



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## **EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE *LYCOPODIUM CLAVATUM* L.**

**GRACIANE FABIOLA DA SILVA**

ENGENHEIRA QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre  
Janeiro, 2014**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## **EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE *LYCOPODIUM CLAVATUM* L.**

**GRACIANE FABIOLA DA SILVA**

ENGENHEIRA QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. RUBEM MÁRIO FUGUEIRÓ VARGAS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

*Trabalho vinculado ao projeto obtenção de metabólitos secundários de pteridófitas nativas do sul do Brasil usando extração supercrítica e avaliação de suas atividades biológicas.*

**Porto Alegre  
Janeiro, 2014**



## EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE LYCOPODIUM CLAVATUM L.

**CANDIDATA: GRACIANE FABIELA DA SILVA**

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

*Rubem Mário F. Vargas*

**DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRO VARGAS - ORIENTADOR**

*Eduardo Cassel*

**DR. EDUARDO CASSEL - CO-ORIENTADOR**

### BANCA EXAMINADORA

*Miriam Anders Apel*

**DRA. MIRIAM ANDERS APEL - DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO DE MATÉRIA PRIMA - UFRGS**

*Marcus Seferin*

**DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS**

*“O pessimista se queixa do vento,  
o otimista espera que ele mude  
e o realista ajusta as velas.”*

*(William George Ward)*

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Elci e Enadir, e à minha irmã, Aline.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Rubem Vargas e Eduardo Cassel, meus orientadores, agradeço todo o incentivo, apoio e confiança que me deram desde o primeiro momento em que manifestei interesse de ingressar no mestrado. Agradeço todo o aprendizado técnico-científico que me proporcionaram, bem como a paciência despendida e a motivação e tranquilidade transmitidas.

À minha família agradeço o apoio incondicional, sem o incentivo e ajuda dados durante toda minha trajetória não chegaria até aqui.

A todos do LOPE meu muito obrigado! O coleguismo, apoio, brincadeiras e amizade foram essenciais para a realização do trabalho. Agradeço a oportunidade de ter feito parte do LOPE e parabênizo os professores Eduardo Cassel e Rubem Vargas pela forma como conduzem o laboratório, tornando-o um ambiente onde predomina o espírito de cooperação, onde todos têm oportunidades e são valorizados. Agradeço em especial à colaboração, disposição e solicitude de Aline Lucas, Vanessa Xavier, Rafael Nolibos, Rodrigo Scopel, Alexandre Timm, Paulo Gandolfi e José Garcez.

Aos professores da Faculdade de Biociências da PUCRS Claudio Mondin e Nelsa Cardoso por toda a atenção e ajuda na identificação e obtenção da planta.

Aos meus colegas e amigos da UFRGS, aos técnicos do DQI, em especial, Jorge Brasil, Marina Laranjo e Graziela Martins. Minha gratidão também à amiga parceira de muitos cafés e partidas de tênis, Jaqueline Vargas.

Aos professores e aos colegas do PGETEMA. Especialmente à colega e amiga Raiane Gonçalves, importante parceira desde a graduação, compartilhando dúvidas e certezas, momentos de descontração e me escutando sempre que precisava.

A todos meus amigos pela compreensão.

A todos que de alguma maneira contribuíram com meu aprendizado e com a realização desse trabalho.

À HP pela bolsa concedida. A presente dissertação foi alcançada em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>6</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
3.1. Pteridófitas.....	21
3.1.1. <i>Lycopodium clavatum</i> L. ....	22
3.2. Metabólitos secundários .....	23
3.2.1. Alcalóides.....	24
3.3. Extração com fluido supercrítico.....	25
3.3.1. O processo.....	28
3.4. Modelagem matemática da extração .....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. Matéria-prima.....	33
4.2. Extração por Soxhlet.....	34
4.3. Extração supercrítica .....	35
4.4. Planejamento de experimentos.....	38
4.4.1. Metodologia de superfície de resposta – Box-Behnken .....	38
4.5. Análise da lycopodina por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM).....	41
4.5.1. Preparação da amostra.....	42
4.5.2. Análise por CG-EM .....	42

<b>4.6. Modelagem matemática da transferência de massa na extração supercrítica</b> .....	<b>43</b>
4.6.1. Modelo 1 .....	43
4.6.2. Modelo 2 .....	44
4.6.3. Modelo 3 .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1. Testes preliminares</b> .....	<b>49</b>
5.1.1. Análise por CG-EM .....	49
5.1.2. Pressão do fluido supercrítico .....	50
<b>5.2. Planejamento de experimentos</b> .....	<b>52</b>
<b>5.3. Extração na condição ótima</b> .....	<b>58</b>
<b>5.4. Modelagem da transferência de massa</b> .....	<b>60</b>
5.4.1. Curva de extração segundo o modelo 1 .....	62
5.4.2. Curva de extração usando o modelo 2 .....	62
5.4.3. Curva de extração usando o modelo 3 .....	63
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>67</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
<b>ANEXO A: CROMATOGRAMAS</b> .....	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Santos, 2003).....	24
Figura 3.3. Diagrama de fases de uma substância pura. (Adaptado de Taylor, 1996).	26
Figura 3.4. Diagrama da densidade do CO <sub>2</sub> (kg.m <sup>-3</sup> ) em função da pressão e temperatura (Mukhonopadhyay, 2000). .....	29
Figura 4.1. <i>Lycopodium clavatum</i> L. em beira de trilha do CPCN Pró-Mata. ....	33
Figura 4.2. Extração em aparelho de Soxhlet. ....	34
Figura 4.3. Unidade piloto de extração supercrítica – LOPE.....	35
Figura 4.4. Fluxograma do processo de extração supercrítica: C1 – condensador; P1 – bomba de alta pressão; W1 – pré-aquecedor; B1 – vaso de extração; B2 – vaso de separação; VC1 – válvula de expansão micrométrica; TC – controlador de temperatura, V1 a V6 – válvulas.....	36
Figura 4.5. Estrutura molecular da licopodina em função do pH (ChemAxon, 2013).	37
Figura 5.1. Cromatograma do extrato obtido por Soxhlet com etanol. ....	50
Figura 5.2. Cromatograma do extrato obtido com CO <sub>2</sub> a 90 bar. ....	51
Figura 5.3. Cromatograma do extrato obtido com CO <sub>2</sub> a 120 bar. ....	51
Figura 5.4. Cromatograma do extrato obtido com CO <sub>2</sub> a 200 bar. ....	51
Figura 5.5. Cromatograma do extrato obtido com CO <sub>2</sub> a 300 bar. ....	52
Figura 5.6. Superfície de resposta para o teor de licopodina no extrato final como função de duas variáveis independentes: a) pressão e temperatura do CO <sub>2</sub> ; b) tempo de imersão na solução de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e pressão do CO <sub>2</sub> ; c) tempo de imersão na solução de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e temperatura do CO <sub>2</sub> . ....	57
Figura 5.7. Curvas de nível da superfície de resposta. ....	57
Figura 5.8. Cromatograma do extrato obtido sem pré-tratamento, com CO <sub>2</sub> a 300 bar e 40°C (condição ótima).....	59
Figura 5.9. Curva de rendimento da extração supercrítica.....	60

Figura 5.10. Curva de rendimento da extração – modelo de Crank.....	62
Figura 5.11. Curva de rendimento da extração – modelo de Sovová.....	63
Figura 5.12. Curva de rendimento da extração – modelo de Reverchon. ....	64
Figura A.1. Cromatograma do extrato LC 1.....	77
Figura A.2. Cromatograma do extrato LC 2.....	77
Figura A.3. Cromatograma do extrato LC 3.....	78
Figura A.4. Cromatograma do extrato LC 4.....	78
Figura A.5. Cromatograma do extrato LC 5.....	78
Figura A.6. Cromatograma do extrato LC 6.....	79
Figura A.7. Cromatograma do extrato LC 7.....	79
Figura A.8. Cromatograma do extrato LC 8.....	79
Figura A.9. Cromatograma do extrato LC 9.....	80
Figura A.10. Cromatograma do extrato LC 10.....	80
Figura A.11. Cromatograma do extrato LC 11.....	80
Figura A.12. Cromatograma do extrato LC 12.....	81
Figura A.13. Cromatograma do extrato LC 13.....	81
Figura A.14. Cromatograma do extrato LC 14.....	81
Figura A.15. Cromatograma do extrato LC 15.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Planejamento Box-Behnken - fatores e níveis codificados.....	40
Tabela 4.2. Planejamento Box-Behnken – valores dos fatores e níveis (ordem randomizada). .....	41
Tabela 5.1. Rendimento total e teor de licopodina no extrato final.....	53
Tabela 5.2. Análise de variância para o teor de licopodina. ....	54
Tabela 5.3. Coeficientes de regressão de superfície de resposta para o teor de licopodina (para variáveis não codificadas).....	55
Tabela 5.4. Parâmetros de entrada para resolução das equações da modelagem da extração.....	61

## LISTA DE SÍMBOLOS

$a_0$	Área superficial	$m^{-1}$
$A_p$	Área total das partículas	$m^2$
$C$	Tempo de imersão da planta na solução de carbonato de sódio	h
$C$	Concentração de soluto na fase sólida	$kg.m^{-3}$
$c$	Concentração de extrato na fase fluida	$kg.m^{-3}$
$C_0$	Número de replicatas dos experimentos no ponto central	
$C_s$	Concentração de soluto na fluido adjacente à partícula	$kg.m^{-3}$
$C_\infty$	Concentração de soluto na fase fluida	$kg.m^{-3}$
$D$	Coeficiente de difusão	$m^2.s^{-1}$
$D$	Diâmetro do extrator	m
$D_i$	Coeficiente de difusão interna	$m^2.s^{-1}$
$\bar{D}_p$	Diâmetro médio das partículas	m
$e$	Massa de extrato relativa a N	
$h$	Altura do leito	m
$h$	Coordenada axial	m
$J$	Taxa de transferência de massa	$kg.s^{-1}.m^{-3}$
$K$	Massa de soluto inacessível contido no interior das partículas sólidas	kg
$K$	Coeficiente de equilíbrio	$m^3.kg^{-1}$
$k$	Número de variáveis	
$k_c$	Coeficiente convectivo de transferência de massa	$s^{-1}$
$k_f$	Coeficiente de transferência de massa da fase fluida	$m.s^{-1}$
$k_s$	Coeficiente de transferência de massa da fase sólida	$m.s^{-1}$
$k_{TM}$	Coeficiente interno de transferência de massa	$m.s^{-1}$
$L$	Parâmetro do modelo de Crank	
$l$	Semi-espessura da folha	m
$l$	Dimensão característica	m
$M_t$	Massa acumulada	g
$M_\infty$	Massa extraída em um tempo infinito	g
$N$	Massa da fase sólida isenta de soluto	kg
$N$	Número de total de experimentos do planejamento	

O	Massa inicial de soluto na fase sólida	kg
P	Massa de soluto de fácil acesso	kg
P	Pressão	bar
p	Nível descritivo p-valor	
P <sub>c</sub>	Pressão crítica	bar
Q	Vazão de solvente	g.s <sup>-1</sup>
q	Quantidade específica de solvente	
q	Concentração de extrato na fase sólida	kg.kg <sup>-1</sup>
q <sub>m</sub>	Quantidade específica de solvente no início da extração do interior das partículas	
q <sub>n</sub>	Quantidade específica de solvente ao final da extração de soluto de fácil acesso	
q <sub>0</sub>	Concentração inicial de extrato na fase sólida	kg.kg <sup>-1</sup>
q*	Concentração na interface sólido-fluido	kg.kg <sup>-1</sup>
ḡ	Taxa de massa de solvente em relação a N	s <sup>-1</sup>
T	Temperatura	°C
T <sub>c</sub>	Temperatura crítica	°C
t	Tempo de extração	s
t <sub>i</sub>	Tempo de difusão interna	s
u	Velocidade superficial do solvente	m.s <sup>-1</sup>
V	Volume do extrator	m <sup>3</sup>
x	Fração de soluto na fase sólida (base livre de soluto)	
x <sub>0</sub>	Concentração inicial de soluto livre na fase sólida (fração mássica)	
x <sub>k</sub>	Concentração inicial de extrato no interior das partículas sólidas (fração mássica)	
x <sub>p</sub>	Concentração de soluto facilmente acessível (fração mássica)	
y	Fração de soluto na fase fluida (base livre de soluto)	
y <sub>r</sub>	Solubilidade do extrato no solvente	
W	Parâmetro do modelo de Sovová para o período de extração lenta	
Z	Parâmetro do modelo de Sovová para o período de extração rápida	
z <sub>w</sub>	Coordenada de contorno entre a extração rápida e lenta	
α	Nível de significância	
β <sub>n</sub>	Parâmetro do modelo de Crank	

$\varepsilon$	Porosidade do leito	
$\rho$	Densidade do solvente	$\text{kg.m}^{-3}$
$\rho_s$	Densidade da fase s3lida	$\text{kg.m}^{-3}$

## RESUMO

SILVA, Graciane Fabiela da. **Extração supercrítica de *Lycopodium clavatum* L.** Porto Alegre. 2014. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Plantas do gênero *Lycopodium* contêm metabólitos secundários que as tornam uma potencial fonte de compostos farmacologicamente ativos. O extrato da espécie *Lycopodium clavatum* L. apresenta atividade anticolinesterásica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e antifúngica. A extração com fluido supercrítico, frente a técnicas tradicionais de extração, apresenta diversas vantagens quando aplicada a diferentes espécies vegetais. Assim, o presente estudo teve por objetivo a aplicação do processo com CO<sub>2</sub> supercrítico para a extração de metabólitos da *Lycopodium clavatum* L. Foram avaliadas, através de um planejamento fatorial incompleto com três fatores e três níveis (Box-Behnken) e da metodologia de superfície de resposta, as influências da pressão e temperatura do fluido supercrítico e do tempo de pré-tratamento (imersão da planta em solução básica) no teor do alcalóide licopodina no extrato. O extrato era purificado pelo processo ácido-base de Stas-Otto e então analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo o teor de licopodina definido pela normalização das áreas dos picos do cromatograma. A pressão foi avaliada entre 200 e 300 bar, a temperatura entre 40 a 60°C e o tempo de imersão foi de zero a duas horas. Apenas pressão e temperatura foram estatisticamente significativas, sendo então parâmetros ideais para a extração: 300 bar, 40°C, sem a imersão da planta na solução alcalina. Nessas condições, obteve-se um teor de 20,29% de licopodina no extrato final e foi levantada a curva de rendimento da extração em função tempo. A curva foi modelada matematicamente, com bom ajuste, pelos modelos de Crank (1975), Sovová (1994) e Reverchon (1996). Assim, foram estimados parâmetros relacionados à transferência de massa, importantes para simulação e *scale-up* do processo, tais como o coeficiente de difusão e coeficientes de transferência de massa. Nesse estudo, a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico mostrou-se tecnicamente viável para a obtenção de licopodina, sendo mais seletiva em relação ao processo de extração com etanol.

Palavras-chave: extração supercrítica, *Lycopodium clavatum* L., planejamento fatorial, Box-Behnken *design*, modelagem da transferência de massa.

## ABSTRACT

SILVA, Graciane Fabiela da. ***Lycopodium clavatum* L. supercritical extraction.** Porto Alegre. 2014. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The *Lycopodium* genus plants contain secondary metabolites that make them a potential source of pharmacologically active compounds. The extract of the specie *Lycopodium clavatum* L. presents anticholinesterase, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral and antifungal activities. The supercritical fluid extraction has several advantages compared to traditional extraction techniques. Therefore, this study aimed metabolites *Lycopodium clavatum* L. extraction thru supercritical CO<sub>2</sub> process. The supercritical fluid pressure and temperature as well the pretreatment time (soaking the plant in basic solution) influences in lycopodine alkaloid content in the extract were evaluated by an incomplete factorial design with three factors and three levels (Box-Behnken) and response surface methodology. The extract was subjected to Stas-Otto acid-base process and then analyzed by mass spectrometry coupled gas chromatography. The content of lycopodine was defined by normalizing peak areas of the chromatogram. The pressure was evaluated between 200 and 300 bar, the temperature between 40 to 60°C and the immersion time was zero to two hours. Only pressure and temperature were statistically significant, for this reason they are ideal parameters for extraction: 300 bar, 40°C, without immersion of the plant in the alkaline solution. Under these conditions we obtained a content of 20.19% of lycopodine the final extract was raised and the yield curve as a function of extraction time. This curve was modeled mathematically, with good fit, for models of Crank (1975), Sovová (1994) and Reverchon (1996). Thus parameters related the mass transfer were estimated, such as diffusion coefficient and mass transfer coefficient, which are important for scale-up and process simulation. In this study, the extraction with supercritical CO<sub>2</sub> was found to be technically feasible to obtain lycopodine, since it is more selective and with higher yields compared to the ethanol extraction case.

Keywords: supercritical extraction, *Lycopodium clavatum* L., factorial design, Box-Behnken design, mass transfer modeling.

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade do estudo de compostos naturais e métodos para sua obtenção é crescente desde as últimas décadas devido à ampliação do interesse farmacêutico por moléculas bioativas de plantas e popularização de medicamentos fitoterápicos (Diniz et al., 2007).

A crescente atenção despendida pelos países industrializados por plantas medicinais ocorre devido a razões como a falta de descobertas de novas moléculas farmacologicamente ativas e com possível uso terapêutico, por meio de processos tradicionais de sínteses químicas; também devido aos efeitos colaterais de alguns fármacos sintéticos e ao novo perfil dos consumidores, os quais desde a década de 1980 preferem produtos naturais frente aos sintéticos em todos os segmentos de mercado. Nesse contexto, há um incentivo positivo para o crescimento da indústria de produtos naturais, especialmente farmacêutica, de alimentos, aromatizantes e perfumaria (Sharapin, 2008; Mukhopadhyay, 2000).

Os primeiros medicamentos usados pelo ser humano foram à base de plantas. Ainda hoje, elas são uma fonte de grande importância para a descoberta de novos fármacos candidatos ao tratamento de uma variedade de doenças que ameaçam a saúde humana (Orhan et al., 2006).

Entre as plantas com potencial ainda a ser explorado estão as pteridófitas. Conforme estudos etnobotânicos, cerca de 200 espécies são utilizadas por comunidades do Equador, Peru, Bolívia e Chile como antídoto para picada de serpentes, para o tratamento de distúrbios do sistema respiratório e do sistema nervoso, como anti-inflamatório, cicatrizante, anti-helmíntico e para o alívio de febres e dores musculares (Looser & Rodríguez, 2004; Macia, 2004; Navarrete et al., 2006). Essas ações farmacológicas normalmente são decorrentes dos metabólitos

secundários, os quais são sintetizados em grande variedade pelas células das plantas para desempenharem importantes papéis na proteção delas (Seabra et al, 2012). Alguns desses compostos podem matar insetos ou mesmo vertebrados de grande porte, porém, se utilizados em doses adequadas, atuam como medicamentos. Assim, produtos secundários envolvidos na defesa contra patógenos através de atividade citotóxica, por exemplo, podem ser úteis como agentes antimicrobianos na medicina. Além disso, aqueles envolvidos na defesa contra herbivoria, através de atividade neurotóxica, podem ter efeitos benéficos no homem atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Briskin, 2000).

