMANN, H.; WURTMAN, R.J.; EMDE, G.G.; ROBERTS, C.; COVIELLA, I.L.G. The effects of low doses of caffeine on human performance and mood. *Psychopharmacology* 308-312, 1987.
- LIEDTKE, U. AND LENTZ, H. The solubility of caffeine in ammonia, *Ber. Bunsenges Phys. Chem.*, v. 88, 1984, p. 921.
- LINK, H. AND BERNAUER, K. *Helv. Chim. Acta*, 55, 1053, 1972.
- LUCCAS, V., Fracionamento térmico da gordura de cupuasu e obtenção de gorduras alternativas à manteiga de cacau (CBAIS) para uso na fabricação de chocolate, Tese de Doutorado, UNICAMP, 2001, 188p.
- LYNCH, G.R. AND 12 COLLABORATORS, *Analyst*, 73, 311, 1948.
- MAAT, L. AND BEYERMAN, H.C. The Imidazole alkaloids, Chapter 5, In: The alkaloids, vol. XXII, 282-327, 1983.
- MAAT, L. AND BEYERMAN, H.C. *The Imidazole alkaloids*, chapter 5, In: The alkaloids, vol. XXII, 282-327, 1983.
- MAGNAN, C, BADENS, E., COMMENGES, N., CHARBIT, G. Soy lecithin micronization by precipitation with a compressed fluid antisolvent-influence of process parameters, *Journal of Superc. Fluids* 19: 69-77, 2000.

- MAMBRIM, M.C.T. E BARRERA-ARELLANO, D. Caracterización de aceites de frutos de palmeras de la región amazónica del Brasil, *Grasas y Aceites*, vol. 48, Fasc. 3 1997, p.158.
- MANESS, N. O.; CHRZ, D.; PIERCE, T.; BRISEWITZ, G. H. Quantitative extraction of pecan oil from small samples with supercritical carbon dioxide. *JAOC*, v.72, n.6, 1995.
- MANNINEN, P., LAAKSO, P., KALLIO, H. Method for characterization of triacylglycerols and fat-soluble vitamins in edible oils and fats by supercritical-fluid chromatography, *Journal of the American Oil Chemists Society* 72(9): 1001-1008, Sep. 1995.
- MARTIN, A., PARUTA, A. N. AND ADJEI, A. Extendend Hildebrand solubility approach: methylxantines in mixed solvents. *Journal of pharmaceutical sciences*, 70(10): 1115-1120, 1981.
- MARX, F. E.; MAIA, J. G. S. Purine alkaloids in seeds of theobroma species from the amazon. *Zeitschrift-fuer-Lebensmittel-Untersuchung-und-Forschung*; 193 (5), p.460-461, 1991.
- MARX, F. PFEILSTICKER, K. AND MAIA, J.G.S. Dtsch. Lebensm. Rundsch. v. 81, p. 390, 1985, In: BAUMANN, T., SCHULTHESS, B.H. AND HÄNNI, K. Guaraná (*Paullinia Cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. *Phytochemistry*, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.
- MASSA, V., GAL, F.,SUSPLU, P.G. AND MAESTRE, G. *Tra. Soc. Pharm. Montpellier*, 30, 267, 1970, CA75, 25466p, 1971.
- MATTEI, R., DIAS, R.F., ESPINOLA, E.B., CARLINI, E.A., BARROS, S.B. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. *J Ethnopharmacol* 60(2):111-116, 1998.
- MAX, M.M. AND POLONOVSKI, M. *Nouvelle recherche dans la serie de la pilocarpina*. III. Isopilocarpinanile or phenylisopilopyrrolidone, *Memoires presentes a la societe chimique*, [4], 31, n°92, 1201-1204, 1922.
- MAZZAFERA, P. AND CARVALHO, A. *A cafeína do café*. Documentos IAC. 1991, 25, p. 1-22.
- MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 6, n. 2, 1994, p. 149-151.
- MAZZAFERA, P. Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chem*. 1997, 60, 67-71.
- McCANCE, R.A. AND WIDDOWSON, R.M, The composition of foods, Medical Reseach Council, Special Report Series, No 297, 1967.
- McHUGH, M.A. AND KRUKONIS, V. J. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworths Publishers, Boston MA, 1986, p. 69-78.

- McHUGH, M.A. AND KRUKONIS, V. J. *Supercritical fluid extraction: principles and practice*. Butterworths Publishers, Boston MA, 1986, p. 69-78.
- McHUGH, M.A. AND KRUKONIS, V. J. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*. Butterworths Publishers, Boston MA, 1994.
- McHUGH, M.A. AND PAULAITIS, M.E. Solid solubilities of naphthalene and biphenyl in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* 25:326, 1980.
- McHUGH, M.A., MALLETT, M.W. AND KOHN, J. P. High-Pressure Fluid Phase Equilibria of Alcohol-Water-Supercritical Solvent Mixtures; *AIChE Ann. Meet.*; New Orleans; 1981.
- McKILLOP, A. *An Introduction to the Chemistry of the Alkaloids*; Butterworths; London; 1970; p. 1-41.
- MD ALI, A. R.; DIMICK, P. S. Melting and solidification characteristics of confectionery fats: anidrous milk fat, cocoa butter and palm kernel stearin blends, *JAOCS*, v.71, n.8, p.803-806, 1994.
- MEHR, C.B., BISWAL, R.N. AND COLLINS, J.L. Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guaraná. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 9, 1996, p. 185-191.
- MELO, J. *Nuevas Tendencias en los processos de modificación de aceites y grasas*. p. 1-9, In: *Aplicação de gorduras em chocolates, sorvetes, confeites e panificação*, Centro de Tecnologia de cereais e chocolate, Instituto de Tecnologia de alimentos, ITAL, Campinas-SP, Maio, 1999.
- MENDES, R.L., NOBRE, B.P., COELHO, J.P. AND PALAVRA, A.P. Solubility of β -carotene in supercritical carbon dioxide and ethane. *Journal of supercritical Fluids*, 16, 99-106, 1999.
- MENDES, R.L., NOBRE, B.P., COELHO, J.P. AND PALAVRA, A.P. Solubility of β -carotene in supercritical carbon dioxide and ethane. *Journal of supercritical Fluids*, 16, 99-106, 1999.
- MERCANDANTE, A.Z., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Avaliação da composição de ácidos graxos de óleos comestíveis, *Bol. SBCTA*, Campinas, 20 (1/2): 29-40, Jan./Jun. 1986.
- MERCK, E. *Merck's Jahresber.*, 1896, 11.
- MESEGUER, G., BURI, P., PLAZONNET, B., ROZIER, A. AND GURNY, R. Gamma scintigraphic comparison of eyedrop containing pilocarpine in healthy volunteers. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, v. 12, n. 4, 1996, p. 481-488.
- MINIFIE, B.W. *Chocolate, cocoa and confectionery-science and technology*, Pitman press., Great Britain, 1970.

- MISHIMA K.; MATSUYAMA K.; MASAYOSHI B.; ISHIKAWA H.; MAEDA S. Dyeing of polyester with disperse dye in supercritical carbon dioxide, p. 161. In the Ninth International Conference on Properties and Phase Equilibria for Product and Process Design. May 20–25, 2001, Kurashiki-Japan.
- MODELL, M. AND REID, R., *Thermodynamics and Its Applications*, 2nd edition, Modar Inc., Natick, Massachusetts, Prentice-Hall Inc., 1983.
- MODELL, M.; ROBEY, R.; KRUKONIS, V.; FILIPPI, R. AND OESTREICH, D. Supercritical Fluid Regeneration of Activated Carbon; AIChE; 87th Nat. Meet., Boston, 1979.
- MOHAMED, R. S.; DEBENEDETTI, P. G.; PRUD'HOMME, R. K.; Effects of Process Conditions on Crystals Obtained from Supercritical Mixtures; AIChE Journal; v. 35; n. 2; 1989a; p. 325-328.
- MOHAMED, R. S.; HALVERSON, D. S.; DEBENEDETTI, P. G.; PRUD'HOMME, R. K.; Solid Formation After the Expansion of Supercritical Mixtures; American Chemical Society; Chapter 23; 1989b; p. 355-378.
- MOHAMED, R.S. AND HOLDER, G.D., High Pressure Phase Behavior in Systems Containing CO₂ and Heavier Compounds with Similar Vapor Pressures, *Fluid Phase Equilibria*, v. 32, 1987, 295.
- MOHAMED, R.S. SALDAÑA, M.D.A. SOCANTAYPE, F.H. KIECKBUSCH, T.G. Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina, *Journal of Supercritical Fluids*, 16 (2000) 225-233.
- MONTANARI, L; FANTOZZI, P.; SNYDER, J.M.; KING, J.W. Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol. *Journal of Supercritical Fluids*, 14: 87-83, 1999.
- MOREAU, F. *Alcalóides et plantes alcaloifères*, Press. Universitaires de France, Paris, 1948, p. 79-83.
- MORRISON, R. AND BOYD, R. Química Orgânica, 2nd edition, Lisboa, 1989.
- MORRISON, R. AND BOYD, R., *Química Orgânica*, 2nd edition, Lisboa, 1961.
- MÜLLER, C. E. AND DALY, J.W. Stimulating of calcium release by caffeine analogs in pheochromocytoma cells, *Biochemical Pharmacology*, v. 46, n. 10, p. 1825-1829, 1993.
- MUMFORD, G.K., BENOWITZ, N.L., EVANS, S.M., KAMINSKI, B.J., PRESTON, K.L., SANNERUD, C.A., SILVERMAN, K AND GRIFFITHS, R.R. Absorption rate of

- methylxanthines following capsules, cola and chocolate, *Eur J. Clin Pharmacol*, v. 51, p. 319-325, 1996.
- NDIOMU, D. P. AND SIMPSON, C. F. Some applications of supercritical fluid extraction, *Analytica Chimica Acta*, v. 213, 1988, p. 237-243.
- NEVES, B. M. *Solubilidade do Colesterol e do Óleo de Manteiga em Dióxido de Carbono Supercrítico*, Tese de Mestrado, Engenharia Química, Unicamp, 1996.
- NEVILLE, G.A., HASAN, F.B. AND SMITH, I.C.P. Stereoselective epimerization of pilocarpina in aqueous solution as determined by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.* 54, 2094-2100, 1976.
- NILSSON, W. B. E.; HUDSON, J. K. Solubility of a simple and mixed triacylglycerols in supercritical CO₂. *JAACS*, v.70, n.8, p.749-754, 1993.
- NOORDAM, A. *Stereoselective synthesis of (+)-pilocarpina*, PhD thesis, Delft University, Delft Univ. Press, 1979, 121 p.
- NOORDAM, A. WALISZEWSKI, K., OLIEMAN, C., MAAT, L. AND BEYERMAN, H.C. Determination of the ophthalmic therapeutic pilocarpina and its degradation products by reversed-phase high performance liquid chromatography, *Journal of chromatography*, 153, 1978, 271-273.
- NOORDAM, A., MAAT, L. AND BEYERMAN, H.C. Quantitative determination of pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpic acid, and isopilocarpic acid in clinical ophthalmic pilocarpina formulations by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 70, n° 1, 96-97, January 1981.
- NOORDAM, A., MAAT, L. AND BEYERMAN, H.C. Quantitative determination of pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpic acid, and isopilocarpic acid in clinical ophthalmic pilocarpina formulations by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 70, n° 1, 96-97, January 1981.
- NORDAM, A., MAAT, L. AND BEYERMAN, H.C. A convenient synthesis of L-N-methylhistidine and L-N-ethylhistidine (Imidazole Chemistry, part IV), *Journal of the Royal Netherlands chemical society*, 97/11, november, 1978, 293-295.
- NUNES, M.A. AND BROCHMAN, E. Hydrolysis and epimerization kinetics of pilocarpine in aqueous-solution, *J Pharm. Sci.* 63(5):716-721, 1974.
- NUNES, M.A. AND BROCHMANN-HASSEN, E.J. *Pharm. Sci.* 63, 716, 1974.

- O'DONNELL, J.J., SANDMAN, R., DRAKE, M.V. Measurement of pilocarpine and its degradation products by high-performance liquid-chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69(9):1096-1097, 1980.
- OHNO, Y., WAKAI, K., GENKA, K., OHMINE, K., TAKASHI, K., TAMAKOSHI, A., AOKI, R., SENDA, M., HAYASHI, Y, NAGAO, K., FUKUMA, S. AND AOKI, K. *Jpn. J. Cancer Research.* v. 86, p. 1027-1034, November 1995.
- OLIVEIRA, F. AND AKISUE, G. Fundamentos da farmacognosia. Editorial Atheneu, São Paulo-Brasil, 1989, p. 216.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G. AND AKISUE, M.K. *Farmacognosia*, Editorial Atheneu, São Paulo-Brasil, 1991, p. 216, 412.
- OZER, E.O., PLATIN, S., AKMAN, U., HORTAÇSU, O. Supercritical carbon dioxide extraction of spearmint oil from mint plant leaves, *Canad. J. Chem. Eng.*, 74(6) (1996), 920-928.
- PANAGIOTOPOULOS, A.Z. AND REID, R.C., High Pressure Phase Equilibria in Ternary Fluid Mixtures with a Supercritical Component, *Am. Chem. Soc.*, Symp. Ser., 1987, n. 329, 115.
- PANAGIOTOPOULOS, A.Z. AND REID, R.C., New Mixing Rules for Cubic Equations of State for Highly Polar Asymmetric Systems, *American Chemical Society*, 1986, p. 571-582.
- PAUL, B.H. AND COWNLEY, A.J. *Pharm. J.*, [4], 3,1, 1896.
- PEKER, H., SRINIVASAN, M.P., SMITH, J.M., MCCOY, B.J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. *AIChE J.* 1992, 38 (5), 761-770.
- PEKIC, B., ZEKOVIC, Z., PETROVIC, L., TOLIC, A. Behavior of (-)-alpha-bisabolol and (-)-alpha-bisabololoxide-A and (-)-alpha-bisabololoxide-B in chamomile flower extraction with supercritical carbon-dioxide. *Separation Science and Technology* 30(18): 3567-3576, 1995.
- PENG, D. Y. AND ROBINSON, D. B. A New Two-Constant Equation of State, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, v. 15, n. 1, 1976, p. 59-64.
- PERMANYER, J.J., HERNANDEZ, B. AND CASTELLOTE, A.I., Triglyceride Analysis of Cocoa Beans from Different Geographical Origins, *Food Chemistry* 41 (1991), p. 269-276.
- PERRUT, M. Supercritical fluid applications: Industrial developments and economic issues, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 39(12):4531-4535, DEC, 2000.
- PERRY, S. Handbook of chemical engineering, 6th ed., mc graw-hill: new york, 1984.
- PERRY, E.S., WEBER, W.H., DAUBERT, B.F. Vapor pressure of phlegmatic liquids I simple and mixed triglycerides, *J. Am. Chem. Soc.*, 71:3720-3726, 1949.

- PETERS, C. J. Phase Behaviour of binary mixtures of ethane + n-icosane and statistical mechanical treatment of fluid phases. PhD thesis, Delft University, 188 p., 1986.
- PETIT, A. AND POLONOVSKI, M. *Bull. soc. Chim. France*, [3], 17, 554, 1897.
- PHELPS, C. L.; WAI, C. M.; SMART, N.G. Past, Present and Possible Future Applications of Supercritical Fluid Extraction Technology. *J. Chem. Ed.*, 73: 1671, 1996.
- PRAUSNITZ, J., LICHTENTHALER, R. AND GOMES DE AZEVEDO, E., *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 2nd edition, Prentice Hall Inc, 1986.
- QMCWEB: Artigo sobre forças intermoleculares. Disponível em: http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/forcas_intermoleculares.html, 05 de julho de 2001.
- QMCWEB: Artigo sobre forças intermoleculares. Disponível em: http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/forcas_intermoleculares.html, 05 de julho de 2001.
- RECASENS, F., ABAROUDI, K., TRABELSI, F., CALLOUD-GABRIEL, B. Mass transport enhancement in modified supercritical fluid, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38: 3505-3518, 1999.
- REED, J.N. AND SNECKUS, V.A. *Alkaloids*, London 7, v. 301, 1977.
- REID, R.C., PRAUSNITZ, J.M. AND POLING, B.E., *The properties of gases and liquids*, 4th edition, McGraw-Hill, New York, 1988, 741.
- REVERCHON, E. DAGHERO, J. MARRONE, C. MATTEA M. AND POLETTO, M. Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: experiments and mathematical modeling, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38: 3069-3075, 1999.
- REVERCHON, E. Supercritical antisolvent precipitation of micro and nanoparticles, *Journal of Supercritical Fluids* 15(1):1, 1999.
- REVERCHON, E., DELLA PORTA, G., DE ROSA, I., SUBRA, P., LETOURNEUR, D. Supercritical antisolvent micronization of some biopolymers, *Journal of Supercritical Fluids* 18(3): 239-245, Oct. 2000.
- REVERCHON, E., DELLA PORTA, G., FALIVENE, M.G. Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation, *Journal of Supercritical Fluids* 17(3): 239-248, Jun. 2000.
- REVERCHON, E.; DAGHERO J.; MARRONE, C.; MATTEA, M.; POLLETO, M. Supercritical fractionation extraction of fennel seed oil and essential oil: experiments and mathematical modeling. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.38, p.3669-3075, 1999.

- REVERCHON, E.; DONSI, G.; E POTA, F. Extraction of essential oils using supercritical CO₂: effect of some process and pre-process parameters. *Italian Journal of Food Science*, n.3, p.187, 1992.
- REVERCHON, E.; OSSÉO, L. S. Comparison of processes for supercritical carbon dioxide extraction of oil from soybean seeds. *JAOCS*, v.71, n.9, september, 1994.
- RICCO, R.A, WAGNER, M.L. AND GURNI, A.A. *Estudio comparativo de flavonoides en especies Austrosudamericanas del genero Ilex*. In erva mate: biologia e cultura no cone sul, eds H. Winge, A.G. Ferreira, J.E.A. Mariath & L.C. Tarasconi. Editora da Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Brasil, Porto Alegre, 1995, p. 243-249.
- RIESELMANN, B.; ROSENBAUM, F.; ROSCHER, S.; SCHNEIDER, V. Fatal caffeine intoxication. *Forensic Science International*, 1999, 103, S49-S52.
- RIZVI, S. S. H., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A. AND DANIELS, J. A. Supercritical Fluid Estraction: Fundamental Principles and Modeling Methods. *Food Technology*, June 1986, p. 55-65.
- ROGERS, P. J.; DERNONCOURT, C. Regular caffeine consumption: A balance of adverse and beneficial effects for mood and psychomotor performance. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4), 1039-1045, 1998.
- RÓNYAL, E.; SIMÁNDI, B.; TÖMÖSKÖZI, S.; DEÁK, A.; VIGH, L.; WEINBRENNER, Zs. Supercritical fluid extraction of corn germ with carbon dioxide-ethyl alcohol mixture. *Journal of Supercritical Fluids*, 14: 75-81, 1998.
- ROSELIUS, R., VITZHUM, O. AND HUBERT. *Recovery of Oil Containing Aroma Ingredients from Roasted Coffee*, German Patent, 1972b.
- ROSELIUS, W., VITZHUM, O. AND HUBERT, P. Method of producing cocoa butter, U.S. Patent 3.923.847, Dez. 1975.
- ROSSI, M. *Supercritical fluid extraction of cocoa and cocoa products*, In: supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry, edited by King, J.W and List, G. AOCS Press, chapter 10, 1996.
- ROSSI, M., ARNOLDI, C., SAVIONI, G. AND SCHIRALDI, A. Characterization of cocoa extracts obtained with supercritical carbon dioxide, *Ital. Journal of Food Science*, 3(1989) 41-50.
- RUSSICK, E.M., POULTER, G.A., ADKINS, C.L.J., SORENSEN, N.R. Corrosive effects of supercritical carbon dioxide and cosolvents on metals, *Journal of Supercritical Fluids* 9(1): 43-50, Mar. 1996.

- SABARIAH, S., ALI, A.R., CHONG, C.L., Chemical and physical characteristics of cocoa butter substitutes, milk fat and Malaysian cocoa butter blends, *JAACS*, 74(8): 905-910, 1998.
- SAITO, M., YAMAUCHI, Y., INOMATA, K., KOTTKAMP, W. Enrichment of tocopherols in wheat-germ by directly coupled supercritical fluid extraction with semipreparative supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatographic Science* 27(2): 79-85, Feb. 1989.
- SAITO, M., YAMAUCHI, Y., INOMATA, K., KOTTKAMP, W.: Enrichment of tocopherols in wheat germ by directly coupled supercritical fluid extraction with semipreparative supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* Vol. 27 (1989) pp. 79-85.
- SALDAÑA, M. D. A. *Extração de alcalóides de produtos naturais com fluidos supercríticos*. Exame de qualificação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, 1998.
- SALDAÑA, M. D. A. *Extração de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico de café com CO₂ supercrítico*. M.Sc. thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 1997.
- SALDAÑA, M. D. A., MAZZAFERA, P. AND MOHAMED, R. S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO₂ supercrítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1997, 17(4), p. 371-376.
- SALDAÑA, M. D. A., MAZZAFERA, P. AND MOHAMED, R. S. Extraction of caffeine, trigonelline and chlorogenic acid from brazilian coffee beans with supercritical fluids, The 4th International Symposium on Supercritical Fluids, May 11-14, Sendai, Japan, 1997, p. 219-222.
- SALDAÑA, M.D.A., MAZZAFERA, P. AND MOHAMED, R. S. Extraction of cocoa butter from brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane, 4895:1-10, 2001.
- SALDAÑA, M.D.A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R.S. (1999), Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂, *Journal of Agric. & Food Chemistry* 47(9), 3804-3808.
- SALDAÑA, M.D.A., ZETZL, C., MOHAMED, R.S. AND BRUNNER, G. (2001), Decaffeination of guaraná seeds in a microextraction column using water-saturated CO₂, *Journal of supercritical fluids*, in press.
- SALGADO, A. *Gorduras alternativas à manteiga de cacau*. Pp. 81-95, In: Aplicação de gorduras em chocolates, sorvetes, confeites e panificação, Centro de Tecnologia de cereais e chocolate, Instituto de Tecnologia de alimentos, ITAL, Campinas-SP, Maio, 1999.
- SAMBARATO, D. Esperienze di estrazione della teobromina da cacao con anidride carbonica supercritica, PhD. Thesis, University of Milan, Italy, pp. 85-115, 1984.

- SAMDAHL, B. AND TANCREDE, E., *Medd. Norsk. Farm. Selsk.* 4, 141, 1942.
- SANDLER, S. *Chemical and Engineering Thermodynamics*. 2nd edition. 1989.
- SAUERBERG, P., CHEN, J., WALDEMUSSIE, E. AND RAPOPORT, H. Cyclic carbamate analogues of pilocarpina, *J. Med. Chem.*, 32, 1322-1326, 1989.
- SAUNDERS, R.A.; PLATTS, J.A. Linear free energy relationship analysis of the solubility of solids in supercritical fluids. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 14: 612-617, 2001.
- SCHAEFFER, S.T.; ZALKOW, L.H.; TEJA, A.S. Solubility of monocrotaline in supercritical carbon dioxide and carbon dioxide-ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*. 1998, 43, 45-46.
- SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., HEINZMANN, B.M., MONTANHA, J.A, ATHAYDE, M.L. AND TAKEDA, A. C. *Saponinas em espécies do gênero Ilex. In erva mate: biologia e cultura no cone sul*, eds H. Winge, A.G. Ferreira, J.E.A. Mariath & L.C. Tarasconi. Editora da Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Brasil, Porto Alegre, 1995, p. 251-256.
- SCHMITT, W.J. AND REID, R.C., 1985, *The influence of the solvent gas on solubility ad selectivity in supercritical extraction*. In J.M.L. Penninger, M. Radosz, M.A. McHugh and V.J. Krukonic, Eds., *Supercritical Fluid Technology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 123-127.
- SCHMITT, W.J. AND REID, R.C., 1985, *The influence of the solvent gas on solubility ad selectivity in supercritical extraction*. In J.M.L. Penninger, M. Radosz, M.A. McHugh and V.J. Krukonic, Eds., *Supercritical Fluid Technology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 123-127.
- SCHMITT, W.J. AND REID, R.C., Solubility of Monofunctional Organic Solids in Chemically Diverse Supercritical Fluids, *J. Chem. Eng. Data*, v. 31, n. 2, 1986, p. 204-212.
- SCOTT, B.S., DUNN, D.L. AND DORSEY, E.D. *J. Pharm. Sci.* 70, 1046, 1981.
- SEBALD, J; SCHULMEYR, J and GEHRIG, M., Removal of Xanthines from Cacao. In: *High Pressure Chemical Engineering*, 1996, 333-338.
- SENANAYAKE, U. M.; WIJESEKERA R. O. B. A rapid micro-method for the separation, identification and estimation of the purine bases: caffeine, theobromine and theophylline. *Journal of Chromatography* 32 (1968): 75-86.
- SERPIL, T., AESKINAZI, O. N., HORTAÇSU, O. AND AKMAN, U. Application of serially-interconnected perfectly-mixed tanks model to dense-gas extraction of plants, in: *Proceedings of the 4th International Symposium on Supercritical Fluids*, Sendai, Japan, 1997, vol. A, 299-302.

- SHUKLA, A.; BHASKAR, A. R.; RIZVI, S. S. H.; MULVANEY, S. J. Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritically fractioned milk fat. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.45-54, 1994.
- SILVA, W. G. Gordura de cupuaçu, suvedâneo e manteiga de cacau. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 1998.
- SINGH, H., YUN, J. S., MACNAUGHTON, S. J., TOMASKO, D. L. AND FOSTER, N. R., Solubility of cholesterol in supercritical ethane and binary gas mixture containing ethane, *Ind. Eng. Chem.*, v. 32, p. 2841-2848, (1993).
- SKODVIN, T. SJOBLUM, J., SAETEN, J.O. AND GESTBLOM, B. Solubilization of drugs in microemulsions as studied by dielectric spectroscopy, *Journal of colloid and interface science*, vol. 155, n° 2, pp. 392-401, Fev, 1993.
- SMITH, B.D. AND SRIVASTAVA, R. *Thermodynamic data for pure compounds*, part B: halogenated hydrocarbons and alcohols, Amsterdam, Elsevier, 1986.
- SMITH, E. Report on drugs-Alkaloids, *Journal of the AOAC*, vol. 55, n° 2, 248-249, 1972.
- SMITH, R. M. Supercritical fluid extraction of natural products. *LC-GC International*, January 1996, p. 8-15.
- SNYDER, J.M., FRIEDRICH J.P. AND CHRISTIANSON, D.D. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂, *JAOCs*, 61(12) (1984) 1851-1856.
- SOCANTAYPE, F. H.; Remoção do Colesterol e Fracionamento do Óleo de Manteiga com Etano Supercrítico; Tese de Mestrado; Engenharia Química; Unicamp; 1996.
- SOMAYAJULU, G.R., Estimation Procedures for Critical Constants, *J. Chem. Eng. Data*, v. 34, 1989, p. 106-120.
- SOTELO, A.; ALVAREZ, R. G. Chemical composition of wild theobroma species and their comparison to the cacao bean. *J. Agric. Food Chem.*, v.39, p.1940-1943, 1991.
- SOVOVÁ, H., Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO₂-I Modeling of Extraction Curves, *Chem. Eng. Sci.*, v. 49, 1994, p. 409-414.
- SOVOVÁ, H.; JEZ, J. BÁRTOLOVÁ, M.; STASTOVÁ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – II Extraction of SEA BUCKTHORN. *Chemical Engineering Science*, v.51, n.3, p.4347-4352, 1996.
- SOVOVÁ, H.; KOMBERS, R.; KUCERA, J.; JEZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. *Chemical Engineering Science*, v.49, n.15, p.2499-2505, 1994b.
- SOVOVÁ, H.; KUCERA, J.; JEZ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – II Extraction of grape oil. *Chemical Engineering Science*, v.49, n.3, p.415-420, 1994a.