O extrato de *Lycopodium clavatum* L., uma pteridófito da família Lycopodiaceae, tem atividade anticolinesterásica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e antifúngica já comprovadas (Orhan et al., 2006; Orhan et al., 2007; Konrath et al., 2012).

Sendo assim, o foco deste trabalho foi o estudo da extração de *Lycopodium clavatum* L. com dióxido de carbono supercrítico, ainda sem relatos na literatura. Foram investigadas as condições do processo supercrítico mais favoráveis para obtenção de licopodina no extrato e modelada matematicamente a curva de rendimento.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo o estudo do processo de extração com dióxido de carbono supercrítico de *Lycopodium clavatum* L. O estudo compreende uma análise multivariada de temperatura e pressão do fluido supercrítico e tempo de contato da planta com uma solução básica em um tratamento pré-extração a fim de otimizar o rendimento do extrato em termos de alcalóides de interesse farmacológico. Além disso, o trabalho visa à determinação de parâmetros relacionados à transferência de massa associados à descrição do processo extrativo.

### 2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- Estudo das variáveis temperatura, pressão e tempo de pré-tratamento, por meio de análise multivariada utilizando planejamento fatorial Box-Behnken.
- Análise dos extratos por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).
- Identificação da melhor condição para o processo de extração supercrítica (otimização) visando à obtenção do alcalóide licopodina.
- Avaliação de modelos de transferência de massa para a descrição da curva de rendimento da extração obtida na condição “ótima”, determinando, assim, parâmetros importantes para o *scale-up* do processo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Pteridófitas

As pteridófitas constituem um grupo de plantas vasculares sem sementes com cerca de 9.000 a 12.000 espécies vivas distribuídas em todo o mundo, existindo estimativas de que o total pode ser de até 15.000 espécies. Nas Américas, ocorrem cerca de 3.250 espécies, das quais aproximadamente 30% são encontradas no Brasil (Tryon & Tryon, 1982; Windisch, 1992). Para o Estado do Rio Grande do Sul, são conhecidas 322 espécies (Falavigna, 2002).

As pteridófitas são divididas em dois grupos distintos: Lycopodiophyta (ou Lycophyta), plantas que apresentam folhas micrófilas, e Monilophyta, formado por plantas com folhas megáfilas (filicíneas).

A divisão Lycophyta compreende as famílias Lycopodiaceae, Selaginellaceae e Isoetaceae. Entre essas, as plantas mais familiares atuais são os licopódios, pertencentes à família Lycopodiaceae (Raven et al., 1996).

Segundo Judd e colaboradores (2002), as Lycopodiaceae ocorrem principalmente em regiões tropicais e são cosmopolitas, com exceção do gênero monotípico *Phylloglossum* (*P. drummondii* Kunze), encontrado na Austrália, Tasmânia e Nova Zelândia. Além desse, mais três gêneros constituem a família Lycopodiaceae: *Huperzia* Bernh., *Lycopodiella* Holub e *Lycopodium* L., totalizando cerca de 500 espécies (Øllgaard, 1987).

No Brasil, ocorrem 54 espécies e cinco variedades de Lycopodiaceae: *Huperzia* com 38 espécies, *Lycopodiella* com 11 espécies e cinco variedades e

*Lycopodium* com cinco espécies, sendo que cerca de 85% das espécies de Lycopodiaceae ocorrentes no Brasil concentram-se nas regiões Sul e Sudeste. (Øllgaard & Windisch 1987; Øllgaard 1992; 1993; 1995; 1996).

Plantas do gênero *Huperzia* vêm sendo empregadas durante séculos na medicina tradicional chinesa para o tratamento de contusões, condições de estresse e de esgotamento mental, inflamações, esquizofrenia, miastenia grave e de envenenamento por organofosforados (Ma et al., 2006). Além disso, dois alcalóides encontrados em espécies desse gênero, huperzina A e B, demonstraram ser potentes inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase (Liu et al, 1986; Ayer, 1991). Esse fato desencadeou o interesse por um grupo de metabólitos que ocorrem na família Lycopodiaceae: os alcalóides de *Lycopodium*, os quais se tornaram uma potencial nova fonte de produtos naturais de interesse farmacológico (Ma & Gang, 2004).

### **3.1.1. *Lycopodium clavatum* L.**

A *Lycopodium clavatum* L. é uma planta de ampla distribuição pelo mundo. A espécie ocorre em locais entre 600 e 2500 metros de altitude. É encontrada em barrancos de solo pobre e desnudo juntamente com samambaias e poáceas, cresce inclusive em barrancos verticais, formando grandes aglomerados de indivíduos.

A planta é popularmente conhecida como licopódio, pinheirinho, chifre de veado, pé de lobo e, em inglês, como *clubmoss*; trata-se de um esporófito terrestre, perene com ramos eretos, bifurcados e para cima, folhas lanceoladas e afiladas. No verão aparecem esporos bifurcados amarelos dos ramos verticais. Apresenta caule primário longo-reptante com 3 a 12 mm de diâmetro, verde-oliva a pardacento; microfilos ascendentes, alterno-verticilados, lineares a aciculares, ápice membranáceo ou filiforme, margem inteira, papiráceos, quatro a sete microfilos por verticilo, 6-8 x 0,4-0,5 mm (Ramos & Silvestre, 2010).

O extrato etanólico bruto de *Lycopodium clavatum* tem sido muito utilizado na medicina complementar e é investigado como alternativa para o tratamento de várias doenças do fígado e doença de Alzheimer. Além disso, é usado como homeopático

e suas diluições apresentaram efeitos hepato-protetores e anti-cancerígenos para câncer de fígado em ratos (Mandal et al., 2010; Samadder et al., 2013).

O extrato da planta, em relação a sua composição de alcalóides, apresenta a licopodina como substância majoritária (84.5% segundo Orhan et al., 2006; 60% segundo Mandal et al., 2010) seguida de diidrolipopodina e licodina. O extrato bruto possui relatada atividade anticolinesterásica, efeito este atribuído aos alcalóides extraídos de *Lycopodium clavatum* L., aos quais também foram atribuídas atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e antifúngica (Orhan et al., 2006; Orhan et al., 2007; Konrath et al., 2012).

### **3.2. Metabólitos secundários**

Os metabólitos secundários são formados a partir da glicose via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, dos quais derivam então os metabólitos secundários aromáticos como, por exemplo, taninos hidrolisáveis, fenilpropanóides e alcalóides (derivados do triptofano e tirosina/fenilalanina). A combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados resultam os metabólitos antraquinonas, flavonóides e taninos condensados. Já os acetatos podem dar origem aos alcalóides (derivados dos aminoácidos alifáticos ornitina e lisina) através da via do ácido cítrico; podem produzir derivados do isopreno pela via do mevalonato e os ácidos graxos e acetogeninas pela condensação da acetil CoA (Santos, 2003). O ciclo biossintético dos metabólitos secundários é apresentado na Figura 3.1.



Figura 3.1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Santos, 2003).

### 3.2.1. Alcalóides

Os alcalóides são produtos derivados dos metabólitos primários, são bases nitrogenadas orgânicas, geralmente com um anel heterocíclico. Na sua grande maioria, os alcalóides possuem caráter alcalino, já que a presença do átomo de nitrogênio representa um par de elétrons não compartilhados (De Luca & St Pierre, 2000).

Aproximadamente 20% das plantas acumulam alcalóides, sendo descritos mais de 12.000 alcalóides, o que sugere maior diversidade estrutural e biossintética comparado a outros metabólitos secundários (Croteau et al., 2000; De Luca & St Pierre, 2000).

Essa classe de compostos do metabolismo secundário é famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos, além de terem conhecidos efeitos farmacológicos em seres humanos e animais. Dentre eles destacam-se a morfina (hipnoanalésico), usada em pacientes com câncer em fase

terminal; a colchicina, utilizada no tratamento da gota; a quinina, como antimalárico; a teobromina e teofilina como diuréticos (Henriques et al., 2003).

As primeiras investigações sobre alcalóides de *Lycopodium* foram em 1881, quando Böodeker separou a lycopodina da planta *Lycopodium complanatum*. Em 1938, Achmatowicz e Uzieblo isolaram a lycopodina, e elucidaram sua fórmula molecular. Durante o início da década de 1980, pesquisadores chineses selecionaram espécies de *Lycopodium* para novas drogas a serem usadas no tratamento da miastenia grave. Já no período de 1986 a 1990, houve o maior destaque da pesquisa desses alcalóides, pois foi descoberta sua atividade para inibição da acetilcolinesterase (Ma & Gang, 2004).

Até 2004, 201 alcalóides de *Lycopodium* foram identificados, oriundos de 54 espécies de *Lycopodium*. Estes alcalóides geralmente contêm um esqueleto composto de 16 carbonos, embora possam apresentar até 32 carbonos (dímeros aparentes), ou menos do que 16 átomos de carbono (provavelmente resultante de clivagem) (Ma & Gang, 2004).

A lycopodina possui fórmula  $C_{16}H_{25}NO$  e peso molecular de  $247 \text{ g.gmol}^{-1}$ . Extraída de *Lycopodium clavatum* L., é citada na literatura como uma opção para tratamento do mal de Alzheimer devido aos efeitos antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase (Konrath et al., 2012). Além disso, Mandal et al. (2010) relataram considerável inibição do crescimento de células Hela (linhagem de células epiteliais de carcinoma de colo de útero humano) e, devido a esse resultado, indicaram sua utilização para quimioterapia. Bishayee et al. (2013) também constataram inibição de proliferação e indução à apoptose em células humanas de câncer de próstata.

### 3.3. Extração com fluido supercrítico

A extração supercrítica é definida como a utilização de fluido supercrítico para remover seletivamente analitos a partir de matrizes sólidas, semi-sólidas e líquidas. As principais propriedades dos fluidos supercríticos relacionadas aos processos de extração são oriundas da combinação de propriedades semelhantes aos líquidos e outras semelhantes aos gases. Entre elas destacam-se o poder de solvatação, a

difusividade relativamente alta, a baixa viscosidade, além de tensão superficial mínima. Em comparação com a extração líquida, a extração supercrítica apresenta as vantagens de ser, geralmente, mais rápida; o solvente é mais fácil de ser removido; a pressão, bem como a temperatura e a natureza do solvente, podem ser utilizadas para selecionar, até certo ponto, os compostos a serem extraídos, tornando-a mais seletiva. Com isso, a extração com fluido supercrítico é uma alternativa para reduzir o tempo de trabalho e o uso de produtos nocivos envolvidos na extração, como, por exemplo, metanol, diclorometano, hexano, entre outros (Castro, 2004; Taylor, 1996).

Os fluidos supercríticos foram observados pela primeira vez em 1822, quando Baron Cagniard de La Tour descobriu o chamado ponto crítico. Em seus experimentos, ele verificou que para cada substância existe uma temperatura abaixo da qual a condensação para líquido (ou evaporação até um gás) é possível através de uma variação de pressão. Porém, acima dela estes processos não ocorrem; essa é a temperatura crítica. Já a pressão crítica é a pressão mais elevada na qual um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido ou um gás transformado em líquido através de diminuição da temperatura. Uma substância acima da temperatura crítica ( $T_c$ ) e da pressão crítica ( $P_c$ ), ou seja, que ultrapassa o ponto crítico, só pode existir na forma de fluido, não sendo possível diferenciar as fases líquido e gás, conforme está representado no diagrama de fases da Figura 3.3. (Clifford, 1999; Taylor, 1996).

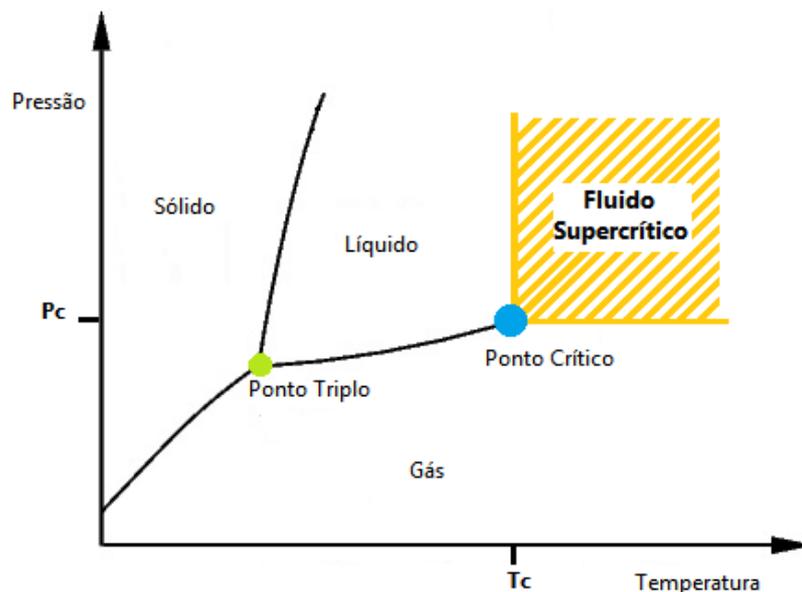


Figura 3.3. Diagrama de fases de uma substância pura. (Adaptado de Taylor, 1996).

A possibilidade do uso dos fluidos supercríticos para extrações é justificada pelo seu grande poder de solvatação, o que foi demonstrado primeiramente por Hannay e Hogarth em 1879, porém foi pouco explorado na primeira metade do século XX. Em 1936, Wilson, Keith e Haylett conceberam um processo de desasfaltação para refinamento de óleos lubrificantes. Em 1970, ocorreu um significativo desenvolvimento na extração com fluido supercrítico: Zosel reportou a descafeinização do café com CO<sub>2</sub>, sua patente foi um importante incentivo para os trabalhos futuros. A partir de 1980, houve um rápido desenvolvimento do processo com fluido supercrítico para extração de lúpulo, colesterol da manteiga, perfumes e aromatizantes a partir de produtos naturais; solventes e monômeros residuais de polímeros e ácidos graxos insaturados de óleos de peixe (Taylor, 1996).

Atualmente, os fluidos supercríticos são investigados para diversas aplicações como remediação de solos, reação química e síntese de polímeros e compostos orgânicos, impregnação e deposição *in situ* de produtos químicos, remoção de nicotina do tabaco, nucleação e controle do tamanho de partícula, limpeza de peças eletrônicas, entre outros (Taylor, 1996).

Em função da preocupação existente com a toxicidade do meio de extração, com o solvente residual e com a estabilidade térmica de materiais, o CO<sub>2</sub> supercrítico destaca-se como uma importante ferramenta na indústria de alimentos e farmacêutica. Nas extrações supercríticas o solvente mais utilizado, em geral, é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o qual apresenta baixos valores de temperatura crítica (31,1°C) e pressão crítica (73,8 bar). Também apresenta as vantagens de não ser tóxico e ser mais seguro do que solventes comuns utilizados em procedimentos de extração clássicos; não é inflamável, é menos dispendioso do que os solventes líquidos, é encontrado disponível em estado de elevada pureza e pode ser reciclado. Além disso, embora o CO<sub>2</sub> seja apolar, quando utilizado em extração supercrítica sua polaridade pode ser manipulada pela adição de pequenas quantidades de um co-solvente, tal como o metanol (Castro, 2004; Taylor, 1996).

Segundo Castro (2004), drogas relevantes foram isoladas utilizando a extração supercrítica, por exemplo, os princípios ativos de plantas medicinais tais como ácido artemisinina e artemisinínico utilizados na tratamento da malária;

michellamine A e B, alcalóides promissores para inibição do vírus HIV; e efedrina, a qual foi extraída seletivamente a partir de *Ephedra sinica* utilizando dietilamina e metanol como modificadores. Ainda segundo Castro (2004), dentre a vasta gama de compostos de diferentes naturezas isolados a partir de matrizes vegetais, os alcalóides são os compostos mais explorados pelo processo supercrítico.

### 3.3.1. O processo

O processo de extração supercrítica tem como equipamentos básicos um compressor ou bomba de alta pressão, dois trocadores de calor, vaso de extração, válvula de expansão e vaso separador. Para a extração, o solvente pode estar inicialmente no estado gasoso ou líquido, sendo pressurizado por compressor ou bomba de alta pressão, respectivamente. Em seguida, sua temperatura é aumentada através de um pré-aquecedor e, assim, o fluido atinge o estado supercrítico e é alimentado no vaso extrator. Quando se soma ao processo o uso de co-solvente, ele é bombeado de um reservatório para um vaso de mistura localizado antes do pré-aquecedor. Nesse vaso ocorre a homogeneização com o solvente. Após a extração, a mistura solvente (e co-solvente) e extrato passam pela válvula de expansão; a pressão é reduzida bruscamente e o solvente passa para o estado gasoso, separando-se do extrato, que precipita no vaso separador (Cassel et al., 2008).

A seletividade e o rendimento da extração dependem do ajuste adequado de parâmetros do processo, entre os quais se destacam pressão, temperatura, co-solvente, e, o de maior efeito, a vazão de solvente. O aumento da capacidade de extração por incremento da vazão é maior do que o incremento obtido pela variação dos demais parâmetros do processo. O poder de solvência do fluido supercrítico está diretamente relacionado à densidade, a qual varia em função da pressão e da temperatura, cuja relação pode ser visualizada na Figura 3.4.

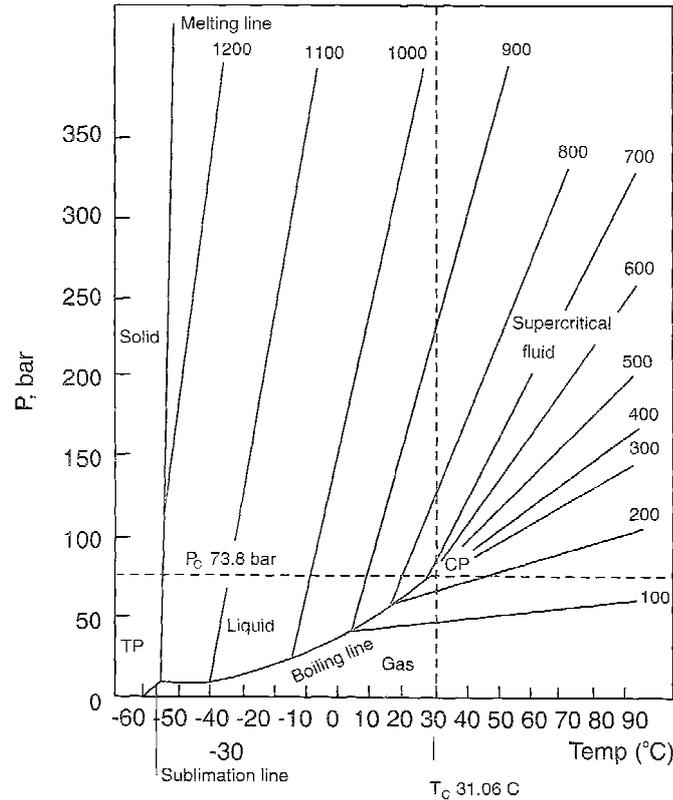


Figura 3.4. Diagrama da densidade do CO<sub>2</sub> (kg.m<sup>-3</sup>) em função da pressão e temperatura (Mukhonopadhyay, 2000).