- STAHL, E. AND SCHILZ, W. Mikroanalytische untersuchungen zur loslichkeit in uberkritischem kohlendioxdid. *Talanta*. 1979, 26, 675-679.
- STAHL, E. UND WILLING, E. Extraktion von Naturstoffen mit Uberkritischen und Verflusigten Gasen, *Mikrochimica Acta*, 1980 II, 465-474.
- STAHL, E., SCHUTZ, E. AND MANGOLD, H.K., Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide, *J. Agric. Food Chem.*, v. 28, n. 6, 1980, p. 1153-1157.
- STASTOVÁ, J., JEZ, J., BARTLOVA, M AND SOVOVÁ, H., Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO₂-III Extraction from sea buckthorn, *Chem. Eng. Sci.*, v. 51, 18, 1996, p. 4347-4352.
- STERNITZKE, K.D., FAN, T.Y., DUNN, D.L. HPLC of pilocarpina hydrochloride, *Journal of chromatography*, 589, 1992, 159-164.
- STRAIN, E.C.; MUMFORD, G.K.; SILVERMAN, K.; GRIFFITHS, R.R. Caffeine dependence syndrome. Evidence from case histories and experimental evaluations. *JAMA* 272(13):1043-1048, 1994.
- SUBRA, P., CASTELLANI, S., JESTIN P. AND AOUIFI, A. Extraction of β -carotene with supercritical fluids: experiments and modelling, *Journal of supercritical fluids*, 12:261-269, 1998.
- SUGIYAMA, K., SAITO, M. Simple microscale supercritical fluid extraction system and its application to gas-chromatography Mass-spectrometry of lemon peel oil, *Journal of Chromatography* 442: 121-131, Jun. 1988.
- SUZUKI, T. AND WALLER, G. In *Modern methods of plant analysis: Analysis of Non Alcoholic Beverages*, Linskens, H.F. and Jackson, J.F., Eds., Springer Verlag: Heidelberg, 1988, 184-220.
- SWAAN ARONS, J. AND DIEPEN, G.A.M. Thermodynamic study of melting equilibria under pressure of a supercritical gas, *Rec. Trav. Chim.* 82:249, 1963.
- SWAN, G.A. *An introduction to the alkaloids*. Blackwell Scientific Publications, Great Britain, 1967, p. 188-192.
- TANAKA, E., ISHIKAWA, A, YAMAMOTO, Y., OSADA, A., TSUJI, K., FUKAO, K. AND IWASAKI, Y. Comparison of hepatic drug-oxidizing activity after simultaneous administration of two probe drugs, caffeine and trimethadione, to human subjects. *Pharmacology & Toxicology*, 1993, v. 72, p. 31-33.
- TASSIOS, D.P., *Applied chemical engineering thermodynamics*. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, cap. VII, 1993.

- TAYLOR, P. *Agonistas colinérgicos*, Capítulo 6, 8^{va} edição, p. 79-84, In: Gilman, A.G. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Editora Guanabara Koogan, 1991, p. 1232.
- TEMELLI, F. Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *Journal of Food Science*, vol. 57, no2, pp 440-447, 1992.
- TOM, J.W., LIM, G.B., DEBENEDETTI, P.G. AND PRUD'HOMME, R.K. In: Supercritical fluid engineering science, ACS Symposium Series 514, Eds. E. Kiran & J.F. Brennecke, Washington, DC: *American Chemical Society*, 1993, v. 238.
- TORMEN, M.J. *Economia ervateira brasileira*. In erva mate: biologia e cultura no cone sul, eds H. Winge, A.G. Ferreira, J.E.A. Mariath & L.C. Tarasconi. Editora da Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Brasil, Porto Alegre, 1995, p. 27-40.
- TULUS, R. AND ISKENDER, G. Istanbul Univ. Eczacilit Fak. Mecm. S, 130, 1969, CA73, 69887u, 1970.
- TURK, M., Influence of thermodynamic behaviour and solute properties on homogeneous nucleation in supercritical solutions. *Journal of Supercri. Fluids* 18: 169-184, 2000.
- TWU, C.R., An Internally Consistent Correlation for Predicting the Critical Properties and Molecular Weights of Petroleum and Coal-IAR Liquids, *Fluid Phase Equilibria*, v. 16, 1984, p. 137-150.
- VAN ACKEREN, J.L., VENABLE, R.M. AND WAINER, I.W. Separation and analysis of pilocarpina, isopilocarpina, and pilocarpic acid by reverse phase liquid chromatography: collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 67, n° 5, 924-926, 1984.
- VAN ACKEREN, J.L., VENABLE, R.M. AND WAINER, I.W. Separation and analysis of pilocarpina, isopilocarpina, and pilocarpic acid by reverse phase liquid chromatography: collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 67, n° 5, 924-926, 1984.
- VAN LEER, R.A. AND PAULAITIS, M.E. Solubilities of phenol and chlorinated phenols in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* 25:257, 1980.
- VERA, G.R., BASUALDO, I., PERALTA, I., DE HEREBIA, M. AND CABALLERO, S. Minerals content of Paraguayan yerba mate (*Ilex paraguariensis*, S.H.). *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, v. 47, n. 1, 1997, p. 77-80.
- VINOGRADOV, S.N. AND LINNELL, R.H. *Hydrogen bonding*, New York, USA, 1971, Litton Educational Publishing Inc., 319p.
- VITZTHUM, O. AND HUBERT, P. German Patent Specification DE 2127642, 1973.

- VITZTHUM, O. AND HUBERT, P.; Extraction of Caffeine from Coffee; German Patent 2.212.281; 1975; September 27; 1973.
- VITZTHUM, O. AND HUBERT, P.; Recovery Fats and Oil from Plants Seeds; German Patent 2.127.596; December 21; 1972.
- VITZTHUM, O. G., WERKHOFF, P. AND HUBERT, P. New volatile constituents of black tea Aroma. *J. Agric. Food Chem.*, v. 23, n. 5, 1975, p. 999-1003.
- VITZTHUM, O.; HUBERT, P. AND SIRTIL, W.; Hop Extracts; Canadian Patent 987,250; April 13; 1976.
- WAN, A.S.C. Thin-Layer electrophoresis of alkaloids, *J. Chromatogr.* 60, 371-376, 1971.
- WANG, Z.Y., HUANG, M., LOU, Y., XIE, J., REUHL, K., NEWMARK, H., HO, C., YANG, C. AND CONNEY, A. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Research.* v. 54, p. 3428-3435, July 1, 1994.
- WATSON, K.M. In Handbook of chemical property estimation methods, Lyman, W.J., Reehl, W.K., Rosenblatt, D.H. Eds., McGraw-Hill, New York, USA, 1982, chapter 14.
- WEBER, A., NOLTE, C., BORK, M., KUMMEL, R. Recovery of lecithin from egg yolk extracts by gas antisolvent crystallization. Proceedings of the 6th Meeting on supercrit. Fluids, Chemistry and Materials, Poliakoff, M., George, M.W., Howdle, S.M., Eds., ISBN 2-905-267-30-5, April 10-13, Nottingham, 1999, 181-184.
- WELL, P.A, CHAPLIN, R.P., FOSTER, N.R. *Journal of supercritical fluids*, 1990, 3,83.
- WIGGALL, P.H. 1970. Nutritional Aspects of Cocoa and Chocolate, Research and Developmente Department, Cadbury Ltd., Bournville, Gordian 70(5), p. 210-212.
- WINGROVE, A. S. AND CARET, R. L. *Química orgánica*, Editorial Harla, 2^{da}. Edição, Cap. 26, 1992, p. 1306.
- WINTERS, M.A., KNUTSON, B.L., DEBENEDETTI, P.G., SPARKS, H.G., PRZYBYCIEN, T.M., STEVENSON, C.L., PRESTRELSKI, S.J. Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(6): 586-594, Jun. 1996.
- WOJCIECHOWSKI, N.J. AND ECANOW, B. Preparation of crystalline pilocarpina methiodide, *Journal of pharmaceutical sciences*, 887-888, 1961.

- WONG, O., ANDERSON, C., ALLABEN, L., PABMANABHAN, R. AND LATTIN, G. Stability-indicating assay method for pilocarpina nitrate in reservoirs used in the cystic fibrosis indicator system, *International Journal of Pharmaceutics*, 76, 171-175, 1991.
- WOOD, R. AND ROBINSON, J.R. High-performance chromatographic determination of pilocarpina and pilocarpic acid in ocular tissues, *Int. J. Pharm.* 20, 285-293, 1984.
- WUBBOLTS, F.E., BRUINSMA, O.S.L., de GRAAUW, J., VAN ROSMALEN, G.M., Continuous Gas Antisolvent Crystalization of Hidroquinone from Acetone Using Carbon Dioxide. In the 4th International Symposium on Supercritical Fluids, May 11-14, Sendai, Japan, 1997, 63-66.
- WURSTZEN, V. AND TIDS, D. *Farm.*, 13, 160, 1939.
- XU, K., LI, Y, LIU, W., Application of perturbation theory to chain and polar fluids pure alkanes, alkanols and water, *Fluid Phase Equilibria*, 142:55-66, 1998.
- YEO, S.D., LIM, G.B., DEBENEDETTI, P.G. BERNSTEIN, H. Formation of microparticulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent. *Biotechnol. Bioeng.* 41:341-346, 1993.
- YONKER, C. R. AND SMITH, R. D. Solubilities of caffeine and theophylline in supercritical ammonia, *Fluid Phase Equilibria*, v. 22, p. 175-183.
- ZEKOVIC, Z., LEPOJEVIC, Z., VUJIC, D. Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris L.*), *Chromatographia* 51(3-4): 175-179, Feb. 2000.
- 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.
- ZOSEL, K.; Caffeine from Crude Coffee; German Patent 2.221.560; November 30; 1972.
- ZOSEL, K.; Deodorization of Plants Oils; German Patent 2.332.038; January 24; 1974.
- ZOSEL, K.; Descafeinizing Coffee; French Patent 2.079.261; December 17; 1971.
- ZOSEL, K.; Simultaneous Hydrogenation and Deodorization of Fats and/or Oils; German Patent 2.441.152; March 6; 1975.
- ZUROWSKA-PRYCKOWSKA, K., SZNITOWSKA, M. AND JANICKI, S. Studies on the effect of pilocarpina incorporation into a submicron emulsion on the stability of the drug and the vehicle, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 47(3): 255-260, May, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Resultados das análises por cromatografia líquida de alta eficiência da pilocarpina hidrocloreata e dos produtos de sua degradação.

APÊNDICE B: Uso de diferentes propriedades críticas estimadas e regras de misturas no sistema dimetilxantina/CO₂SC

APÊNDICE C: Publicações em revistas nacionais e internacionais.

APÊNDICE A

Resultados das análises por cromatografia líquida de alta eficiência da pilocarpina hidrociorada e dos produtos de sua degradação

Para realizar a análise dos extratos obtidos após a extração supercrítica foi necessário estabelecer o método correto de identificação qualitativa e quantitativa da pilocarpina hidrociorada pura, assim como de seus produtos de degradação (isopilocarpina, ácido pilocárpico e ácido isopilocarpico).

Foram testadas algumas colunas mencionadas na literatura para análise de pilocarpina. As colunas, porém apresentaram defeitos como baixa eficiência e má resolução. Dentre as várias colunas testadas, escolheu-se trabalhar com a coluna descrita no item III.5, e nas condições especificadas nesse item. Pois houve muita discrepância com o que diz respeito ao comprimento de onda usado, pH da fase móvel e a coluna cromatográfica.

Na Figura A.1 mostra-se os cromatogramas dos padrões das amostras: A- pilocarpina hidrociorada adquirida da Sigma (USA) e, B- pilocarpina hidrociorada doada pela Diosynth (Netherlands). O tempo de retenção (t_R) em ambos produtos de pilocarpina hidrociorada foi de 29 min. O cromatograma da amostra padrão C- isopilocarpina hidrociorada doada pela Diosynth apresenta um tempo de retenção de 26,5 minutos.

Visando investigar uma possível degradação da pilocarpina foi realizada uma análise por CLAE da solução de pilocarpina hidrociorada em etanol conforme mostrado na Figura A.2. Neste cromatograma observa-se que não houve nenhuma degradação na solução após três semanas de preparo, à temperatura de 21°C.

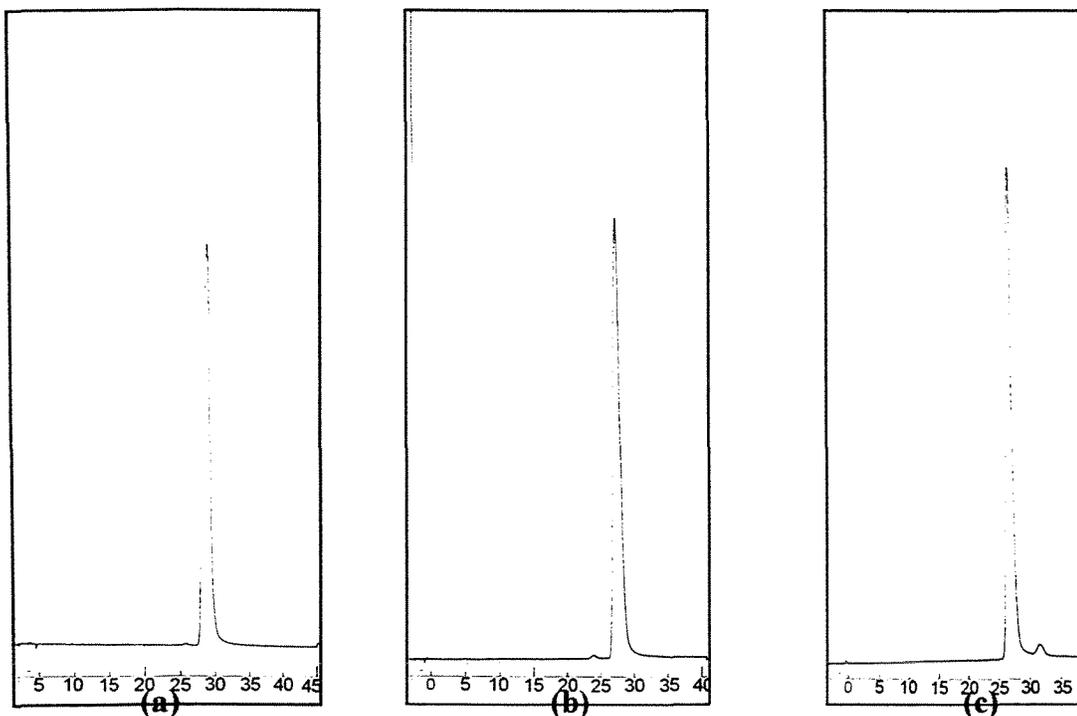


Figura A.1. (a) Cromatograma do padrão Sigma de pilocarpina hidrocloreada diluída em água, (b) Cromatograma do padrão Diosynth de pilocarpina hidrocloreada, e (c) Cromatograma do padrão Diosynth de isopilocarpina hidrocloreada

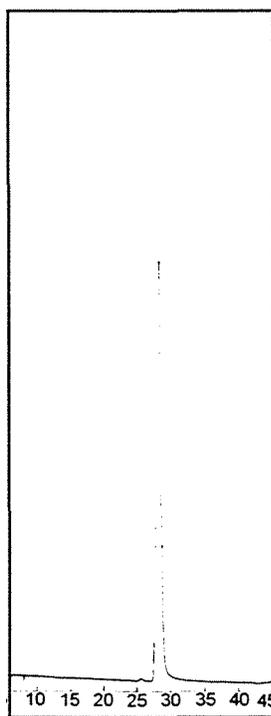


Figura A.2. Cromatograma da solução de pilocarpina hidrocloreada em etanol ($t_R=29$ min)

Na Figura A.3 mostramos o cromatograma obtido após causar uma conversão da pilocarpina hidrocloreada a ácido pilocárpico hidrocloreado, usando 0,1 N de NaOH aquoso. Neste cromatograma aparece só uma conversão inicial, mas cabe destacar que foi obtida a conversão total a ácido pilocárpico, e ao mesmo tempo houve a aparição de traços de ácido isopilocárpico.

A ordem de eluição e os tempos de retenção estão em concordância com os da literatura (ácido isopilocárpico-45 min, ácido pilocárpico-40 min, pilocarpina-29 min e isopilocarpina-26,5 min), sendo que a resolução e a eficiência obtidas foram melhores que os da literatura (Fan et al., 1996).

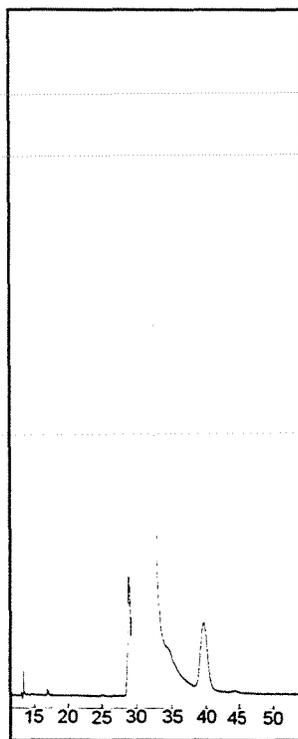


Figura A.3. Cromatograma da conversão de pilocarpina hidrocloreada a ácido pilocárpico hidrocloreado ($t_R=29$ min e $t_R=40$ min).

Também foi realizada a análise da solução oftalmológica colírio (colóide), contendo 2% pilocarpina para avaliar a integridade desta solução comercial na forma de medicamento. Por este cromatograma verificamos que esta solução contém, conforme especificado na bula, apenas pilocarpina (Figura A.4).

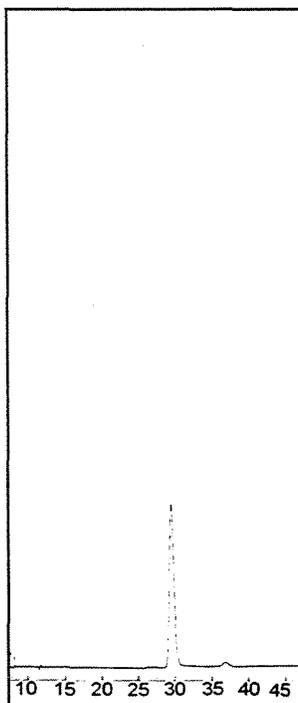


Figura A.4. Cromatograma da solução oftalmológica do colírio

APÊNDICE B

USO DE DIFERENTES PROPRIEDADES CRÍTICAS ESTIMADAS E REGRAS DE MISTURAS NO SISTEMA DIMETILXANTINA/CO₂SC

B.1. SISTEMA TEOFILINA/CO₂SC UTILIZANDO AS DIFERENTES PROPRIEDADES CRÍTICAS ESTIMADAS

B.1.1. Para a isoterma a 313,2 K

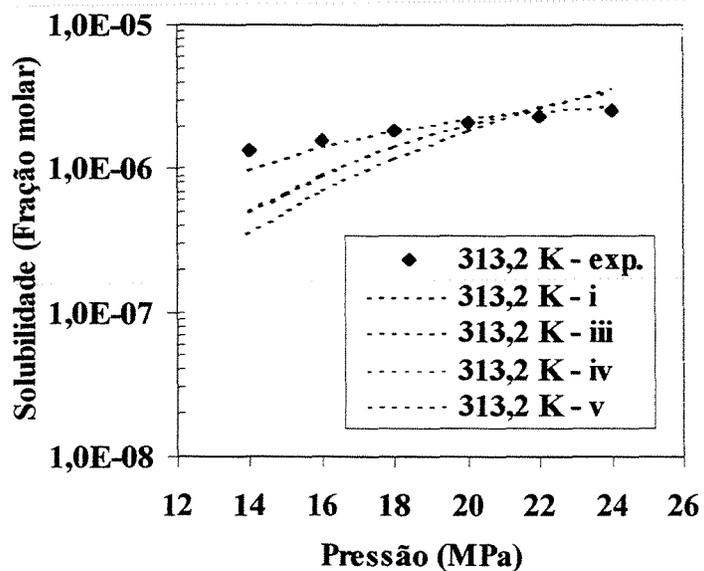


Figura B.1. Usando a Regra de van der Waals a 313,2 K

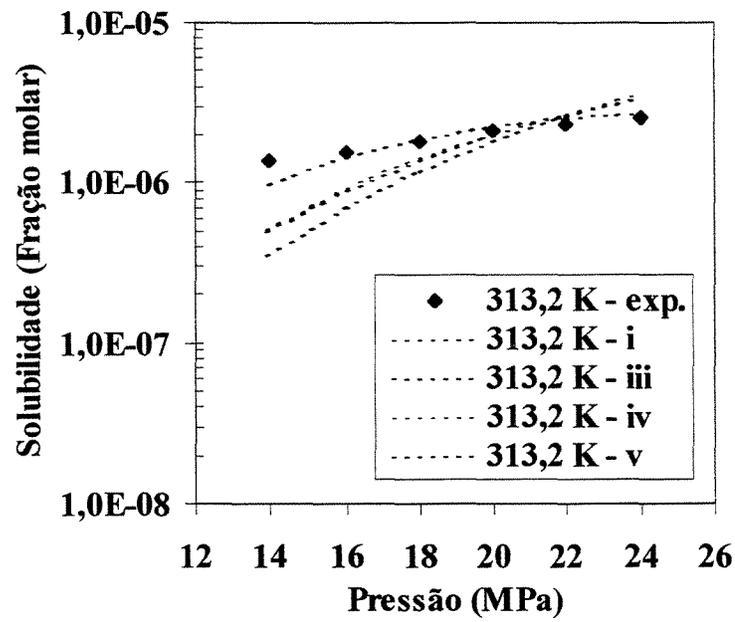


Figura B.2. Usando a Regra de Panagiotopoulos e Reid a 313,2 K

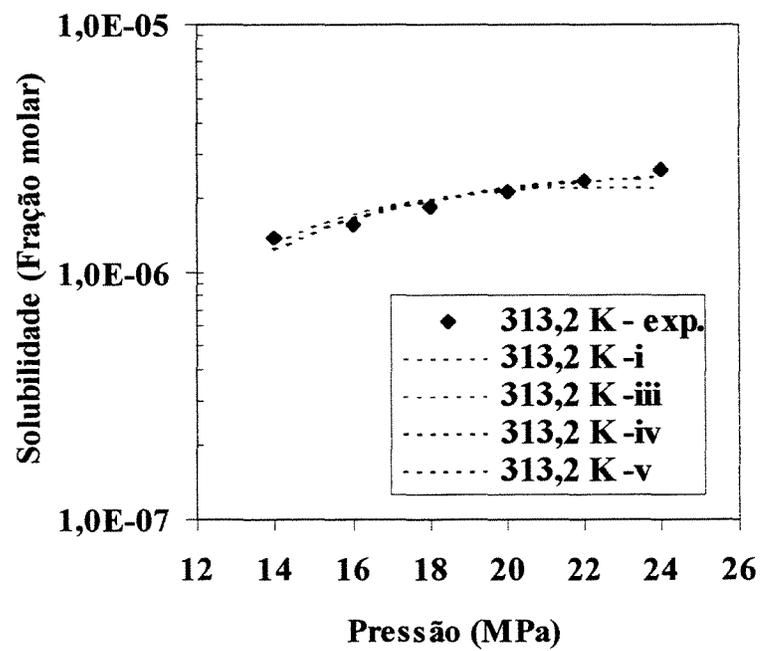


Figura B.3. Usando a Regra de Mohamed e Holder a 313,2 K

B.2. SISTEMA TEOBROMINA/CO₂SC UTILIZANDO AS DIFERENTES PROPRIEDADES CRÍTICAS ESTIMADAS

B.2.1. Para a isoterma a 313,2 K

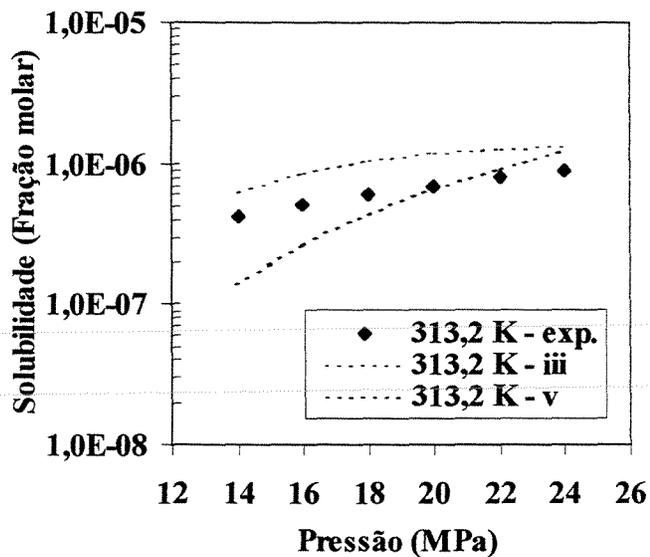


Figura B.4. Usando a Regra de van der Waals a 313,2 K

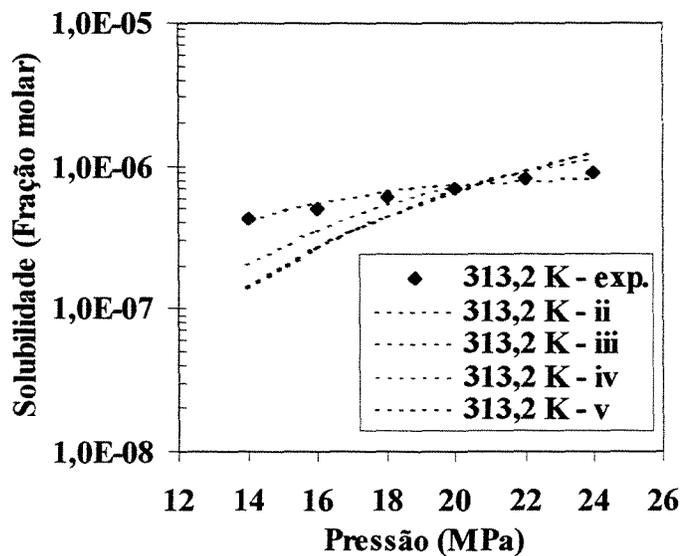


Figura B.5. Usando a Regra de Panagiotopoulos e Reid a 313,2 K

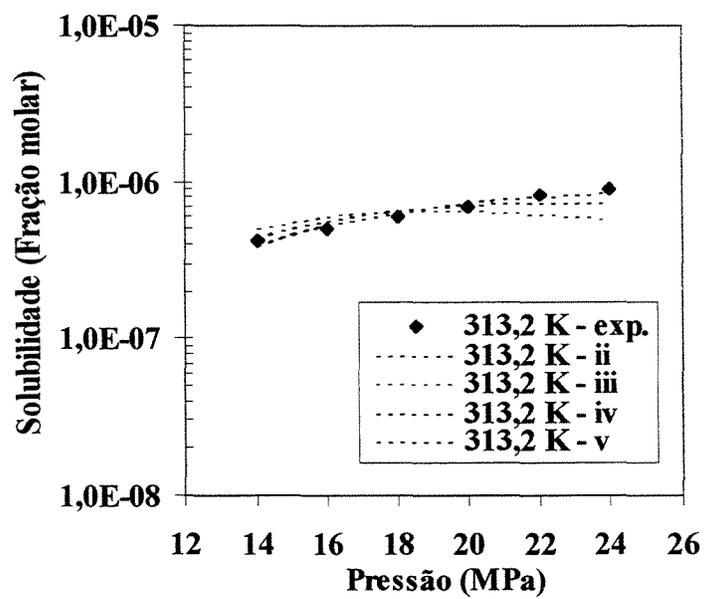


Figura B.6. Usando a Regra de Mohamed e Holder a 313,2 K

APÊNDICE C

PUBLICAÇÕES

C.1. REVISTAS INTERNACIONAIS E CAPÍTULOS DE LIVROS

- **Marleny D. A. Saldaña** and Rahoma S. Mohamed. 'Application of Supercritical Fluids: extraction of alkaloids from natural plants'. In: Constantina Tzia and George Liadakis, 'Extraction Optimization in Food Engineering', Chapter 5, Marcel Dekker Inc., in press, 2002.
- Rahoma S. Mohamed, **Marleny D. A. Saldaña**, Alvaro B. de Azevedo and Uiram Kopcak. 'Extraction of Cholesterol from Food Products Using Supercritical Fluids'. In: Constantina Tzia and George Liadakis, 'Extraction Optimization in Food Engineering', Chapter 3, Marcel Dekker Inc., in press, 2002.
- **Marleny D.A. Saldaña**, Rahoma S. Mohamed and Paulo Mazzafera. 'Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane', *Journal of Fluid Phase Equilibria*, 4895: 1-10, 2001.
- **Marleny D. A. Saldaña**, Carsten Zetzl, Rahoma S. Mohamed and G. Brunner. 'Decaffeination of guaraná seeds in a microextraction column using water-saturated CO₂', *Journal of Supercritical Fluids*, in press, 2001.
- **Saldaña, M.D.A.**, Mohamed, R.S. and Mazzafera, P. 'Methylxanthines Extraction from Maté (*Ilex paraguariensis*) leaves *in natura* using Supercritical CO₂', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17(3): 251-259, 2000.
- Rahoma S. Mohamed, **Marleny D. A Saldaña**, Fredy H. Socantaype, Theo G. Kieckbusch. 'Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina', *Journal of Supercritical Fluids* 16: 225-233, 2000.
- **Saldaña, M.D.A.**, Mohamed, R.S. and Mazzafera, P. 'Extraction of Purine Alkaloids from Maté (*Ilex paraguariensis*) using Supercritical CO₂', *Journal of Agric. and Food Chemistry* 47(9): 3804-3808, 1999.
- **M.D.A. Saldaña**, R.S. Mohamed y P. Mazzafera. 'Extracción de alcaloides de los granos de café *canephora* usando fluidos supercríticos', *Información Tecnológica*, vol. 10 (1), 87-94, 1999.

- **M.D.A Saldaña**, E.M. Homen y R.S Mohamed, 'Extracción del colesterol com mezclas de dióxido de carbono y etano supercrítico', *Información Tecnológica*, vol. 10 (1), 95-100, 1999.
- **M.D.A.Saldaña**, Paulo Mazzafera e Rahoma S. Mohamed, 'Uso de Fluidos Supercríticos para Obtenção de Alcalóides de Plantas', *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32 (1): 80-88, 1998.
- **M.D.A.Saldaña**, Paulo Mazzafera e Rahoma S. Mohamed, 'Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO₂ supercrítico', *Ciência e Tecnol. Aliment.* 17 (4): 371-376, dez. 1997.
- **M.D.A Saldaña**, E.M. Homen e R.S Mohamed, 'Extração do colesterol com misturas de dióxido de carbono e etano supercrítico', *Ciência e Tecnol. Aliment.* 17 (4): 389-392, dez. 1997.

C.2. CONGRESSOS INTERNACIONAIS

- **Marleny D. A. Saldaña** and Rahoma S. Mohamed. 'Extraction of theobromine and cocoa butter from brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane', accepted for publication in the proceedings of the 6th World congress of chemical engineering, 23-27 september, 2001, Melbourne, Australia.
- **Marleny D.A. Saldaña**, Rahoma S. Mohamed and Paulo Mazzafera. 'Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane', In the proceedings of the Ninth International Conference on Properties and Phase Equilibria for Product and Process Design – PPEPPD 2001: bridging theory with product and process design, May 20-25, 2001, Kurashiki, Japan.
- **Marleny D. A. Saldaña**, Carsten Zetzl, Rahoma S. Mohamed and G. Brunner. 'Extraction of methylxanthines from guaraná seeds, cocoa beans, maté tea leaves in a microextraction column using supercritical CO₂', In the proceedings of the 7th Meeting on Supercritical Fluids: Particle Design - Materials and Natural Products Processing, December 6-7-8, 2000, Antibes, France.
- **Marleny D. A. Saldaña**, Carsten Zetzl, Rahoma S. Mohamed and G. Brunner. 'Extraction of xanthines from natural products in a microextraction column using supercritical CO₂ and ethanol', In the proceedings of the 7th Meeting on supercritical Fluids: Particle Design - Materials and Natural Products Processing, December 6-7-8, 2000, Antibes, France.
- **Marleny D. A. Saldaña**, Carsten Zetzl, Rahoma S. Mohamed and G. Brunner. 'High pressure extraction of alkaloids from guaraná seeds, maté leaves and cocoa beans using supercritical CO₂', In the proceedings of the XVII Brazilian Congress of Food Science and Technology, August 8-10, 2000, Fortaleza-Ceara, Brazil.

- **Marleny D. A. Saldaña**, Carsten Zetzi, Rahoma S. Mohamed and G. Brunner. 'Decaffeination of guaraná seeds in a microextraction column using water-saturated CO₂'. In: Proceedings of the *Fifth International Symposium on Supercritical Fluids – ISSF2000*, The Westin Atlanta North Hotel, 8-12 April, 2000, Atlanta-Georgia, United States.
- **Saldaña, M.D.A.**, Mohamed, R.S. e Mazzafera, P. 'Extracción de los Principios Activos de los Granos de Café del Brasil', *Anales del II Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos*, Universidad Nacional del Sur UNS (PLAPIQUI)-UNLP (CIDCA) – CYTED, file:///D:/congreso/iv26htm, pp. 1-5, 1998, Bahia Blanca, Argentina.
- **Saldaña, M.D.A.**, Homen, E.M. e Mohamed, R.S. 'Uso de Etano como Co-solvente na Extração do Colesterol com CO₂ Supercrítico', *Anales del II Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos*, Universidad Nacional del Sur UNS (PLAPIQUI)-UNLP (CIDCA) – CYTED, file:///D:/congreso/iv26htm, pp. 1-6, 1998, Bahia Blanca, Argentina.
- **Saldaña, M.D.A.**, Mohamed, R.S. e Mazzafera, P. 'Extraction of Caffeine, Trigonelline and Chlorogenic Acid From Brazilian Coffee Beans with Supercritical Fluids', In: Proceedings of the *4th International Symposium on Supercritical Fluids*, pp. 219-222, 1997, Sendai, Japan.
- **Saldaña, M.D.A.**, Socantaype, F.H., Neves, G.B.M. and Mohamed, R.S. 'Cholesterol Removal and Fractionation of Butter Oil Using Supercritical CO₂ and Ethane', In: Proceedings of the *4th International Symposium on Supercritical Fluids*, pp. 609-612, 1997, Sendai, Japan.
- **Saldaña, M.D.A.**, Mohamed, R.S. e Mazzafera, P. 'Extração dos princípios ativos dos grãos de café', *Anais do II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, pp. 242, 1997, Campinas, Brasil.
- **M.A.Saldaña**, F.H. Socantaype, G.M. Neves, R.S. Mohamed e T.G. Kieckbusch, 'Fracionamento do óleo de manteiga usando CO₂ e etano (puros e misturas) Supercríticos e Adsorção em Alumina', *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (ENEMP)*, vol. II, pp. 550-555, 1996, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.
- **M.A.Saldaña**, Rahoma S. Mohamed e Paulo Mazzafera, 'Extração da Cafeína e trigonelina dos grãos de café usando fluidos supercríticos', *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (ENEMP)*, vol. II, pp. 747-752, 1996, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.



Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane

Marleny D.A. Saldaña^a, Rahoma S. Mohamed^{a,*}, Paulo Mazzafera^b

^a School of Chemical Engineering, State University of Campinas-UNICAMP, C.P. 6066, Campinas-SP, 13083-970, Brazil

^b Biology Institute, University of Campinas-UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

Received 20 May 2001; accepted 7 August 2001

Abstract

This work explores the use of supercritical CO₂ and ethane, both acceptable and non-contaminating solvents for food products, in the recovery of cocoa butter from *Theobroma cacao* cocoa beans. Continuous extractions were performed using a high pressure apparatus. Extractions were first performed using processed cocoa butter to assess and compare the extraction efficiencies of CO₂ and ethane. These extractions were carried out at 323.2 K, pressures of 15.2 and 24.8 MPa, and CO₂ and ethane flow rates of 1.3 and 0.9 g min⁻¹, respectively. Extraction yields of cocoa butter using ethane were an order of magnitude higher than obtained with CO₂. Extractions to explore the capacity of supercritical fluids in the extraction of cocoa butter from cocoa beans were subsequently performed with ethane at 323.2 and 343.2 K, pressures of 15.2, 24.8 and 28.3 MPa and ethane flow rate of 0.9 g min⁻¹. The results revealed a pronounced effect of pressure on the extraction yield at all temperatures investigated. Extraction curves showed a retrograde behavior for the two temperatures in the whole pressure range. This behavior suggests a range of possibilities for the extraction of cocoa butter from cocoa beans. Cocoa butter fractions with varying fatty acids concentrations were also obtained. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Cocoa butter; Supercritical extraction; Ethane; Fractionation; Cocoa beans; Mixture; Application

1. Introduction

Cocoa butter is unique among vegetable fats due its composition and crystallization behavior. Triglycerides represent the major part of cocoa butter (97–98%) with three main fatty acids: palmitic (C16); stearic (C18); and oleic fatty acid (C18:1). With the oleic fatty acid always sterified in the central position of the glycerol molecule while saturated fatty acids are in positions 1 and 3, cocoa butter presents

* Corresponding author. Tel.: +55-19-788-3932; fax: +55-19-788-3922.
E-mail address: mohamed@feq.unicamp.br (R.S. Mohamed).

29 three main symmetric triglycerides POP (palmitic–oleic–palmitic), POSt (palmitic–oleic–stearic), StOSt
30 (stearic–oleic–stearic). Of all the ingredients present in chocolate, none has more influence on its physical
31 and chemical properties than cocoa butter, which is responsible for the different favorable characteristics
32 such as hardness at room temperature, brightness and fast and complete melting when placed in the
33 mouth. Cocoa butter has a light yellow color, breakable at temperatures less than 26.7 °C with complete
34 melting at 35 °C [1]. Cocoa butter hardness and crystallization behaviors depend on many factors, in-
35 cluding origin, climatic and processing conditions, among others. To minimize the variability of cocoa
36 butter in chocolate processing, a mixture of butters from different origins is generally used. It is possible
37 to achieve a desired consistency by blending hard and soft cocoa butters. This blending can also avoid the
38 shorter product life of cocoa butter in warm climates. Fractionation of cocoa butter allows the production
39 of fractions with well established and universal characteristics available for the formulation of desirable
40 blends.

41 Common fractionation techniques include, melt crystallization with or without solvents [2]. This tech-
42 nique was used by Norris et al. [3] for the fractionation of butter oil. Molecular and vacuum distillation
43 were also used [4,5].

44 High quality cocoa butter used in food, cosmetic and pharmaceutical industries are obtained by me-
45 chanical press and expeller and solvent extraction with hexane. Increasing awareness of health and
46 safety hazards associated with the use of organic solvents, due to its possible contamination of ex-
47 tracted products has placed new demands on the food industry to develop new and clean technologies
48 for the processing of food products. Supercritical fluid extraction using carbon dioxide as a solvent
49 has provided an excellent alternative to the use of chemical solvents in the extraction of oils from dif-
50 ferent plant matrixes such as corn, soybean and cotton seeds, among others [6–12]. Supercritical CO₂
51 has also proved to be a powerful solvent for the extraction of valuable compounds such as linoleic
52 acid, linolenic acid and other compounds present in natural resources [13]. Extraction with supercrit-
53 ical CO₂ requires higher investment but can be selective, without leaving toxic residues or the risk of
54 thermal degradation and thus can be an attractive solvent for the extraction and fractionation of cocoa
55 butter.

56 Roselius et al. [14] presented a patent on the efficient extraction of cocoa butter from cocoa beans with
57 CO₂ in the pressure range from 25 to 35 MPa at temperatures between 318 and 333 K. However, McHugh
58 and Krukonis [10] found that less than 5% of the cocoa butter could be extracted even if the extraction
59 was carried out at 48.3 MPa for 8 h. Rossi et al. [15] only observed minor changes in the triacylglycerols
60 compositions of fats extracted from cocoa beans and shells with supercritical CO₂ as a function of time,
61 temperature and pressure. Li and Hartland [16] reported on the extraction of cocoa butter at 15 MPa and
62 333.2 K and showed the potential for the large scale utilization of carbon dioxide in the extraction of
63 cocoa butter from cocoa beans.

64 Ethane has similar characteristics to CO₂, being more efficient in the extraction of lipids but its potential
65 application is not yet fully explored [17,18]. Recent data on butter oil solubility in supercritical fluids
66 revealed a much higher solubility in ethane as compared to that in CO₂ [18]. Ethane ($T_c = 305.15$ K,
67 $P_c = 48.8$ bar) has a critical temperature nearly equal to that of carbon dioxide ($T_c = 304.15$ K,
68 $P_c = 73.9$ bar) and a critical pressure lower than that of CO₂. The resulting lower pressure requirements
69 combined with the higher solubilities of vegetable fats in ethane makes it an attractive solvent for the
70 extraction and fractionation of these fats. The main objective of this work is to provide specific and com-
71 parative experimental data on the use of supercritical CO₂ and ethane in the extraction and fractionation
of cocoa butter from cocoa beans.

72 2. Materials and methods

73 2.1. Materials

74 Cocoa butter and cocoa beans were donated by Cardill Ltda (Bahia, Brazil). The cocoa beans content
 75 of cocoa butter was estimated to be 50 wt.% as obtained using soxhlet extraction. Pure ethanol alcohol,
 76 99% purity, was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis-Missouri, USA). CO₂ and ethane, 99.9%
 77 purity, were obtained from the White Martins Gases Industrials S.A. (Campinas, Brazil).

78 2.2. Experimental apparatus

79 The experimental apparatus used is a semi-continuous flow high pressure system purchased from Au-
 80 toclave Engineers (Erie, PA, USA), and designed for working pressures up to 37 MPa at 473 K (Fig. 1).
 81 This apparatus is the one used earlier by Mohamed et al. [19], Saldaña et al. [20] and Mohamed et al.
 82 [18]. The major components of this apparatus include positive liquid displacement pumps (Thermal Sep-
 83 aration Products, Riveira Beach, FL, USA) for solvent delivery (46–460 ml/h), two 300 ml high pressure
 84 extraction vessels (one simple and another equipped with a window that allows visual observation of
 85 the phases in equilibrium), and separator flasks. The extraction vessels are supplied with heating jackets
 86 and temperature controllers and can be operated in series or parallel. Heating tapes are used through-
 87 out the apparatus to maintain constant temperature in the extraction section. To ensure constant and
 88 steady solvent delivery, pump heads are cooled by a circulating fluid passing through a chiller, CFT
 89 R134a (NESLAB Instruments, Newington, NH, USA). Flow rates and accumulated gas volumes passing
 90 through the apparatus are measured using a flow computer measuring device (EG&G Instruments Flow
 91 Technology). Autoclave Engineers (Erie-Pennsylvania, USA) micrometering valves (MVs) were used
 92 for flow control throughout the apparatus. Heating tapes are also used around these valves to prevent

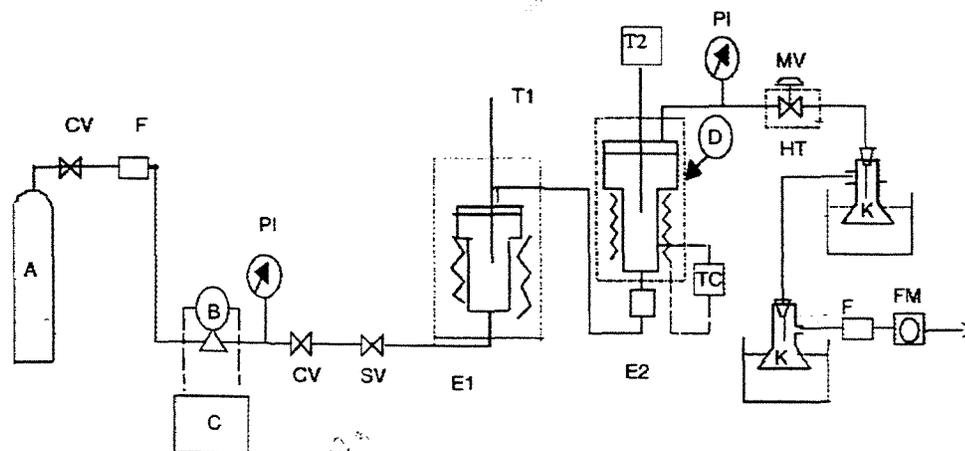


Fig. 1. Experimental apparatus: A, CO₂ cylinder; CV, check valve; F, filter; PI, pressure indicator; B, pump; C, chiller; SV, shut-off valve; SH, safety head; TC, temperature controller; E, extractor; D, furnace; T1, thermocouple; MV, micro-metering valve; HT, heating tape; K, separator vessel; IB, ice bath; IM, ice/methanol bath; CF, carbon adsorption filter; FM, flow meter.

93 freezing of solvents or solid solute precipitation following depressurization. Pressure in both extrac-
94 tors were monitored with a digital transducer system, Heise Series 901A RTS, acquired from Dresser
95 Industries (Stratford, CT) with a precision of ± 0.03 MPa. Extractor temperatures were controlled to
96 ± 0.5 °C.

97 2.3. Cocoa butter extraction and fractionation

98 In order to determine the extractability of cocoa butter with supercritical fluids, samples of press
99 processed cocoa butter (115 g) were placed in the extractor. Glass wool was placed in the extractor exit to
100 prevent entrainment of cocoa butter droplets. The cocoa butter were extracted using supercritical carbon
101 dioxide and supercritical ethane at 323.2 K and 15.2 and 24.8 MPa. CO₂ and ethane flow rates of 1.3
102 and 0.9 g min⁻¹, respectively, were used. In a typical extraction experiment, solvent (CO₂ or ethane) was
103 delivered by the pumps as a liquid and slowly allowed into the extractor until extraction pressure was
104 reached. The extractor was heated to the extraction temperature and the MV located downstream of the
105 extractor was slowly opened while maintaining the pressure constant in the extractor. The effluents of the
106 extractor (supercritical fluid saturated with cocoa butter) were depressurized through the MV which was
107 properly heated to prevent solvent freezing and plugging with precipitated solid solute. The precipitated
108 cocoa butter following depressurization was recovered in the separator flasks placed in a cooling bath.
109 Hexane was placed in the last separator flasks to assure complete recovery of precipitated cocoa butter. The
110 amount of recovered cocoa butter was weighed and recorded. In these particular experiments, fractions
111 were collected at certain time intervals characterized by the passage of each 377 and 62 g of CO₂ and
112 ethane, respectively, through the extractor. This large difference in the mass of the solvent used is due
113 to the lower solubilities of cocoa butter in CO₂ as compared to ethane. In total, 7 and 19 fractions of
114 butter were collected when using CO₂ and ethane, respectively. The amount of solvent used is determined
115 through the gas flow meter.

116 2.4. Extraction and fractionation of cocoa butter from cocoa beans

117 In order to explore the capacity of ethane in the extraction and fractionation of cocoa butter from cocoa
118 beans, experiments were performed using supercritical ethane at 323.2 and 343.2 K and pressures of 15.2,
119 24.8 and 28.3 MPa. A sample of 30 g of cocoa beans (0.3–2 mm) were mixed with glass beads (4 mm
120 in diameter) and placed in extractor I. The solvent was passed through the extractor and the extracted
121 butter was recovered by depressurization of the extractor effluent, as explained above for the extraction
122 of press processed cocoa butter. In these experiments, butter fractions were collected at time intervals
123 characterized by the passage of each 124 g of ethane through the extractor. In total, 7 fractions of butter
124 were collected when using ethane. The amount of solvent used is determined through the gas flow meter.

125 2.5. Fatty acid analysis

126 A gas chromatography, Perkin-Elmer Sigma 3B, with an ionization flame detector and a capillary
127 Silar 10C column (10% ciano propilsiloxane in chromosorb W) of 30 mm × 0.25 mm ID × 0.1 μm of
128 film thickness (DB-5) was employed to determine fatty acid concentration in each fraction. An LC-100
129 Perkin-Elmer integrator that employs peaksimple chromatography data system was used. The column
130 temperature was 175 °C and the temperature of the detector and injector were maintained at 225 °C. The

131 carrier gas (N₂) flow rate was kept at 25 ml min⁻¹. Before the analysis, samples were treated according
 132 to the Hartman and Lago method [21] for methyl sterification.

133 3. Results and discussion

134 In order to characterize the cocoa butter used in this work, a fatty acid analysis was carried out and
 135 presented in Table 1. As shown, the fatty acid content was very similar to that obtained by Silva [22] and
 136 Salgado [23].

137 Fig. 2 shows the extraction yields (gram cocoa butter extracted/gram original cocoa butter) of cocoa
 138 butter obtained when using supercritical CO₂ at 323.2 K and the pressures of 15.2 and 24.8 MPa. The
 139 data reported represent average values of two independent experiments with a standard deviation of 8%.
 140 With the same solvent quantity (2.6 kg of CO₂), the increase in pressure caused a three-time increase in
 141 the extraction yield (4.5–13%). A similar effect was observed by Li and Hartland [16] when extracting
 142 cocoa butter with supercritical CO₂ at 313.2 K and pressures of 15 and 25 MPa. Pressures over 400 bar,
 143 however, are reported to be of little practical use due to the loss of selectivity for the fat components in
 144 relation to other extractable components in cocoa butter [15].

145 The solubility of cocoa butter in supercritical CO₂ at 323.2 K and the pressures of 15 and 24.8 MPa, as
 146 obtained from the extraction curves, were found to be 0.43 and 0.60 wt.%, respectively. These values are in
 147 close agreement with those (0.46 and 0.59 wt.%) reported by Bhaskar et al. [24] at 313.2 K and pressures
 148 of 19.3 and 24.1 MPa, respectively. Li and Hartland [25] reported the values of 0.18 and 0.4 wt.% at
 149 323.2 K and pressures of 15 and 25 MPa. It is important to note that these previous works were limited to
 150 determination of solubility of processed cocoa butter in CO₂ at different conditions and no fractionation
 151 data were reported. It is also important to note that the fractions obtained in this work can be described

Table 1

Fatty acid composition of cocoa butter and of selected fractions collected during fractionation with supercritical fluids at 24.8 MPa and 323.2 K

No. of carbon	Fatty acid	Cocoa butter [22]	Cocoa butter [23]	Original cocoa butter	A	B	C
C12:0	↖ Lauric			0.24	–	0.11	–
C14:0	Myristic	0.1–0.3	0.1	0.18	0.13	0.14	0.07
C16:0	Palmitic	25.0–28.0	26.0	26.05	28.84	27.52	22.03
C16:1	Palmitoleic	0.4–0.7	0.3	0.46	0.53	0.48	0.49
C18:0	Stearic	33–37	34.4	32.61	31.91	32.77	29.96
C18:1	Oleic	31–35	34.8	32.86	33.76	34.42	29.68
C18:2	Linoleic	2–3.5	3.0	3.24	3.71	3.30	3.28
C18:3	Linolenic	0.2	0.2	0.16	0.22	0.19	0.18
C18:4n-3	↖ Parinaric			0.91	0.81	0.89	1.02
C20:0	Arachic	0.6–1.0	1.0	0.09	0.07	–	5.06
C22:0	Behenic	0.1	–	0.17	–	–	–
C22:5n-3				–	–	–	0.07
C22:6n-3				2.97		0.10	8.08
Saturated		66.4–60.6	61.7	59.36	60.96	60.57	57.15
Unsaturated		33.6–39.4	38.3	40.63	39.03	39.42	42.84

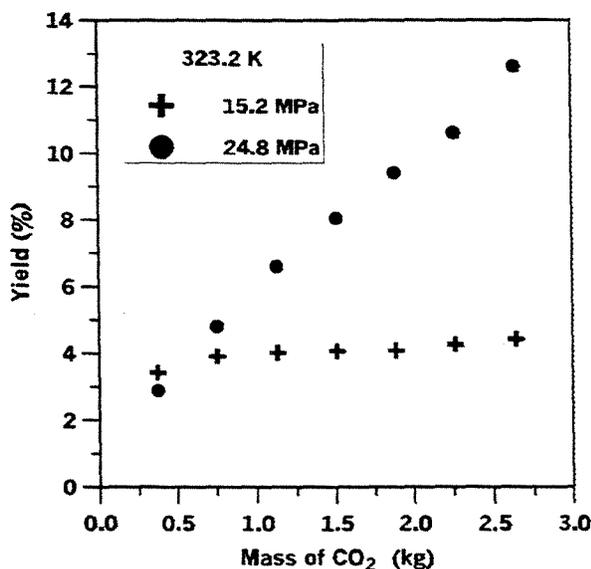


Fig. 2. Fractionation and extraction of cocoa butter with supercritical carbon dioxide at 323.2 K and 15.2 and 24.8 MPa.

152 as solids at room temperature, of light yellow color (typical of the cocoa butter) and presented pleasant
153 flavor.

154 The results obtained for the fractionation of cocoa butter with supercritical CO₂ and ethane at 323.2 K
155 and pressures of 15.2 and 24.8 MPa, are shown in Fig. 3. At 15.2 MPa, with the same quantity of solvent
156 (1.5 kg), extraction yields of 4 and 24% of the original cocoa butter sample were obtained with CO₂ and
157 ethane, respectively. At the higher pressure of 24.8 MPa, extraction yields of 7 and 100%, were obtained
158 with a solvent quantity of 1.2 kg of ethane and CO₂, respectively. These higher extraction yields obtained
159 with ethane can be attributed to the higher solubilities of triglycerides in ethane, as observed earlier by
160 Mohamed et al. [18] for butter oil extraction using supercritical CO₂ and ethane. It is important to observe
161 that all the cocoa butter was extracted using ethane as the solvent, a result that cannot be confirmed from
162 the results obtained in this work for the case when CO₂ was employed. From these extraction curves, the
163 solubility of cocoa butter in supercritical CO₂ and ethane at 323.2 K and 24.8 MPa were estimated to be
164 0.6 and 14%, respectively.

165 With these superior extraction efficiencies, obtained for the press processed cocoa butter/ethane model
166 system, the extraction and fractionation of cocoa butter from cocoa beans was carried out and limited to
167 the use of ethane as the supercritical solvent. Cocoa butter extraction yields obtained using supercritical
168 ethane at 323.2 and 343.2 K and pressures of 15.2, 24.8 and 28.3 MPa are shown in Fig. 4. The extraction
169 curves (Fig. 4) clearly show the three typical regions pointed out by Hedrick et al. [26] for supercritical
170 extraction systems: solubility dependent, intermediate, and diffusion-controlled regions. Extractions at
171 323.2 K and using the same quantity of solvent (0.31 kg of ethane), cocoa butter yields of 15, 90 and 99%,
172 were obtained at the extraction pressures of 15.2, 24.8 and 28.3 MPa, respectively. At 343.2 K, and for the
173 same quantity of solvent, extraction yields of 9, 62 and 72% were obtained, at 15.2, 24.8 and 28.3 MPa,
174 respectively. While an increase in pressure resulted in an increase in extraction yield as expected due

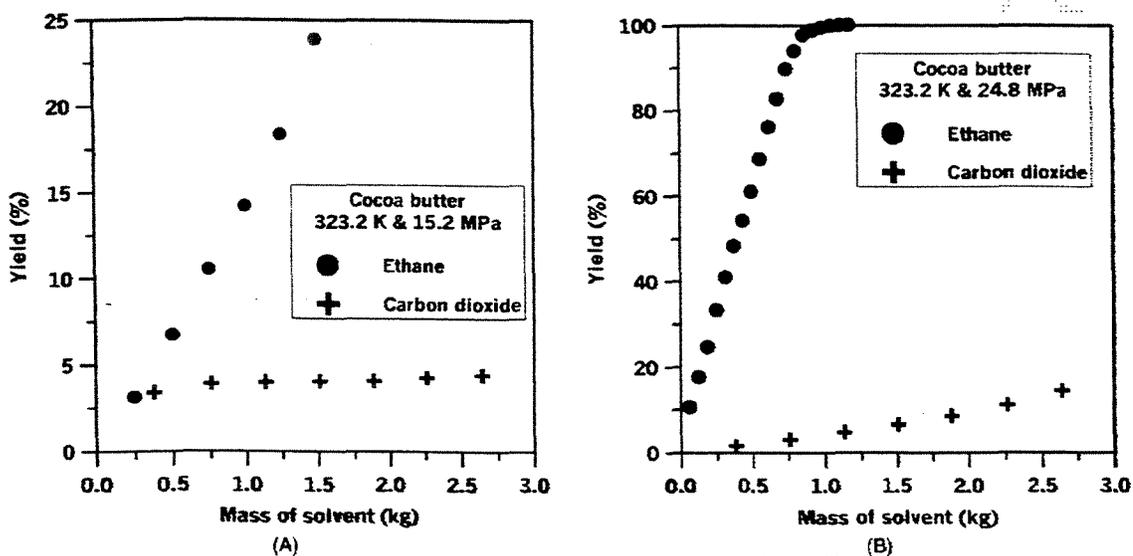


Fig. 3. Fractionation and extraction of cocoa butter with supercritical CO_2 and supercritical ethane at 323.2 K and pressures of 15.2 and 24.8 MPa.