À temperatura constante, a taxa de extração aumenta com o aumento da densidade. Maiores temperaturas também promovem maiores taxas de extração, exceto se a pressão estiver próxima do ponto crítico, caso em que ocorre um comportamento retrógrado da solubilidade. De uma forma geral, o aumento da pressão (à temperatura constante) aumenta a capacidade de solubilização do fluido supercrítico (Cassel et al., 2008; Mukhonopadhyay, 2000).

A adição de co-solvente está relacionada à ideia da interação com um ou mais componentes resultando maior solubilidade de determinado composto no fluido supercrítico, ou seja, contribuindo para uma melhor seletividade. Geralmente o co-solvente aumenta a polaridade e poder de solubilização do solvente em determinada condição de temperatura e pressão. Além do efeito no poder de solvatação, os co-solventes também tem importante ação nas matrizes, em que o analito se liga fortemente através de quimissorção e fisissorção. No caso de utilização de um modificador polar, uma vantagem é o inchaço da matriz, pois assim há aumento do

volume interno, o que, por sua vez, aumenta a área de superfície acessível aos solventes supercríticos (Mukhonopadhyay, 2000).

### 3.4. Modelagem matemática da extração

A modelagem matemática das curvas de extração é uma ferramenta que permite determinar parâmetros do processo, sendo importante na predição, otimização e *scale-up* da extração. Em função disso, muitos modelos são propostos na literatura. De um modo geral, há modelos empíricos, modelos baseados na transferência de massa em uma única fase do processo (fase fluida ou partícula sólida), modelos que consideram a transferência em ambas as fases, modelos estabelecidos por analogia ao transporte de calor e combinações entre eles. Entretanto, como a curva de extração pode variar conforme as condições de extração, tipo de produto obtido, tipo de matéria-prima, solvente utilizado, forma geométrica do extrator e estrutura vegetal do material usado na extração, não há um modelo que possa ser considerado aplicável a qualquer fenômeno de transferência de massa, cada modelo considera diferentes características de um determinado processo (Gaspar et al., 2003; Cassel et al., 2008). Uma breve descrição de alguns modelos será apresentada a seguir.

Um dos primeiros modelos para o processo de extração supercrítico foi baseado em balanços diferenciais e leis de conservação de massa, proposto por Bulley et al. (1984). Também fundamentado em balanço diferencial, um modelo proposto por Reverchon et al. (1993) foi aplicado a uma partícula esférica onde o mecanismo difusivo se manifesta de forma que a variação da concentração seja apenas na direção radial da esfera.

Com relação aos modelos empíricos, segundo Reverchon (1997), eles servem para representar de forma aproximada processos de extração em casos em que não estão disponíveis informações sobre os mecanismos de transferência de massa e relações de equilíbrio, entretanto, tais equações não expressam o fenômeno físico do processo. Esquivel et al. (1999) propuseram um modelo empírico baseado na equação de Langmuir para a cinética do crescimento microbiano. O

modelo é bastante simples, porém é limitado a condições específicas de um processo.

Um dos primeiros modelos a introduzir uma descrição do fenômeno físico foi sugerido por Sovová (1994) que supôs que o soluto a ser extraído apresenta-se de duas formas: uma facilmente acessível e outra de difícil acesso. Tal proposta surgiu da observação de que óleos de matérias-primas vegetais normalmente encontram-se em células das plantas, protegidos pelas paredes dessas células. Após passar por moagem, parte das paredes celulares seriam rompidas, tornando o soluto de fácil acesso. Porém, outras células permaneceriam intactas, impedindo o contato direto do solvente com o soluto. Com isso, o modelo considera que a extração ocorre em três etapas: na primeira há soluto facilmente acessível em todas as partículas do leito de extração, na segunda o soluto facilmente acessível é esgotado gradualmente da entrada até a saída do leito e por fim, na terceira etapa, há apenas soluto de difícil acesso. Através do balanço de massa dentro do leito para cada uma das três etapas, o modelo apresenta uma solução analítica razoavelmente simples. Esse modelo considera ainda o regime pseudo-estacionário, o escoamento pistonado e as propriedades do sistema constantes durante a extração.

Em uma analogia da extração supercrítica com a transferência de calor, Reverchon (1997) aplicou a Segunda Lei de Fick para a difusão. Nesse modelo, uma partícula esférica é o sólido que contém o óleo a ser extraído e o meio é o solvente e o balanço de massa na superfície interna da partícula resulta em uma equação que relaciona a quantidade de óleo remanescente no sólido em função do tempo de extração.

Já Gaspar et al. (2003), apresentaram um modelo fundamentado na proposta de Bartle et al. (1990), no qual a partícula sólida é considerada plana. Esse modelo, conhecido como SSP (*Simple Single Plate*), se baseia no balanço de massa apenas para a fase sólida e considera as seguintes hipóteses: o óleo extraível está inicialmente distribuído de forma uniforme no interior das partículas, a extração ocorre com igual velocidade em cada partícula, o transporte é difusivo e ocorre através da espessura das partículas sendo a resistência oferecida pelo filme estagnado desprezível. A equação obtida pelo modelo expressa o grau de extração

em função do tempo de extração e tem como único parâmetro ajustável o coeficiente de difusão. O modelo teve um bom ajuste aos dados experimentais, entretanto apresentou maiores desvios quando comparado a outro modelo que considera também o balanço de massa na fase fluida.

Sovová et al. (2007) apresentaram um modelo que leva em consideração a existência de dois períodos significativos ao longo da extração supercrítica verificados a partir de dados experimentais. No primeiro período, ocorre a extração do soluto livre nas cavidades abertas da matriz vegetal e a concentração de equilíbrio com a fase fluido corresponde à solubilidade do soluto puro no solvente. Na segunda etapa, o soluto de fácil acesso já foi esgotado, sendo extraído o soluto de difícil acesso e a concentração de equilíbrio com a fase fluida é menor. Com base nessas duas etapas, Sovová et al. (2007) propuseram um modelo mais simples, no qual cada etapa é representado por um linha reta.

Os modelos utilizados para a extração supercrítica de *Lycopodium clavatum* L. foram definidos a partir da análise do comportamento experimental e são apresentados a seguir no capítulo “materiais e métodos”.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Matéria-prima

A planta *Lycopodium clavatum* L. (Figura 4.1) foi coletada em São Francisco de Paula (RS) no Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza (CPCN) Pró-Mata. No mês de junho de 2012 foi realizada uma coleta prévia para a identificação botânica da espécie. Após, foi coletada para os experimentos nos meses de outubro e novembro de 2012 (combinados em um único lote), junho e novembro de 2013. A identificação do material vegetal foi realizada pelos professores da Faculdade de Biociências da PUCRS Dra. Nelsa Cardoso e Dr. Cláudio Augusto Mondin.



Figura 4.1. *Lycopodium clavatum* L. em beira de trilha do CPCN Pró-Mata.

Todo o material vegetal (partes aéreas, raízes, esporos, folhas) foi seco em estufa à 40°C por 48 horas e posteriormente triturado em moinho de facas. O

material moído apresentou diâmetro médio de 1,29 mm, determinado por análise granulométrica com série de peneiras Tyler.

#### 4.2. Extração por Soxhlet

A extração por aparelho de Soxhlet consiste em um método de extração a quente, em sistema fechado e que utiliza solventes voláteis para a extração de sólidos. O processo apresenta a vantagem de utilizar uma quantidade reduzida de solvente, quando comparado aos outros métodos tradicionais. Isso ocorre devido ao fato do material vegetal entrar em contato com solvente renovado a cada ciclo de operação (Falkenberg et al., 2003). O sistema para a extração (Figura 4.2) é constituído basicamente por um balão de destilação, uma manta de aquecimento, o aparelho de Soxhlet e um condensador. A extração foi realizada no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS, onde a planta moída (50 g) foi introduzida no Soxhlet em um cartucho de papel filtro e então o solvente (300 mL de etanol) foi adicionado ao balão. Em seguida, a operação foi iniciada com o aquecimento do solvente, o qual evapora, chega ao condensador, retorna para o estado líquido e, por fim, entra em contato com a planta no aparelho de Soxhlet. O solvente acumula no Soxhlet até o momento em que a altura do líquido atinge um sifão e então a mistura solvente-extrato escoar para o balão, caracterizando um ciclo. O tempo decorrido até o primeiro ciclo foi de 55 minutos, sendo realizados três ciclos no total. Após a extração, o solvente foi eliminado com o uso de um evaporador rotatório.



Figura 4.2. Extração em aparelho de Soxhlet.

### 4.3. Extração supercrítica

As extrações com fluido supercrítico foram realizadas na unidade piloto (Figura 4.3) do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS.



Figura 4.3. Unidade piloto de extração supercrítica – LOPE.

A unidade de extração supercrítica, representada pelo fluxograma da Figura 4.4, é constituída por dois cilindros com  $\text{CO}_2$ , o qual, no estado líquido, passa por um condensador (C1) para evitar sua vaporização devido a diferença de temperatura entre o ambiente e a tubulação e é pressurizado através de uma bomba de alta pressão Maximator<sup>®</sup> G35 (P1). Após, o  $\text{CO}_2$  segue por um pré-aquecedor (W1) para que atinja o estado supercrítico e, então, o fluido supercrítico é alimentado no vaso de extração (B1) que contém a matriz a ser extraída. O equipamento conta com vasos de 100 mL, 500 mL e 1000 mL. Em seguida, o produto passa por uma válvula micrométrica Hoke<sup>®</sup>-Micromite<sup>®</sup> 1600 (VC1) onde o  $\text{CO}_2$  se expande e tem sua vazão mássica determinada por um sensor Siemens<sup>®</sup> Sitrans F C Massflo<sup>®</sup> Mass 6000. A válvula micrométrica é aquecida por resistências elétricas para que assim seja evitado o congelamento do solvente na etapa de despressurização devido ao efeito Joule-Thomson. O extrato, já separado do solvente que passa para a fase

gasosa durante a expansão, é coletado no vaso separador (B2). O equipamento conta ainda com uma bomba para co-solvente, *software* de monitoramento e controle automatizado.

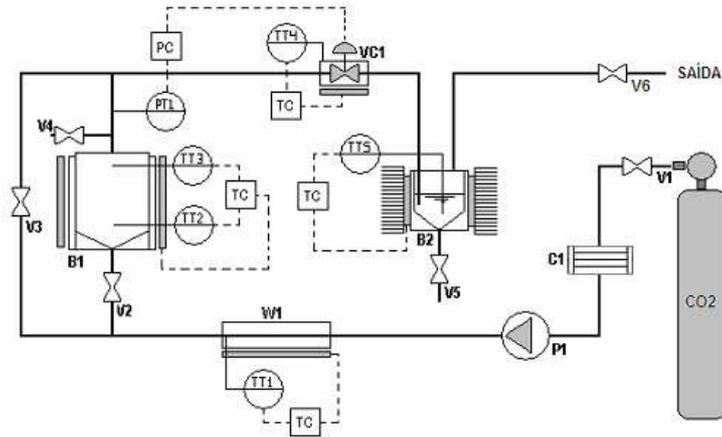


Figura 4.4. Fluxograma do processo de extração supercrítica: C1 – condensador; P1 – bomba de alta pressão; W1 – pré-aquecedor; B1 – vaso de extração; B2 – vaso de separação; VC1 – válvula de expansão micrométrica; TC – controlador de temperatura, V1 a V6 – válvulas.

As extrações foram realizadas no vaso de 500 mL utilizando  $\text{CO}_2$  com vazão de  $800 \text{ g.h}^{-1}$ . Em cada procedimento foram utilizados 100 gramas de planta moída.

Um dos parâmetros considerados nesse trabalho, o pré-tratamento com solução alcalina, foi uma adaptação da ideia inicial de utilizá-la como co-solvente, o que havia sido definido com base em estudos de extração supercrítica de alcalóides relatados na literatura. Segundo Kim et al. (2001), os alcalóides na planta apresentam-se no vacúolo das células, na forma de sais, solúveis em água. Como, tratando-se de solventes apolares, geralmente os sais de alcalóides são insolúveis mas suas bases livres são muito solúveis, um co-solvente alcalino pode aumentar a solubilidade dos alcalóides no  $\text{CO}_2$  supercrítico.

Choi et al. (1999) investigaram o uso de co-solvente alcalino para a extração dos alcalóides hiosciamina e escopolamina. Para isso, os autores utilizaram como alcalinizante dietilamina, adicionada aos co-solventes água e metanol na proporção de 10% (v/v). Com isso, o rendimento da extração foi melhor quando comparado ao uso de co-solventes sem dietilamina, pois assim os sais de hiosciamina e escopolamina foram extraídos na forma de base livre, tornando-se bastante solúveis

no solvente apolar. Bahramifar et al. (2005) testaram metanol alcalinizado com dietilamina e com hidróxido de potássio e também relataram assim melhorar o rendimento de extração de propanolol e fenazopiridina. Outro exemplo de extração supercrítica de alcalóides usando modificador alcalino foi relatado para cefalotaxina a partir de folhas de *Cephalotaxus wilsoniana* (Choi et al., 2000).

No equipamento de extração supercrítica do LOPE não é possível a utilização de metanol, dietilamina ou hidróxido de potássio, devido ao risco dessas substâncias atacarem suas vedações. Sendo assim, foi proposta nesse trabalho uma extração em meio alcalino, porém utilizando como co-solvente uma solução tampão pH 12 de carbonato e bicarbonato de sódio. O pH elevado poderia concentrar a lycopodina na forma de base livre, conforme está representado na Figura 4.5, onde são apresentadas as estruturas moleculares da lycopodina na forma de base livre e sal, em relação ao pH.

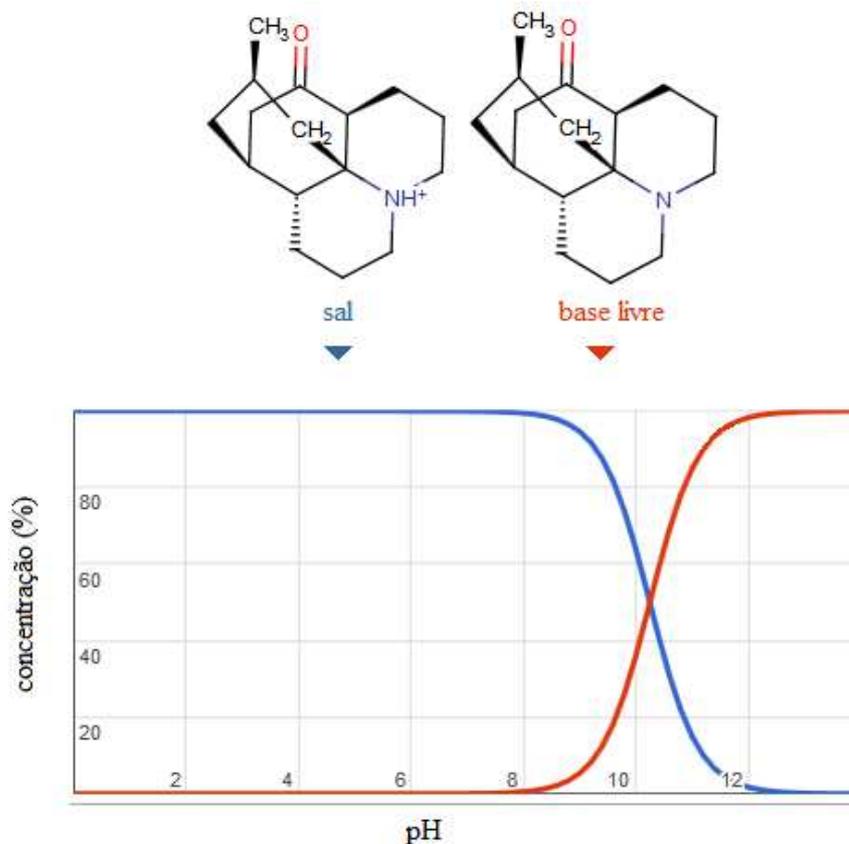


Figura 4.5. Estrutura molecular da lycopodina em função do pH (ChemAxon, 2013).

Seriam avaliadas as extrações supercríticas com adição de 0, 5 e 10% de co-solvente, sendo essa uma das variáveis da análise multivariada. Algumas extrações chegaram a ser realizadas, porém ocorreu a precipitação de carbonato na tubulação e nas válvulas do equipamento, comprometendo a segurança da operação. Em função disso, foi necessário modificar o experimento. A fim de continuar com a proposta de promover uma alcalinização que pudesse favorecer a solubilização da licopodina no CO<sub>2</sub> supercrítico, na forma de base livre, a solução que seria usada como co-solvente passou a ser utilizada para uma espécie de tratamento da planta pré-extração. Assim, passou então a ser avaliada a variável tempo de contato da planta com a solução.

O pré-tratamento consistiu basicamente no contato de 100 g de planta imersos em 300 mL da solução. Após um período de tempo pré-estabelecido a planta era pressionada manualmente contra uma peneira para remoção do excesso de líquido e por fim era transferida para o vaso de extração. A solução era trocada para cada amostra.

#### **4.4. Planejamento de experimentos**

O planejamento de experimentos é uma ferramenta que se destaca pela avaliação do efeito das interações de fatores, pois, diferentemente do método tentativa e erro, um conjunto de fatores tem seus níveis variados simultaneamente. Por isso, essa ferramenta foi escolhida para a otimização da extração supercrítica de licopodina a partir de *Lycopodium clavatum* L., sendo avaliados os efeitos dos fatores pressão e temperatura do CO<sub>2</sub> e tempo de imersão da planta em solução alcalina com um número reduzido de experimentos quando comparado aos métodos que testam uma variável única por vez.

##### **4.4.1. Metodologia de superfície de resposta – Box-Behnken**

A metodologia de superfície de resposta consiste em técnicas matemáticas e estatísticas que possibilitam a avaliação da influência de várias variáveis sobre uma ou mais respostas e tem como principal objetivo a otimização da resposta. A relação entre as variáveis e a resposta são modeladas ajustando-se os resultados

experimentais através de modelos lineares ou quadráticos e pode ser representada graficamente como uma superfície em um espaço tridimensional, o que explica a denominação do método (Barros Neto et al., 1996; Montgomery & Runger, 2003). Para o ajuste do modelo, a análise de variância (ANOVA) e a criação da superfície de resposta foi utilizado o programa estatístico Minitab®.

Um planejamento de superfície de resposta é o de Box-Behnken, o qual consiste em um método baseado em um planejamento fatorial fracionado em três níveis. O número de experimentos é dado por  $N = 2k(k-1) + C_0$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $C_0$  o número de replicatas no ponto central (Barros Neto et al., 1996; Montgomery & Runger, 2003). Nesse estudo, as variáveis  $k$  (pressão, temperatura, tempo de imersão na solução alcalina) assim como  $C_0$  equivalem a três, resultando o total de 15 experimentos.