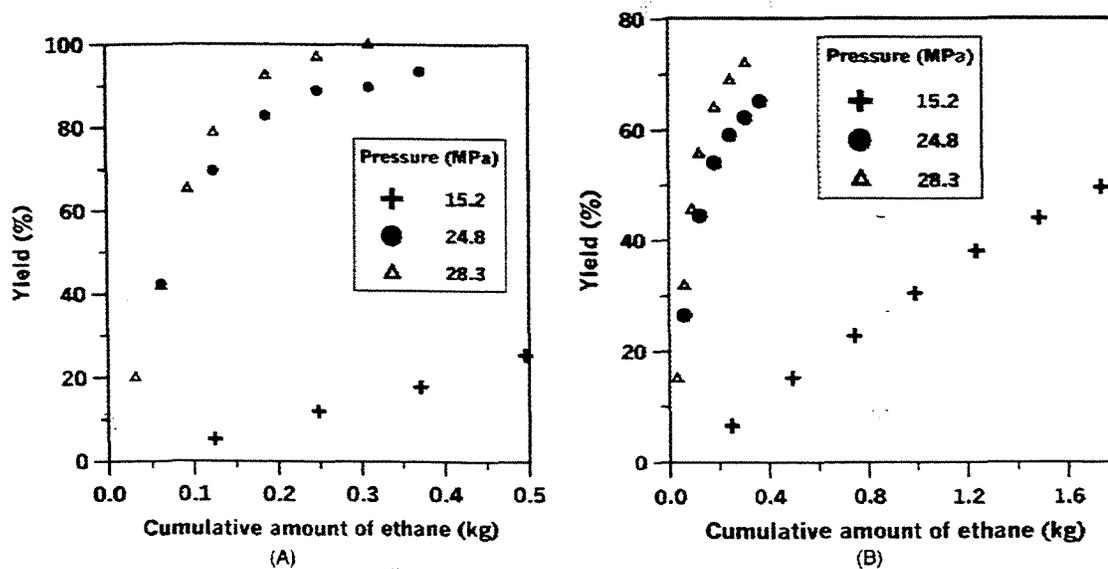


Fig. 4. Cocoa butter fractionation and extraction from cocoa beans at pressures of 15.2, 24.8 and 28.3 MPa and temperatures of 323.2 and 343.2 K.

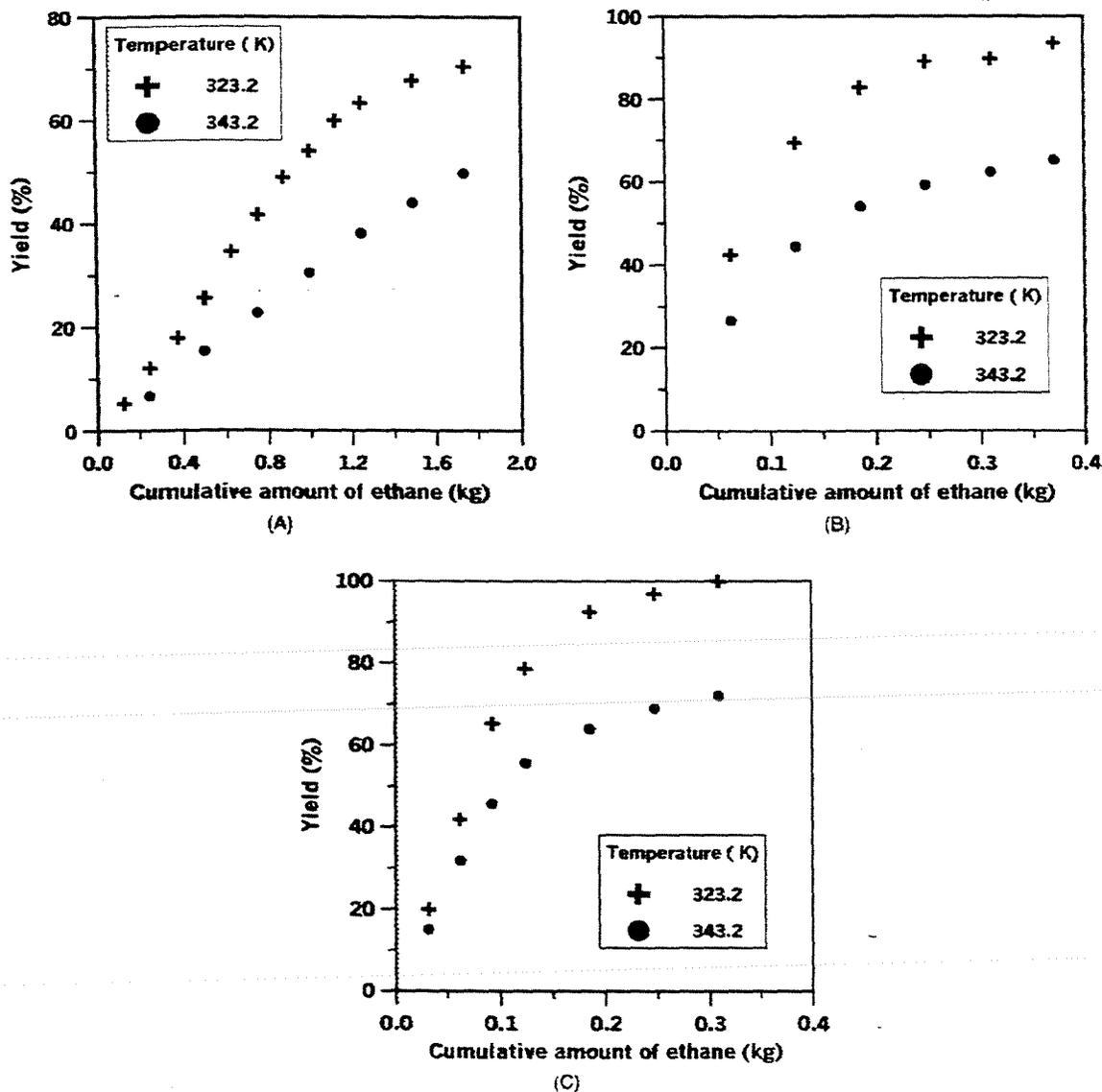


Fig. 5. Retrograde behavior for the isotherms of 323.2 and 343.2 K and pressures of 15.2, 24.8, and 28.3 MPa.

175 to resultant increase in solvent density, the proportional increase is much smaller in the second pressure
 176 range (24.8–28.3 MPa) due to the smaller density increase as compared to that in the 15.2–24.8 MPa
 177 pressure range. The retrograde behavior in the whole pressure range for these two temperatures is evident
 178 in Fig. 5. Friedrich et al. [6] reported similar behavior for the extraction of oil from soybeans using
 179 supercritical CO₂ at 323.2 and 333.2 K and pressures up to 41.4 MPa. The same behavior was observed

180 by Li and Hartland [16] when working with the model system cocoa butter/supercritical CO₂ at pressures
181 of 15–30 MPa and temperatures of 313.2 and 333.2 K. This behavior was also observed by Friedrich and
182 Pryde [27] and Stahl et al. [28] in the supercritical extraction of other lipid-bearing products.

183 Table 1 presents the results of fatty acid analysis of some selected fractions collected when extraction and
184 fractionation were carried out at a pressure of 24.8 MPa and a temperature of 323.2 K using supercritical
185 carbon dioxide and ethane. The fractions correspond to the first fraction (A) with CO₂, fourth fraction (B)
186 with ethane and twelfth fraction (C) with ethane. The analysis of the two fractions (A) and (B) obtained
187 using the two different supercritical fluids show that these fractions contain fatty acids up to C20 in
188 the same relative proportions found in the original cocoa butter (Table 1). These fractions, however, are
189 characterized with the absence of C22 fatty acids. The twelfth fraction collected with ethane as the solvent
190 is characterized by the presence of fatty acids C20 and C22 together with distinctly different contribution
191 of the palmitic fatty acid as shown in Table 1. These results show the tendency of the progressive
192 fractionation of cocoa butter, with the light POP triglyceride easily extracted in the early stages, and the
193 less soluble SOS (C54) removed in the late stages. Arul et al. [29] and Mohamed et al. [18] reported
194 similar behaviors for the fractionation of milk fat and butter oil, respectively. The information presented
195 in this work on the fractionation of cocoa butter are preliminary examples to illustrate the fractionation
196 process taking place. Work is currently continuing to define in greater detail this potential fractionation
197 through a full triglyceride analysis of all the fractions collected.

198 This simple single stage extraction/fractionation is a clear indication of the technological possibili-
199 ties for the formulation of cocoa butter fractions with desirable fat contents using efficient multi-stage
200 fractionation and subsequent blending.

201 4. Conclusions

202 Extraction yields of cocoa butter obtained with supercritical ethane as the solvent were an order of
203 magnitude higher than those obtained when using carbon dioxide. Large pressure and temperature effects
204 on the extraction of cocoa butter from cocoa beans with supercritical ethane were observed. Retrograde
205 behavior was observed in the whole pressure range for the two temperatures considered in this work.
206 Preliminary analysis of selected fractions collected during the extraction from cocoa beans indicated the
207 potential fractionation of cocoa butter with supercritical carbon dioxide and ethane.

208 Acknowledgements

209 The authors thank the Brazilian Research Funding agencies: FAPESP and CNPq for their financial
210 support and the Cardill Ltda for supplying cocoa butter and cocoa beans.

211 References

- 212 [1] B.W. Minifie, *Chocolate, Cocoa and Confectionery—Science and Technology*, Pitman, London, Great Britain, UK, 1989.
213 [2] J. Melo, Nuevas tendencias en los procesos de modificación de aceites y grasas, in: *aplicação de gorduras em chocolates,*
214 *sorvetes, confeites e panificação*, Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL),
215 Campinas-SP, Maio, 1999, pp. 1–9.

- 216 [3] R. Norris, I.K. Gray, A.K.R. McDowell, Chemical composition and physical properties of fractions of milk fat obtained by
217 a commercial fractionation process, *J. Dairy Res.* 38 (1971) 179–191.
- 218 [4] U. Bracco, Butter-like food product, British Patent 1 559 064, 1980.
- 219 [5] C. Pfaudler, Wiped film evaporator, Bulletin No. SB 39-100-1, Rochester, New York, 1982.
- 220 [6] J.P. Friedrich, G.R. List, A.J. Heakin, Petroleum-free extraction of oil from soybean with supercritical CO₂, *JAOCS* 59
221 (1982) 282–292.
- 222 [7] J.P. Friedrich, J.M. Snyder, D.D. Christianson, Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds
223 with supercritical CO₂, *JAOCS* 61 (12) (1984) 1851–1856.
- 224 [8] J.M. Snyder, J.P. Friedrich, D.D. Christianson, Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds
225 with supercritical CO₂, *JAOCS* 61 (12) (1984) 1851–1856.
- 226 [9] R. Eggers, U. Sievers, W. Stein, High pressure extraction of oilseed, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62 (1985) 1222.
- 227 [10] M.A. McHugh, V.J. Krukonis, *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworths, Boston, MA, 1986,
228 pp. 69–78.
- 229 [11] F. Temelli, J.W. King, G.R. List, Conversion of oils to monoglycerides by glycerolysis in supercritical carbon dioxide
230 media, *JAOCS* 73 (6) (1996) 699–706.
- 231 [12] J.W. King, M. Cygnarowicz-Provost, F. Favati, Supercritical fluid extraction of evening primrose oil kinetic and mass
232 transfer effects, *Ital. J. Food Sci.* 9 (3) (1997) 193–204.
- 233 [13] Y. Itoh, N. Saito, K. Hatakeda, S. Ito, M. Arai, K. Arai, In situ monitoring of extraction and separation behavior of
234 lipids with supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 31 (2) (1992) 568–574.
- 235 [14] W. Roselius, B. Magmas, O. Vitzthum, P. Hubert, Methods of producing cocoa butter, US Patent 3 923 847, 1975.
- 236 [15] M. Rossi, C. Arnoldi, G. Savioni, A. Schiraldi, Characterization of cocoa extracts obtained with supercritical carbon dioxide,
237 *Ital. J. Food Sci.* 3 (1989) 41–50.
- 238 [16] S. Li, S. Hartland, A new industrial process for extracting cocoa butter and xanthines with supercritical carbon dioxide,
239 *JAOCS* 73 (4) (1996) 423–429.
- 240 [17] H. Singh, J.S. Yun, S.J. Macnaughton, D.L. Tomasko, N.R. Foster, *Ind. Eng. Chem. Res.* 32 (1993) 2841–2848.
- 241 [18] R.S. Mohamed, M.D.A. Saldaña, F.H. Socantaype, T.G. Kieckbusch, Reduction in the cholesterol content of butter oil using
242 supercritical ethane extraction and adsorption on alumina, *J. Supercritical Fluids* 16 (2000) 225–233.
- 243 [19] R.S. Mohamed, G.M. Neves, T.G. Kieckbusch, Reduction in cholesterol and fractionation of butter oil using supercritical
244 carbon dioxide with adsorption on alumina, *Int. J. Food Sci. Technol.* 33 (5) (1998) 245.
- 245 [20] M.D.A. Saldaña, P. Mazzafera, R.S. Mohamed, Extraction of purine alkaloids from maté plant *Ilex paraguariensis* using
246 supercritical CO₂, *J. Agric. Food Chem.* 47 (9) (1999) 3804–3808.
- 247 [21] L. Hartman, R.C.A. Lago, Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids, *Lab. Prac.* 22 (1973) 475–476.
- 248 [22] W.G. Silva, Gordura de cupuaçu, sucedâneo a manteiga de cacau, São Paulo, Tese de Doutorado, Universidade de São
249 Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1988.
- 250 [23] A. Salgado, Gorduras alternativas à manteiga de cacau, in: *Aplicação de gorduras em chocolates, sorvetes, confeites e*
251 *panificação*, Centro de Tecnologia de cereais e chocolate, Instituto de Tecnologia de alimentos (ITAL), Campinas-SP, Maio,
252 1999, pp. 81–95.
- 253 [24] V.R. Bhaskar, S.S.H. Rizvi, C. Bertoli, Cocoa butter fractionation with supercritical carbon dioxide, in: Rudolf von Rohr,
254 Ch. Trepp (Eds.), *High Pressure Chemical Engineering*, Elsevier, New York, USA, 1996, pp. 7–9.
- 255 [25] S. Li, S. Hartland, Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cocoa butter from
256 cocoa beans with supercritical carbon CO₂, *J. Supercritical Fluids* 5 (1992) 7–12.
- 257 [26] J.L. Hedrick, L.J. Mulcahey, L.T. Taylor, Fundamental review: supercritical fluid extraction, *Mikrochim. Acta* 108 (1992)
258 115–132.
- 259 [27] J.P. Friedrich, E.H. Pryde, Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products, *J.*
260 *Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 223.
- 261 [28] E. Stahl, F. Shutz, H. Mangold, Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide, *J. Agric. Food Chem.*
262 28 (1980) 1153.
- 263 [29] J. Arul, A. Boudreau, J. Makhlof, Distribution of cholesterol in milk fat fractions, *J. Dairy Res.* 55 (1988) 361.



Decaffeination of guaraná seeds in a microextraction column using water-saturated CO₂

Marleny D.A. Saldaña^a, Carsten Zetzl^b, Rahoma S. Mohamed^{a,*},
G. Brunner^b

^a Faculty of Chemical Engineering, State University of Campinas, C.P. 6066, CEP, 13083-970, Campinas SP, Brazil

^b Arbeitsbereich Thermische Verfahrenstechnik, Technical University Hamburg-Harburg, Eisendorfer Str. 38,
D-21071 Hamburg, Germany

Received 4 September 2000; received in revised form 22 June 2001; accepted 17 August 2001

Abstract

Experimental data on the reduction of the caffeine content of guaraná seeds with water-saturated supercritical carbon dioxide were obtained in order to provide information on the ability of supercritical fluids for the decaffeination of widely consumed caffeine-rich natural products. The extraction was performed using a semi-continuous flow high-pressure micro-extraction apparatus at 40 and 70 °C and pressures of 100, 200 and 400 bar. Carbon dioxide flow rates of 5.7 and 9.4 g min⁻¹ were used. The extraction curves obtained showed the existence of thermodynamic solubility dependent, intermediate and diffusion controlled regions. Extraction at 400 bar and 70 °C using water-saturated supercritical carbon dioxide at a flow rate of 5.7 g min⁻¹ allowed the removal of almost 98% of the initial caffeine content in wet ground guaraná seeds, in a period of 240 min. When extractions were performed at lower pressures or temperatures, additional time and larger amounts of carbon dioxide were necessary to achieve the same yield. Increasing carbon dioxide flow rate did not present any economic advantage unless the extraction was limited to the thermodynamic solubility region. For total extraction of caffeine, the use of low flow rates resulted in a similar final product yield but at a much lower solvent consumption. A retrograde behavior for the extraction of caffeine from guaraná seeds was also observed at 100 bar for the 40 and 70 °C isotherms. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Caffeine; Guaraná seeds; Supercritical extraction

1. Introduction

Guaraná is a Brazilian native plant, with seeds being the only part suitable for human consumption. Most of the guaraná seeds produced are used in concentrates and soft drinks and as ingredients of a variety of pharmaceutical products. Guaraná seeds are the richest source of caffeine

* Corresponding author. Tel.: + 55-19-7883-932; fax: + 55-19-788-3931.

E-mail address: mohamed@feq.unicamp.br (R.S. Mohamed).

[1,2] as, on dry basis, caffeine contents generally range from 3 to 6 wt.% [3]. Guaraná has been shown to be an aphrodisiac and also a stimulant that acts on the cardiovascular and nervous system, with most of these properties attributed to its rich caffeine content [4].

In Brazil, these seeds are toasted, ground and mixed with water to form a paste that is molded into different configurations (rods and sticks) commonly sold as handy crafts to tourists and used by South American Indians in special rituals. The toasted seeds can also be ground into a powder that is added to syrups as an essence and to water to form consumable drinks. In many parts of the world, the guaraná is sold as a medicinal plant and as a natural product.

Decaffeination of guaraná seeds is an attractive process for producing caffeine, a valuable substance for pharmaceutical applications, as well as for the production of decaffeinated guaraná. Similar to coffee decaffeination, caffeine removal from guaraná seeds could be performed using organic solvents such as dimethylchloride or water [5]. The use of chemical solvents brings with it the risk of toxic residue in the extracted products and the requirement of several hours for a complete extraction [5]. Water is an excellent but a non-selective solvent for caffeine. Extraction of guaraná seeds with water leads to dissolution and subsequent loss of other valuable components from the final extracted product such as tannins and polyphenols (catechins and epicatechins). The low critical temperature (31 °C), non-toxicity and low cost have long rendered supercritical carbon dioxide a suitable solvent for food products [6–9]. Data on the solubility of caffeine in supercritical carbon dioxide have been reported by Ebeling and Frank [10], Lentz et al. [11], Johannsen and Brunner [12] and Saldaña et al. [13]. Lentz et al. [11] was the only one among these authors to also report data on the solubility of caffeine in supercritical CO₂ saturated with water. Supercritical CO₂ has also been successfully employed for the removal of caffeine from coffee beans [7,14]. As observed with coffee beans, water can act as a valuable co-solvent leading to a substantially improved extraction yield [1,2,14]. Grinding of seeds results in a larger solvent-solute contact area and

thereby an improved mass transfer during extraction. Shells would also need to be removed to lower resistance to mass transfer.

There is no patent on the use of supercritical carbon dioxide as a solvent for caffeine extraction from guaraná seeds. The open literature contains only the limited data of Mehr et al. [1] who reported extractions for pressures of 137.4–274.7 bar and temperatures of 35, 45 and 55 °C. No data were encountered for higher temperatures, pressures or flow rates. Expanding the operating conditions is indispensable for the better understanding of the extraction process, control and optimization which are fundamental to any scale-up project.

The main objective of this work was to provide experimental data on the extractability of caffeine from guaraná seeds using water-saturated supercritical carbon dioxide at wider ranges of thermodynamic conditions and carbon dioxide flow rates than reported in the literature.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Supercritical CO₂, 99.95% in purity, was purchased from KWD (Bad Hönningen, Germany). Guaraná fruits were obtained in dried form from EMBRAPA (Manaus, Brazil). The seeds and shells removed from the fruits were kept in separate and sealed plastic bags until ground in a mill immediately before use. For all experiments, ground seed particles with sizes ranging from 0.630 µm to 1 mm, as measured using known size sieves were used. The ground seeds were moistened to achieve a 40% water content on dry weight basis. Caffeine, 99.9% in purity, was purchased from Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany).

2.2. Experimental apparatus

The supercritical fluid extraction (SFE) plant (Fig. 1) purchased from Applied Separation Inc. (Allentown-PA) is designed for pressures and temperatures up to 690 bar and 250 °C, respectively.

This microextraction apparatus allows simple and efficient extractions at supercritical conditions with flexibility to operate in either a dynamic (continuous flow) or static (where supercritical carbon dioxide is pressurized in a sealed extraction vessel for a specific period of time) modes. The plant consists of mainly three modules: an oven, a pump and a control and collection module. The oven module has four extraction columns with a capacity of 50 cm³ for each column. The pump module is equipped with a compressed air-driven pump with a constant flow capacity of 100 ml min⁻¹ of liquid carbon dioxide or 50 standard l min⁻¹ of expanded gas. The collection module is formed of glass vials of 25 ml, sealed with caps and septa for the recovery of extracted products, and provided with micrometering valves and a flowmeter (Allentown, PA). Pressure and temperature are monitored and controlled in the three

modules to ± 0.5 °C and ± 3 bar, respectively. The carbon dioxide flow rate is controlled to ± 0.47 g min⁻¹.

Caffeine contents of guaraná seeds were quantified by HPLC using a Shimadzu LC-6A chromatograph (Kyoto, Japan) and a C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm) ODS-Inertsil (Steinheim, Germany). Isocratic solvents composed of 40% of methanol in 0.5% of acetic acid in water were used at a flow rate of 1 ml min⁻¹ [9]. Caffeine was identified by a UV detector, purchased from LKB Bromma (Kyoto, Japan), at 280 nm and quantities were determined using a Chromjet integrator purchased from Spectra-Physics (Kyoto, Japan). Pure caffeine standards used for the quantification were purchased from Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany). Two chromatograms for each sample were made and the results were reproducible to within 6%.

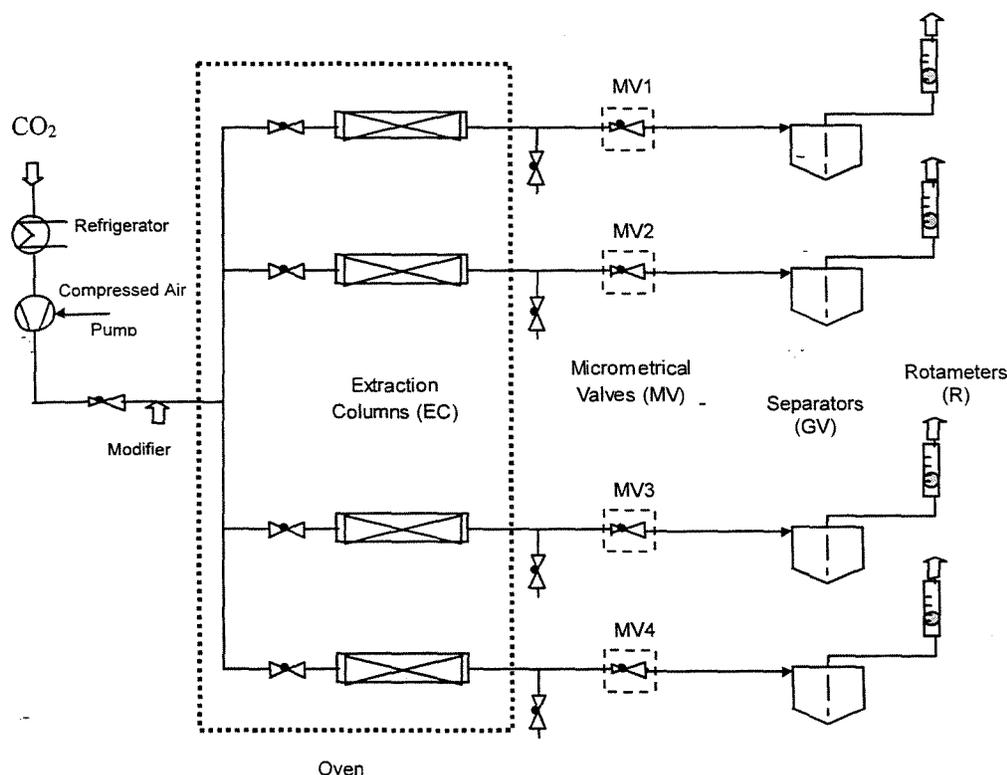


Fig. 1. Microextraction plant. MV(1): micrometrical valves, EC(1): extraction columns, GV(1): glass vials, R(1): Rotameters.

2.3. Experimental procedure

In this work, data were obtained at pressures of 100, 200 and 400 bar, temperatures of 40 and 70 °C and carbon dioxide flow rates of 5.7 and 9.4 g min⁻¹. For each experiment, one of the extraction columns was packed with 3 g (or 5 g) of ground guaraná seeds (saturated with water until reaching a water content of 40%), mixed with 30 g of glass spheres (3 mm in diameter). Glass wool was placed at the two ends of the column to avoid any possible carry over of solid material. In another extraction column, located upstream of the column with guaraná seeds, 40 ml of distilled water were placed to allow the saturating of the incoming carbon dioxide. When the desired extraction temperature, as controlled by the oven, was reached in both columns, carbon dioxide was pumped to the water-containing column and subsequently to the extraction column until reaching the desired extraction pressure. Once equilibrium is reached, the mixture carbon dioxide/solute was allowed, to flow to the micrometering valve where the separation/precipitation of the desired solute occurred. Following each experiment, the transfer lines from the outlet valve to the micrometering valve were cleaned with hot water and alcohol to ensure the total collection of all extracted material.

The caffeine content in the dry ground seeds was 4.82 wt.%, as measured by HPLC, which amounted to 144.6 and 241 mg of total caffeine in the 3 and 5 g samples of dry guaraná seeds, respectively.

3. Results and discussions

In order to assess the reproducibility of experimental data obtained with this apparatus, two independent extractions were performed for each one of the set of conditions: 400 bar, 70 °C and 5.7 g min⁻¹ and 100 bar, 70 °C and 5.7 g min⁻¹. The cumulative amounts of caffeine extracted in these independent experiments for each set of conditions were found to agree to within $\pm 5\%$, which was considered a good and acceptable reproducibility.

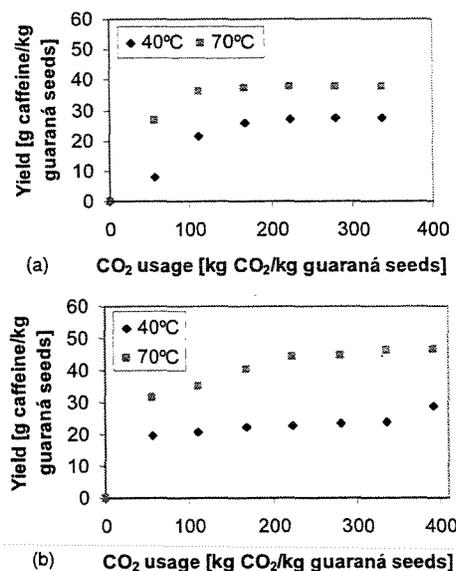


Fig. 2. Amounts of caffeine extracted with water saturated CO₂ at 400 bar, 40 and 70 °C from wet ground guaraná seeds: (a) 5 g sample and a flow rate of 9.4 g min⁻¹; (b) 3 g sample and a flow rate of 5.7 g min⁻¹. Initial caffeine content is 48 g caffeine/kg guaraná seeds.