A matriz do planejamento foi criada no *software* Minitab® com o qual os experimentos foram aleatorizados (base 9). A forma randômica é importante para que os erros de variáveis não controláveis sejam distribuídos ao longo dos experimentos, tornando possível a análise estatística. A matriz de delineamento dos experimentos com os níveis de cada fator, bem como suas combinações, conforme designadas pelo planejamento Box-Behnken, é apresentada a seguir na Tabela 4.1 no formato codificado e na Tabela 4.2 com os valores das variáveis (formato não codificado). A pressão teve valor mínimo de 200 bar e máximo de 300 bar, enquanto a temperatura variou entre 40 e 60°C e foi avaliado o tempo de imersão da planta em solução alcalina entre zero (processo sem imersão) e duas horas.

Tabela 4.1. Planejamento Box-Behnken - fatores e níveis codificados.

<b>Ordem padrão</b>	<b>Pressão</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de imersão</b>
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Tabela 4.2. Planejamento Box-Behnken – valores dos fatores e níveis (ordem randomizada).

Ordem padrão	Ordem de ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo de imersão (h)
13	1	250	50	1
3	2	200	60	1
2	3	300	40	1
1	4	200	40	1
15	5	250	50	1
10	6	250	60	0
6	7	300	50	0
5	8	200	50	0
7	9	200	50	2
4	10	300	60	1
8	11	300	50	2
11	12	250	40	2
9	13	250	40	0
14	14	250	50	1
12	15	250	60	2

A otimização das extrações foi realizada em função da licopodina extraída. Para isso, foram comparados os percentuais de licopodina presentes nos extratos (concentração), o que foi determinado através da análise cromatográfica pelo método da normalização de área. Assim, pela normalização, a área no cromatograma do pico da licopodina foi comparada com a porcentagem da composição da mistura, conforme a equação 4.1 (Bonato, 1988), sendo as áreas obtidas por integração dos picos com o *software* GCMS Solution<sup>®</sup>.

$$\% \text{ licopodina} = \frac{\text{área pico licopodina}}{\text{área total dos picos}} \times 100 \quad (4.1)$$

#### 4.5. Análise da licopodina por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM)

#### 4.5.1. Preparação da amostra

O extrato bruto antes de ser analisado foi submetido a uma etapa de extração de alcalóides, a fim de concentrar a lycopodina através da remoção de substâncias como ceras, terpenos e pigmentos. Esse processo foi realizado em funil de separação pelo método ácido-base de Stas-Otto (Kovar et al., 2010; Henriques et al., 2003; Sharapin, 2008b).

O extrato bruto foi ressuspendido em solução de ácido clorídrico (HCl 5% v/v) e particionado com diclorometano. A fase orgânica foi então descartada e a fase aquosa, contendo alcalóides na forma de sal, foi alcalinizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>) até pH 12. Em seguida, a fase alcalina foi submetida à partição com diclorometano. Após, a fase aquosa foi descartada e o extrato de alcalóides foi finalmente obtido pela evaporação do solvente orgânico. Para ser analisado, o extrato de alcalóides foi solubilizado em metanol.

#### 4.5.2. Análise por CG-EM

As amostras de extratos de alcalóides de *Lycopodium clavatum* L. foram analisadas no Laboratório de Pesquisas Ambientais (LAPA) da PUCRS com um cromatógrafo à gás da marca Agilent modelo 7890A equipado com um espectrômetro de massas da marca Agilent modelo 5975C. A coluna capilar utilizada foi uma HP-5MS revestida com 5% de fenil metil silox, com 30 m x 250 µm de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25 µm. A programação de temperatura do forno foi de 230°C por 2 minutos; após foi aquecido a uma taxa de 20°C / min até 250°C e mantido a essa temperatura por 2 minutos. Em seguida, foi submetido a um aquecimento de 5°C / min até a temperatura de 280°C, a qual foi mantida por 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 300 °C; modo de injeção *split* com razão de *split* 1:10; volume injetado igual a 1,0 µL. O gás de arraste utilizado foi hélio com vazão 0,8 mL.min<sup>-1</sup>; a temperatura da interface foi de 280 °C; modo MS EI com tensão de ionização por impacto de elétrons de 70 eV. O intervalo de aquisição de massas analisado, m/z, foi de 30 a 450 u.m.a.

Os compostos foram identificados por comparação com a biblioteca de espectros de massas NIST.

#### **4.6. Modelagem matemática da transferência de massa na extração supercrítica**

A transferência de massa de soluto da planta para o fluido supercrítico está relacionada à curva de rendimento (massa extraída em função do tempo). Para obtenção dos parâmetros do fenômeno foram usados três modelos, aqui denominados, modelo 1 (Crank, 1975), modelo 2 (Sovová, 1994) e modelo 3 (Reverchon, 1996).

##### **4.6.1. Modelo 1**

O modelo 1, desenvolvido a partir da Segunda Lei de Fick, admite a difusão em uma única partícula na forma de placa plana placa, e considera que o transporte do soluto na superfície externa ocorre por convecção. Esse modelo descreve o comportamento do leito como um todo através da transferência de massa em uma única partícula, o que é uma hipótese simplificada do processo. Com isso, o modelo considera a transferência de massa por convecção junto ao contorno da partícula, cuja representação é:

$$-D \frac{\partial C}{\partial x} = k_c (C_s - C_\infty) \quad (4.2)$$

Na expressão acima,  $D$  é a difusividade do soluto através da matriz vegetal,  $k_c$  é coeficiente convectivo de transferência de massa,  $C_s$  é a concentração do soluto no fluido adjacente à partícula e  $C_\infty$  é a concentração do soluto que se desloca no entorno da partícula sólida. Sendo a espessura da folha limitada por  $-l \leq x \leq l$  e com concentração inicial uniforme, a solução da Segunda Lei de Fick para a condição de contorno da equação 4.2, para transferência em ambas as superfícies da placa, é dada por (Crank, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 L^2 \exp\left(-\beta_n^2 D \frac{t}{l^2}\right)}{\beta_n^2 (\beta_n^2 + L^2 + L)} \quad (4.3)$$

Onde  $\beta_n$  são as raízes positivas de:

$$\beta_n \tan \beta_n = L \quad (4.4)$$

e

$$L = \frac{l k_c}{D} \quad (4.5)$$

Assim, a equação 4.3 expressa a quantidade de soluto ( $M_t$ ) extraída da folha até o tempo  $t$  como uma fração em relação à quantidade total extraída ( $M_\infty$ ) em um intervalo de tempo infinito.

#### 4.6.2. Modelo 2

O modelo 2 foi proposto por Sovová (1994) e considera que a extração do soluto com  $\text{CO}_2$  supercrítico pode ser dividida em períodos. Isso porque o soluto contido nos vegetais é protegido pelas paredes das células, as quais, em parte, são rompidas no processo de moagem, ficando o soluto disponível na superfície das partículas. Assim, em um primeiro período da extração, Sovová considera que é extraído apenas o soluto de fácil acesso, o qual tem contato direto com o solvente. Em uma segunda etapa, o soluto facilmente acessível é esgotado gradualmente da entrada até a saída do leito e por fim, na terceira etapa, há apenas soluto de difícil acesso, contido no interior das partículas. Assim, a massa de óleo inicialmente presente na fase sólida (O) é composta pela massa de soluto facilmente acessível (P) e massa de soluto inacessível contido no interior das partículas sólidas (K). A massa relativa à fase sólida isenta de soluto (N) é constante durante a extração e relaciona as concentrações iniciais de soluto:

$$x(t = 0) = x_0 = \frac{O}{N} = x_p + x_k = \frac{P}{N} + \frac{K}{N} \quad (4.6)$$

O modelo considera que o solvente é isento de soluto e que escoar axialmente em um extrator cilíndrico contendo um leito constituído por planta moída. O tamanho das partículas e sua concentração inicial de soluto são considerados homogêneos. Outra hipótese é de que a pressão e a temperatura no leito são constantes.

O balanço de massa na fase sólida e na fase fluida, para um elemento do leito, é descrito pelas equações 4.7 e 4.8, respectivamente.

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (4.7)$$

$$\rho \varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho u \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (4.8)$$

Onde  $\rho_s$  é a densidade da fase sólida,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $x$  é a fração de soluto na fase sólida, expressa em base livre de soluto,  $y$  é fração de soluto na fase fluida, em base livre,  $J$  é a taxa de transferência de massa,  $\rho$  é a densidade da fase fluida,  $u$  é a velocidade superficial do solvente,  $t$  é o tempo de extração e  $h$  é a coordenada na direção axial.

As equações são resolvidas negligenciando o primeiro termo da equação 4.8 e considerando as condições:

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad (4.9)$$

$$y(h = 0, t) = 0 \quad (4.10)$$

Além disso, Sovová considera também que  $J(x, y)$  é função da diferença de concentração e utiliza um coeficiente local de transferência de massa para cada fase. Em razão da suposição de soluto de fácil e de difícil acesso, a massa de extrato ( $e$ ) relativa à  $N$  varia dependendo do período da extração e tem a solução de acordo com a equação 4.11.

$$e = \begin{cases} qy_r[1 - \exp(-Z)] & q < q_m \\ y_r[q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q < q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[ \exp \left( W \frac{x_0}{y_r} - 1 \right) \exp[W(q_m - q)] \frac{x_k}{x_0} \right] \right\} & q \geq q_n \end{cases} \quad (4.11)$$

Onde:

$$q = \frac{Q t}{N} \quad (4.12)$$

$$q_m = \frac{(x_0 - x_k)}{y_r Z} \quad (4.13)$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(W x_0 / y_r)}{x_0} \quad (4.14)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_r}{w x_0} \ln \frac{x_0 \exp[W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad (4.15)$$

$$Z = \frac{k_f a_0 \rho}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (4.16)$$

$$W = \frac{k_s a_0}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad (4.17)$$

Nas equações acima,  $y_r$  é a solubilidade,  $Z$  e  $W$  são parâmetros ajustáveis para o período rápido e para o lento, respectivamente, e são diretamente proporcionais aos coeficientes de transferência de massa de cada fase.  $q$  é a quantidade específica de solvente, e os subscritos  $m$  e  $n$  correspondem ao início da extração do interior das partículas e fim da extração de soluto de fácil acesso, respectivamente, enquanto  $\dot{q}$  representa a taxa de massa de solvente em relação a  $N$ . O termo  $z_w$  corresponde à coordenada de contorno entre a extração rápida e lenta (obtido pela relação  $z = k_f a_0 h / u$ ); a área específica é representada por  $a_0$ ;  $k_f$  e  $k_s$  são os coeficientes de transferência de massa das fases fluida e sólida, respectivamente.

### 4.6.3. Modelo 3

Reverchon (1996) propôs um modelo para investigar a extração supercrítica de óleo de sálvia, sendo desenvolvido através de um balanço de massa para as fases sólida e fluida. Reverchon considera o óleo essencial um único composto e que após o processo de moagem apenas uma pequena fração do óleo está disponível na superfície das partículas. Em função disso, o autor admite que a transferência de massa é controlada pela resistência interna, sendo desprezado no modelo a transferência de massa relacionada à resistência externa.

O autor considera a dispersão axial negligenciável e que a densidade e vazão do solvente são constantes ao longo do leito, o balanço de massa para um elemento do extrator de altura  $dh$  é representado pelas equações 4.18 para a fase fluida e 4.19 para a fase sólida.

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (4.18)$$

$$(1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p k_{TM}(q - q^*) \quad (4.19)$$

As condições iniciais e de contorno são:  $t = 0$ ,  $c(h, 0) = 0$ ,  $q(h, 0) = q_0$  e  $h = 0$ ,  $c(0, t) = 0$ .

Nas equações acima,  $u$  é a velocidade superficial do solvente,  $V$  é o volume do extrator,  $c$  é a concentração de extrato na fase fluida,  $q$  é a concentração de extrato na fase sólida,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $h$  é a coordenada espacial ao longo do leito,  $A_p$  é a área total das partículas,  $k_{TM}$  é o coeficiente de transferência de massa interna,  $q^*$  corresponde à concentração na interface sólido-fluido (de acordo com o modelo da resistência interna, é suposta em equilíbrio com a fase fluida) e  $t$  é o tempo de extração.

O balanço de massa é resolvido conhecendo-se a relação de equilíbrio das fases. Devido à falta de dados experimentais, uma relação linear é geralmente utilizada para os processos de extração supercrítica (Reverchon, 1996):

$$q^* = K C \quad (4.20)$$

Onde  $K$  é o coeficiente de equilíbrio do extrato entre as fases fluida e sólida.

Reverchon define o tempo de difusão interna como:

$$t_i = \frac{(1 - \varepsilon)V}{A_p k_{TM}} \quad (4.21)$$

A equação 4.19, então, pode ser reescrita como:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\frac{1}{t_i} (q - q^*) \quad (4.22)$$

Assumindo como válida a hipótese de Villermaux (1987) para o tempo de difusão interna (equação 4.23), é possível determinar o coeficiente de difusão interna ( $D_i$ ).

$$t_i = \frac{\mu l^2}{D_i} \quad (4.23)$$

Onde  $\mu$  é uma constante relacionada à geometria da partícula (igual a 1/3 para placas) e  $l$  é a dimensão característica dada pela relação volume de partícula por área da partícula.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O extrato de *Lycopodium clavatum* L. apresenta composição química que varia em função das condições de processo para sua obtenção. Uma investigação de algumas variáveis da extração com fluido supercrítico foi realizada a fim de otimizar o teor de licopodina no extrato, um alcalóide de potencial uso farmacológico. Para isso foi realizado um planejamento estatístico de experimentos, através do qual foram definidas as melhores condições para a extração de *Lycopodium clavatum* L. Nessas condições de processo, foi levantada e modelada matematicamente a curva de extração, para que assim fossem determinados parâmetros do fenômeno de transferência de massa.

### 5.1. Testes preliminares

#### 5.1.1. Análise por CG-EM

A fim de testar e definir a metodologia para a análise e identificação da licopodina e posteriormente comparar os resultados da extração com fluido supercrítico, inicialmente foi realizada uma extração no aparelho de Soxhlet utilizando como solvente etanol. A licopodina já havia sido extraída com a utilização de solventes orgânicos (metanol, etanol, éter de petróleo) por vários autores (Konrath et al, 2012; Orhan et al, 2006; Mandal et al, 2010; Bishayee et al, 2013). Assim, primeiramente houve o uso deste método de extração devido ao conhecido sucesso na obtenção de licopodina para verificar se a metodologia proposta permitiria a identificação desse alcalóide. Dessa forma, a análise foi testada enquanto eram definidas as condições para extração via fluido supercrítico.

O programa de temperaturas apresentado mostrou-se adequado para separação e identificação da licopodina, sendo estabelecida a injeção das amostras

na concentração de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (massa de extrato final por volume de metanol) para obtenção de uma boa resolução no cromatograma. O resultado da análise para a amostra obtida por Soxhlet é apresentada a seguir na Figura 5.1, sendo que a identificação da licopodina foi realizada pela comparação de espectros de massas com os padrões da biblioteca NIST. Assim, a licopodina foi identificada como provável substância para o pico com tempo de retenção de 3,8 minutos e apresentou área de 2,24% em relação à área total dos picos. Os fragmentos característicos para identificação da licopodina e suas intensidades relativas, entre parênteses, foram: 190 (100); 191 (16); 247 (10); 162 (7); 134 (3); 188 (2).

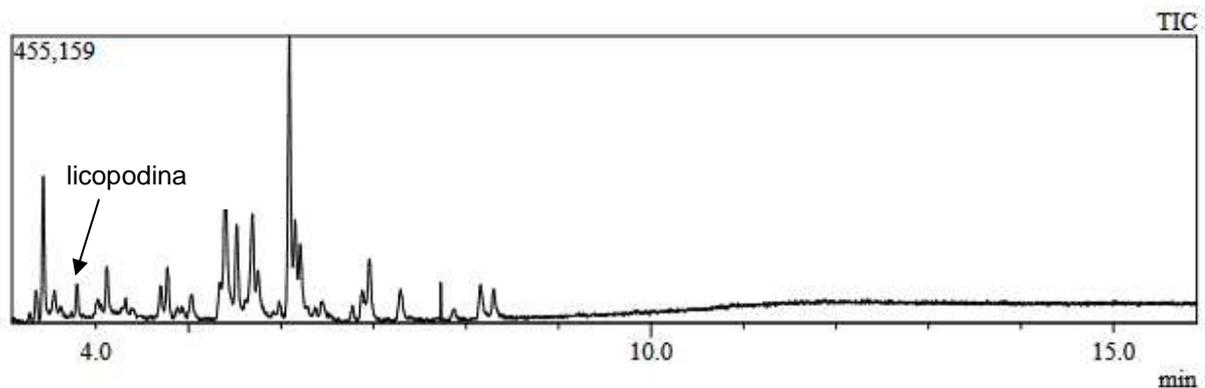


Figura 5.1. Cromatograma do extrato obtido por Soxhlet com etanol.

### 5.1.2. Pressão do fluido supercrítico

Uma das principais propriedades do fluido supercrítico que interfere na composição do extrato é a pressão. De uma forma geral, compostos mais leves são extraídos em pressões mais baixas, ao passo que substâncias de massa molecular mais elevadas requerem maior pressão do fluido supercrítico.

Para estabelecer uma faixa de pressão a ser investigada no planejamento estatístico, foram testadas extrações nas pressões de 90, 120, 200 e 300 bar, todas na temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  com as demais variáveis também mantidas constantes. Os cromatogramas obtidos são apresentados a seguir.

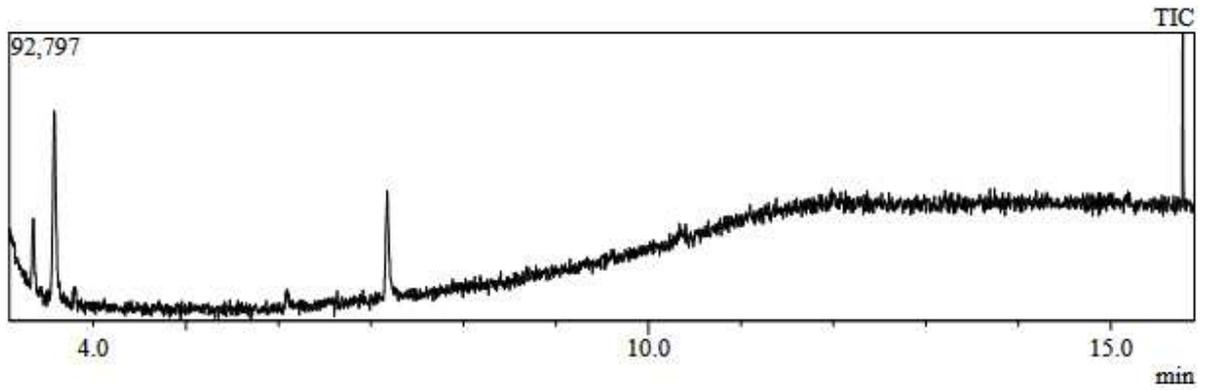


Figura 5.2. Cromatograma do extrato obtido com CO<sub>2</sub> a 90 bar.

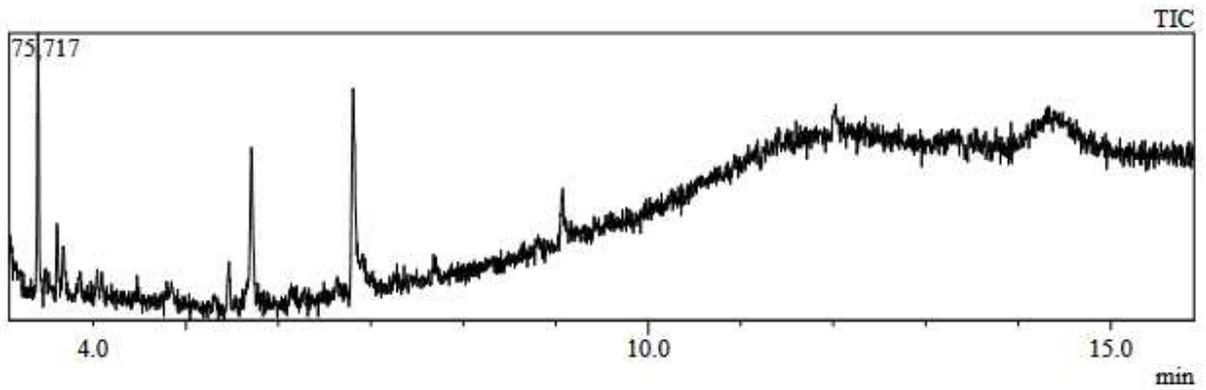


Figura 5.3. Cromatograma do extrato obtido com CO<sub>2</sub> a 120 bar.

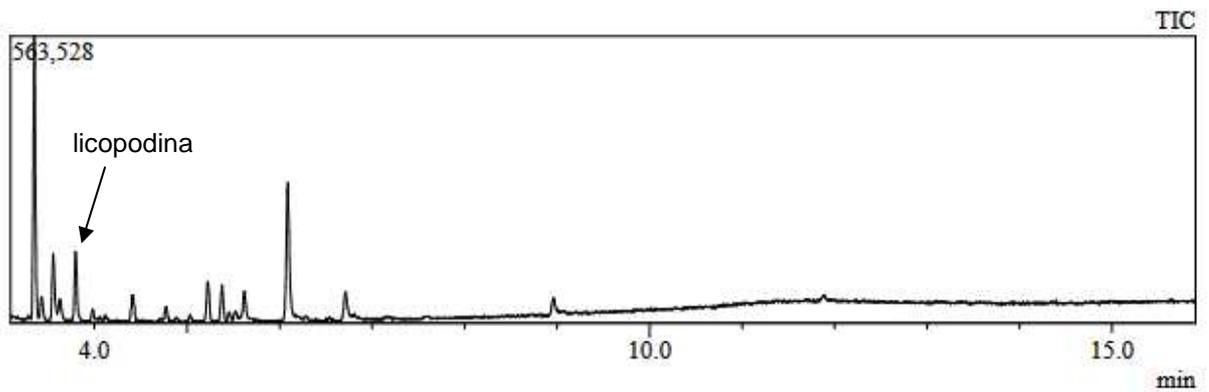


Figura 5.4. Cromatograma do extrato obtido com CO<sub>2</sub> a 200 bar.

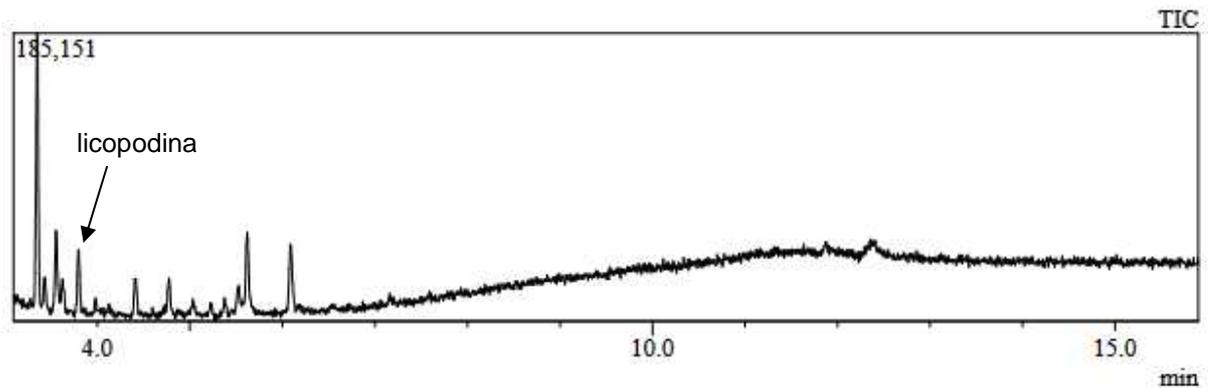


Figura 5.5. Cromatograma do extrato obtido com CO<sub>2</sub> a 300 bar.

Pela análise dos cromatogramas das Figuras 5.2 a 5.5, considerando o tempo de retenção da licopodina (3,8 min), nota-se que o aumento da pressão favoreceu a extração da licopodina, sendo que nas condições de extração a 90 e 120 bar não foi identificado o alcalóide. Com isso, a análise multivariada teve a pressão definida na faixa 200 a 300 bar.

## 5.2. Planejamento de experimentos

O planejamento de Box-Behnken foi utilizado para avaliar a influência dos parâmetros pressão e temperatura do CO<sub>2</sub> e tempo de contato da planta com solução de carbonato de sódio na resposta percentual de licopodina no extrato. Nesses experimentos, foi utilizada a planta coletada em novembro de 2012. Cada extrato obtido por extração supercrítica foi submetido a uma purificação com solvente para concentração de alcalóides e, então, o extrato final foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Os cromatogramas de cada amostra são apresentados no anexo A.

Através da integralização das áreas dos cromatogramas foi expresso o percentual de licopodina presente em cada extrato. Os rendimentos dos extratos supercríticos obtidos variaram entre 0,187 e 1,364 % (m/m), enquanto o teor de licopodina, relativo à área total dos picos eluídos no cromatograma, variou entre 3,48 e 20,37%, conforme é apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Rendimento total e teor de licopodina no extrato final.

<b>Amostra</b>	<b>Pressão (bar)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de imersão (h)</b>	<b>Resposta (% de licopodina)</b>	<b>Rendimento total de extrato (% m/m)</b>
LC 1	250	50	1	5,12	0,343
LC 2	200	60	1	7,75	0,248
LC 3	300	40	1	20,37	0,433
LC 4	200	40	1	14,92	0,674
LC 5	250	50	1	3,48	0,793
LC 6	250	60	0	5,49	0,901
LC 7	300	50	0	11,56	1,364
LC 8	200	50	0	6,74	0,242
LC 9	200	50	2	6,53	0,187
LC 10	300	60	1	11,64	1,329
LC 11	300	50	2	7,49	0,274
LC 12	250	40	2	7,67	0,203
LC 13	250	40	0	9,67	0,762
LC 14	250	50	1	6,47	0,346
LC 15	250	60	2	5,65	0,720

Os dados da Tabela 5.1 foram inseridos no *software* estatístico Minitab<sup>®</sup>, com o qual foi realizada a análise da variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Análise de variância para o teor de licopodina.

<b>Fator</b>	<b>gl</b>	<b>Seq SS</b>	<b>Adj SS</b>	<b>Adj MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Regressão	9	250,690	250,690	27,854	7,50	0,020
Linear	3	94,310	87,078	29,026	7,81	0,025
P	1	28,577	55,437	55,437	14,92	0,012
T	1	61,051	46,959	46,959	12,64	0,016
C	1	4,682	1,718	1,718	0,46	0,527
Quadrática	3	150,880	150,880	50,293	13,54	0,008
P*P	1	80,848	85,189	85,189	22,93	0,005
T*T	1	58,768	54,540	54,540	14,68	0,012
C*C	1	11,265	11,265	11,265	3,03	0,142
Interação	3	5,500	5,500	1,833	0,49	0,702
P*T	1	0,608	0,608	0,608	0,16	0,702
P*C	1	3,725	3,725	3,725	1,00	0,363
T*C	1	1,166	1,166	1,166	0,31	0,599
Erro residual	5	18,574	18,574	3,715		
Falta de ajuste	3	14,090	14,090	4,697	2,09	0,339
Erro puro	2	4,484	4,484	2,242		
Total	14	269,264				

Conforme os dados da ANOVA, apenas a pressão e a temperatura são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) considerando um nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Também nota-se que há o efeito quadrático dessas variáveis (P\*P e T\*T), enquanto que as demais interações não são estatisticamente significativas. O tempo de imersão da planta na solução (fator C) não interferiu significativamente no teor de licopodina presente no extrato final, de acordo com o índice descritivo (valor p) de 52,7%. Com isso, a hipótese de correlação desse fator com a extração de licopodina deve ser rejeitada.

A análise indica também que a regressão é estatisticamente significativa e assim pode-se aplicar o modelo para descrever a variação de licopodina no extrato

final em função das variáveis estudadas. Com valores de p de 0,025 e 0,008 para a regressão linear e quadrática, respectivamente, deve-se então adotar o modelo quadrático. Assim, os coeficientes de regressão de superfície de resposta foram estimados pelo modelo de Box-Behnken (modelo quadrático completo), sendo obtidos os valores indicados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Coeficientes de regressão de superfície de resposta para o teor de lycopodina (para variáveis não codificadas).

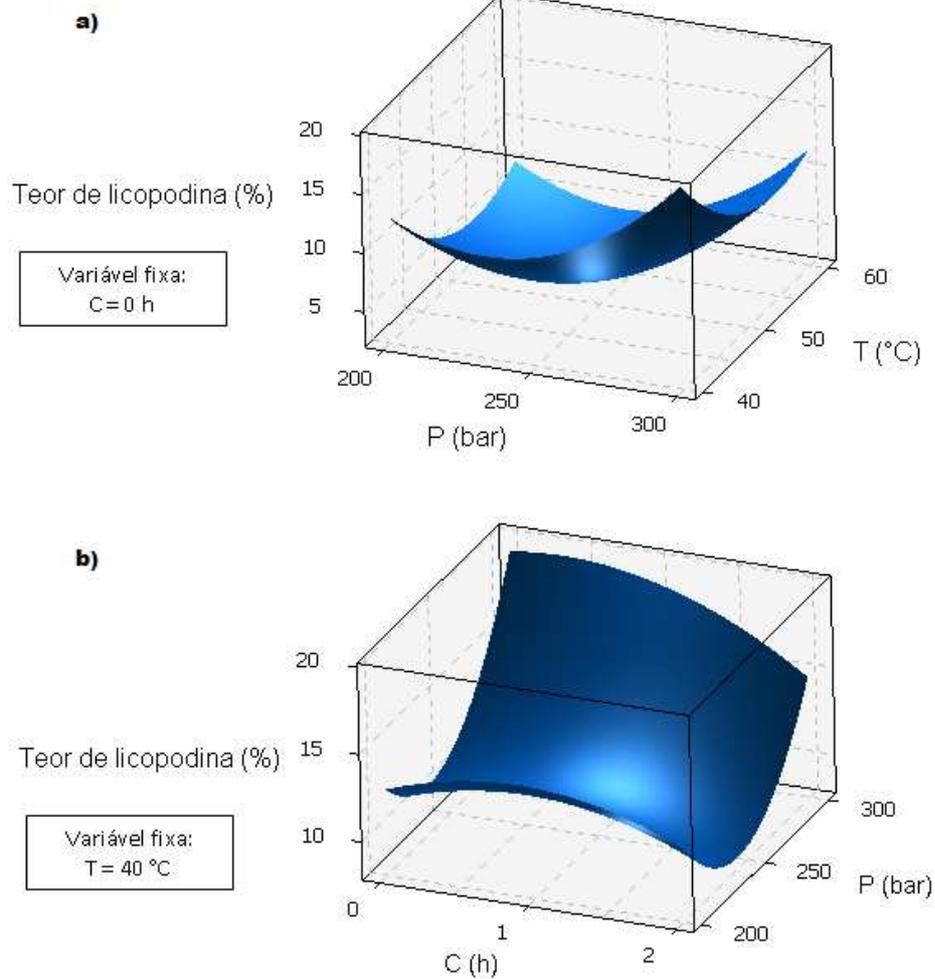
<b>Termo</b>	<b>Coef</b>	<b>SE Coef</b>	<b>p</b>
Constante	212,969	44,178	0,005
P	- 0,865	0,224	0,012
T	- 3,979	1,119	0,016
C	4,853	7,136	0,527
P*P	0,002	0,000	0,005
T*T	0,038	0,010	0,012
C*C	- 1,747	1,003	0,142
P*T	- 0,001	0,002	0,702
P*C	- 0,019	0,019	0,363
T*C	0,054	0,095	0,599
S = 1,927      R <sup>2</sup> = 93,10%      R <sup>2</sup> (adj) = 80,69%			

O modelo ajustado representa bem os dados, apresentando coeficiente de determinação R<sup>2</sup> igual a 0,9310. Porém, o coeficiente de determinação ajustado apresenta o valor de 0,8069, e significa que 19,31% das variações não são explicadas pelo modelo. Esse valor, menor que o coeficiente de determinação, pode ser explicado pelo fato da variável tempo de imersão na solução de carbonato não contribuir significativamente para o modelo. Enquanto o coeficiente de determinação leva em conta apenas o número de variáveis, o valor ajustado considera também o impacto de cada variável na resposta. Ainda assim, é razoável a representação dos dados pelo modelo. A validade do modelo é confirmada ainda pelo valor não significativo ( $p = 0,339 > 0,05$ ) para a falta de ajuste, o que aponta o modelo

quadrático como estatisticamente significativo para a resposta. O modelo ajustado, para variáveis não codificadas, é expresso pela equação 5.1

$$\begin{aligned} \% \text{ lycopodina} = & 212,696 - 0,865 P - 3,979 T + 4,853 C + 0,002 P^2 \\ & + 0,038 T^2 - 1,757 C^2 - 0,001 P T - 0,019 P C + 0,054 T C \end{aligned} \quad (5.1)$$

A seguir, são apresentadas a superfície de resposta e curvas de nível, da superfície da equação 5.1, nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente.



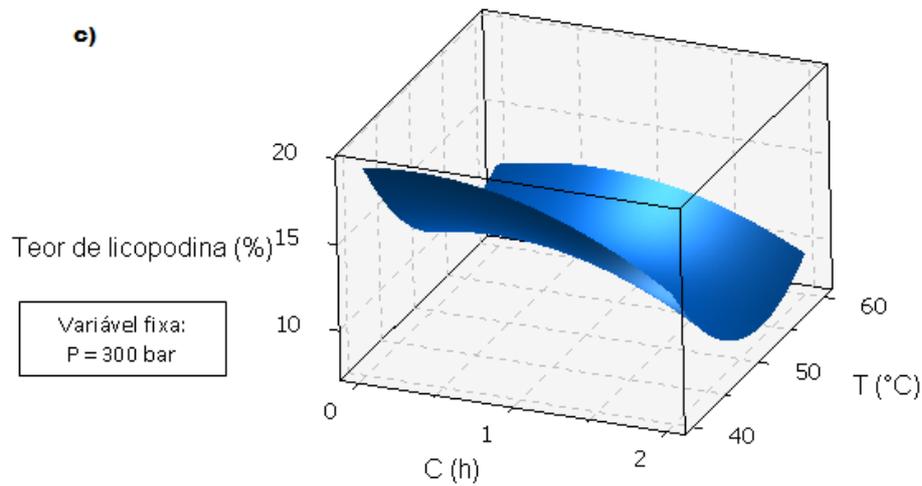


Figura 5.6. Superfície de resposta para o teor de licopodina no extrato final como função de duas variáveis independentes: a) pressão e temperatura do  $\text{CO}_2$ ; b) tempo de imersão na solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pressão do  $\text{CO}_2$ ; c) tempo de imersão na solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e temperatura do  $\text{CO}_2$ .

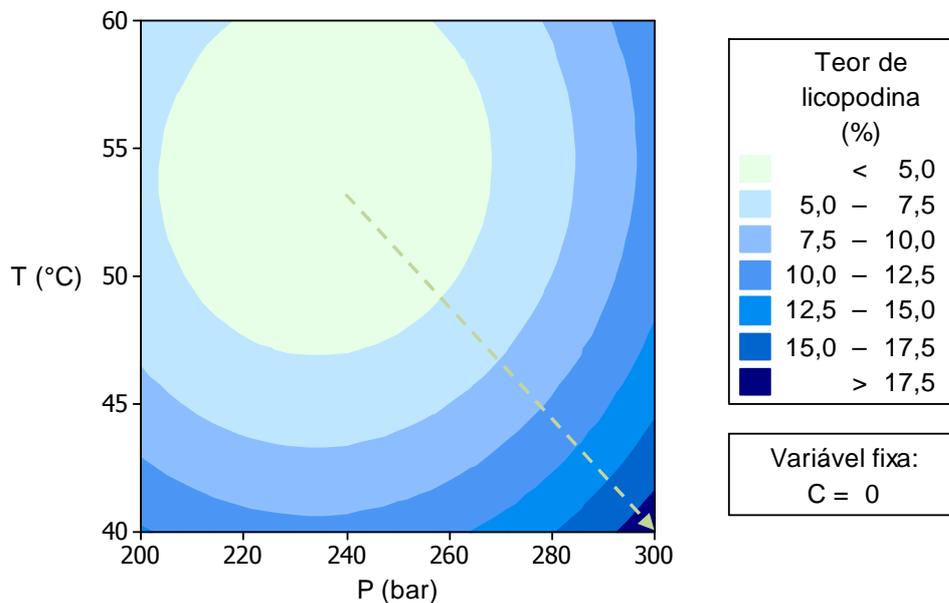


Figura 5.7. Curvas de nível da superfície de resposta.

Os dados representados pelas Figuras 5.6 e 5.7 evidenciam uma ascendência do percentual de licopodina no extrato final com o aumento da pressão e diminuição da temperatura do fluido supercrítico. Com isso, pode-se definir como melhor condição para extração da licopodina a partir da *Lycopodium clavatum* L. os seguintes parâmetros: pressão de 300 bar, temperatura de 40 °C, sem o pré-

tratamento com a solução de carbonato, o qual não é estatisticamente significativa conforme a ANOVA. Considerando essas condições e substituindo esses valores na equação 5.1, estima-se que o teor de licopodina no extrato será de 19,24% (percentual da área do pico de licopodina em relação à área total dos picos do cromatograma).

Extrapolando-se o modelo poder-se-ia ter um maior rendimento de licopodina no extrato. Entretanto, o aumentando da pressão não é viável, uma vez que o equipamento poderia não suportar pressão mais elevada. Com relação à temperatura, sua diminuição, além da faixa avaliada, poderia diminuir o rendimento, uma vez que a temperatura está diretamente relacionada à solubilidade.