In Fig. 2(a), extraction curves for a 5 g sample of wet ground guaraná seeds, at 400 bar and a flow rate of 9.4 g min⁻¹ obtained at 40 and 70 °C were presented. The quantity of caffeine extracted increased with increase in temperature for both flow rates. The data indicated that for an extraction period of 180 min at 70 °C and 400 bar, which corresponds to the use of 335.8 kg CO₂/kg guaraná, the cumulative caffeine extracted amounted to 37.8 g caffeine/kg guaraná (79% of the initial caffeine content in the original sample), compared to the cumulative amount of 27.4 g caffeine/kg guaraná (57% of the initial caffeine) obtained at 40 °C and the same pressure, flow rate and extraction time period. For these systems, the increase in vapor pressure of caffeine (due to an increase in temperature) appeared to compensate for the decrease in solubility caused by the decrease in supercritical fluid density at the higher temperature.

High caffeine removal rates were obtained in the early stages of the extraction with rates, diminishing at later stages, as shown by changes in the inclination of the extraction curve. This be-

havior is similar to extraction curves encountered in the literature when other ground natural products were extracted [7,13,15,16]. Extraction curves clearly show the three distinct regions identified earlier by Hedrick et al. [17]: solubility dependent, intermediate and diffusion controlled regions. The first region, dominated by thermodynamic solubility, was observed in the first 90 min (up to an accumulated solvent ratio of 167.9 kg CO₂/kg of guaraná) for the curve at 40 °C where 25.6 g caffeine/kg guaraná (53.3% of caffeine in the original seeds) was extracted. At 70 °C, this same region was observed to prevail in the first 60 min (with the use of up to 111.9 kg of CO₂/kg guaraná), during which 35.9 g caffeine/kg guaraná (74.7% of caffeine in the original seeds) was extracted. After these time periods, extraction was controlled by the wet ground guaraná seeds internal as well as external caffeine diffusion. The experimental solubilities of caffeine in water-saturated supercritical carbon dioxide as obtained from the linear portions of the extraction curves at 400 bar and temperatures of 40 and 70 °C were found to be 3.7×10^{-5} and 9×10^{-5} , respectively. This temperature effect is qualitatively similar to that observed through solubility calculations in humid CO₂/caffeine systems using the correlation proposed by Lentz et al. [11], through which one estimates, caffeine solubilities of 3.79×10^{-4} and 7.39×10^{-4} at 400 bar and 40 and 70 °C, respectively. The solubility values of caffeine in water-saturated supercritical CO₂ obtained from the extraction curves of guaraná seeds, are about an order of magnitude lower than those predicted using the correlation proposed by Lentz et al. [11] for the binary system caffeine/water-saturated supercritical CO₂. This result is consistent with those pointed out in the extraction of β -carotene from carrots using supercritical CO₂ and N₂O [18], extraction of caffeine from coffee beans using supercritical CO₂ [8,13], extraction of caffeine from maté tea leaves using supercritical CO₂ [9] and extraction of oil from fennel seeds using supercritical carbon dioxide [19]. Furthermore, similar qualitative trends were observed when comparing solubilities in binary and ternary systems, with one to two order of magnitude differences observed when comparing

solubility values in binary and quaternary systems [20]. This discrepancy in solubility values could be attributed to possible component interactions present in naturally occurring mixtures and demonstrates the difficulty in using binary data to predict the extraction of substances from natural and complex structures.

Mehr et al. [1] reported solubility data for caffeine in water-saturated carbon dioxide that ranged from 7.6×10^{-5} to 4.6×10^{-4} for the narrow temperature and pressures ranges of 35–55 °C and 137–275 bar, as obtained from extraction experiments using wet ground guaraná seeds (0.26 mm). These values are much higher than the values obtained from the extraction curves in this work, which ranged from 1.4×10^{-7} to 1×10^{-4} for the temperatures of 40 and 70 °C and pressures of 100, 200 and 400 bar. While our solubility data were obtained from the extraction curves in the whole solubility-dominated region (which corresponds to extraction times that could reach 90 min), Mehr et al. [1] report that their equilibrium data were obtained at much shorter times (15 min). While theoretically, this difference in procedure should not make any difference in reported solubility data, experimental uncertainties would be minimized at longer extraction time periods. Discrepancies in reported solubility values could be attributed to many reasons including solvent purity, experimental methods used, sample origin and composition of key components in the sample, solvent saturation, and entrainment problems. As pointed earlier, our data are also consistent with the observations made with regard to the differences often observed when comparing binary and multicomponent systems.

The temperature effect found with the 5 g sample was also observed when the smaller initial quantity of wet ground guaraná seeds of 3 g (Fig. 2(b)) was used. In this case, 31.7 g caffeine/kg of guaraná seeds were extracted at 70 °C, 400 bar and using 55.9 kg of CO₂/kg guaraná. The quantity extracted reached 46.6 g caffeine/kg guaraná (97% of the initial caffeine) in 210 min of extraction (which corresponds to the use of 391.8 kg of CO₂/kg guaraná). In contrast, a maximum of 60.2% of caffeine in the seeds (29.01 g caffeine/kg guaraná) was obtained at the lower temperature

of 40 °C. At 70 °C, it was also possible to extract 98% of initial caffeine (47.2 g caffeine/kg guaraná) in a period of 240 min (corresponding to the use of 447.8 kg of CO₂/kg guaraná).

In Fig. 2(b), the solubility-dominated regions ended after a 60 and 30 min periods of extraction (111.9 and 55.9 kg of CO₂/kg guaraná) at 40 and 70 °C, respectively. The caffeine quantities extracted in this region were about 43% (20.6 g caffeine/kg guaraná) and 66% (31.7 g caffeine/kg guaraná) for the extraction temperatures of 40 and 70 °C, respectively. These values were similar to those obtained in Fig. 2(a) for the 5 g sample using a flow rate of 9.4 g min⁻¹ and therefore were, as expected, independent of the initial amounts of wet ground guaraná seeds.

Fig. 3(a–b) shows the effect of the flow rate when using the same initial quantity of guaraná seeds (5 g) and operating at a pressure of 400 bar at the two different extraction temperatures of 40 and 70 °C. In the first 120 min (corresponding to the use of 134.3 and 223.9 kg CO₂/kg guaraná for the flow rates of 5.7 and 9.4 g min⁻¹, respectively), cumulative amounts of extracted caffeine

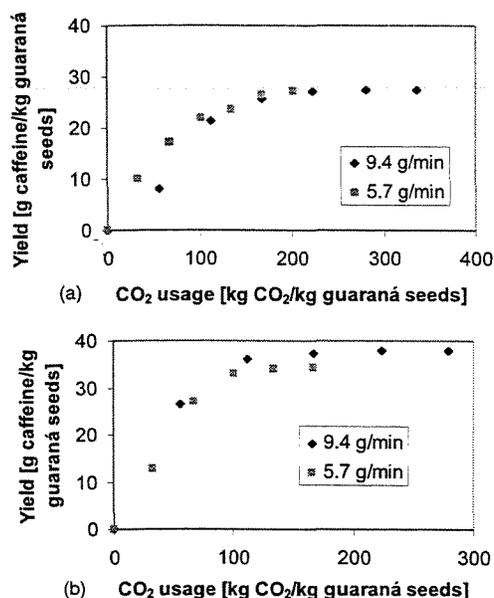


Fig. 3. Fractional and cumulative amounts of caffeine removed from a 5 g of guaraná seeds with CO₂ at flow rates of 5.7 and 9.4 g min⁻¹, 400 bar and extraction temperatures of: (a) 40 °C; and (b) 70 °C.

at 40 °C and 400 bar were slightly higher for the larger CO₂ flow rate but not proportional to the increase in the quantity of carbon dioxide, particularly in the solubility controlled region (Fig. 3(a)). Extraction curves at 70 °C showed, however, a much higher increase in the extracted quantity of caffeine with increase of flow rate (Fig. 3(b)). In the thermodynamic solubility controlled region (for the first 30 min which corresponds to the use of 33.6 and 55.9 kg CO₂/kg guaraná for the flow rates of 5.7 and 9.4 g min⁻¹, respectively), this increase was almost proportional to the increase in quantity of carbon dioxide, as would be expected. This proportional increase in extracted caffeine was observed to diminish at higher extraction times as we get closer to the removal of all extractable caffeine from guaraná seeds. In fact, following an extraction period of 60 min, the use of a higher flow rate (9.4 g min⁻¹), which amounted to the use of 111.9 kg CO₂/kg guaraná, resulted in the extraction of 36 g caffeine/kg guaraná (74.6% of the original caffeine in the seeds). When using the lower flow rate (5.7 g min⁻¹) for the same time period which amounted to the use of 67.1 kg of CO₂/kg guaraná, 56% of the original caffeine in seeds was extracted (27 g caffeine/kg guaraná). After a 150 min extraction period, we extracted 37.8 and 34.2 g caffeine/kg guaraná (78.4 and 71% of initial caffeine), using the high and low flow rate limits, which corresponded to the use of 279.9 and 167.9 kg CO₂/kg guaraná seeds, respectively. One can thus conclude that when considering the whole extraction time interval, and unless extraction was limited to the solubility controlled region, the advantage of using the lower flow rate limit and thereby lower CO₂ consumption was quite evident. This result is similar to that obtained earlier by Oazer et al. [21] for the extraction of essential oil components from mint leaves. A possible explanation is that there is a limited fraction of the supercritical solvent that could diffuse into the cellular structure of the guaraná seeds and dissolve the caffeine. The amount of solvent that is in excess to what is needed to penetrate the cellular structure of the seeds simply bypasses the extractable seeds. This result also indicates that external mass transfer resistance is

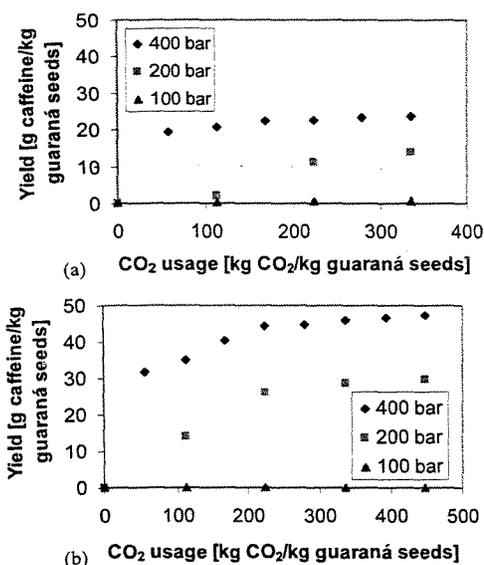


Fig. 4. Cumulative caffeine extracted from 3 g of guaraná seeds with CO₂ at a flow rate of 5.7 g min⁻¹ for the extraction temperatures of: (a) 40 °C; and (b) 70 °C.

not controlling as solvent velocity has no effect on the transfer rate. This phenomena was also mathematically modeled by Serpil et al. [22]. With this result in mind, all subsequent experiments were carried out with a CO₂ flow rate of 5.7 g min⁻¹.

Fig. 4(a) showed the effect of pressure on the removal of caffeine from the solid matrix of wet ground guaraná seeds when extracted at 40 °C. For the first 60 min (111.9 kg CO₂/kg guaraná), extraction at 40 °C and 5.7 g min⁻¹ resulted in obtaining 0.9, 4.2, and 43% of the initial caffeine (0.4, 2 and 20.7 g caffeine/kg guaraná) at extraction pressures of 100, 200 and 400 bar, respectively. For a period of 180 min of extraction time (corresponding to the use of 335.8 kg CO₂/kg guaraná), the amounts extracted were 1.1, 28.4 and 49.4% which corresponds to 0.5, 13.7 and 23.8 g caffeine/kg guaraná, at 100, 200 and 400 bar, respectively. Fig. 4(b) showed once more the influence of pressure during the process of extraction. The quantity of caffeine extracted increased with increase in pressure with this effect being more pronounced at this temperature of 70 than at 40 °C (Fig. 4(a)). In this case, extraction at 400 bar resulted in the removal of ~73 and 96% of

the caffeine in the original seeds (35.2 and 46.1 g caffeine/kg guaraná) in the first 60 and 180 min of operation (using 111.9 and 335.8 kg CO₂/kg guaraná), respectively. Similar behavior occurred at an extraction pressure of 200 bar, where 29 and 60% of the initial caffeine contents, the equivalent to 14 and 28.7 g caffeine/kg guaraná, were removed following 60 and 180 min periods of continuous extraction. For these same extraction time periods, only 0.17 and 0.26% of the original caffeine in seeds (0.08 and 0.12 g caffeine/kg guaraná) were removed at 100 bar. This observed influence of pressure on the amounts of caffeine extracted is consistent with the solubility values of 1.11×10^{-5} , 5.27×10^{-4} and 7.39×10^{-4} obtained from Lentz et al. [11] correlation and the values of 0.14×10^{-6} , 2.7×10^{-5} and 10×10^{-5} obtained from our extraction curves for caffeine in wet CO₂ at 70 °C and pressures of 100, 200 and 400 bar, respectively. The increment in solubility is much more pronounced when increasing pressure from 100 to 200 bar, than when increasing pressures from 200 to 400 bar, in agreement with results observed in Fig. 4(a).

Caffeine extraction from guaraná seeds using water-saturated carbon dioxide at 100 bar for the two extraction temperatures of 40 and 70 °C, shown in Fig. 5, clearly revealed a higher quantity of extracted caffeine at the lower temperature. This is the retrograde behavior commonly encountered in supercritical extraction systems. Specifically for caffeine, this behavior is similar to that observed for the caffeine/CO₂ binary system [13,23] at pressures below 190 bar, with normal behavior manifested at higher pressures. Similar

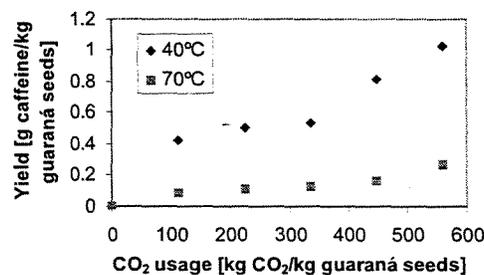


Fig. 5. Retrograde behavior observed during caffeine extraction from 3 g of guaraná seeds at 100 bar, 40 and 70 °C and CO₂ flow rate of 5.7 g min⁻¹.

tendencies for the extraction curves of caffeine from guaraná seeds with supercritical carbon dioxide were shown by Mehr et al. [1] at pressures below 172 bar.

4. Conclusions

It was possible, in a period of 240 min (447.8 kg CO₂/kg guaraná) to successfully extract 98% of initial caffeine content in wet ground guaraná seeds at 400 bar and 70 °C using water-saturated supercritical carbon dioxide at a flow rate of 5.7 g min⁻¹. Extractions at lower pressures or temperatures required additional time and larger amounts of carbon dioxide to achieve the same yield.

In close agreement with literature for the extraction of other solids, extraction curves showed the existence of three regions: thermodynamic solubility dependent, intermediate and diffusion controlled regions.

The pressure and temperature showed large influence on the extraction of caffeine from wet ground guaraná seeds as expected from literature solubility data for caffeine in moist carbon dioxide. No advantage in extraction yield was observed when increasing carbon dioxide flow rate unless the extraction was limited to the thermodynamic solubility region. For total extraction, using low flow rates leads to similar final product yield at lower solvent consumption. The extraction time will, however, be longer in the solubility region for a lower flow rate. A retrograde behavior of caffeine extraction from guaraná seeds was observed for the 40–70 °C isotherms when operating at a pressure of 100 bar. This is similar to the behavior observed in the binary system caffeine/supercritical carbon dioxide at pressures < 190 bar. Extractions at pressures of 200 and 400 bar showed normal behavior.

Acknowledgements

The authors express their appreciation for the financial support received from the Brazilian Research Funding Agency, FAPESP. The authors are also grateful to the EMBRAPA for donating the guaraná fruits.

References

- [1] C.B. Mehr, R.N. Biswal, J.L. Collins, Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guaraná, *J. Supercrit. Fluids* 9 (3) (1996) 185–191.
- [2] M.D.A. Saldaña, Extraction of caffeine, trigonelline and chlorogenic acid from coffee beans with supercritical CO₂, M.Sc. thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, 1997.
- [3] P. Mazzafera, Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*, *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6 (1994) 149–151.
- [4] J.E. James, Caffeine and Health, Academic Press, San Diego-CA, 1991, pp. 24–32, 63–85.
- [5] G.J. Hulbert, R.N. Biswal, T.H. Walker, C.B. Mehr, J.L. Collins, Solid/liquid extraction of caffeine from guaraná with methylene chloride, *Food Sci. Technol. Int.* 4 (1) (1998) 53–58.
- [6] R.P. Fillipi, CO₂ as a solvent: application to fats, oils and other materials, *Chem. Ind.* 19 (1982) 390–394.
- [7] G. Brunner, Mass transfer from solid material in gas extraction, *Ber. Bunsenges Phys. Chem.* 88 (1984) 887–891.
- [8] M.A. McHugh, V.J. Krukoni, Supercritical fluid extraction: principles and practice, Butterworths, Boston, MA, 1994.
- [9] M.D.A. Saldaña, P. Mazzafera, R.S. Mohamed, Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguayensis*) using supercritical CO₂, *J. Agric. Food Chem.* 47 (9) (1999) 3804–3808.
- [10] H. Ebeling, E.U. Franck, Spectroscopic determination of caffeine solubility in supercritical carbon dioxide, *Ber. Bunsenges Phys. Chem.* 88 (1984) 862–865.
- [11] H. Lentz, M. Gehrig, J. Schulmeyer, Dynamic solubility measurements of caffeine in carbon dioxide and in carbon dioxide saturated with water, *Physica* 139 (1986) 70–72.
- [12] M. Johannsen, G. Brunner, Solubilities of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide, *Fluid Phase Equilibria* 95 (1994) 215–226.
- [13] M.D.A. Saldaña, P. Mazzafera, R.S. Mohamed, Extraction of caffeine, trigonelline and chlorogenic acid from Brazilian coffee beans with supercritical fluids, *Proceedings of the Fourth International Symposium on Supercritical Fluids*, Sendai, Japan, 1997, pp. 219–222.
- [14] H. Peker, M.P. Srinivasan, J.M. Smith, B.J. McCoy, Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide, *AIChE J.* 38 (5) (1992) 761–770.
- [15] O.J. Catchpole, J.B. Grey, B.M. Smallfield, Near-critical extraction of sage, celery and coriander seeds, *J. Supercrit. Fluids* 9 (1996) 273–279.
- [16] R.S. Mohamed, M.D.A. Saldaña, F.H. Socantaype, T.G. Kieckbusch, Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina, *J. Supercrit. Fluids* 16 (2000) 225–233.
- [17] J.L. Hedrick, L.J. Mulcahey, L.T. Taylor, Fundamental review: supercritical fluid extraction, *Mikrochim. Acta* 108 (1992) 115–132.

- [18] P. Subra, S. Castellani, P. Jestin, A. Aoufi, Extraction of β -carotene with supercritical fluids: experiments and modelling, *J. Supercrit. fluids* 12 (1998) 261–269.
- [19] E. Reverchon, J. Daghero, C. Marrone, M. Mattea, M. Poletto, Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: experiments and mathematical modeling, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 3069–3075.
- [20] T. Bamberger, J.C. Erickson, C.L. Cooney, S.K. Kumar, Measurement and model prediction of solubilities of pure fatty acids, pure triglycerides and mixtures of triglycerides in supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Eng. Data* 33 (1988) 327–333.
- [21] E.O. Ozer, S. Platin, U. Akman, O. Hortaçsu, Supercritical carbon dioxide extraction of spearmint oil from mint plant leaves, *Canad. J. Chem. Eng.* 74 (6) (1996) 920–928.
- [22] T. Serpil, O.N. Aeskinazi, O. Hortaçsu, U. Akman, Application of serially-interconnected perfectly-mixed tanks model to dense-gas extraction of plants, *Proceedings of the Fourth International Symposium on Supercritical Fluids*, Sendai, Japan, 1997, vol. A, pp. 299–302.
- [23] E. Stahl, W. Schilz, Mikroanalytische untersuchungen zur loslichkeit in uberkritischem kohlendioxid, *Talanta* 26 (1979) 675–679.

SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION OF METHYLXANTHINES FROM MATÉ TEA LEAVES

M.D.A. Saldaña¹, R.S. Mohamed¹ and P. Mazzafera²

¹School of Chemical Engineering, Universidade Estadual de Campinas,
P. O. Box 6066, 13083-970, Campinas - SP, Brazil,

²Biology Institute, UNICAMP, Campinas (SP), Brazil.

E-mail: mohamed@feq.unicamp.br

E-mail: marlen@feq.unicamp.br.

(Received: February 8, 2000 ; Accepted: April 6, 2000)

Abstract - Methylxanthines are alkaloids found in natural products such as tea, coffee and guaraná. These alkaloids are commonly used in cola drinks and pharmaceutical products due principally to their stimulant and diuretic effects on the human organism. In this work, experimental data on the supercritical CO₂ extraction of caffeine, theophylline and theobromine from herbal maté tea, a beverage traditionally consumed by the gauchos of southern Brazil, the Argentine, Paraguay and Uruguay, were obtained using high pressure extraction equipment that allows adequate control of temperature and pressure. The continuous extraction/fractionation of maté tea leaves, *Ilex paraguariensis* in natura using carbon dioxide was carried out at 313.2 and 343.2 K and pressures of 13.8 and 25.5 MPa. Extraction/fractionation curves revealed the large influence of temperature and pressure on extraction yield. CO₂ was also found to show a higher selectivity for caffeine than for theophylline and theobromine.

Keywords: Supercritical extraction, *Ilex paraguariensis*, caffeine, theobromine, theophylline.

INTRODUCTION

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), theophylline (1,3-dimethylxanthine) and theobromine (3,7-dimethylxanthine) are some of the natural components of maté tea leaves (Suzuki and Waller, 1988; Clifford and Ramirez, 1990; Saldaña et al., 1999), coffee beans (Brunner, 1984; Saldaña, 1997), guaraná seeds (Mehr et al., 1996) and cocoa nuts (Li and Hartland, 1992). In the human organism, these alkaloids stimulate the central nervous, muscular and circular systems (James, 1991). Decaffeination of natural products is economically attractive as it results in higher value decaffeinated products and caffeine, a valuable by-product commonly used in

soft drinks and pharmaceutical products (Mazzafera and Carvalho, 1991).

Maté, *Ilex paraguariensis*, is a native plant of South America, whose taxonomic, chemical composition and other characteristics are shown in Table 1. A beverage prepared by the infusion of dry maté tea leaves is traditionally consumed by the gauchos of southern Brazil, the Argentine, Paraguay and Uruguay (Alikaridis, 1987; Tormen, 1999). A careful inspection of the chemical constituents of *Ilex* species (Table 1) demonstrates the reasons for the current and successful use of maté tea as a natural product as a stimulant, an antirheumatic and a diuretic. Nevertheless, a high intake of maté tea provoke irritability and loss of sleep.

Table 1: Taxonomy, chemical composition and other characteristics of *Ilex paraguariensis* (Alikaridis, 1987; Mazzafera, 1994)

Taxonomy	Other characteristics
Division: Anthophyta Type/Subtype: Magnoliopsida/Rosidae Order: Celastrales Family: Aquifoliaceae Gender: <i>Ilex</i> Specie: <i>paraguariensis</i> , <i>paraguayensis</i> Common names: yerba maté, maté, erva maté, Paraguay Cayi, Paraguai Tea, South American Holly	Consumed part: leaves and some barks Color: green Taste: astringent and sour Humidity - <i>in natura</i> : 50-60% - commercial: 8-10%
Chemical composition/quantity (100 g)	Alkaloids (mg kg ⁻¹)
Protein: 10.89 Carbohydrate: 12.04 Starch: 4.55 Glucosc: 3.84 Fiber: 16.96	Theophylline: 142±6 ^a , 768±3 ^b Theobromine: 340±7 ^a , 209±5 ^b Caffeine: 5371±161 ^a , 8375±251 ^b

^a old leaves, ^b new leaves from branches with fruit

and even may cause cerebral depression, nervous tremors and numbness. Several laboratory studies (Wang et al., 1994; Inagake et al., 1995; Hasegawa et al., 1995; Katiyar et al., 1995) have also shown that polyphenols found in this tea can inhibit the formation and growth of tumors.

Caffeine can be removed from maté tea leaves using organic solvents (dimethyl chloride) or water (Saldaña, 1997). However, the use of chemical solvents involves the risk of leaving toxic residues in the products extracted while the use of water results in a nonselective extraction and the loss of valuable flavor components (Mazzafera and Carvalho, 1991). Carbon dioxide, which has a low critical temperature (31°C) and is nontoxic and relatively inexpensive, has become a universally attractive alternative solvent in the extraction of natural products (McHugh and Krukoni, 1994; Saldaña, 1997).

While there are many patents for the use of supercritical CO₂ as a solvent to extract caffeine from coffee beans and *Camelia sinensis* tea leaves (Brunner, 1984; Peker et al., 1992; McHugh and Krukoni, 1994; Saldaña et al., 1997), little is known

about the extraction of methylxanthines from maté tea, *Ilex paraguariensis* (Saldaña et al., 1999). The objective of this work was to obtain extensive experimental data on the extraction/fractionation of methylxanthines (caffeine, theophylline and theobromine) from maté tea, *Ilex paraguariensis in natura* using supercritical CO₂.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Caffeine, theobromine and theophylline, 99% purity, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). The supercritical fluid, dry carbon dioxide, 99.9% purity was supplied in the liquid phase by White Martins Industrials Gases S.A (Campinas, Brazil). Maté, *Ilex paraguariensis* tea leaves, *in natura* were obtained from the Experimental Campus of the Department of Plant Physiology - Biology Institute (UNICAMP-Campinas, Brazil).

METHODS

(a) Sample Preparation and Analysis

Prior to extraction, whole maté tea leaf samples were separated and classified by hand (4.5cm x 9cm). Moisture content of the samples was determined by drying at 80°C for 24 h.

Compositions of the methylxanthines in the extracted products were determined using a reversed-phase High Performance Liquid Chromatography apparatus (Shimadzu, Japan) with UV monitor set at 280 nm and a Nucleosil C₁₈ column (Supelco, 4 x 150 mm, 5 µm). The isocratic solvent used was a solution of 40% methanol in 0.5% aqueous acetic acid. A flow rate of 1mL min⁻¹ was employed.

(b) Experimental Apparatus

The experimental apparatus used was a semicontinuous-flow, high-pressure system purchased from Autoclave Engineers (Erie, PA,

USA), that had been designed for working pressures up to 37 MPa at 200 °C (Figure 1) apparatus is the same as that used earlier by Neal et al. (1996) and Saldaña et al. (1999). The components of this apparatus include positive displacement pumps for solvent delivery, pressure extraction vessels and three separator in series. Flow rates and accumulated gas volume passing through the apparatus were controlled by micrometering valves from Autoclave Eng (Erie, PA, USA) and measured with a flow measuring device from EG&G Instrument Technology (Phoenix, AR, USA). Heating jackets were used to maintain constant temperature in order to prevent freezing of solvents or solute precipitation following depressurization in the extraction section. Pressure in both extractors was monitored with a digital transducer system with a precision of ± 0.03 MPa from Heise Series RTS, Dresser Industries (Stratford, CT, USA). Extractor temperatures were controlled to within

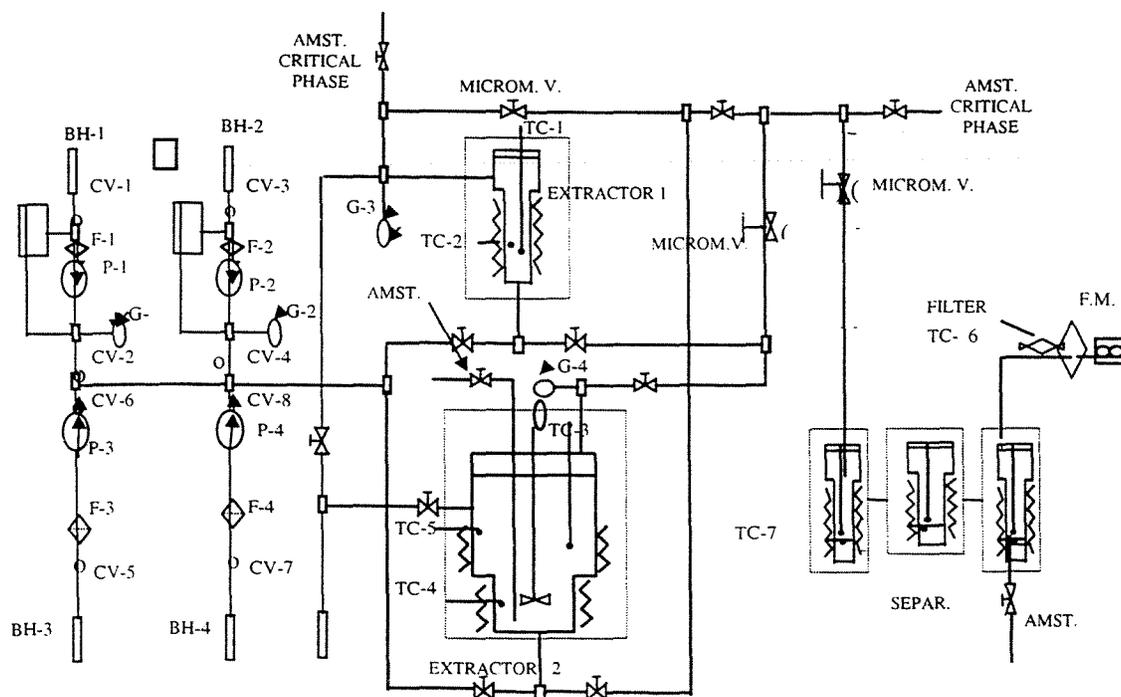


Figure 1: Experimental Apparatus. BH(1-2) - solvent, BH(3-4) co-solvent, G(1-2-3-4) - pressure indicator, P(1-2-3-4) - pumps, F(1-2-3-4) - filters, Microm.V. - micrometric valve, CV(1-2-3-4-5-6-7-8) - valves, TC(1-2-3-4-5-6-7) - thermocouples, Extractor 2 - extractor with stirring and a window, Separ.-Separator flasks, Amst.-sample, FM-Flow measurement.

(c) Determination of Caffeine, Theophylline and Theobromine During Supercritical Carbon Dioxide Extraction From Maté Tea Leaves *In Natura*

In a typical experiment, liquid CO₂ was pumped into the maté tea leaf sample (22.5g with 60% moisture content) in extractor E1 until the specified extraction pressure was reached at the specified temperature. After a three-hour period to reach equilibrium, the saturated supercritical fluid was depressurized whilst pressure was maintained constant in the extractor and a precipitated fraction was collected in the tarred separator flasks placed in a cooling bath maintained at 0 °C by carbon dioxide passing through the apparatus. Collected samples were weighed and analyzed for methylxanthines using HPLC. The three separator flasks were replaced at specified time intervals as fractions were collected. Tubings and valves throughout the apparatus were cleaned with chloroform at the end of each experiment to assure good quantification.

RESULTS AND DISCUSSION

Calibration Curves

To analyze the extracts obtained after fractionation, it was necessary to establish calibration curves for five standard concentrations (0.0001; 0.001; 0.01; 0.1 and 0.2 mg mL⁻¹). This interval covers the entire concentration range found in the extracted samples to be analyzed. Figure 2a shows the retention times (t_R) for theobromine, theophylline and caffeine at approximately 3.5, 4.3 and 6 minutes, using a mobile phase 40% methanol in water and Figure 2b shows their chemical structures. The shorter retention times obtained for theobromine can be attributed to the better interaction between the mobile phase and theobromine as a result of the hydrogen radical in position 1 and the two methyl radicals in positions 3 and 7, in comparison to the caffeine molecule which has three methyl radicals in positions 1, 3 and 7 (Figure 2b). Baltassa et al. (1984) used the same mobile phase methanol-water (40-60 v/v) and obtained peaks at approximately 4, 4.7 and 6 min for theobromine, theophylline and caffeine, respectively.

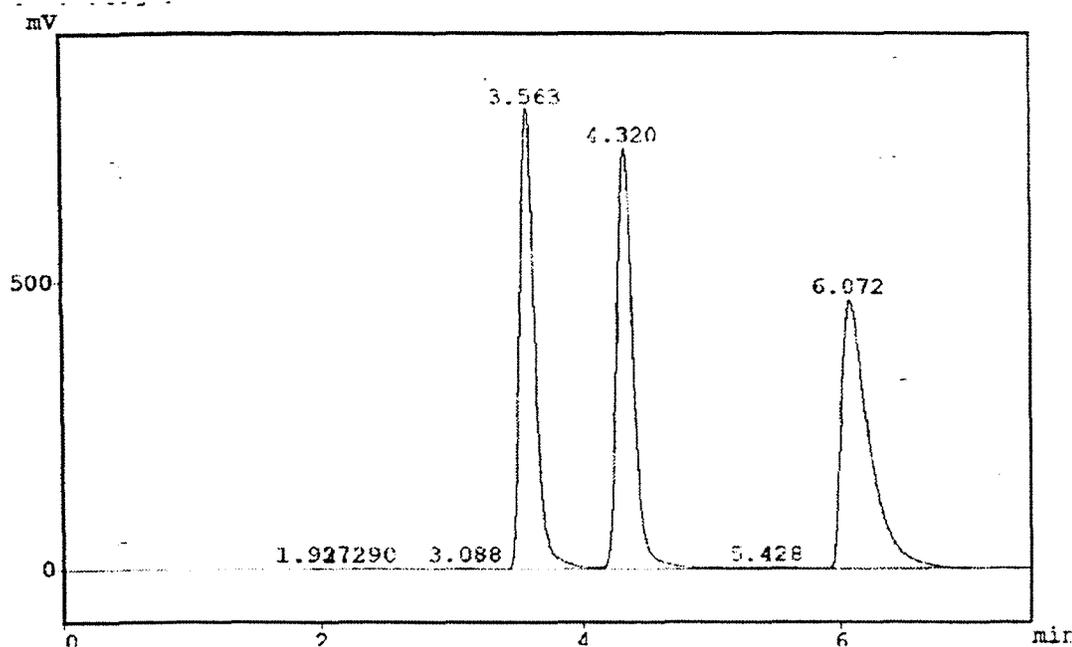


Figure 2a: Chromatogram of standard mixture of methylxanthines by HPLC

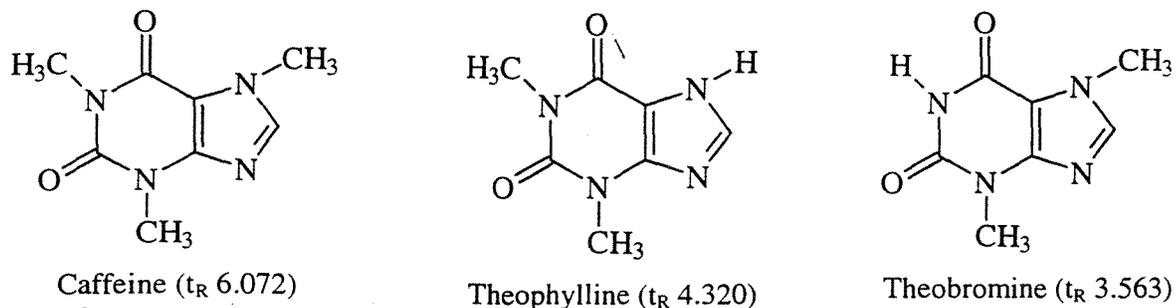


Figure 2b: Chemical structures of methylxanthines

Extraction of Caffeine, Theobromine and Theophylline From Maté Tea Leaves Using Supercritical CO₂

Results for the fractionation of maté tea leaves *in natura*, performed at 13.8 and 25.5 MPa and 313.2 and 343.2 K are shown in Figure 3, where the extraction rate of methylxanthines at a lower temperature and pressure (313.2 K and 13.8 MPa) was found to be almost constant (as shown by the approximately linear behavior). Under these conditions, extraction was controlled by solubility effects with no evidence of mass transfer limitations. The low extraction velocity and yield required the use of 3.74 kg of CO₂ to obtain 25.22 mg of caffeine. Extraction/fractionation at 343.2 K and 25.5 MPa presented higher rates of caffeine removal in the first ten fractions. The extraction rates, however, decreased as the cumulative amounts of CO₂ increased as shown by the changes in the slope of the extraction curve. The total amount of caffeine extracted at 343.2 K and 25.5 MPa is approximately 2.7 times the amount obtained at 313.2 K and 13.8 MPa.

The three extraction regions, solubility, intermediate and diffusion-controlled, which were first identified by Hedrick et al. (1992), were evident for extractions at 343.2 K and 25.5 MPa (Figure 3). The region dominated by solubility effects was observed for the first 10 fractions. The intermediate region was identified by the eleventh to sixteenth fraction, while the diffusion-controlled extraction was represented by fractions numbered 17 to 40. When the 16th fraction was collected, 84.5% of the caffeine had been extracted. The total quantity of caffeine obtained from the 9g of whole leaves of dry maté tea was 67.27 mg.

A qualitatively similar behavior was observed during the extraction of theobromine and theophylline from maté tea leaves *in natura* during the fractionation of maté tea leaves *in natura* under these very same conditions (Figures 4 and 5). When comparing the extraction curves in Figures 4 and 5, we observe that the last fractions richest in theobromine and theophylline increased with the cumulative amount of CO₂ showing it to be an interesting scheme for the separation of the three methylxanthines, obtaining fractions with varying concentrations of caffeine, theobromine and theophylline. The selectivity of supercritical CO₂ for caffeine, compared to those for theobromine and theophylline, is also very evident.

At 13.8 MPa and 313.2 K, the extraction velocity and yield were very low, requiring the use of 3.74 kg of CO₂ to obtain merely 0.69 mg of theobromine (Figure 4). At 343.2 K and 25.5 MPa, 70.4% of theobromine had been extracted when the 16th fraction was collected. The total quantity of theobromine obtained from the 9g of whole leaf dry maté tea was 2.33 mg, which was approximately 3.4 times the amount of theobromine extracted at 13.8 MPa and 313.2 K.

Supercritical carbon dioxide extraction of theophylline from maté tea leaves at 343.2 K and 25.5 MPa resulted in the removal of approximately 4.6 times the amount of theophylline obtained under the extraction conditions of 313.2 K and 13.8 MPa (Figure 5).

The total quantity of methylxanthines obtained from 9g of whole leaf dry maté tea at 25.5 MPa and 343.2 K from the 9g of whole leaf dry maté tea were 67.27, 2.33 and 0.27 mg of caffeine, theobromine and theophylline respectively. These quantities amount to 74.2, 258.9 and 30 mg of caffeine, theobromine and theophylline per kg of dry maté tea, respectively. The corresponding values reported by Mazzoni et al. (1992) are 74.2, 258.9 and 30 mg of caffeine, theobromine and theophylline per kg of dry maté tea, respectively.

(1994) and shown in Table 1 for new leaves from branches with fruit are 8375 ± 251 , 768 ± 3 and 209 ± 5 mg of caffeine, theobromine and theophylline per kg of dry maté tea leaves.

Figure 6 shows a comparison between the results of caffeine extraction from two different matrixes of *Ilex paraguariensis: in natura*, whole maté leaves (this work) and ground commercial maté tea (10g, 10% humidity), reported earlier by Saldaña et al. (1999). The two samples contain the same amount of dry material (9g) with two different moisture contents (10% and 60%). The results shown in Figure 6 clearly reveal that the higher caffeine extraction rate for ground commercial maté tea at the early stages of extraction, as expected due to the absence of mass transfer resistance and plant matrix interference with the extraction, is determined

mainly by solubility effects. Figure 6 also shows that higher amounts of caffeine were extracted from whole leaves, which could possibly be attributed to the higher moisture content of the whole leaf sample.

The binary solubilities, 2047.6, 14.13, 7.15 mg of caffeine, theophylline and theobromine per kg CO_2 , respectively (Saldaña et al., 1999), are substantially greater than those obtained during extraction at 25.5 MPa and 343.2 K of whole maté tea leaves (48.46, 1.51 and 0.14 mg of caffeine, theobromine and theophylline per kg CO_2 , respectively). This can be attributed to several factors, including mass transfer limitations caused by the plant matrix, and points to the difficulty of using binary data to predict the behavior of complex plant systems.

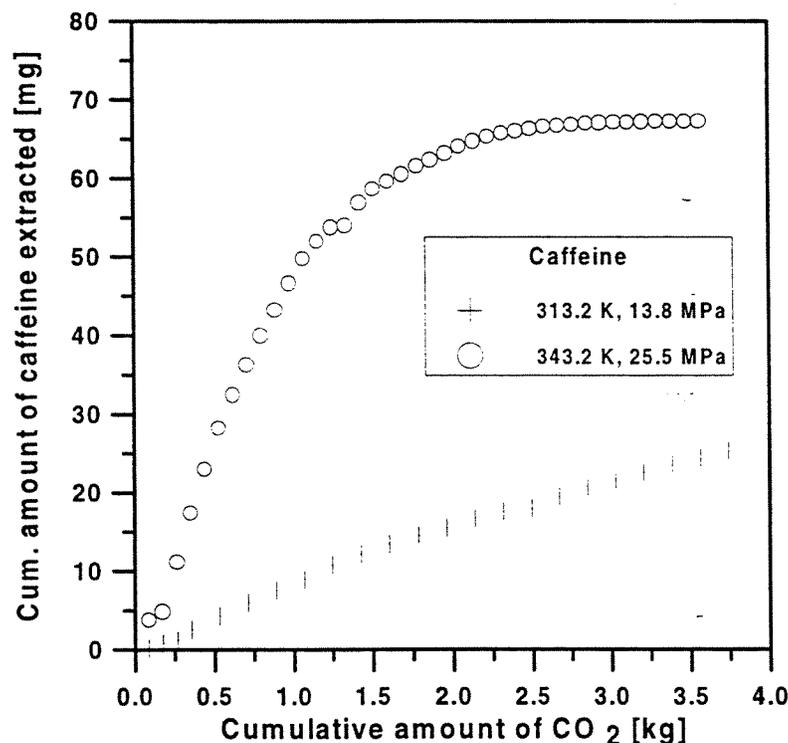


Figure 3: Caffeine extraction curve for the fractionation of maté tea leaves *in natura* at a CO_2 flow rate of $1.2\text{-}1.8 \text{ g min}^{-1}$

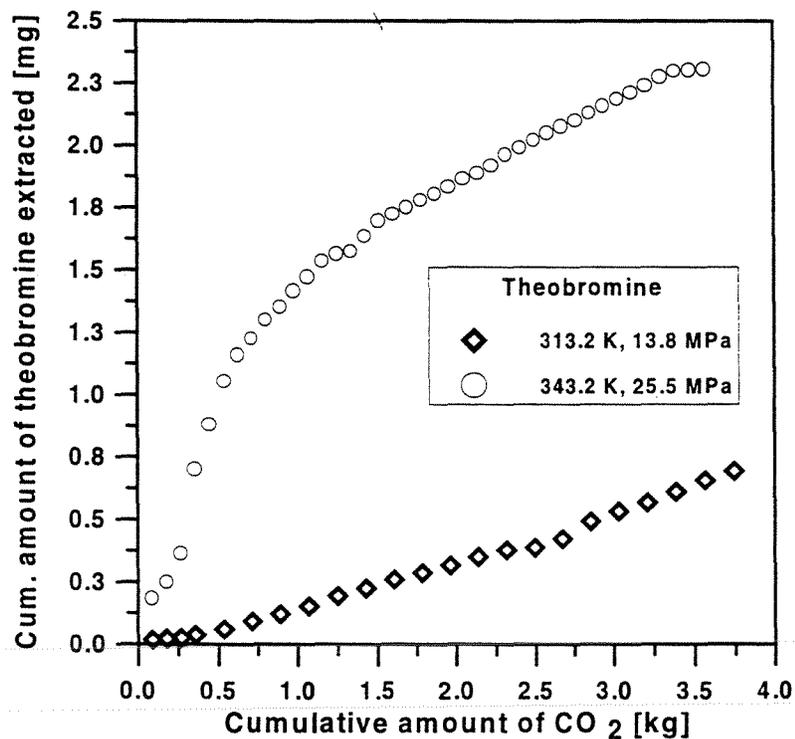


Figure 4: Theobromine extraction curves for the fractionation of maté tea leaves *in natura*

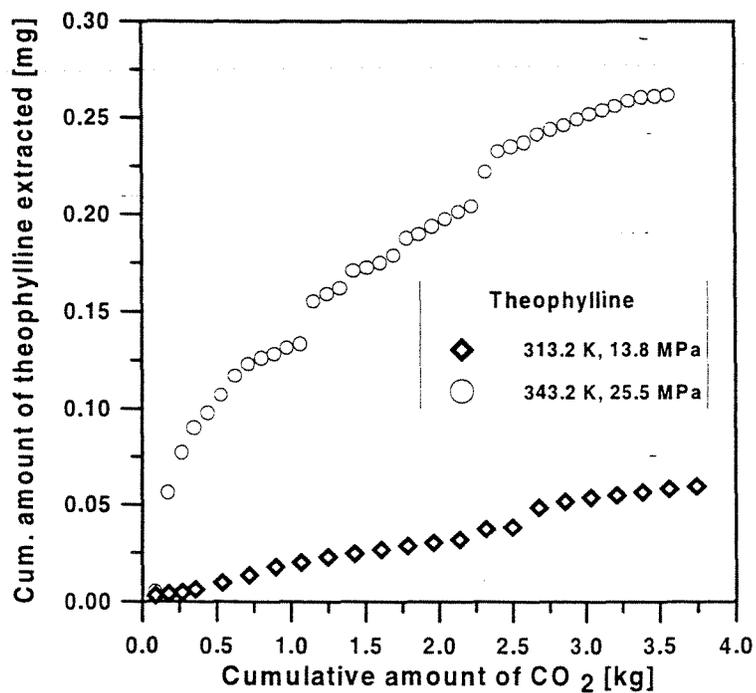


Figure 5: Theophylline extraction curves for the fractionation of maté tea leaves *in natura* at 1.2-1.8 g min⁻¹ CO₂ flow

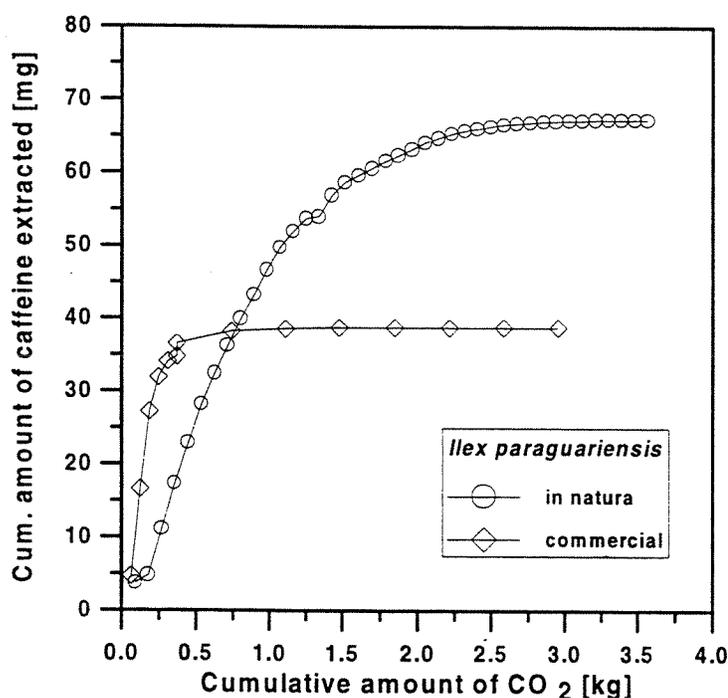


Figure 6: Extraction curves obtained for the fractionation of maté tea at 343.2 K, 25.5 MPa and 1.2-1.8 g min⁻¹ CO₂ flow

CONCLUSIONS

(a) Using carbon dioxide, it was possible to extract caffeine, theobromine and theophylline from maté tea, *Ilex paraguariensis in natura*.

(b) Extractable material was fractionated into several fractions of varying concentrations of methylxanthines.

(c) Extraction curves revealed the existence of three regions: solubility, intermediate and diffusion-controlled, in agreement with the literature.

(d) Rates of extraction from ground material were higher than those from whole leaves observed due to the absence of mass transfer resistance and the interference of the plant matrix.

(e) The higher moisture content of the extracted material resulted in improved total removal of caffeine.

(f) Solubilities in CO₂/methylxanthine binary systems were greater than those found during the extraction of maté tea leaves, illustrating the difficulty of using binary data to predict complex natural product systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial assistance of FAPESP and CNPq, Brazilian research funding agencies.

REFERENCES

- Alikaridis, F., Constituents naturels do *Ilex* espèces, Journal of Ethnopharmacology, 20, 121-144 (1987).
- Baltassa, F., Carbour, N. and Ferry, S., Étude du contenu purique de drogues a caféine: I.-Le Maté: *Ilex paraguayensis* Lamb., Plantes médicinales et phytothérapie, 18(4), 195-203 (1984).
- Brunner, G., Mass transfer from solid material in gas extraction, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 88, 887-891 (1984).
- Clifford, M. and Ramirez-Martinez, J.R., Chlorogenic acid and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage, Food Chemistry, 35, 13-21 (1990).

- Hasegawa, R., Chujo, T., Sai-kato, K., Umemura, T., Tanimura, A. and Kurokawa, Y., Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane, *Fd. Chem. Toxic.*, 33 (11), 961-970 (1995).
- Hedrick, J.L., Mulcahey, L.J. and Taylor, L.T., Fundamental Review: Supercritical Fluid Extraction, *Mikrochim Acta*, 108, 115-132 (1992).
- Inagake, M., Yamane, T., Kitao, Y., Oya, K., Matsumoto, H., Kikuoka, N., Nakatani, H., Takahashi, T., Nishimura, H. and Iwashima, A., Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rats, *Jpn. J. Cancer Research*, 86, 1106-1111 (1995).
- James, J.E., Caffeine and health. Academic Press Inc., San Diego (1991).
- Katiyar, S.D., Elmets, C.A., Agarwal, R. and Mukhtar, H., Protection against ultra violet- β radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema responses in C₃H/HeN mice by green tea polyphenols, *Photochemistry and Photobiology*, 62 (5), 855-861 (1995).
- Li, S. and Hartland, S., Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO₂, *J. Supercritical Fluids*, 5, 7-12 (1992).
- Mazzafera, P., Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*, *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 6 (2), 149-151 (1994).
- Mazzafera, P., Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake, *Food Chem.*, 60, 67-71 (1997).
- Mazzafera, P. and Carvalho, A., A cafeína do café, *Documentos IAC*, 25, 1-22 (1991).
- McHugh, M.A. and Krukoni, V.J., *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworths Publishers, Boston MA (1994).
- Mehr, C.B., Biswal, R.N., Collins, J.L. and Cochran, H.D., Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guaraná, *J. of Supercritical Fluids*, 9, 185-191 (1996).
- Neves, G.M., Mohamed, R.S. and Kieckbusch Reduction of cholesterol level in dairy pr using supercritical carbon dioxide, *Proce of the International Conference on S Extraction*, Melbourne, Australia, 999 (199
- Peker, H., Srinivasan, M.P., Smith, J.M. and N B.J., Caffeine extraction rates from coffee with supercritical carbon dioxide, *AlC*. 38(5), 761-770 (1992).
- Saldaña, M.D.A., Extração de cafeína, trigono ácido clorogênico de café com CO₂ super M.Sc. thesis, Universidade Estadua Campinas, Campinas, Brazil (1997).
- Saldaña, M.D.A., Mazzafera, P. and Mohamed Extraction of caffeine, trigonelline chlorogenic acid from Brazilian coffee with supercritical fluids, *The 4th Intern: Symposium on Supercritical Fluids*, May Sendai, Japan, 219-222 (1997).
- Saldaña, M.D.A., Mazzafera, P. and Mohamed Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguayensis*) using supercritical *Journal of Agric. and Food Chemistry*, 3804-3808 (1999).
- Suzuki, T. and Waller, G., In *Modern metho plant analysis: Analysis of Non Alc Beverages*, Linskens, H.F. and Jackson, Eds., Springer Verlag: Heidelberg, 18 (1988).
- Tormen, M.J., *Economia ervateira brasileira, I maté: biologia e cultura no cone sul, e Winge, A.G. Ferreira, J.E.A. Mariath and Tarasconi. Editora da Universidade Feder Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, (1995).*
- Wang, Z.Y., Huang, M., Lou, Y., Xie, J., Reul Newmark, H., Ho, C., Yang, C. and Conne Inhibitory effects of black tea, green decaffeinated black tea, and decaffeinated tea on ultraviolet β -light-induced carcinogenesis in dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 *Cancer Research*, 54, 3428-3435 (1994).

Reprinted from

THE JOURNAL OF
**Supercritical
Fluids**

Journal of Supercritical Fluids 16 (2000) 225–233

Reduction in the cholesterol content of butter oil using
supercritical ethane extraction and adsorption on alumina

Rahoma S. Mohamed ^{*}, Marleny D.A. Saldaña, Fredy H. Socantaype,
Theo G. Kieckbusch

*Faculty of Chemical Engineering, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Caixa Postal 6066, CEP 13083-970,
Campinas, SP, Brazil*



ELSEVIER

content in dairy products. The removal of lipids and cholesterol from animal fat using liquid solvents has also been reported [9,10].

Extraction with supercritical carbon dioxide requires higher investment but can be highly selective, without leaving objectionable residues or the risk of thermal degradation, and thus can be suitable for dairy products. The solubility of cholesterol in supercritical carbon dioxide has been intensively investigated [11–13]. Reduction in cholesterol content using supercritical CO₂ extraction was also reported for dehydrated meat and chicken samples [14] and dried and liquid eggs [15,16]. The possibility of producing low-cholesterol milk fat, while maintaining the original color and flavor in the extracted product, with the use of supercritical CO₂ has been presented [13,17–22].

Processes currently utilized or suggested for the fractionation of butter oil include melt crystallization [23,24], molecular distillation [25], short-path distillation [26], vacuum distillation [27], complexation with β -cyclodextrins [28,29] and extraction with supercritical carbon dioxide. The fractionation of milk fat and the concentration of flavor from anhydrous milk fat were recently presented [13,19,21,30,31]. Rizvi and Bhaskar [19] presented a comparison between these methods and concluded that milk fat fractions produced with supercritical CO₂ have distinct and different physical and chemical properties from those obtained by other methods.

Supercritical CO₂ extraction was successfully coupled to adsorption on silica gel or alumina to efficiently reduce cholesterol content in butter oil fractions and maximize oil yield [17,20–22]. The low solubilities of milk fat and cholesterol in supercritical CO₂ have, however, made it necessary for excessive amounts of carbon dioxide to be used (about 200 g of CO₂ to extract 1 g of butter oil at 40°C and 17.2 MPa according to Neves et al. [20] and Mohamed et al. [22]). Large solvent requirements are a major drawback in large scale separation processes due to higher capital and operating costs.

Recent data on cholesterol solubility in supercritical fluids [32] revealed cholesterol solubilities in ethane that are approximately two orders of magnitude higher than in CO₂. Ethane and CO₂

are acceptable solvents for food products and have nearly equal critical temperatures. Despite its higher cost, ethane has a lower critical pressure than CO₂ and should, therefore, be explored in the reduction of cholesterol content of milk fat. The higher cost of ethane as compared to CO₂ would need to be compensated for by a lower ethane consumption (due to the higher cholesterol and milk fat solubilities) and lower operating costs due to lower operating pressures.

In this work, we explore the potential application of supercritical ethane and alumina in the reduction of cholesterol content of dairy products through the continuous extraction of butter oil and enhanced cholesterol removal with adsorption on alumina.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Butter oil was donated by Nestlé (São José do Rio Pardo, SP, Brazil). The cholesterol content of the butter oil was 2.2 mg/g of oil. Ethane (99.9% purity) was obtained from White Martins (Campinas, Brazil). The alumina was an ALCOA CG-20 obtained from ALCOA (São Jose dos Campos, Brazil).