As condições determinadas como adequadas para obtenção de licopodina, estão de acordo com o esperado segundo dados da literatura. Com pressões mais elevadas e diminuição da temperatura há aumento da densidade do CO<sub>2</sub>, o que promove maior capacidade de solubilização. Já a ineficiência da utilização do pré-tratamento com solução de carbonato pH 12 pode ter ocorrido devido a uma baixa absorção da solução pela planta. Sem uma boa absorção, então possivelmente não houve contato com o conteúdo dos vacúolos das células e também não ocorreu o inchaço da matriz, situações que contribuiriam para um melhor rendimento da extração.

### **5.3. Extração na condição ótima**

Após definida a pressão de 300 bar e temperatura de 40°C como melhor condição de processo supercrítico para obtenção da licopodina, a extração foi testada para a planta colhida em duas diferentes épocas do ano: junho e novembro de 2013. Os extratos foram analisados, sendo que para a planta coletada em junho não foi identificada a licopodina.

Já no caso da planta coletada em novembro, o extrato obtido continha licopodina, conforme o esperado pela metodologia de superfície de resposta, na qual os experimentos haviam sido conduzidos com planta coletada em novembro de 2012.

Esse fato deixa clara a importância do fator sazonalidade e leva à hipótese de que o modelo obtido por metodologia de superfície de resposta é válido apenas para *Lycopodium clavatum* L. coletada no mês de novembro. Nessa época, a planta encontra-se em período de reprodução, apresentando esporos. Assim, pode-se supor que a licopodina esteja localizada nessa parte da planta.

Com a planta coletada em novembro de 2013, foi realizada extração em duplicata, obtendo-se para o pico de licopodina o valor médio de 20,29% da área total dos picos eluídos nos cromatogramas. Esse valor está de acordo com o valor de 19,24% previsto pela equação obtida com o planejamento de Box-Behnken (erro de 5,43%). O cromatograma obtido para esse extrato é apresentado na Figura 5.8.

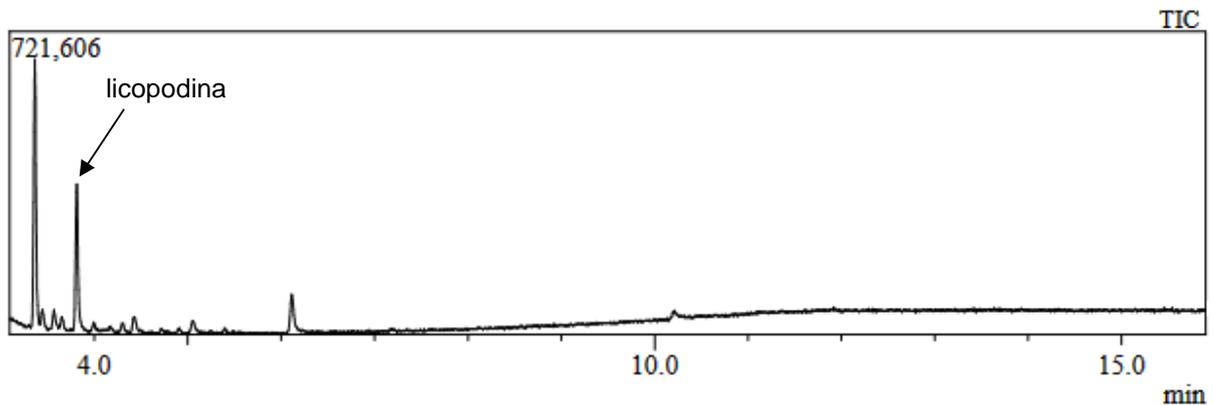


Figura 5.8. Cromatograma do extrato obtido sem pré-tratamento, com CO<sub>2</sub> a 300 bar e 40°C (condição ótima).

Um processo com Soxhlet seguido de maceração, com n-hexano e metanol, respectivamente, foi utilizado por Konrath et al (2012) na extração de *Lycopodium clavatum* L. Em análise semelhante à utilizada nesse trabalho, os autores obtiveram em seu extrato final 31,8% de licopodina (relação da área do pico em relação à área total dos picos do cromatograma). A extração supercrítica resultou um teor de licopodina no extrato final inferior ao relatado para extração com solventes orgânicos, mas, em contrapartida, o processo supercrítico demanda menor tempo, além de não gerar resíduos e resultar um extrato livre de solvente residual.

Também com os experimentos realizados com a planta coletada em novembro de 2013 que foi determinado o rendimento da extração em função do

tempo. A curva obtida é apresentada na Figura 5.9, cujos valores médios (desvio padrão médio de 0,22) foram adotados para a modelagem matemática da transferência de massa.

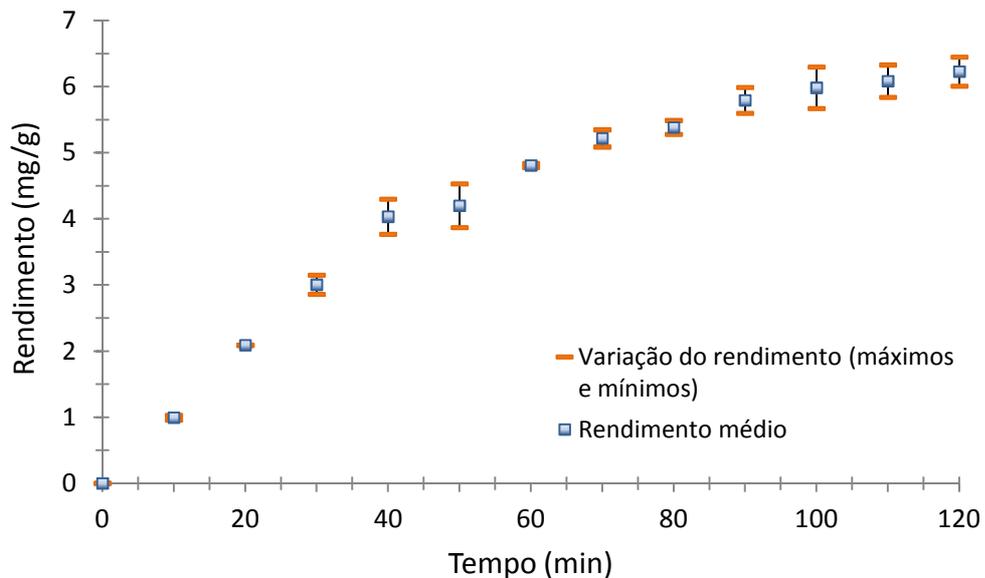


Figura 5.9. Curva de rendimento da extração supercrítica.

#### 5.4. Modelagem da transferência de massa

Através da modelagem matemática da transferência de massa, foram estimados parâmetros do fenômeno pelo modelo 1 (coeficiente de difusão e coeficiente convectivo de transferência de massa), modelo 2 (coeficientes de transferência de massa para as fases sólida e fluida, solubilidade do extrato e concentração de soluto de difícil acesso na fase sólida) e modelo 3 (coeficiente de difusão e constante de equilíbrio).

Para resolução das equações dos modelos foram inseridos os parâmetros relacionados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Parâmetros de entrada para resolução das equações da modelagem da extração.

Parâmetro	Valor
$a_0$ (m <sup>-1</sup> )	4651,16
$\varepsilon$	0,65
$\rho_s$ (kg.m <sup>-3</sup> )	560
$\rho$ (kg.m <sup>-3</sup> )	929
$Q$ (g.s <sup>-1</sup> )	0,22
$x_0$	6,23 x10 <sup>-3</sup>
$u$ (m.s <sup>-1</sup> )	7,30x10 <sup>-5</sup>
$d$ (m)	0,06
$h$ (m)	0,18
$O$ (kg)	0,10

Dentre esses parâmetros, a área superficial, a porosidade, densidade do sólido, concentração inicial de soluto e velocidade específica do solvente foram calculados, enquanto os demais parâmetros foram determinados de forma direta, experimentalmente. A porosidade foi calculada através da relação entre o volume de planta e o volume do leito de extração. A concentração inicial de soluto na fase sólida ( $x_0$ ) foi determinada através da massa de soluto extraída até o esgotamento da planta em relação à massa de planta do leito. Já a densidade da planta ( $\rho_s$ ) foi determinada pela relação entre sua massa e o volume deslocado ao ser imersa em um líquido. A densidade do solvente foi calculada pela equação de Peng-Robinson modificada por Stryjek e Vera (Stryjek & Vera, 1986). A velocidade específica do solvente ( $u$ ) foi calculada através dos parâmetros relacionados ao solvente vazão, densidade e área da secção perpendicular ao fluxo. E a área superficial ( $a_0$ ) foi estimada pela equação 5.2, na qual foi utilizado o diâmetro médio da partícula ( $\bar{D}_p$ ) determinado pelo método da média de Sauter, a partir de dados experimentais de análise granulométrica (Foust et al., 1980).

$$a_0 = \frac{6}{\bar{D}_p} \quad (5.2)$$

### 5.4.1. Curva de extração segundo o modelo 1

As equações do modelo 1 (Crank, 1975) foram inseridas no *software* Matlab<sup>®</sup>, no qual, foram estimados os valores dos parâmetros D e L e, em seguida, foram calculados os respectivos valores de  $\beta_n$ . Os parâmetros foram otimizados por meio de uma função objetivo para minimização do erro entre os valores experimentais e os calculados. Assim, foi determinada a difusividade igual a  $3,04 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , sendo L igual a  $4,48 \times 10^{-3}$ . Com isso, mediante o uso da equação 4.5, foi obtido o valor de  $2,11 \times 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  para o coeficiente de transferência de massa. A curva obtida pelo modelo é apresentada na Figura 5.10.

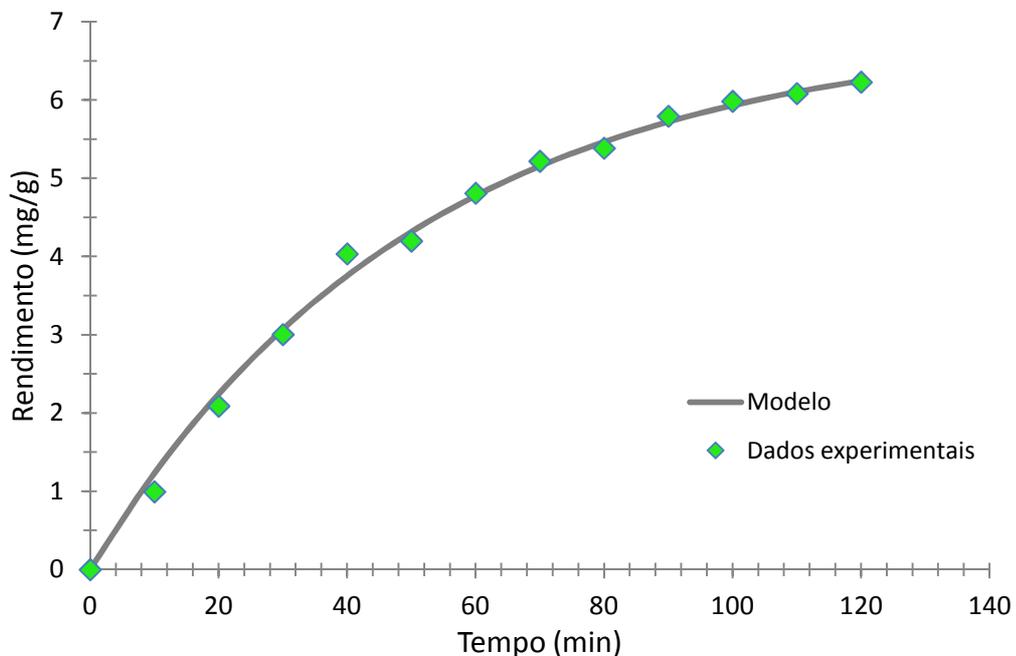


Figura 5.10. Curva de rendimento da extração – modelo de Crank.

O modelo apresentado na Figura 5.10 teve um ajuste satisfatório aos dados experimentais, apresentando um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9966.

### 5.4.2. Curva de extração usando o modelo 2

O sistema de equações do modelo 2 (Sovová, 1994) também foi resolvido utilizando a ferramenta computacional Matlab<sup>®</sup>. Nesse modelo são estimados quatro parâmetros: Z, W,  $x_k$  e  $y_r$ , os quais foram otimizados pela minimização da soma dos

erros quadráticos entre os dados experimentais e dados calculados, através do método Nelder-Mead simplex (Lagarias et al., 1998). Assim, foram estimados  $Z=1,0013$ ;  $W=0,1869$ ;  $x_k=0,0034$ ;  $y_r=0,0012$ . Após determinação desses parâmetros, através das equações 4.16 e 4.17, foram determinados os coeficientes de transferência de massa para fase sólida e fase fluida:  $k_s=3,15 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$  e  $k_f=1,02 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$ .

A curva de extração ajustada pelo modelo 2 (Sovová, 1994) representou muito bem os dados de rendimento reais. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 0,9979 e a curva modelada é apresentada na Figura 5.11.

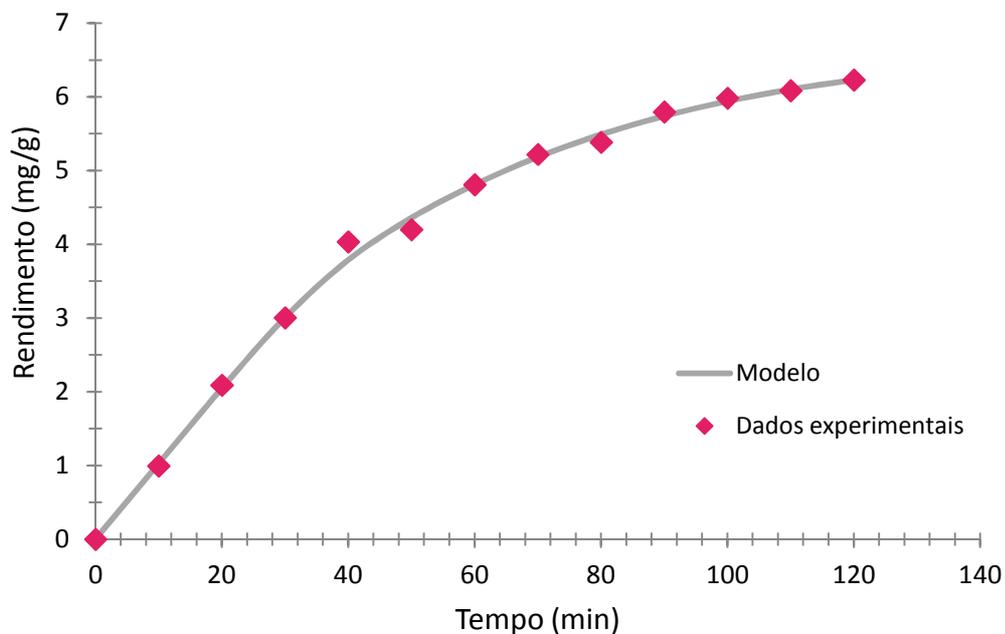


Figura 5.11. Curva de rendimento da extração – modelo de Sovová.

#### 5.4.3. Curva de extração usando o modelo 3

O modelo 3 (Reverchon, 1996) foi implementado no *software* de simulação EMSO (Soares & Secchi, 2003), sendo resolvido o sistema de equações por um integrador de passos múltiplos, otimizado por meio de poliedros flexíveis. As equações foram discretizadas considerando-se o leito dividido em 100 estágios. Dessa forma, foram estimados, pelo método dos mínimos quadrados, os valores do

tempo de difusão interna e da constante de equilíbrio, obtendo-se os valores de  $t_i = 690,63$  s e  $K = 0,0036$   $\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ . Em seguida, através das equações 4.21 e 4.23 foram determinados o coeficiente de transferência de massa interna e o coeficiente de difusão interna, cujos valores foram  $k_{TM} = 3,11 \times 10^{-7}$   $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  e  $D_i = 8,02 \times 10^{-10}$   $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . A representação dos valores de rendimento da extração supercrítica pelo modelo é apresentada na Figura 5.12, cujo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,9901.

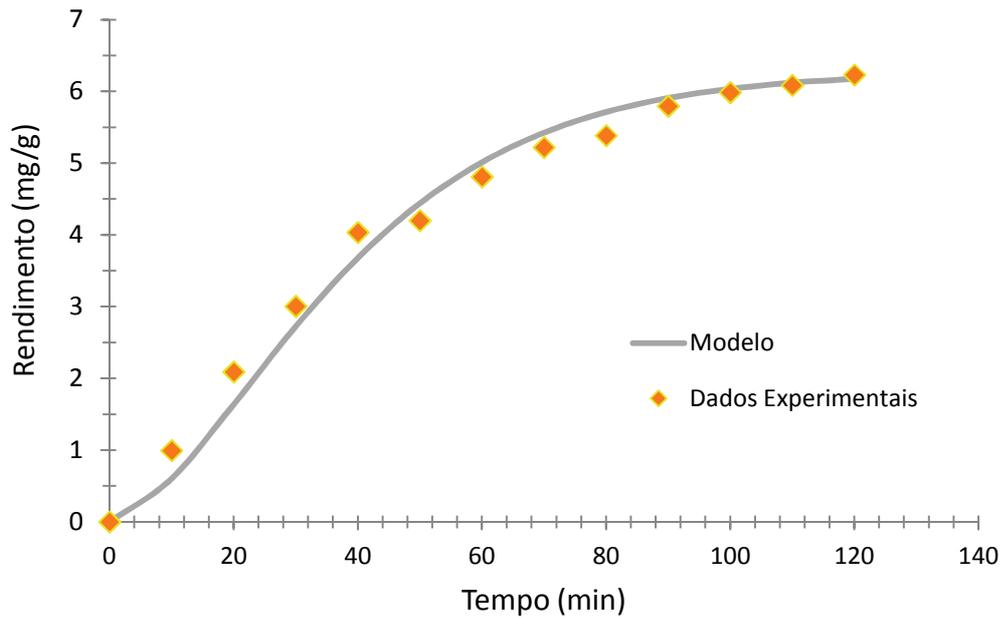


Figura 5.12. Curva de rendimento da extração – modelo de Reverchon.

## 6. CONCLUSÃO

O trabalho investigou a aplicação do processo de extração com fluido supercrítico na obtenção de extrato de *Lycopodium clavatum* L. e a modelagem matemática da curva de rendimento para obtenção de parâmetros da transferência de massa. Com o processo, foi possível a obtenção de extrato com licopodina, um alcalóide com potencial uso farmacológico, o qual foi identificado através de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

O estudo do processo supercrítico teve como primeira etapa testes preliminares para identificação de um intervalo de pressão adequado para a obtenção de licopodina. Com isso, nas extrações realizadas a 90 e a 120 bar, não foi constatado o alcalóide no extrato, enquanto que o resultado foi positivo para pressões de 200 e 300 bar. Essa variação na composição do extrato comprova o efeito da pressão na seletividade do fluido supercrítico durante a extração.

A influência da pressão também foi verificada através dos resultados da análise estatística. Foi realizado um planejamento de Box-Behnken e aplicada a metodologia de superfície de resposta, sendo avaliados os efeitos de três variáveis e suas interações no teor de licopodina no extrato. Os parâmetros avaliados foram a pressão e a temperatura do fluido supercrítico e o tempo de pré-tratamento da planta em uma solução básica de carbonato e bicarbonato de sódio. Dessa forma, foi identificada a melhor combinação desses parâmetros em relação à quantidade de licopodina no extrato. A análise estatística apontou apenas a pressão e a temperatura como significativas para um intervalo de confiança de 95 %. Com isso, foi descartada a variável tempo de imersão da planta na solução básica. A relação entre as variáveis e a resposta teor de licopodina foi obtida pela metodologia de superfície de resposta. O modelo quadrático foi estatisticamente significativo e

apresentou um nível de ajuste razoável, sendo capaz de explicar 80,69% das variações dos dados experimentais.

A extração na condição de processo otimizada foi modelada matematicamente e o produto obtido apresentou um teor de licopodina próximo ao previsto pelo modelo de superfície de resposta, demonstrando a validade do modelo. Além disso, esse teor foi mais elevado que o encontrado no extrato obtido por extração com etanol em aparelho de Soxhlet. Assim, a extração supercrítica foi mais seletiva e é uma boa opção para a extração de licopodina.

Também foi verificada a influência da época de coleta da planta na composição do extrato. Em análise univariável, com planta colhida em junho e em novembro de 2013, foi identificada licopodina apenas no extrato da planta colhida em novembro.

Em relação à modelagem matemática da curva de rendimento da extração, os três modelos avaliados apresentaram um ótimo ajuste aos dados experimentais. O modelo 2, proposto por Sovová (1994) foi o que melhor representou a curva experimental, com um coeficiente de determinação de 0,9979. Valor semelhante, de 0,9966, foi encontrado para o ajuste do modelo 1 (Crank, 1975). O modelo de Reverchon considera apenas a resistência interna para a transferência de massa e foi o modelo menos eficaz na representação dos dados experimentais. Portanto, considerando as hipóteses de cada um dos três modelos e os ajustes aos dados, pode-se afirmar que a difusão é a principal forma de transferência de massa associada à extração da *Lycopodium clavatum* L.

Além disso, com a modelagem da extração foram obtidos parâmetros importantes na predição do processo, que tornam possíveis o *scale-up* e a simulação do rendimento da extração alterando as condições experimentais como, por exemplo, volume do extrator, porosidade do leito, vazão de CO<sub>2</sub>, entre outras.

Dessa forma, o processo com fluido supercrítico é tecnicamente viável na extração da licopodina a partir da *Lycopodium clavatum* L..

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A fim de complementar o estudo realizado, fica a sugestão quanto à realização de testes com extrato de *Lycopodium clavatum* L. para avaliação e comparação (com extratos obtidos por métodos convencionais) de suas propriedades farmacológicas como, por exemplo, atividades anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, entre outras. Além disso, a exploração de técnicas de análise poderia contribuir na identificação e quantificação dos compostos presentes no extrato além da licopodina. O fracionamento do extrato com fluido supercrítico pode ser uma ferramenta para concentração ou isolamento da licopodina e outros compostos de interesse.

Outra possibilidade de estudo é a utilização da técnica de extração supercrítica para outras pteridófitas, uma vez que elas ainda são pouco exploradas, apresentam potencial farmacológico e não são encontrados dados na literatura relativos ao uso de fluidos supercríticos para o seu processamento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYER, W.A. The *Lycopodium* alkaloids. **Natural product Reports**. p. 455-463, 1991.

BAHRAMIFAR, N; Yamini, Y.; Shamsipur, M. Investigation on the supercritical carbon dioxide extraction of some polar drugs from spiked matrices and tablets. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 35, p. 205–211, 2005.

BARROS NETO, B. de; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1996. p. 165-186.

BARTLE, K.D.; Clifford, A.A.; Hawthorne, S.B.; Langenfeld, J.J.; Miller, D.J.; Robinson, R. A Model for Dynamic Extraction Using a Supercritical Fluid. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 3, p. 143-149, 1990.

BISHAYEE, K.; Chakraborty, D.; Ghosh, S.; Boujedaini, N.; Khuda-Bukhsh, A.R. Lycopodine triggers apoptosis by modulating 5-lipoxygenase, and depolarizing mitochondrial membrane potential in androgen sensitive and refractory prostate cancer cells without modulating p53 activity: signaling cascade and drug-DNA interaction. **European Journal of Pharmacology**. v. 698, p. 110-121, 2013.

BONATO, P.S. Cromatografia gasosa. In: Carol H. Collins; Gilberto Leite Braga. (Org.). **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1988. p. 168-173.

BRISKIN, D.P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiology**, v. 124, n°2, p. 507-514, October 2000.

BULLEY, N.R.; Fattori, M.; Meisen, A.; Moyls, L. Supercritical Fluid Extraction of Vegetable Oil Seeds. **JAOCS**, v. 61, nº 8, p. 1362-1365, 1984.

CASSEL, E.; Vargas, R.M.F.; Brun, G.W. Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais. In: Eduardo Cassel; Leandro Machado Rocha. (Org.). **Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008. p. 213-228.

CASTRO, M.D.L. de; Jurado-Lopez, A.; Luque-Garcia, J.L. Drug Extraction. In: Peter York, Uday B. Kompella, and Boris Y. Shekunov. (Org.). **Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development**. Informa Healthcare, 2004. p. 1-2, 9-16.

CHEMAXON. Disponível em:< <http://www.chemicalize.org>>. Acesso em: 28 jan 2013.

CHOI, Y.H.; Chin, Y.W.; Kim, J.; Jeon, S.H.; Yoo, K.P. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. **Journal of Chromatography A**. v. 863, p. 47-55, 1999.

CHOI, Y.H.; Kim, J.; Kim, J.Y.; Joung, S.N.; Yoo, K.P.; Chang, Y.S. Modifier effects on supercritical CO<sub>2</sub> extraction efficiency of cephalotaxine from *Cephalotaxus wilsoniana* leaves. **Archives of Pharmacal Research**. v. 23, p. 163-166, 2000.

CLIFFORD, T. **Fundamentals of supercritical fluids**. New York, NY: Oxford University Press, 1999. p. 1, 83-85.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. New York, NY: Oxford University Press. 2 ed. 1975. p. 60-61.

CROTEAU, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DE LUCA, V.; St Pierre, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**. v. 5, p. 168-173, 2000.

DINIZ, A.C.B.; Astarita, L.V.; Santarém, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n°2, p. 442-450, São Paulo Apr./June 2007.

ESQUÍVEL, M.M.; Bernardo-Gil, M.G.; King, M.B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 16, p. 43-58, 1999.

FALAVIGNA, T.J. **Diversidade, formas de vida e distribuição altitudinal das pteridófitas do Parque da Ferradura, Canela (RS), Brasil**. 2002. 106 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2002.

FALKENBERG, M.; Santos, R.; Simões, C. Introdução à análise fitoquímica. In: Cláudia Maria Oliveira Simões et al. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS – UFSC, 2003. p. 234.

FOUST, A. S.; Wenzel, L. A.; Clump, C.W.; Maus, L.; Anderson, L. B. **Principles of Unit Operations**. John Wiley & Sons: New York, 1980, 2ª Ed.

GASPAR, F.; Lu, T.; Santos, R.; Al-Duri, B. Modelling the Extraction of Essential Oils with Compressed Carbon Dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 25, 2003, p. 247-260.

HENRIQUES, A.T.; Kerber, V.A.; Moreno, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Cláudia Maria Oliveira Simões et al. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS – UFSC, 2003. p. 765-788.

JUDD, Walter S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p. 187-190.

KIM, J.; Choi, Y.H.; Yoo, K.P. Supercritical fluid extraction of alkaloids. In: S. William Pelletier (Org.). **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives**. v. 15, p. 415-431, 2001.

KONRATH, E.L.; Neves, B.M.; Lunardi, P.S.; Passos, C.S.; Simões-Pires, A.; Ortega, M.G.; Gonçalves, C.A.; Cabrera, J.L.; Moreira, J.C.F.; Henriques, A. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 58–67, 2012.

KOVAR, K.; RUF, C.O.L.; Beuerle, G.; Schenkel, E.P.; Bergold, A.M.; Oliveira, S.Q. de. **Identificação de fármacos**. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 33-39.

LAGARIAS, J.C.; Reeds, J.A.; Wright, M.H.; Wright P.E. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. **SIAM Journal of Optimization**, v. 9, p. 112-147, 1998.

LIU, J.S.; Zhu, Y.L.; Yu, C.M. The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 64, p. 837-839, 1986.

LOOSER, G.; Rodríguez, R. Los helechos medicinales de Chile y sus nombres vulgares. **Gayana Botanica**, v. 61, p. 1-5, 2004.

MA, X; Gang, D. The *Lycopodium* alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 752-772, 2004.

MA, X.; Tan, C.; Zhu, D.; Gang, D.R. A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 54-67, 2006.

MACIA, M.J. A comparison of useful Pteridophytes between two amerindian groups from Amazonian Bolivia and Ecuador. **American Fern Journal**, v. 94, p. 39-46, 2004.

MANDAL, S.K.; Biswas, R.; Bhattacharyya, S.S.; Paul, S.; Dutta, S.; Pathak, S.; Khuda-Bukhsh, A.R. Lycopodine from *Lycopodium clavatum* extract inhibits proliferation of HeLa cells through induction of apoptosis via caspase-3 activation. **European Journal of Pharmacology**. v. 626, p. 115-122, 2010.

MONTGOMERY, D.C.; Runger, G.C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

MUKHOPADHYAY, Mamata. **Natural extracts usign supercritical carbon dioxide**. Boca Raton: CRC, 2000. p. 2-3, 11-28.

NAVARRETE, H.; León, B.; Gonzáles, J.; Aviles, D.K.; Lecaro, J.S.; Mellado, F.; Alban, J.; Øllgaard, B. Helechos. **Botánica Económica de los Andes Centrales**, p. 385-411, 2006.

ØLLGAARD, B. A revised classification of the Lycopodiaceae s. l. **Opera Botanica**. v. 9, p. 153-178, 1987.

ØLLGAARD, B. & Windisch, P.G. Sinopse das Lycopodiáceas do Brasil. **Bradea**. v. 5, p.1-43, 1987.

ØLLGAARD, B. Neotropical Lycopodiaceae – an overview. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 79, p. 687-717, 1992.

ØLLGAARD, B. Lycopodiaceae. In: R.M. Tryon & R.G. Stolze (eds.). **Pteridophyta of Peru. Part VI: Marsileaceae-Isoetaceae**. Fieldiana (Botany). p. 16-66, 1993.

ØLLGAARD, B. Diversity of *Huperzia* (Lycopodiaceae) in Neotropical Montane Forests. In: S. P. Churchill (ed.). **Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forests**. New York, The New York Botanical Garden, 1995. p. 349-358.

ØLLGAARD, B. Neotropical *Huperzia* (Lycopodiaceae) – distribution of species richness. In: J.M. Camus; M. Gibby & R.J. Johns (eds.). **Pteridology in Perspective**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1996. p. 93-100.

ORHAN, I.; Küpeli, E.; Sener, B.; Yesilada, E. Appraisal of anti-inflammatory potential of the clubmoss, *Lycopodium clavatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 146-150, 2006.

ORHAN, I.; Ozcelik, B.; Aslan, S.; Kartal, M.; Karaoglu, T.; Sener, B.; Terzioglu, S.; Choudhary, M. Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p.189-196, 2007.

RAMOS, C.G.V.; Sylvestre, L.S.. Lycopodiaceae no Parque Nacional do Itatiaia, RJ e MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 1, Mar. 2010.

RAVEN, P.H. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996. p. 294-323.

REVERCHON, E.; Donsi, G.; Sesti Osséo, L. Modeling of Supercritical Fluid Extraction from Herbaceous Matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, p. 2721-2726, 1993.

REVERCHON, E. Mathematical Modelling of Supercritical Extraction of Sage Oil,. **AIChE Journal**, v. 42, 1765, p. 1765–1771, 1996.

REVERCHON, E. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Essential Oils and Related Products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p.1-37, 1997.

SAMADDER, A.; Das, S.; Das, J.; Paul, A.; Boujedaini, N.; Khuda-Bukhsh, A.R. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 4, p. 180-187, 2013.

SANTOS, R.I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Cláudia Maria Oliveira Simões et al. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS – UFSC, 2003. p. 403-434.

SEABRA, I.J.; Braga, M.E.M.; Sousa, H.C. de. Statistical mixture design investigation of CO<sub>2</sub>–Ethanol–H<sub>2</sub>O pressurized solvent extractions from tara seed coat. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 64, April 2012, p. 9–18.

SHARAPIN, N. Materias Primas Vegetales para la Industria de Productos Fitoterapéuticos. In: Eduardo Cassel; Leandro Machado Rocha. (Org.). **Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008a. p. 1-8.

SHARAPIN, N. Extracción de los alcalóides. In: Eduardo Cassel; Leandro Machado Rocha. (Org.). **Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008b. p. 46-56.

SOARES, R. de P.; SECCHI, A.R. EMSO: A New Environment for Modelling, Simulation and Optimisation. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 14, p. 947-952, 2003.

SOVOVÁ, H. Rate of Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modelling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H.; Opletal L.; Bártlová, M.; Sajfřtová, M.; Křenková, M. Supercritical fluid extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, n.1, p. 88-95, 2007.

STRYJEK, R.; Vera, J. H. PRSV: An Improved Peng –Robinson Equation of State for Pure Compounds and Mixtures. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 64, p. 233-333, 1986.

TAYLOR, L.T. **Supercritical fluid extraction**. New York, NY: J. Wiley, 1996. p. 1-3, 45-47.

TRYON, R.M; Tryon, A.F. **Ferns and allied plants: with special reference to tropical america**. New York, NY: Springer, 1982. p. 797-808.

VILLERMAUX, J, Chemical Engineering Approach to Dynamic Modelling of Linear Chromatography, **Journal of Chromatography A**, v.406, p.11-26,1987.

WINDISCH, P. G. **Pteridófitas da Região Norte-Occidental do Estado de São Paulo**. 2. ed. São José do Rio Preto: UNESP, 1992.

## **ANEXOS**

## ANEXO A: CROMATOGRAMAS

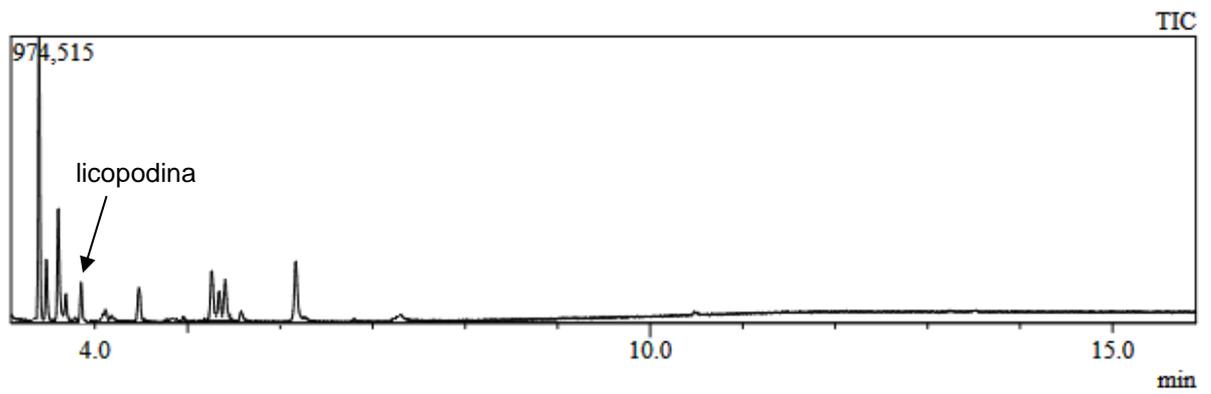


Figura A.1. Cromatograma do extrato LC 1.

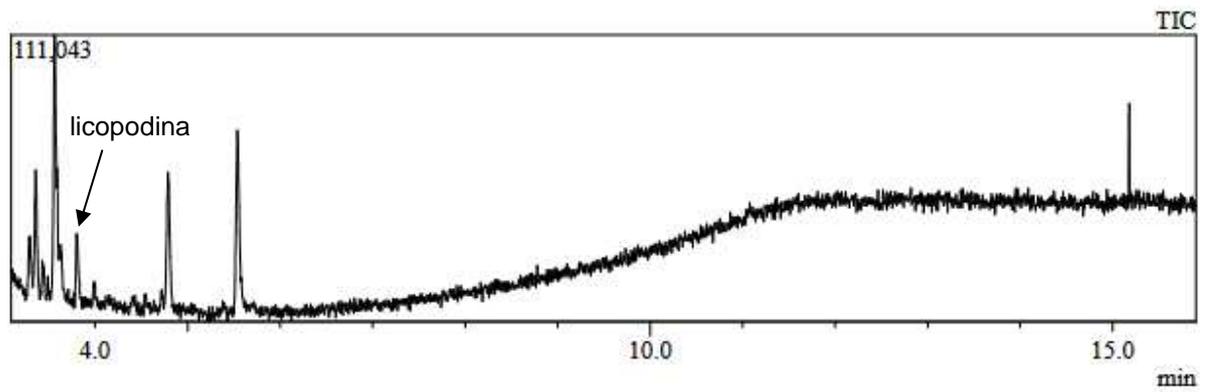


Figura A.2. Cromatograma do extrato LC 2.

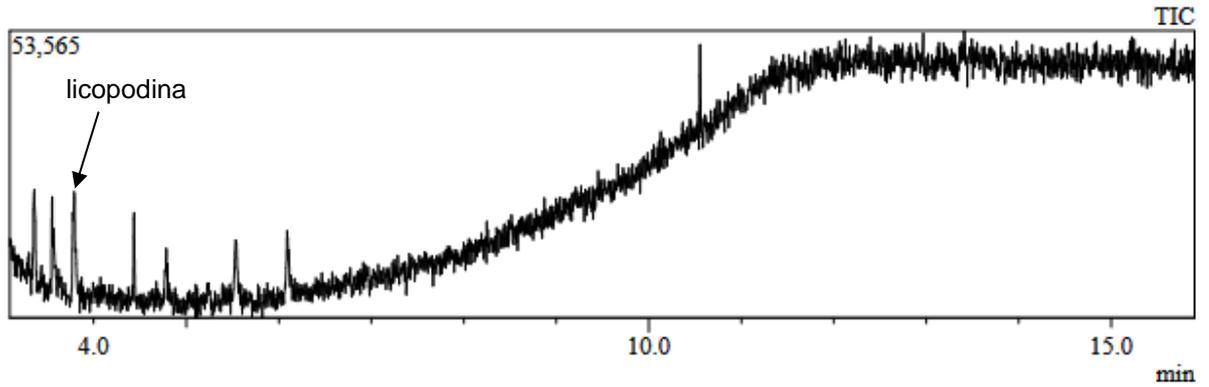


Figura A.3. Cromatograma do extrato LC 3.

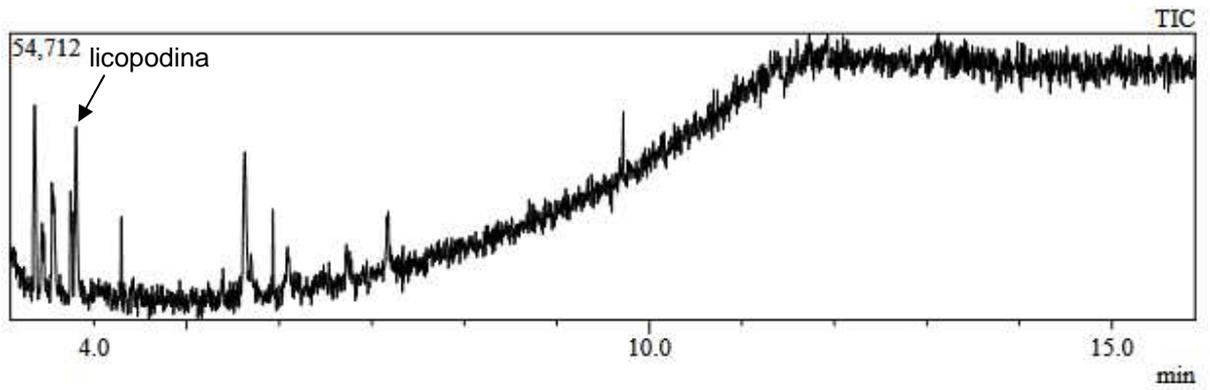


Figura A.4. Cromatograma do extrato LC 4.

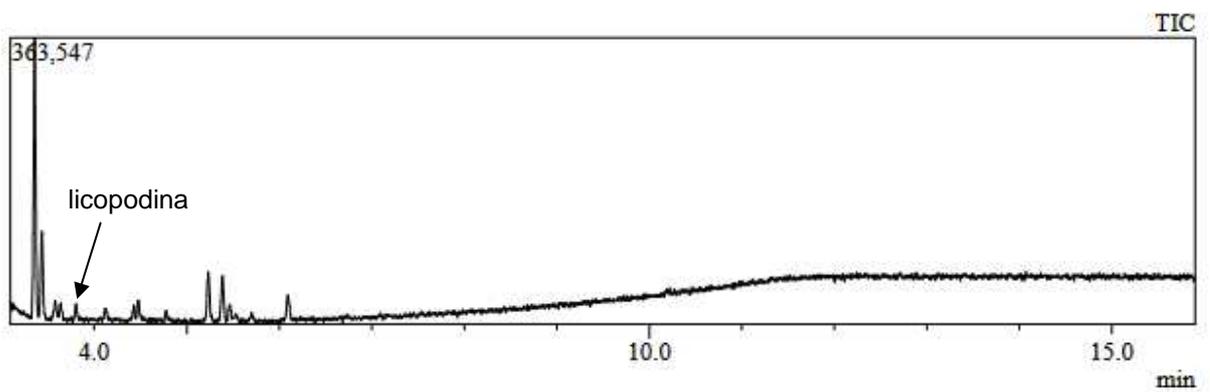


Figura A.5. Cromatograma do extrato LC 5.

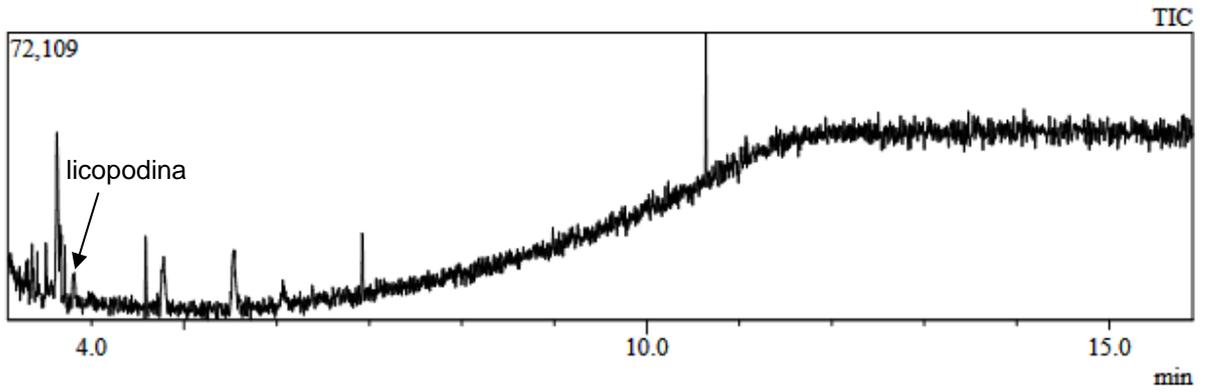


Figura A.6. Cromatograma do extrato LC 6.

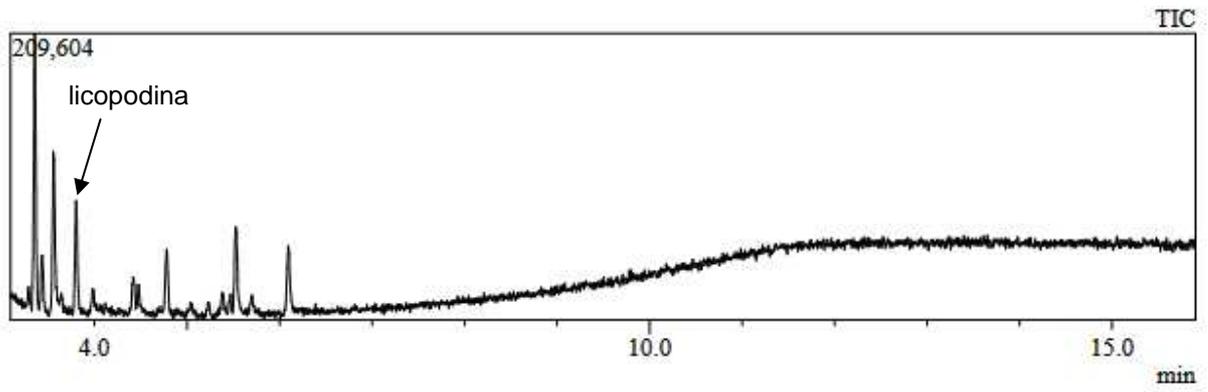


Figura A.7. Cromatograma do extrato LC 7.

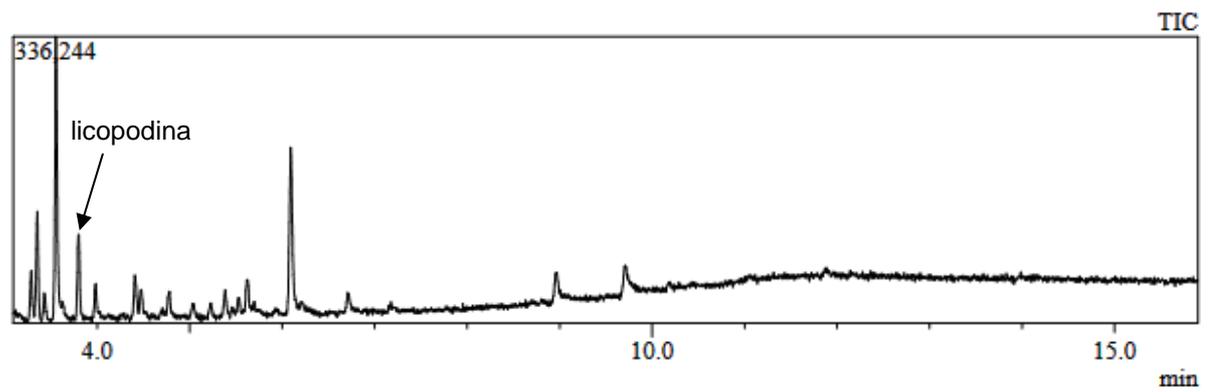


Figura A.8. Cromatograma do extrato LC 8.

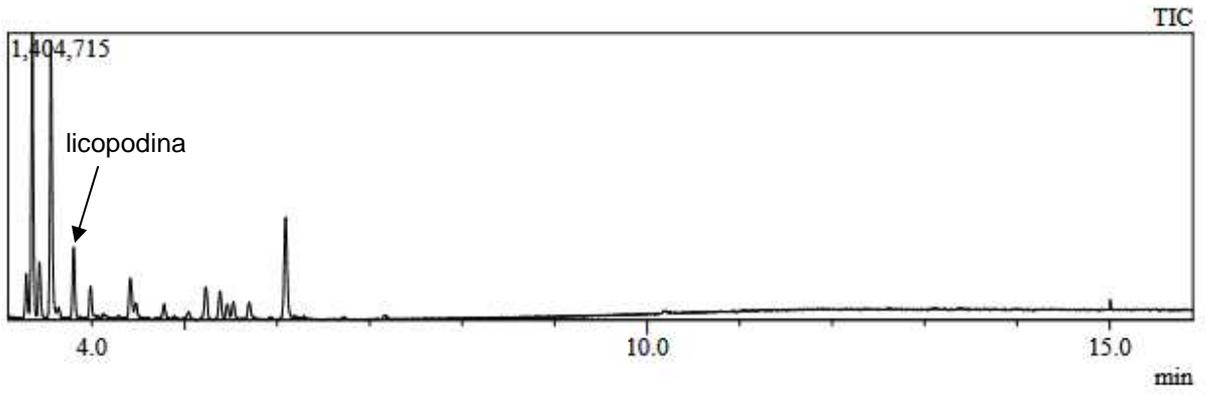


Figura A.9. Cromatograma do extrato LC 9.

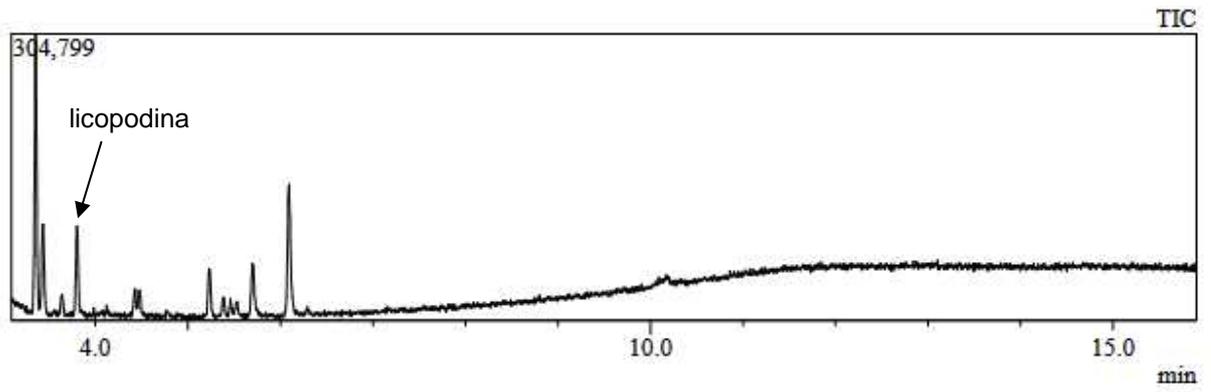


Figura A.10. Cromatograma do extrato LC 10.

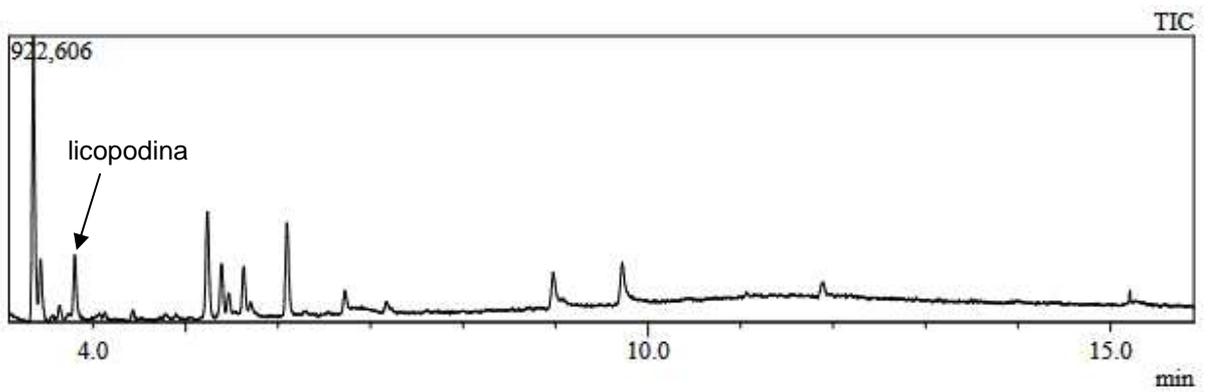


Figura A.11. Cromatograma do extrato LC 11.

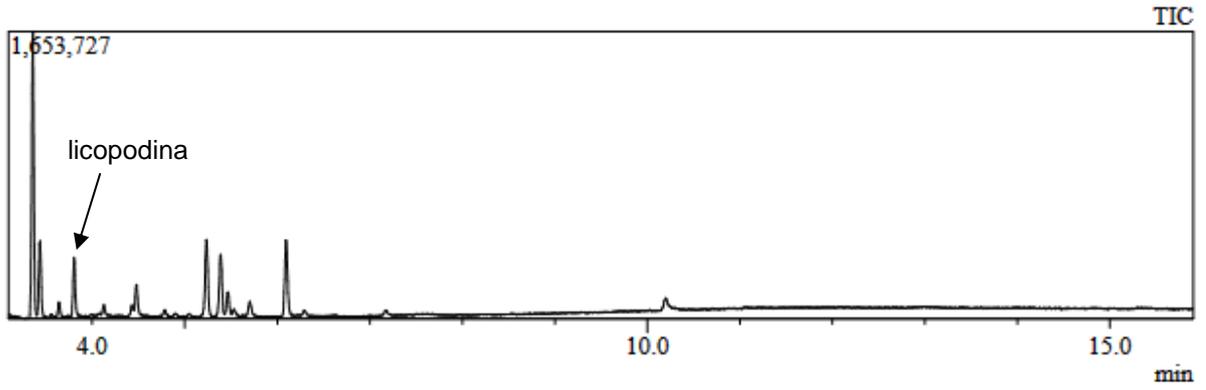


Figura A.12. Cromatograma do extrato LC 12.

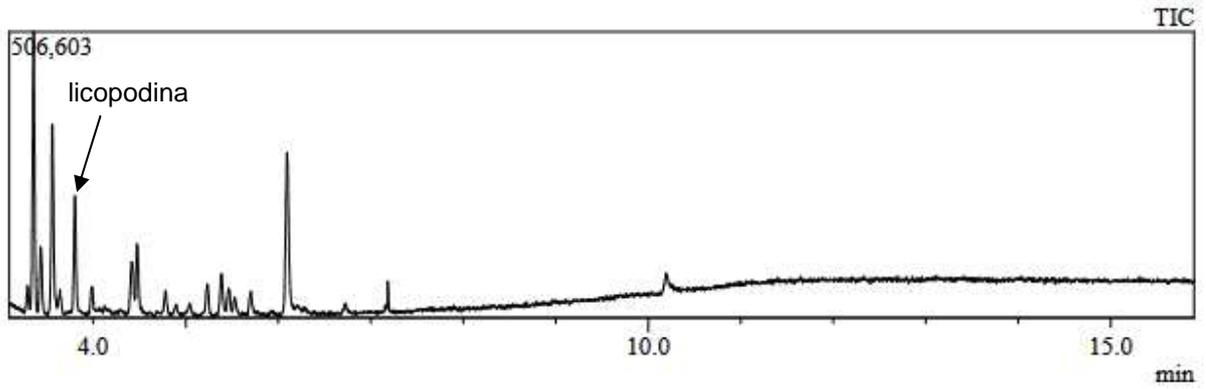


Figura A.13. Cromatograma do extrato LC 13.

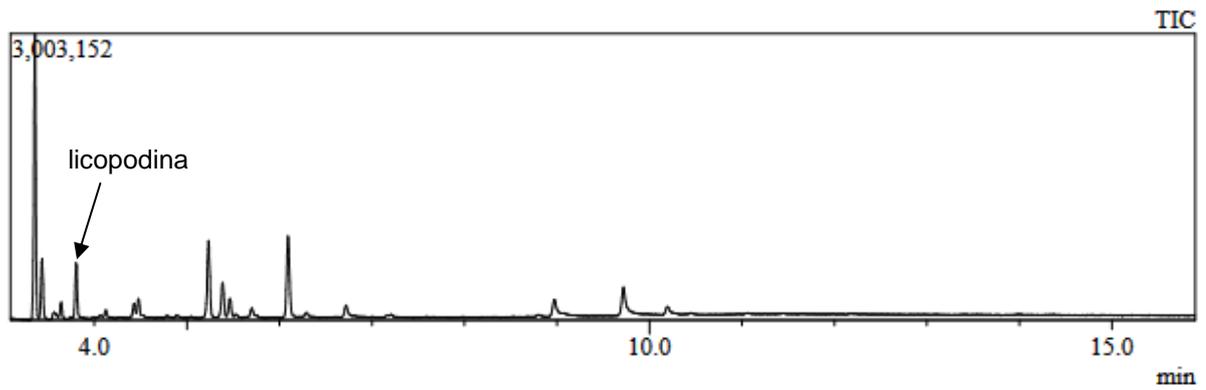


Figura A.14. Cromatograma do extrato LC 14.

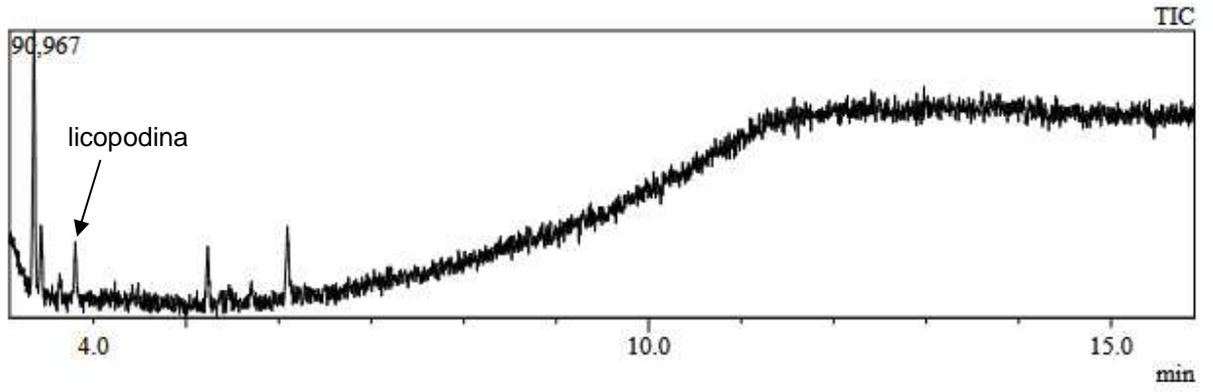


Figura A.15. Cromatograma do extrato LC 15.