2.2. Experimental apparatus

The experimental apparatus used was a semi-continuous flow, high-pressure system purchased from Autoclave Engineers (Erie, PA, USA), and designed for working pressures up to 37 MPa (370 bar) at 200°C (Fig. 1). This apparatus is the one used earlier by Neves et al. [20] and Mohamed et al. [22]. The major components of this apparatus include positive liquid displacement pumps for solvent delivery, high-pressure extraction vessels (equipped with a window that allows visual observation of the phases in equilibrium), and two separator flasks in series. Flow rates and accumulated gas volumes passing through the apparatus were controlled with micrometering valves (Autoclave Engineers, Erie, PA, USA) and measured with a flow computer measuring device

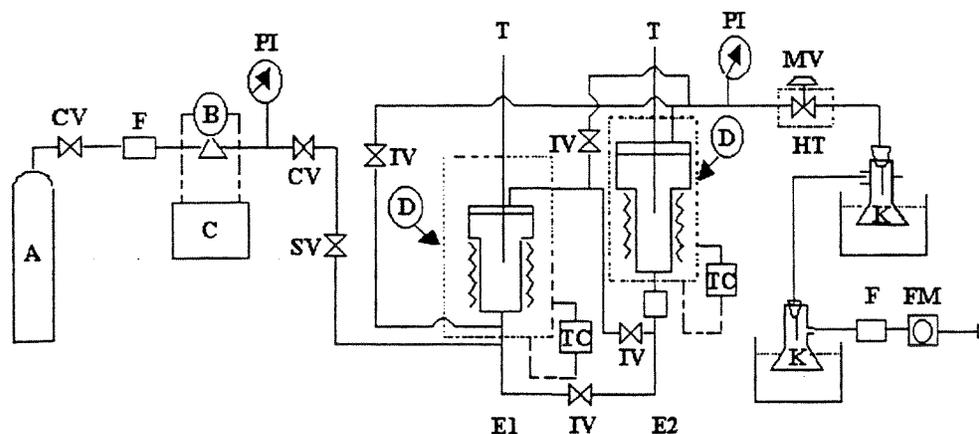


Fig. 1. Experimental apparatus: A, ethane cylinder; B, pump; C, chiller; CV, check valve; D, heating jacket; E1, simple extractor; E2, extractor with window; F, line filter; FM, flow meter; HT, heating tape; IV, isolation valve; K, separator flasks in cooling bath at 0°C; MV, micrometering valve; PI, pressure indicator; TC, temperature controller; T, thermocouples.

(EG&G Instrument Flow Technology, Phoenix, AR, USA). Heating tapes were used to maintain constant temperature in the extraction section and in valves in order to prevent freezing of solvents or solid solute precipitation following depressurization. Pressures in both extractors were monitored with a digital transducer system, Heise Series 901A RTS (Dresser Industries, Stratford, CT, USA) with a precision of ± 0.05 MPa. Extractor temperatures were controlled to $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

Cholesterol contents of extracted butter oil fractions were obtained by gas chromatography following the standard AOAC method [33]. The chromatograph was a Varian model Star 3400 CX, with a flame ionization detector and a capillary column of 30 m \times 0.25 mm ID \times 0.1 μm of film of DB-5. Column temperature was programmed from 150°C to 325°C at 20°C/min and injector temperature was kept at 150°C.

2.3. Experimental procedure

In a typical experiment for the extraction of butter oil, liquid ethane was pumped into the butter oil sample placed in extractor E2 until the specified extraction pressure was reached at the specified temperature. Extractor E2, equipped with an observation window, allowed the identification of the butter oil and supercritical solvent-rich phases and thereby the correct determination of

the vapor–liquid phase behavior and proper sampling of the supercritical phase. After a 2 h period to reach equilibrium, the oil saturated supercritical fluid was depressurized through the heated micrometering valve whilst pressure was maintained constant in the extractor. The effluents of the heated valve (low pressure ethane, now in gaseous state, and condensed butter oil) were continuously passed to the tarred flasks, placed in a cooling bath maintained at 0°C, for the recovery of precipitated butter oil. For solubility measurement at certain extraction temperature and pressure, an oil fraction was collected in the cooled and tarred separator flasks, when 134 g of ethane had passed through the apparatus. Collected oil was weighed and analyzed for cholesterol content using gas chromatography. The total amount of ethane used was recorded by the gas flow meter.

Ethane flow rates of 2.5 to 4.0 g/min were used in all experiments reported in this work. These flow rates were similar to those reported in the literature [21,22,34] and are much lower than the 170 g/min limit calculated from the maximum space velocity of 2.0/min suggested in the literature [35] in order to avoid mass transfer limitations in supercritical extraction systems. Furthermore, experiments were also repeated at different flow rates (1.3 to 7 g/min). The variation in flow rate was found to have no effect on the measured solubilities, thereby confirming the achievement of

equilibrium solubility. A glass wool plug in the exit of the extractor was used to prevent any carry-over of butter oil droplets.

In the fractionation experiments, the separator flasks were replaced at certain time intervals. A butter oil fraction was collected for each 245.5 g of ethane passing the extractor until almost all butter oil in the extractor was eventually recovered. 12 fractions were collected at an extraction temperature of 40°C and a pressure of 13.8 MPa and another six fractions at corresponding cumulative ethane mass were obtained at 40°C and 17.2 MPa.

In order to explore the potential removal of cholesterol from milk fat by selective adsorption on alumina, data on the supercritical extraction of butter oil and adsorption of cholesterol were obtained at 40°C and 17.2 MPa and the flow rates specified earlier. The butter oil extraction experiments, described above, were repeated with the effluents from extractor E2 passed over alumina placed in extractor E1. Experiments were conducted using two different amounts of alumina: 50 and 100 g, and the fractions collected at the same intervals were weighed and analyzed for cholesterol content.

3. Results and discussion

The solubility behavior of butter oil in supercritical ethane at 40, 55, and 70°C is shown in Fig. 2. Solubilities were measured in two independent experiments and average values were reported. The data were reproducible to within $\pm 4\%$. The solubility increased with density for each isotherm in the entire pressure range investigated. Depending on the pressure and temperature of the system, butter oil solubilities in ethane are about one to two orders of magnitude higher than observed by Mohamed et al. [22] when using carbon dioxide as the solvent.

Cholesterol contents in extracted butter oil fractions, shown in Fig. 3, are found to be a function of density and temperature and reach values two to three times those in the initial butter oil. These cholesterol contents were about 50% higher than those found in fractions extracted with supercriti-

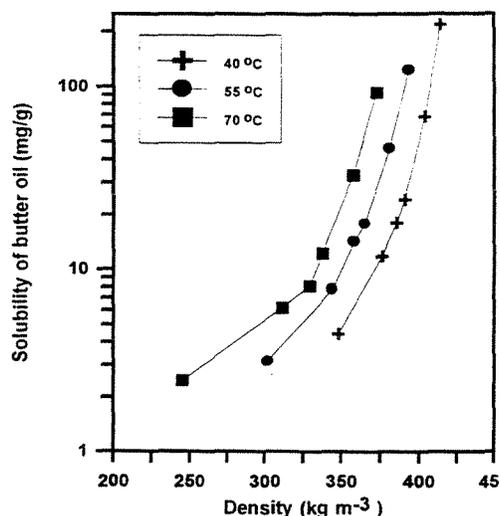


Fig. 2. Solubility of butter oil in supercritical ethane at 40, 55, and 70°C and different pressures using 2.5–4.0 g/min of ethane.

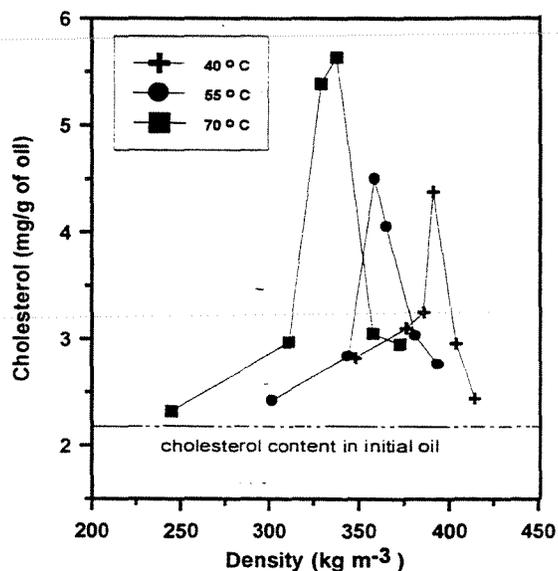


Fig. 3. Cholesterol content in butter oil extracts obtained at 40, 55, and 70°C and different pressures.

cal CO₂ with the same butter oil and under the same conditions [22].

From these butter oil and cholesterol solubility profiles (Figs. 2 and 3), it became clear that the separation of butter oil into fractions with different cholesterol contents and triglyceride compositions could be carried out for any particular set of

thermodynamic conditions. Extraction at 70°C, for example, maximizes cholesterol and minimizes lipids removal and consequently results in a cholesterol-reduced butter oil product as a raffinate. This was the option adopted in many earlier studies on the fractionation of butter oil using supercritical fluids [17,18]. At 40°C and high densities (approximately 380 to 420 kg/m³), however, we maximize oil extraction while minimizing cholesterol removal, resulting in the production of fractions with lower cholesterol and higher triglyceride contents, as extracts. This presents new and interesting possibilities in the use of supercritical fluids for the extraction of dairy products and was the option chosen in this work for the production of low-cholesterol and varying triglyceride fractions.

Fractional and cumulative yields during extraction of butter oil with supercritical ethane at 40°C and pressures of 13.8 and 17.2 MPa (densities of 376 and 391 kg/m³, respectively), are shown in Fig. 4. As noted earlier (Section 2), a fraction was collected for each 245.5 g of ethane passing through the extractor. The data show an approximately linear increase in oil yield with increase in the amount of ethane used, except at the late stages of the extraction. The steeper curve obtained for the 17.2 MPa is consistent with the higher

solubilities at this pressure (Fig. 3). At an extraction temperature of 40°C, the amount of ethane necessary to extract a certain amount of butter oil at 17.2 MPa was less than half of that needed to recover the same quantity of butter oil at 13.8 MPa. A similar conclusion can be drawn with regard to extraction times for these two pressures.

For the extraction conditions of 17.2 MPa and 40°C, less than 2 kg of ethane was necessary for the recovery of all the oil in the extractor (Fig. 4). When using supercritical CO₂ as the solvent at the same pressure, more than 20 kg of solvent was reported to be necessary for the complete removal of the same amount of oil in the extractor [22]. This result is consistent with the observed higher solubilities of butter oil in ethane as compared to those in CO₂, and in practice results in much shorter extraction times with supercritical ethane. Moreover, the extensive studies by Singh and Rizvi [36] and Rizvi and Bhaskar [19] on the scale-up, design and economic analysis of supercritical carbon dioxide fractionation of milk fat revealed a favorable economic viability for the continuous countercurrent operation. An economic evaluation of a plant processing 10 000 tons/year, with a desired return of 20% was estimated to have a 5 year payback. With estimated ethane price approximately twice that of carbon dioxide [37], the economic viability is clearly much more pronounced when considering the much lower solvent and pressure requirements of processing milk fat with supercritical ethane.

Cholesterol contents of these collected oil fractions (Fig. 4) are shown in Fig. 5. Fractions obtained at the early stages were found to have a higher cholesterol content than the original oil. As extraction proceeded, the remaining oil became poorer in cholesterol and butter oil fractions obtained at late stages showed lower cholesterol contents than the original oil. Due to the higher cholesterol solubilities at 17.2 MPa, cholesterol contents in fractions obtained at early stages of the extraction were found to be higher than those in corresponding fractions obtained at the lower pressure of 13.8 MPa. Cholesterol contents of the oil in the extractor during fractionation as a function of the amount of ethane used are shown in Fig. 6. The data, obtained through a mass balance

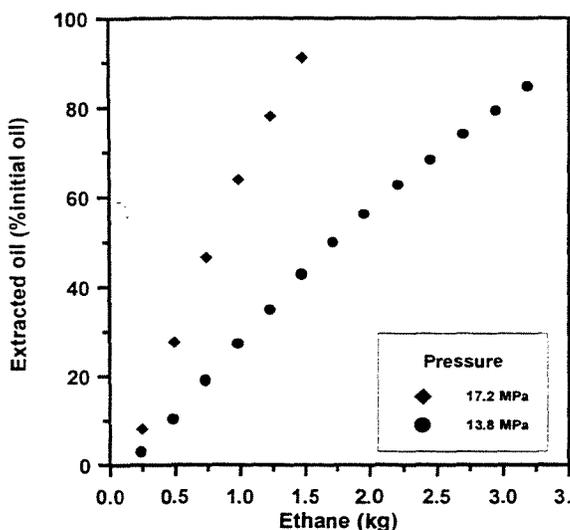


Fig. 4. Cumulative mass of oil removed during extraction at 13.8 and 17.2 MPa, 40°C, 2.5–4.0 g/min of ethane as a function of cumulative mass of ethane.

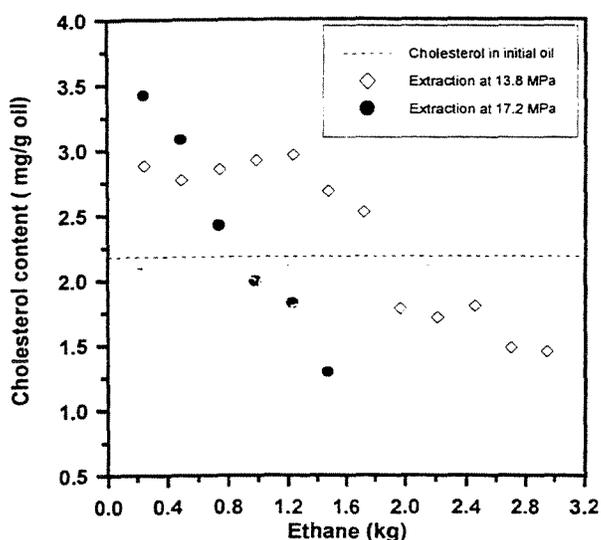


Fig. 5. Cholesterol content in butter oil fractions obtained at 13.8 and 17.2 MPa, 40°C and 2.5–4.0 g/min of ethane as a function of mass of ethane used.

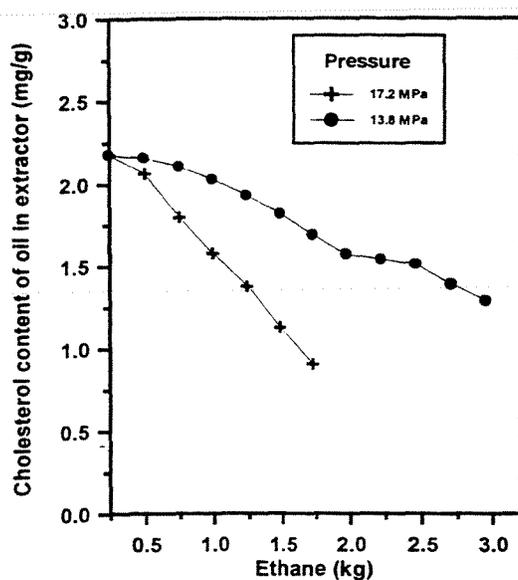


Fig. 6. Cholesterol content in residual butter oil (fraction that remains in extractor) during fractionation at 13.8 and 17.2 MPa, 40°C and 2.5–4.0 g/min of ethane as a function of mass of ethane used.

around the extractor, show a decline in the cholesterol content of the residual oil due to the selective removal of cholesterol in the extracted fractions (Fig. 5). This reduction in the cholesterol content

was found more pronounced during the fractionation at 17.2 MPa, as expected from the higher cholesterol solubilities at this pressure in comparison to those at 13.8 MPa (Fig. 3).

The cumulative amounts of butter oil recovered during the continuous supercritical ethane extraction and in the combined supercritical extraction/adsorption process at 40°C and 17.2 MPa are shown in Fig. 7. The difference in the cumulative amounts of butter oil in the two processes indicated the quantity of oil retained by the alumina, which amounted to a maximum of about 12 to 16% of the original oil for the 50 and 100 g alumina charges in the extractor, respectively (Fig. 7). The amounts of butter oil extracted during the fractionation process and their cholesterol contents were found to be reproducible to ± 2 and $\pm 12\%$, respectively.

Fig. 8 shows the cholesterol contents of oil fractions obtained in the combined extraction/adsorption process at 40°C and 17.2 MPa using the two different quantities of alumina as adsorbent. For the butter oil sample placed in the extractor, the cholesterol content was reduced from 2.2 to less than 0.1 mg/g of oil. While further work

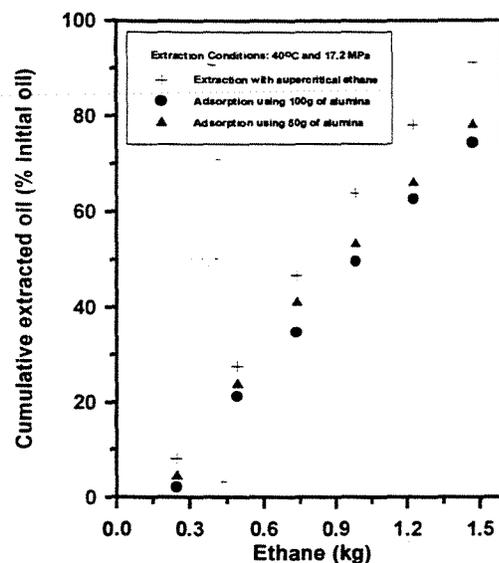


Fig. 7. Fractional and cumulative mass of butter oil obtained during extraction and extraction/alumina adsorption operations at 17.2 MPa, 40°C and 2.5–4.0 g/min of ethane as a function of cumulative mass of ethane used.

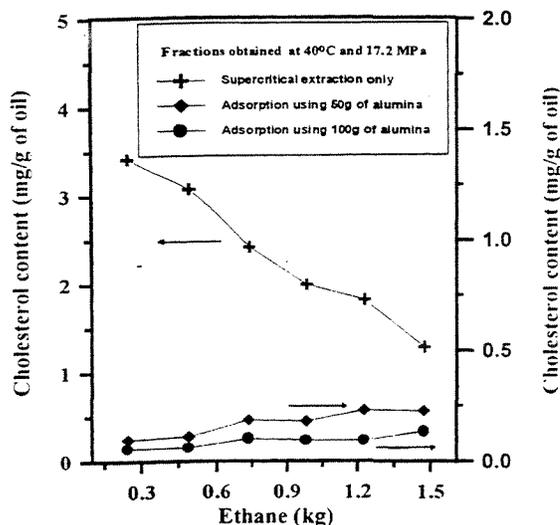


Fig. 8. Cholesterol content in fractions obtained during the extraction:alumina adsorption operation at 17.2 MPa, 40 °C and 2.5–4.0 g/min of ethane as a function of mass of ethane used.

would need to be carried out to better define the thermodynamic and kinetic aspects of the adsorption of cholesterol in the presence of a supercritical fluid, it is clear (Fig. 8) that the use of alumina as an adsorbent resulted in a drastic reduction of the cholesterol concentration in recovered oil fractions. Changing the amount of alumina from 50 to 100 g resulted in little gain in cholesterol removal efficiency. Similar reductions in cholesterol content were reported by Mohamed et al. [22] using supercritical CO₂ and adsorption on alumina and by Shishikura et al. [17] using supercritical CO₂ and adsorption on activated carbon. Mohamed et al. [22] employing the same apparatus and using supercritical CO₂ extraction alone and supercritical CO₂ extraction followed by adsorption on alumina reported the separation of butter oil into fractions represented by an arbitrary triglyceride grouping. These fractions were labeled light-richer (C₂₈–C₃₆), intermediate (C₃₈–C₄₆) and heavy-richer (C₄₈–C₅₂). Triglyceride distributions in fractions obtained with supercritical CO₂ extraction alone remained practically unaltered following cholesterol adsorption on alumina. While triglyceride distributions in extracted fractions obtained in this work using supercritical ethane were not deter-

mined, it is not unreasonable to expect that they also remain unaltered following cholesterol adsorption on alumina.

This single-stage fractionation is a clear indication of the technological possibilities in the use of an efficient multi-stage supercritical ethane extraction coupled with adsorption for the production of low-cholesterol butter oil fractions.

4. Conclusions

Supercritical ethane was found to be an effective solvent in the extraction and fractionation of butter oil, showing higher ability than carbon dioxide to dissolve cholesterol and butter oil. The higher solubilities of butter oil in ethane result in solvent requirements that were an order of magnitude smaller than needed when using supercritical CO₂ for the extraction of the same amount of oil at the same temperature and pressure. Using a combined supercritical ethane extraction/adsorption on alumina process, it was possible to reduce cholesterol content of butter oil to 3% of that in the original oil, at a much lower solvent consumption than with carbon dioxide. The combined process allows the extraction of butter oil and production of low-cholesterol fractions, opening thereby a wide range of technological possibilities for the formulation of milk fat with desirable nutritional and marketable properties.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Research Funding agencies FAPESP, CNPq, CAPES for their financial support, the White Martins Company for supplying liquid CO₂ and the ALCOA Company for furnishing the alumina.

References

- [1] G.A. Muck. Overview of dairy product modifications, in: C. Haberstroh, C.E. Morris (Eds.), *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies*, Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 12, Gulf Publishing, The Woodlands, TX, 1991, p. 233.

- [2] R.M. Feeley, P.E. Criner, B.K. Watt, Cholesterol content of food, *J. Am. Diet Assoc.* 61 (1972) 134.
- [3] D.E. LaCroix, W.A. Mattingly, N.P. Wong, J.A. Alford, Cholesterol, fat and protein in dairy products, *J. Am. Diet Assoc.* 62 (1973) 275.
- [4] J.P. Sweeney, J.L. Weihrauch, Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8 (1976) 131.
- [5] R.L. Bradley, Removal of cholesterol from milk fat using supercritical carbon dioxide, *J. Dairy Sci.* 72 (1989) 2834.
- [6] C.E. Morris, Dairy science removes cholesterol, replaces fat. Overview, in: C. Haberstroh, C.E. Morris (Eds.), *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies*, Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 12, Gulf Publishing, The Woodlands, TX, 1991, p. 201.
- [7] E. Sundfeld, S. Yun, J.M. Krochta, T. Richardson, Separation of cholesterol from butter oil using Quillaja saponins, I. Effects of pH, contact time and adsorbent, *J. Food Process Eng.* 16 (3) (1993) 191.
- [8] E. Sundfeld, J.M. Krochta, T. Richardson, Separation of cholesterol from butter oil using Quillaja saponins, II. Effects of temperature, agitation and concentration of Quillaja solution, *J. Food Process Eng.* 16 (3) (1993) 207.
- [9] H.W. Warren, H.G. Brown, D.R. Davis, Solvent extraction of lipid components from egg yolk solids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65 (7) (1988) 1136.
- [10] J.E. Larsen, G.W. Froning, Extraction and processing of various components from egg yolk, *Poultry Sci.* 60 (1981) 160.
- [11] J.M. Wong, K.P. Johnston, Solubilization of biomolecules in carbon dioxide based in supercritical fluids, *Biotechnology Prog.* 2 (1) (1986) 30.
- [12] E. Kosal, C.H. Lee, G.D. Holder, Solubility of progesterone, testosterone, cholesterol in supercritical fluids, *J. Supercrit. Fluids* 5 (1992) 169.
- [13] G.M. Neves, R.S. Mohamed, Removal of cholesterol from dairy products using supercritical carbon dioxide, in: *Proc. 5th World Congress of Chemical Engineering Vol. 2* (1996) 203.
- [14] R.L. Wehling, Supercritical fluid extraction of cholesterol from meat products, in: C. Haberstroh, C.E. Morris (Eds.), *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies*, Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 12, Gulf Publishing, The Woodlands, TX, 1991, p. 133.
- [15] G.W. Froning, Supercritical fluid extraction of cholesterol from dried eggs, in: C. Haberstroh, C.E. Morris (Eds.), *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies*, Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 12, Gulf Publishing, The Woodlands, TX, 1991, p. 277.
- [16] R.A. Novak, W.J. Reightler, G. Pasin, A.J. King, G. Zeidler, Supercritical fluid extraction of cholesterol from liquid egg, in: C. Haberstroh, C.E. Morris (Eds.), *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies*, Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 12, Gulf Publishing, The Woodlands, TX, 1991, p. 28.
- [17] A. Shishikura, K. Fujimoto, T. Kaneda, Modification of butter oil by extraction with supercritical carbon dioxide, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 1209.
- [18] R.L. Bradley, Removing cholesterol from milk fat using supercritical carbon dioxide, in: C. Haberstroh, C.E. Morris (Eds.), *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies*, Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 12, Gulf Publishing, The Woodlands, TX, 1991, p. 221.
- [19] S.S.H. Rizvi, A.R. Bhaskar, Supercritical fluid processing of milk fat: fractionation, scale-up and economics, *Food Technol.* 49 (2) (1995) 90.
- [20] G.M. Neves, R.S. Mohamed, T.G. Kieckbusch, Reduction of cholesterol level in dairy products using supercritical carbon dioxide, in: *Proc. Int. Conf. on Solvent Extraction*, Melbourne, Australia Vol. II (1996) 999.
- [21] W. Huber, A. Molero, C. Pereyra, E. Martinez de la Ossa, Dynamic supercritical CO₂ extraction for removal of cholesterol from anhydrous milk fat, *Int. J. Food Sci. Technol.* 31 (1996) 143.
- [22] R.S. Mohamed, G.M. Neves, T.G. Kieckbusch, Reduction in cholesterol and fractionation of butter oil using supercritical carbon dioxide with adsorption on alumina, *Int. J. Food Sci. Technol.* 33 (5) (1998) 245.
- [23] R. Norris, I.K. Gray, A.K.R. McDowell, Chemical composition and physical properties of fractions of milk fat obtained by a commercial fractionation process, *J. Dairy Res.* 38 (1971) 179.
- [24] J. Arul, A. Boudreau, J. Makhlof, Distribution of cholesterol in milk fat fractions, *J. Dairy Res.* 55 (1988) 361.
- [25] U. Bracco, Butter-like food product, British Patent 1,559,064, 1980.
- [26] Pfaunder Co., Wiped film evaporator, Bulletin No. SB 39-100-1, Rochester, NY, 1982.
- [27] S.S. Marschner, J.B.-Fine, Physical process for simultaneous deodorization and cholesterol reduction of fats and oils, US Patent 4,804,555, 1989.
- [28] J. Courrelonge, J.P. Maffrand, Procédé d'élimination du cholestérol contenu dans une M.G. d'origine animal et M.G. appauvrie en cholestérol obtenue, European Patent Application EP 0256911 A1, 1988.
- [29] H. Roderbourg, D. Dalemans, R. Bouhon, Fundamentals of processing with supercritical fluids, in: S.S.H. Rizvi (Ed.), *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Black Academic, Glasgow, 1990, pp. 1–26.
- [30] A.B. de Haan, J. De Graauw, J.E. Scaap, H.T. Badings, Extraction of flavors from milk with supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 3 (1990) 15.
- [31] S.H. Rizvi, Z. Yu, A. Bhaskar, L. Rosenberry, Phase equilibria and distribution coefficients of δ -lactones in supercritical carbon dioxide, *J. Food Sci.* 58 (1993) 996.
- [32] H. Singh, J.S. Yun, S.J. Macnaughton, D.L. Tomasko, N.R. Foster, Solubility of cholesterol in supercritical ethane and binary gas mixtures containing ethane, *Ind. Eng. Chem. Res.* 32 (1993) 2841.
- [33] AOAC, Official Methods of Analysis, Residue (Unsaponifiable) of Oils and Fats — Ether Extraction Method, Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA, 1990, p. 971.

- [34] S.L.J. Yun, K.K. Liong, G.S. Gurdial, N.R. Foster, Solubility of cholesterol in supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 30 (1991) 2476.
- [35] R.P. de Filippi, CO₂ as a solvent: application to fats, oils and other materials, *Chem. Ind.* 19 (1982) 390.
- [36] B. Singh, S.S.H. Rizvi, Design and economic analysis : continuous countercurrent processing of milk fat w supercritical carbon dioxide, *J. Dairy Sci.* 77 (1994) 17.
- [37] C.R. Paiva, Ethane gas recovery process — Petrobr Refinery (REVAP), Personal communication, 1999.

**Extraction of Purine Alkaloids from Maté
(*Ilex paraguariensis*) Using
Supercritical CO₂**

**Marleny D. A. Saldaña, Rahoma S. Mohamed,
Martin G. Baer, and Paulo Mazzafera**

Faculty of Chemical Engineering and Institute of Biology, State
University of Campinas, C.P. 6066, CEP 13083-970,
Campinas, SP, Brazil

Journal of
**Agricultural
and Food
Chemistry**[®]

Reprinted from
Volume 47, Number 9, Pages 3804–3808

Extraction of Purine Alkaloids from Maté (*Ilex paraguayensis*) Using Supercritical CO₂

Marleny D. A. Saldaña,[†] Rahoma S. Mohamed,^{*†} Martin G. Baer,[†] and Paulo Mazzafera[‡]

Faculty of Chemical Engineering and Institute of Biology, State University of Campinas, C.P. 6066, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Experimental data for the supercritical CO₂ extraction of purine alkaloids (caffeine, theobromine, and theophylline) from ground herbal maté tea (*Ilex paraguayensis*) using a high-pressure apparatus are presented. Caffeine, theophylline, and theobromine were identified in the extracted fractions using HPLC. Results indicated a much higher CO₂ selectivity for caffeine in comparison with those for theophylline and theobromine. Solubilities of pure compounds in carbon dioxide were also determined at 313.2, 323.2, 338.2, and 343.2 K, and pressures ranging from 14 to 24 MPa. Caffeine solubility exhibited a retrograde behavior with temperature while theophylline and theobromine manifested a normal behavior at conditions explored in this study. Solubilities in binary CO₂/purine alkaloid model systems were much higher than those obtained during extraction of maté tea, demonstrating the difficulty of using binary data in predicting complex multicomponent behavior.

Keywords: *Supercritical fractionation; maté tea; caffeine; theophylline; theobromine; methylxanthines*

INTRODUCTION

Maté, *Ilex paraguayensis*, a member of the denominated "holly" plants, is a native plant of South America. Most of the maté produced is locally consumed, with Argentina being the largest producer and consumer (Alikaridis, 1987; Tormen, 1995).

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), theophylline (1,3-dimethylxanthine), and theobromine (3,7-dimethylxanthine), whose chemical structures are shown in Figure 1, are natural components of maté tea leaves, coffee, guaraná, and cocoa beans (Baltassa et al., 1984; Suzuki and Waller, 1988). For the human body, these alkaloids act as stimulants of the central nervous, muscle, and circular systems (James, 1991).

Decaffeination of natural beans and leaves can be economically attractive in obtaining a decaffeinated product and caffeine, a valuable byproduct commonly used in cola drinks and pharmaceutical products (Mazzafera and Carvalho, 1991). Maté tea is a beverage that is prepared by the infusion of green dried maté leaves and traditionally consumed by the Gauchos of South America, residing in Argentina, southern Brazil, Paraguay, and Uruguay (Tormen, 1995). Estimates of caffeine intake due to maté tea consumption exceed by far intakes recorded in the literature from other beverages containing this alkaloid (Mazzafera, 1997). Similar to coffee decaffeination, caffeine removal of maté leaves could be performed using organic solvents (dimethyl chloride) or water (Saldaña, 1997). However, chemical solvents bring with them a risk of toxic residue in the extracted products, and the use of water results in a nonselective extraction with a consequent loss of valuable flavor components (Mazzafera and Carvalho, 1991).

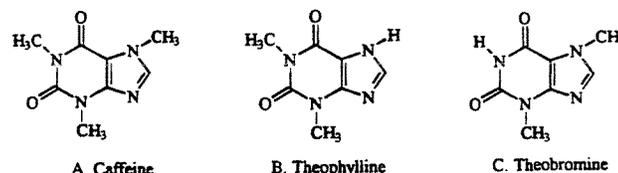


Figure 1. Purine alkaloids chemical structures.

The low critical temperature (31 °C), nontoxicity, and low cost have rendered supercritical carbon dioxide a more suitable solvent for food products (McHugh and Krukonic, 1994; Saldaña, 1997).

While there are various patents on the use of supercritical CO₂ as a solvent for caffeine extraction from coffee beans and tea leaves (Saldaña et al., 1997; Peki et al., 1992; Brunner, 1984; McHugh and Krukonic 1994), very little is known about the extraction of other important methylxanthine constituents of pharmaceutical value and pronounced physiological effects, such as theophylline and theobromine. Data on the solubility of these purine alkaloids in supercritical fluids is rather scarce in the open literature. The works of Johannser and Brunner (1994) and Li et al. (1991) on binary methylxanthine/CO₂ systems were the only ones encountered.

The main objective of this work was to obtain experimental information on the extractability of the methylxanthines: caffeine, theophylline, and theobromine from ground herbal maté tea leaves, using supercritical CO₂. Individual solubilities of pure methylxanthines in model supercritical carbon dioxide/methylxanthine systems were also measured at various temperatures and pressures and compared to those in complex maté carbon dioxide systems.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Caffeine, theophylline, and theobromine, 99% purity, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: mohamed@feq.unicamp.br. Fax: +55 19 289 4717.

[†] Faculty of Chemical Engineering.

[‡] Biology Institute.

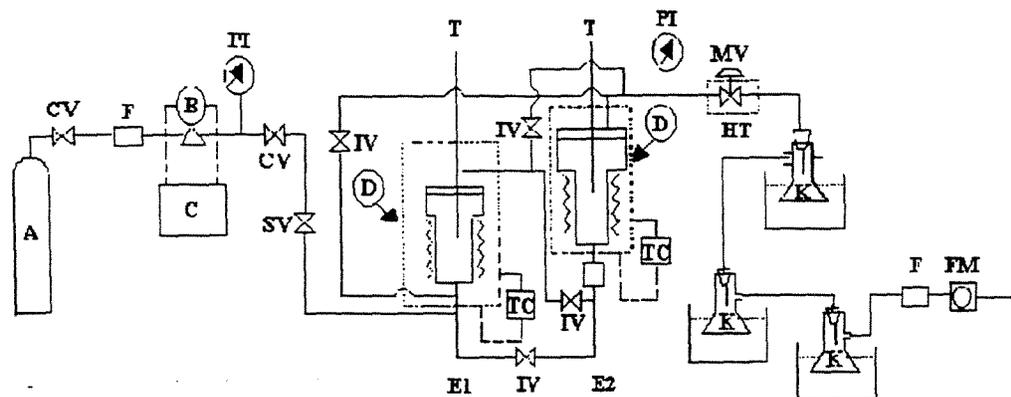


Figure 2. Experimental apparatus: (A) CO₂ cylinder, (B) pump, (C) chiller, (CV) check valve, (D) heating jacket, (E1) sin extractor, (E2) extractor with window, (F) line filter, (FM) flow meter, (HT) heating tape, (IV) isolation valve, (K) separator fl in cooling bath at 0 °C, (MV) micrometering valve, (PI) pressure indicator, (TC) temperature controller, and (T) thermocou

MO). Carbon dioxide, bone dry, 99.9% purity, was donated by White Martins (Campinas, SP, Brazil). Maté tea leaves, produced by Ximango Erva-Maté Ltda. (Ilópolis, Rio Grande do Sul, Brazil) was purchased in a local market. This product, ready for maté infusion, is composed of dry and coarsely ground leaves.

Sample Preparation and Analysis. Before the extraction, samples of maté tea leaves (30 g) were granulometrically classified using standardized sieves. The sample was separated in fractions as a function of particle size. Moisture content of the sample was determined by drying at 105 °C for 24 h. Compositions of methylxanthines in extracted products were determined by HPLC (Shimadzu, Japan) with a Nucleosil C₁₈ column (Supelco, 4 × 150 mm, 5 μm), using 20% methanol (HPLC grade) in 0.5% aqueous acetic acid as isocratic solvent. The flow rate was 1 mL min⁻¹, and the compounds eluting from the column were detected with a UV monitor set at 280 nm. The peak areas registered by a recorder/integrator were compared with those obtained with pure standards.

Experimental Apparatus. The experimental apparatus used was a semicontinuous-flow high-pressure system purchased from Autoclave Engineers (Erie, PA), and designed for working pressures up to 37 MPa (370 bar) at 200 °C (Figure 2). This apparatus is the same one used earlier by Neves et al. (1996). The major components of the apparatus include positive liquid displacement pumps for solvent delivery, high-pressure extraction vessels, and three separator flasks in series. Flow rates and accumulated gas volumes passing through the apparatus were controlled with micrometering valves from Autoclave Engineers (Erie, PA) and measured with a flow computer measuring device from EG&G Instrument Flow Technology (Phoenix, AR). Heating tapes were used to maintain constant temperature in the extraction section and in valves to prevent freezing of solvents or solid solute precipitation following depressurization. Pressure in both extractors were monitored with a digital transducer system, Heise Series 901A RTS, acquired from Dresser Industries (Stratford, CT) with a precision of ± 0.03 MPa (± 0.3 bar). Extractor temperatures were controlled to ± 0.5 °C.

Pure Methylxanthines Solubility Measurements. The solubilities of caffeine, theophylline, and theobromine in supercritical carbon dioxide as a function of temperature and pressure were first determined. These are binary model systems that could provide information essential for the comprehension and thermodynamic modeling of the complex multicomponent real system, e.g., maté leaves/carbon dioxide. To measure the pure alkaloid solubility in supercritical CO₂, each methylxanthine (12 g) was mixed with glass beads (4 mm in diameter) and placed in extractor E1. Liquid CO₂ was slowly delivered into the extractor until the extraction pressure at the specified temperature was reached. Following a 2–3 h period to reach equilibrium, the heated micrometering valve was slowly opened while pressure was maintained constant in the extractor. CO₂ flow rates of 0.9–1.2 g min⁻¹ were used in all experiments reported in this work. These flow rates were

similar to those reported in the literature (Mohamed et al. 1998; Jimmy Yun et al., 1991) and are much lower than maximum space velocity of 2.0 min⁻¹ suggested in the literature (Fillipi, 1982) in order to avoid mass transfer limit in supercritical extraction systems. Furthermore, experiments were also repeated at different flow rates (0.5–2.5 g min⁻¹). The variation in flow rate was found to have no effect on measured solubilities and thereby confirming achievement of equilibrium solubility. Glass wool plug in the exit of extractor was used to prevent any carry-over of methylxanthine particles. The effluent of the heated valve (low-pressure CO₂, now in gaseous state, and precipitated methylxanthines) were introduced into the cooled and tarred flasks for recovery of precipitated methylxanthines. The second and third flasks contained deionized water to ensure complete recovery of all precipitated alkaloid. At the end of each experiment, tubing located down stream of the micrometering valve was washed with hot water, added to the contents of the second and third flasks, and the whole sample was analyzed for alkaloid by HPLC. The total amount of CO₂ used was recorded by the gas flow meter.

Extraction of Methylxanthines from Maté Tea Leaves. In a typical experiment liquid CO₂ was pumped into ground maté leaves sample (10 g, 10% moisture content) in extractor E1 until the specified extraction pressure was reached at the specified temperature. After a 3-h period to reach equilibrium, the saturated supercritical fluid was depressurized while pressure was maintained constant in extractor and a precipitated fraction was collected in the first separator flasks placed in a cooling bath maintained at 0 °C. Collected samples were weighed and analyzed for purity using HPLC. The three separator flasks were replaced at intervals and extracted fractions were collected for each 6 g of carbon dioxide passing through the extractor for the first 7 h. Subsequently, fractions were collected for each 369.2 g CO₂ passing through the extractor. A total of 14 fractions were continuously collected during the extraction carried out at 2 MPa and 343.2 K. Tubings and valves throughout the apparatus were cleaned with chloroform at the end of each experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

The granulometrically classified sample was separated in four fractions as a function of particle size. In this work, a finely divided fraction with an average diameter of 0.046 mm and a moisture content of 10% was used in all experiments.

Pure Methylxanthines Solubility Measurements. To verify the reliability of equilibrium data obtained with our apparatus, caffeine solubility was obtained at 313.2 K (Figure 3a) and compared to those reported by Johannsen and Brunner (1994). Good agreement between

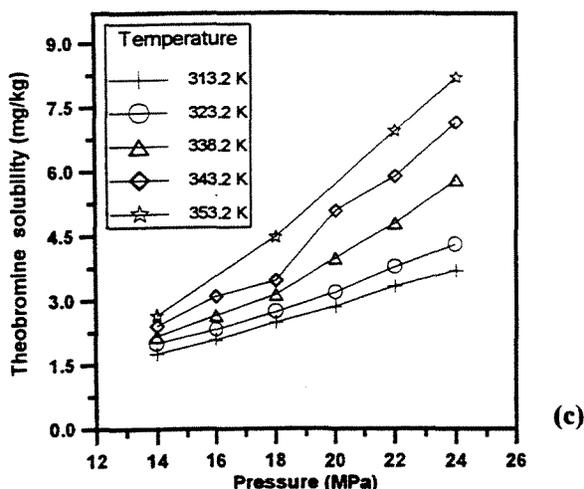
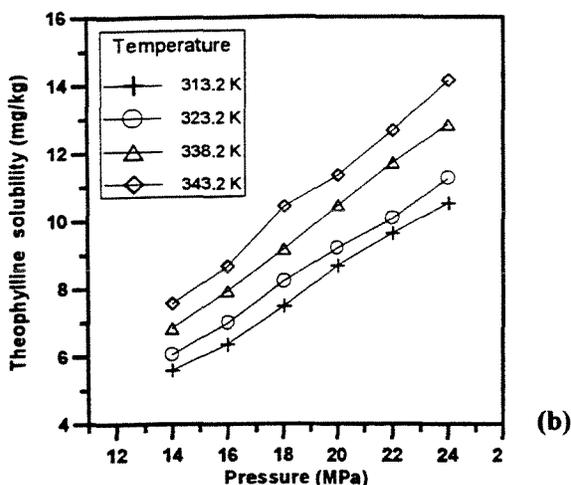
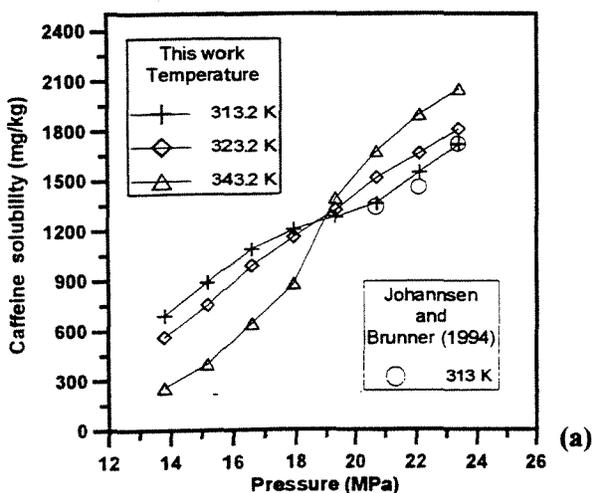


Figure 3. Caffeine (a), theophylline (b), and theobromine (c) solubilities at different pressures and temperatures.

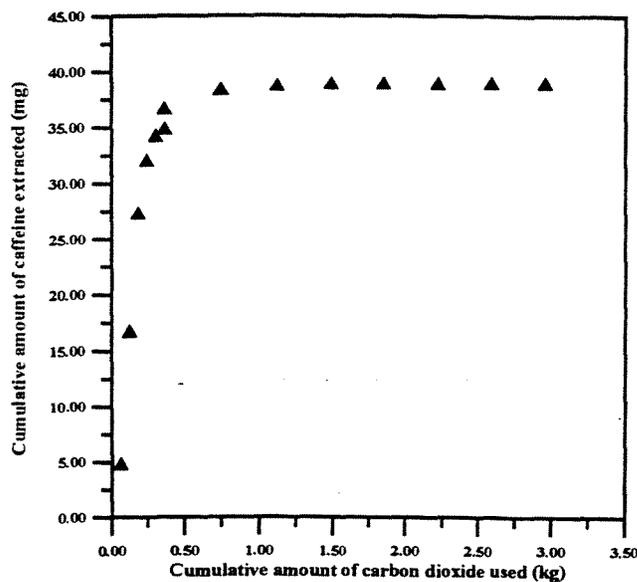
tween our data and reported values was observed. New data at 323.2 and 343.2 K were also obtained (Figure 3a). Under these conditions, caffeine solubility exhibited a retrograde behavior (a decrease in solubility with increase in temperature) at pressures lower than 19 MPa. These results were in qualitative agreement with those obtained by Stahl and Schilz (1979). At pressures above 19 MPa, the normal behavior of increase in solubility with increase in temperature was observed.

Solubilities of pure theophylline and theobromine in supercritical CO_2 at 313.2, 323.2, 338.2, and 343.2 K and pressures from 14 to 24 MPa were also obtained (Figure 3, parts b and c). All experimental data reported were average values of four independent experiments with a standard deviation of $\pm 6\%$. The solubilities of theophylline and theobromine were found to be much lower than those of caffeine and increased with pressure at all temperatures investigated. For these systems, the increase in vapor pressure due to increase in temperature appeared to compensate for the decrease in solubility caused by the reduction in supercritical fluid density.

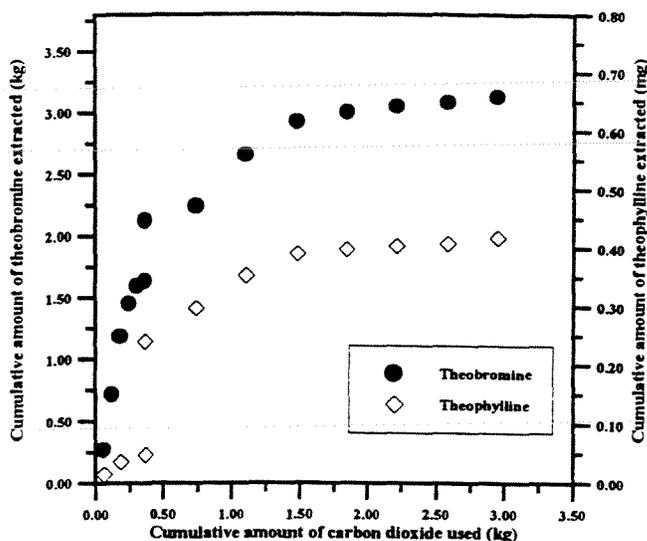
Pure theobromine solubilities at 338.2 K were found to be in close agreement with the values reported by Li et al. (1991), using a similar dynamic extraction method but lower than those reported by Johannsen and Brunner (1994), who employed a static method. Data at other temperatures represented new contributions to the literature.

Johannsen and Brunner (1994) pointed out that dynamic methods often tend to underestimate equilibrium solubilities due to nonachievement of equilibrium conditions. Due to the very low solvent flow rates used and the good agreement between measured caffeine solubilities and those reported by Johannsen and Brunner (1994) using the static methods, it is unreasonable to believe that equilibrium conditions were closely approached in this work. Because of the low solubilities of theophylline and theobromine, reported values would be sensitive to the method of measurement, sample collection, and analysis.

When comparing parts a–c of Figure 3, we may conclude that solubilities of caffeine in supercritical carbon dioxide are much higher than those of theophylline and are about 2 orders of magnitude higher than those for theobromine. As pointed out by Martin et al. (1981), the ideal behavior of these methylxanthines in liquids, at 25 °C is such that caffeine is more soluble than theophylline and both being an order of magnitude more soluble than theobromine. This behavior is qualitatively similar to that observed in supercritical carbon dioxide. A possible explanation of this behavior can be found in the differences of the chemical structures of these methylxanthines (Figure 1). We see that the difference in structure between the three methylxanthines is that caffeine has three methyl groups while theophylline and theobromine have two methyl groups and one hydrogen attached. As pointed out by Li et al. (1991), the presence of a hydrogen atom (an electron acceptor), and the negative atoms: ring nitrogen and carbonyl oxygen, allows the formation of hydrogen bonding between theobromine as well as theophylline molecules. The effects of these additional cohesive forces are macroscopically manifested in the higher melting temperatures, 547 and 621 K, and enthalpies, 7097 and 9819 cal mol^{-1} for theophylline and theobromine, respectively as compared to caffeine (512 K and 5044 cal mol^{-1}) and ultimately the lower observed solubilities of theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide in comparison with those of caffeine. The differences in melting temperature and enthalpies and ultimately in solubility between theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide is attributed to the greater extent of hydrogen bonding in theobromine due to the localization of the hydrogen between the two carbonyl oxygen atoms.



(a)



(b)

Figure 4. Caffeine (a) and theobromine and theophylline (b) extraction curves during fractionation of maté tea at 343.2 K and 25.5 MPa and CO₂ flow of 0.9–1.2 g min⁻¹.

Extraction of Methylxanthines from Maté Tea Leaves. A supercritical extraction curve for maté tea at 343.2 K and 25.5 MPa, representing the cumulative amounts of extracted caffeine as a function of cumulative amounts of carbon dioxide used, is shown in Figure 4a. High caffeine removal rates were obtained in the early stages of the extraction. Extraction rates, at later stages, diminished with time as shown by changes in the inclination of extraction curve. A similar qualitative behavior was observed for theophylline and theobromine extraction as shown in Figure 4b. These extraction curves clearly show three distinct regions: solubility dependent, intermediate, and diffusion controlled, as defined by the three distinct inclinations in the curve. This is in qualitative agreement with the behavior pointed out by Hedrick et al. (1992).

An examination of Figure 4a,b reveals the higher selectivities of CO₂ for caffeine followed by theobromine and theophylline. The cumulative amounts of methyl-

xanthines extracted from 9 g of dry ground maté using a cumulative amount of 2.95 kg of carbon dioxide at 343 K and 25.5 MPa were 38.77, 3.13, and 0.4 of caffeine, theobromine, and theophylline, respectively. These amounted to 4308, 348, and 47 mg of caffeine, theobromine and theophylline, per kg of dry maté, respectively. Considering that different maté leaves were used, these values are in good accordance with values of 5371, 340, and 142 mg kg⁻¹ reported by Mazzafera (1994).

After about 7 h of extraction, 94, 68, and 57% of caffeine, theobromine and theophylline, respectively, had been recovered. By the 11th fraction, 99.9% of caffeine, 96% of theobromine and 95% of theophylline had been removed. Fractions obtained at the late stages became richer in theobromine and theophylline and could provide an interesting starting point for the separation of extractable methylxanthines fractions of varying concentrations.

It is important to observe that supercritical CO₂ effectively remove this moisture during the extraction given sufficient time. For the flow rates, temperature and pressure conditions used in this experiment, analysis of maté tea at the end of the extraction showed only 3.6% of moisture was removed in the first 7 h and 94% of caffeine had already been extracted (Figure 4). Furthermore, when 99.4% of caffeine, 82.7% of theobromine, and 80.8% of theophylline are extracted, moisture content is reduced by only 10% of its original value. Peker et al. (1992) also showed that concentration histories at small times showed little differences between experiments performed with dry CO₂ and modified supercritical CO₂.

Another interesting observation is with respect to the solubility of methylxanthines in model binary dioxide-methylxanthine systems as compared to amount of methylxanthines extracted in carbon and carbon dioxide-maté tea systems at the same conditions (343.2 K and 25.5 MPa). The binary solubilities of 2047.6, 14.13, and 7.15 mg of caffeine, theophylline, and theobromine per kilogram of CO₂, respectively, are substantially higher than the amounts obtained during the extraction of maté tea (94.1, 0.13, and 4.44 mg of caffeine, theophylline, and theobromine per kilogram of CO₂, respectively) in the solubility-dependent region, as obtained using the linear part of the extraction curves. This could be attributed to component interactions and possible solvent effects in naturally occurring mixtures. This demonstrates the difficulty in using binary data to predict the extraction of these substances from natural and complex structures.

Finally, as suggested by one of the reviewers of this work, it is important not to ignore the role of moisture in substantially improving the efficiency of caffeine extraction and decreasing the extraction time. It is, however, equally important to recognize that soaking the ground maté leaves in water before the extraction would lead to the loss of caffeine, chlorophyll, and other water-soluble substances from the extracted product. Caffeine is not the product of interest but rather the decaffeinated product that is of interest as it is in the majority of cases, the quality of this decaffeinated product would be compromised if the operation is carried out with maté tea soaked in water.

CONCLUSIONS

Solubilities of caffeine in supercritical carbon dioxide are about 2 orders of magnitude higher than those of theobromine and theophylline.

After 7 h of extraction at 343.2 K and 25.5 MPa and a CO₂ flow rate of 0.9–1.2 g min⁻¹ 94, 68 and 57% of all extractable caffeine, theobromine and theophylline were successfully removed from maté tea.

Amounts of pure methylxanthines dissolved in supercritical CO₂ were found to be much higher than those obtained during the extraction of ground maté tea, in the solubility-dependent region, demonstrating the difficulty of using pure-component solubility data in predicting the extraction of these substances from natural products.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the White Martins Company for donating liquid CO₂.

LITERATURE CITED

- Alikaridis, F. Natural constituents of *Ilex* species. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *20*, 121–144.
- Baltassa, F.; Carbour, N.; Ferry, S. Étude du contenu purique de drogues a caféine: I.-Le Maté: *Ilex paraguayensis* Lamb (Investigation of caffeine drug content: I.-Le Maté: *Ilex paraguayensis* Lamb). *Plant. Méd. Phytothér.* **1984**, *18* (4), 195–203.
- Brunner, G. Mass transfer from solid material in gas extraction. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 887–891.
- Fillipi, R. P. CO₂ as a solvent: application to fats, oils and other materials. *Chem. Ind.* **1982**, *19*, 390–394.
- Hedrick, J. L.; Mulcahey, L. J.; Taylor, L. T. Fundamental Review: Supercritical Fluid Extraction. *Mikrochim. Acta* **1992**, *108*, 115–132.
- James, J. E. *Caffeine and health*; Academic Press Inc.: San Diego, CA, 1991; pp 24–32 and pp 63–85.
- Jimmy Yun, S. L.; Liang, K. K.; Gurdial, G. S.; Foster, N. R. Solubility of Cholesterol in Supercritical Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1991**, *30*, 2476–2482.
- Johannsen, M.; Brunner, G. Solubility of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.* **1994**, *95*, 215–226.
- Li, S.; Varadarajan, G. S.; Stanley, H. Solubilities of theobromine and caffeine in supercritical carbon dioxide: correlation with density-based models. *Fluid Phase Equilib.* **1991**, *68*, 263–280.
- Mazzafera, P.; Carvalho, A. A cafeina do café (Caffeine from Coffee). *Documentos IAC* **1991**, *25*, 1–22.
- Mazzafera, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1994**, *6*, 149–151.
- Mazzafera, P. Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chem.* **1997**, *60*, 67–71.
- Martin, A.; Paruta, A. N.; Adjei, A. Extended Hildebrand Solubility Approach: Methyxanthines in Mixed Solvents. *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70* (10), 1115–1120.
- McHugh, M. A.; Krukonis, V. J. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*; Butterworth Publishers: Boston, MA, 1994.
- Mohamed, R. S.; Neves, G. M.; Kieckbusch, T. G. Reduction in cholesterol and fractionation of butter oil using supercritical carbon dioxide with adsorption on alumina. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1998**, *33* (5), 245–254.
- Neves, G. M.; Mohamed, R. S.; Kieckbusch, T. G. Reduction of cholesterol level in dairy products using supercritical carbon dioxide. In *Proceedings of the International Conference on Solvent Extraction*; University of Melbourne: Melbourne, Australia, 1996; pp 999–1004.
- Peker, H.; Srinivasan, M. P.; Smith, J. M.; McCoy, B. J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. *AIChE J.* **1992**, *38*(5), 761–770.
- Saldaña, M. D. A.; Mazzafera, P.; Mohamed, R. S. Extraction of caffeine, trigonelline and chlorogenic acid from brazilian coffee beans with supercritical fluids. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Supercritical Fluids*; Sendai, Japan; Tohoku University Press: Sendai, Japan, 1997; pp 219–222.
- Saldaña, M. D. A. Extração de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico de café com CO₂ supercrítico (Extraction of caffeine, trigonelline and chlorogenic acid from coffee beans using supercritical CO₂). M.Sc. thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, 1997.
- Suzuki, T.; Waller, G. In *Modern methods of plant analysis: Analysis of Non Alcoholic Beverages*; Linskens, H. F., Jackson, J. F., Eds.; Springer-Verlag: Heidelberg, 1988; pp 184–220.
- Stahl, E.; Schilz, W. Mikroanalytische untersuchungen zur löslichkeit in uberkritischem kohlendioxid (Microanalytic analyses of the solubility in supercritical carbon dioxide). *Talanta* **1979**, *26*, 675–679.
- Tormen, M. J. Economia ervateira Brasileira (The Brazilian Economy of Herbs). In *Erva Mate*; Universidade Rio Grande de Sul: Porto Alegre, Brazil, 1995; pp 27–40.

Received for review December 21, 1998. Revised manuscript received June 21, 1999. Accepted June 21, 1999. The authors express their appreciation for the financial support received from the Brazilian research funding agencies FAPESP and CNPq.

JF981369Z

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE