



DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MANOOL A
PARTIR DE *SALVIA OFFICINALIS*.

Alan Seigneur Alonso

Monografia em Engenharia Química

Orientadores

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
Claudia Moraes de Rezende, D.Sc.

Agosto de 2017

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE MANOOL A PARTIR DE SALVIA
OFFICINALIS.**

Alan Seigneur Alonso

Monografia em engenharia química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Thaís Matsue Uekane, D.Sc.

Ivaldo Itabaiana Junior, D.Sc.

Joselia Alencar Lima, D.Sc.

Orientado por:

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Claudia Moraes de Rezende, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Agosto de 2017

Alonso, Alan Seigneur.

Desenvolvimento do método de extração e purificação de manool a partir de *Salvia officinalis*./Alan Seigneur Alonso. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017. viii, 57 p.; il

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Cláudia Moraes de Rezende

1. Manool. 2. *Salvia officinalis*. 3. Extração sólido-líquido. 4. Monografia (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Selma Gomes Ferreira Leite e Cláudia Moraes de Rezende I. Título.

São as questões que não podemos responder que mais nos ensinam.
Elas nos ensinam como pensar.
Se você der a um homem uma resposta, tudo que ele ganha é um fato.
Mas dê a ele uma questão e ele vai procurar pela sua própria resposta.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ana Paula, pois sem sua dedicação à minha educação, sem seu estímulo ao meu raciocínio e sem o seu apoio, não haveria nesse momento pelo que agradecer.

Aos meus irmãos Lucas e Andre, por me fazerem desligar da faculdade e descansar quando era necessário. Ao meu padrasto João, por completar essa grande, confusa, agitada e amada família.

À minha avó Maira, cujo amor por viagens vem sendo passado de geração em geração, me inspirou e inspirará por toda minha vida a buscar novas aventuras.

Ao meu avô pelas nossas conversas na sala. E a toda minha família, minhas tias e tios, primos e primas, cuja companhia marcou minha infância e vai continuar marcando toda a minha vida.

Ao meu pai Pablo que participou da minha criação e tanto me inspirou a pensar.

À minha namorada Joana, a quem eu tanto amo e admiro, cuja importância do auxílio, apoio, motivação e companhia não podem ser mensurados.

Aos meus amigos da faculdade, que apesar de todos estudos de véspera em noites viradas, integraram (sequelas de Cálculo 1) uns dos melhores anos da minha vida.

Aos meus amigos também de fora da faculdade, por me ensinarem a abrir meus horizontes, ter empatia, respeitar e valorizar todas as diferenças individuais.

À professora Claudia Moraes de Rezende, minha orientadora, mentora, por ter me reintroduzido ao mundo da química, e ter confiado tanto em mim quanto que um engenheiro não explodiria o laboratório.

À professora Selma Gomes Ferreira Leite, minha orientadora, por toda a ajuda em horas tão críticas.

À toda equipe do Laboratório de Aromas por todo o auxílio prestado e toda paciência. Em especial ao Fábio pela ajuda constante, sempre tirar as minhas dúvidas e acreditar tanto em mim.

Aos grandes químicos, físicos, matemáticos, biólogos e filósofos da história que ajudaram a tornar a Ciência algo tão divertido e interessante para mim.

A todos meus professores, do ensino fundamental à faculdade, por despertarem em mim o amor pela ciência, me instigarem à querer saber mais, e em alguns casos me obrigarem a buscar esse conhecimento sozinho.

A todas pessoas que passaram pela minha vida com diferentes níveis de importância, por contribuírem pro amalgama de experiência que compõe quem eu sou hoje.

À banca por aceitar o meu convite.

E à BIORIO pelo apoio financeiro.

Resumo da monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MANOOL A PARTIR DE *SALVIA OFFICINALIS*.

Alan Seigneur Alonso

Agosto, 2017

Orientadores: Prof^a Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
Prof^a Cláudia Moraes de Rezende, D.Sc

Há séculos que a sálvia (*Salvia officinalis*) é conhecida e utilizada por suas propriedades medicinais, tendo seu próprio nome derivado de *salvare*, salvar em latim. Não é de se espantar portanto que pesquisas tenham atribuído a sálvia uma gama de diferentes atuações benéficas para o nosso organismo, desde características bactericidas até avanços contra a doença de Alzheimer. Sendo o constituinte majoritário do óleo essencial de sálvia, é natural que o manool possa ser relacionado com algumas dessas propriedades, além de ter também espaço em outras indústrias, como a de *flavours*. Contudo, pesquisas esbarram na necessidade de extrair o manool, muitas vezes obtendo baixos rendimentos. Com isso em mente, buscou-se desenvolver e otimizar um método reprodutível para a extração de manool a partir de *Salvia officinalis*. A matriz vegetal de sálvia seca foi preparada sendo moída. Testou-se extração direta a quente e extração Soxhlet antes de definir que aquela com melhor rendimento foi a extração direta a quente. Então, com o auxílio dos parâmetros de Hansen e de um planejamento experimental, foram realizados testes para a definição do solvente e dos parâmetros extrativos, quando definiu-se a utilização de etanol, à 69°C, por 2h, com uma razão 6:1 entre volume de solvente (ml) e massa de matriz vegetal (g). Em sequência, foi feita uma extração líquido-líquido para remoção dos lipídeos polares, com metanol e água 9:1, e hexano, no qual o manool poderia ser encontrado. A fase de interesse então seguiu para a realização de uma coluna cromatográfica em coluna sob pressão, com fase estacionária de sílica gel 60, e fase móvel de 5% de acetato de etila em hexano. O eluato foi analisado por CG-EM para a seleção das frações de interesse, e encaminhados para uma nova coluna cromatográfica sob pressão, com a mesma fase estacionária, mas fase móvel em gradiente de hexano até alcançar 1% de acetato de etila em hexano. A seleção das frações desejadas foi novamente realizada por CG-EM, e por fim o material de interesse foi reunido e levado para uma cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE). Nesta última etapa, a fase estacionária foi uma coluna Luna 5 µm C18 e fase móvel de acetonitrila. Foi obtido no eluato manool com uma pureza de 93,59%. O processo foi repetido para realizar um acúmulo de massa de manool, permitindo que este seja encaminhado para novas pesquisas.

Palavras chave: Manool, *Salvia officinalis*, Extração Sólido-Líquido.

ABSTRACT

For centuries the common sage (*Salvia officinalis*) is known and used for its medical properties, having its own name derived from *salvare*, the Latin word for “save”. Therefore it is no surprise that researches had attributed to the sage a range of different beneficial applications to our organism, from bactericide characteristics to uses against Alzheimer’s disease. Being the principal component in the sage’s essential oil, it is only natural that Manool may be related to some of those properties, also having its place in other industries, as the flavor one. Yet, researchers stumbles in the need to extract the Manool, many times obtaining low yield. With that in mind, it was sought to develop and optimize a reproducible method for the extraction of manool from *Salvia officinalis*. The dried aerial parts of sage were grounded. We tested direct hot extraction and Soxhlet extraction, before observing that the one with the better yield was direct hot extraction. Then, with the help of Hansen’s parameters and experimental planning, tests were made to define the solvent and the extraction parameters, ethanol at 69°C for 2h, with a 6:1 ration between solvent volume (ml) and amount of sage (g). The next step was doing an liquid-liquid extraction, to remove polars lipids, with methanol and water 9:1, and hexane, being the later where manool could be found. The phase of interest moved on to a flash column liquid chromatography, with stationary phase of silica gel 60, and mobile phase of 5% ethyl acetate in hexane. The eluate were analysed by GC-MS for the selection of fractions of interest, that was forwarded to another flash column liquid chromatography with the same stationary phase, but a gradient mobile phase from hexane to 1% ethyl acetate in hexane. The selection of the fractions desired were once again done by GC-ME, and finally the material of interest were reunited and taken to an preparative high performance liquid chromatography (HPLC). In this final stage, the stationary phase were Luna 5 µm C18, and the mobile phase acetonitrile. It was obtained in the eluate Manool with 93,59% purity. The process was repeated 4 times in order to accumulate mass, allowing it to be forwarded to another researches.

Key words: Manool, *Salvia officinalis*, Solid-liquid extraction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. Sálvia	9
1.1.1. Registros Históricos.....	9
1.1.2. Características gerais	9
1.1.3. Usos atuais.....	10
1.1.4. Composição da sálvia	13
1.2. Terpenos e terpenoides	14
1.2.1. Estrutura e formação.....	15
1.2.2. Usos de terpenos e terpenoides.....	17
1.3. Manool.....	19
1.3.1. Características gerais	19
1.3.2. Usos atuais.....	19
1.3.3. Isolamento de Manool	20
1.4. Parâmetros de solubilidade de Hansen	21
2. OBJETIVOS.....	25
Capítulo 1: Desenvolvimento da Metodologia.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Materiais utilizados.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.1. Aparelhagem.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.2. Matéria prima e solventes.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.3. Equipamentos	Error! Bookmark not defined.
3.2. Preparação da matriz vegetal	26
3.3. Pesquisa bibliográfica sobre a extração	26
3.4. Escolha do tipo de Extração Sólido – Líquido	26
3.5. Escolha do solvente	26
3.6. Planejamento experimental.....	27
3.7. Análise univariável solvente/amostra	29
3.8. Aumento de escala da extração.....	29
3.9. Extração Líquido-Líquido.....	29
3.10. Pesquisa bibliográfica sobre a purificação.....	30
3.11. Primeira Coluna Cromatográfica (C.C.1)	30
3.12. Segunda Coluna Cromatográfica (C.C.2)	30
3.13. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	31

3.14.	Métodos de análise	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.	Pesquisa bibliográfica sobre a extração	33
4.2.	Escolha do tipo de extração Sólido-Líquido	33
4.3.	Escolha do Solvente	36
4.4.	Planejamento experimental	36
4.5.	Análise univariada solvente/sálvia	38
4.6.	Pesquisa bibliográfica	39
4.7.	Segunda coluna cromatográfica (C.C.2)	40
4.8.	CLAE preparativo	41
	Capítulo 2: Acúmulo de massa de manool	43
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1.	Materiais	Error! Bookmark not defined.
5.1.1.	Aparelhagem	Error! Bookmark not defined.
5.1.2.	Matéria prima e solventes	Error! Bookmark not defined.
5.1.3.	Equipamentos	Error! Bookmark not defined.
5.2.	Preparo da matriz vegetal	43
5.3.	Extração Sólido-Líquido	43
5.4.	Extração Líquido-Líquido	43
5.5.	Primeira Coluna Cromatográfica (C.C.1)	43
5.6.	Segunda Coluna cromatográfica (C.C.2)	44
5.7.	CLAE	45
5.8.	Métodos de análise	45
6.1.	Extração Sólido-Líquido da sálvia	46
6.2.	Extração Líquido-Líquido do extrato de sálvia	46
6.3.	Primeira Coluna Cromatográfica (C.C.1)	46
6.4.	Segunda Coluna Cromatográfica (C.C.2)	47
6.5.	Cromatografia líquida de alta eficiência	47
6.6.	Resumo geral das condições do processo	48
6.7.	Reaproveitamento de solventes	49
6.8.	Eficiência total do projeto	49
6.9.	Análise Econômica	50
7.	CONCLUSÃO E PROJEÇÕES FUTURAS	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO E PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

1.1. Sálvia

1.1.1. Registros Históricos.

Não é incomum que plantas e ervas utilizadas na atualidade sejam conhecidas desde a idade antiga, e este é o caso da Sálvia, presente na história da humanidade desde o Egito antigo. Considerado um dos primeiros e mais importantes tratados médicos do mundo, o Papiro de Ebers (aproximadamente 1500 A.C.) contém o primeiro registro da planta que era usada contra dores estomacais, coceiras e até mesmo asma.

Já na Grécia antiga, o filósofo grego reconhecido como pai da botânica, Theophrastus (371-287 A.C.), em seu livro “*Historia Plantarum*”, documentou pela primeira vez o uso da sálvia, cujo nome grego na época era referente a suas propriedades adstringentes. (Andrews, A. 1956)

Referências posteriores ocorreram logo no império romano, primeiramente com Dioscorides, médico militar do exército do imperador Nero, que escreveu “*De Materia Medica*” em 77 D.C. também explicitando o uso da sálvia. Em sequência, seu contemporâneo Pliny, “o Ancião”, também documentou o uso da sálvia.

Alguns séculos depois, a grande figura histórica tida como pai da Europa, Carlos Magno (742-814), ordenou que determinadas plantas medicinais fossem cultivadas em seu império, dentre as quais se destacava a sálvia, cujo nome se origina da palavra em latim *salvare*, que significa “cura”. Até os dias de hoje, a sálvia comum é uma planta encontrada em monastérios católicos (Bauer-Petrovska, B, 2012).

1.1.2. Características gerais

Até hoje, sálvia é o nome popular atribuído a algumas ervas do gênero *Salvia*, maior gênero (com mais de 900 espécies diferentes) da família *Lamiaceae*, mas em especial para a sálvia comum, de nome científico *Salvia officinalis*. Ao longo deste documento, “sálvia” irá se referir à *Salvia officinalis*, a menos que seja indicado o contrário.

Devido a sua distribuição mundial, o gênero *Salvia* é considerado um gênero cosmopolita (Walker, J. et al, 2004), tendo espécies naturais na Europa mediterrânea, sul e norte da África, Oriente Médio, China, EUA e América Latina.

A sálvia é uma planta em forma de arbusto de até 80cm, com folhas acinzentadas e flores azuladas, endêmica da Europa mediterrânea e norte da África, justificando assim os seus primeiros registros históricos.

Apesar de não ser endêmica no Brasil, ela já pode ser encontrada em estados do sul e sudeste brasileiro, tendo se adaptado melhor ao clima mais ameno, com maiores semelhanças à Europa mediterrânea (Figura 1).

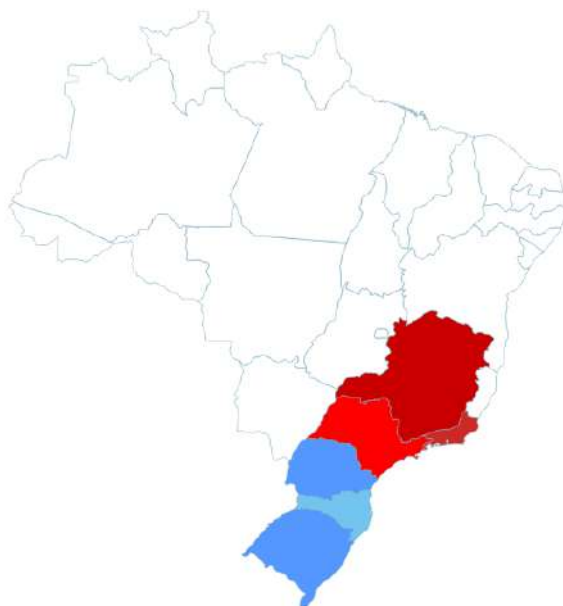


Figura 1: Distribuição geográfica da Sálvia no Brasil. As diferentes cores indicam apenas regiões e estados diferentes. Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

É interessante observar também que dentro da família Lamiaceae encontram-se outras plantas muito presentes no nosso dia-a-dia, como o manjericão (*Ocimum basilicum*), menta (todas as espécies englobadas no gênero *Mentha*), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*), orégano (*Origanum vulgare*) e lavanda (*Lavandula angustifolia*), como podemos observar na Figura 3. Observamos portanto, como padrão das *Lamiaceae*, plantas de pequeno porte com folhas simples.

1.1.3. Usos atuais

Atualmente, a área de destaque na utilização de sálvia é relacionada à fitoterapia, onde pesquisas vêm explorando a atuação do óleo essencial no corpo humano como forma de combate a diversas doenças comuns hoje em dia. O uso de materiais naturais deste tipo é comumente visto com bons olhos (tendo sido provada a sua eficiência) tanto para a comunidade médica, quando para o público em geral.

Dentre as atribuições da sálvia, uma das mais comuns é a sua ampla capacidade bactericida. Diversos estudos foram realizados para explorar o uso da sálvia no combate a bactérias. Sua importância (assim como a de outros tratamentos alternativos e outros óleos essenciais) é inflada devido à crescente proliferação de bactérias resistentes aos antibióticos mais comumente prescritos.

Um dos estudos observou as taxas de sobrevivência de bactérias tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial de sálvia. Os resultados mostraram que concentrações tão pequenas quanto 0,05% podem ser suficientes para inibir completamente determinadas bactérias, sendo 1% suficiente para inibir onze das catorze bactérias testadas, explicitando o caráter bactericida do óleo essencial de sálvia (Koga, T. et al, 1999).

Outro estudo explora o uso da sálvia em conjunto com outros antibióticos, buscando responder se a sálvia teria um efeito negativo (atrapalharia o antibiótico), positivo (ajudaria o antibiótico apenas por também ser bactericida), ou sinérgico (além de ser bactericida, trabalharia em conjunto com o antibiótico para possuir um efeito maior do que qualquer um dos dois separados). Neste artigo, o extrato de sálvia em acetona foi combinado com outro antibiótico (amoxicilina) e apresentou um efeito sinérgico (em oito das nove bactérias testadas), diminuindo substancialmente o MIC (*Minimal inhibitory concentration*, concentração inibitória mínima) em relação ao antibiótico ou extrato sozinho. Portanto, além de apresentar capacidade bactericida, a sálvia aumentou a efetividade do antibiótico usado em conjunto com ela (Stefanovic, O. et al, 2012).

Características anti-oxidantes da sálvia também foram exploradas, observando a capacidade do extrato de sálvia em diminuir a oxidação de água ao peróxido de hidrogênio em emulsões de água e óleo (mais suscetíveis à oxidação devido a sua maior área superficial). Além disso, também se experimentou adicionar um pouco do extrato a xícaras de chá, para o consumo humano. Painelistas em sua maioria conseguiram notar diferença entre as xícaras com e as sem o extrato, contudo, ainda assim (em sua maioria), consideraram o chá com extrato aceitável (Bakota, E. et al, 2015).

A sálvia também parece possuir um efeito ansiolítico. Em um estudo duplo-cego (teste onde nem os médicos nem os pacientes sabem quem está utilizando a droga ou o placebo, apenas ao final do experimento), pacientes sem nenhuma doença relevante foram selecionados. Durante o estudo, em determinados dias (com intervalos) os participantes

receberam o extrato de sálvia, e eram subjugados a um “estressor” (situação arquitetada para induzir o estresse), um teste online onde os indivíduos respondiam a testes e o tempo demorado para realizá-lo era contabilizado em pontos. Após o teste, uma série de perguntas eram feitas, e com bases nelas (um sistema validado pela academia) os valores de ansiedade eram observados. Os resultados mostraram que aqueles que foram tratados com 300mg de extrato de sálvia apresentaram menos estresse após a aplicação do teste (Kennedy, D. et al, 2006).

A sálvia novamente aparece com resultados promissores no campo da medicina quando se explora a hiperlipidemia (concentrações elevadas de lipídios no sangue). Em um estudo de 2006, pacientes tratados por dois meses com cápsulas de extrato de sálvia apresentaram diminuição de aproximadamente 20% nos níveis de LDL (*Low density cholesterol*, o colesterol prejudicial à saúde) e de triglicérides no sangue, além do aumento de HDL (*High density cholesterol*, o colesterol vantajoso à saúde) (Kianbakht, S. et al, 2011). Novamente o estudo foi duplo-cego. Esse resultado é especialmente relevante pois, atualmente, a maior causa de morte em países desenvolvidos são as doenças cardiovasculares (causadas por má alimentação e falta de exercício físico).

Outra doença que move grandes pesquisas é a doença de Alzheimer. Com apenas duas drogas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*, o órgão estadunidense responsável pelos medicamentos vendidos no país, equivalente à ANVISA no Brasil), a busca por tratamentos fitoterápicos é alta. Como a sálvia já havia demonstrado possuir uma atividade em receptores de acetilcolina (um neurotransmissor que sabidamente é reduzido na doença de Alzheimer), um estudo duplo-cego foi realizado para observar a resposta de pacientes com Alzheimer ao extrato, administrado em gotas. O teste foi completado com sucesso em 30 pessoas por 16 semanas e, ao final do teste, pacientes tratados com sálvia mostraram uma melhora significativa do aspecto cognitivo nos que possuíam doença de Alzheimer, avaliado segundo um *score* validado, como podemos observar na Figura 2 (Akhondzadeh, S. et al, 2003).

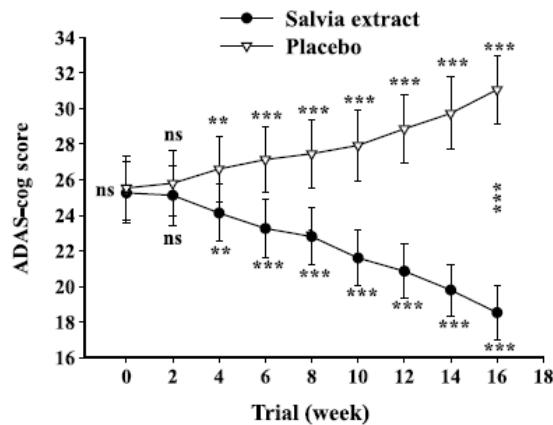


Figura 2: Nota ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive, escala cognitiva de avaliação da doença de Alzheimer) em relação ao número de semanas de uso do extrato. "ns" significa resultados não significantes, e as três estrelas a significância total. Fonte: *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial (Akhondzadeh, S. et al, 2003).

Outras pesquisas também ligam a sálvia à atividade antiinflamatória e à redução de níveis de glicose sanguínea em pacientes diabéticos e saudáveis, sendo sugerida ainda como uma possível forma de prevenção ao diabetes (Bower, A. et al, 2015).

Diante dos resultados obtidos ao longo de décadas de pesquisa, pode-se concluir que a sálvia apresenta uma gama de possíveis benefícios na área terapêutica, motivo pelo qual a sua composição química tornou-se alvo de diversos pesquisadores.

1.1.4. Composição da sálvia

Com tanto interesse ao redor da sálvia, diversos estudos buscam determinar sua composição. A título de exemplo, um dos estudos nesta área conseguiu identificar 29 diferentes substâncias no óleo essencial de sálvia (Pino, J. et al, 1997).

Tabela 1: Composição percentual dos constituintes encontrados na Sálvia. Fonte: Essential oil of Sage (*Salvia officinalis*) grown in Cuba (Pino, J. et al, 1997).

Substancia	Área relativa em CG-DIC
Manool	14,74
viridiflorol	13,46
α -tujona	12,95
β -tujona	10,89
Cânfora	10,36
α -humuleno	9,72
β -cariofileno	5,51
borneol	3,81
canfeno	2,48
acetato de α -fenchila	2,24
óxido de humuleno I	2,21
1,8-cineol	1,81
limoneno	1,69
α -felandreno	1,16
β -pineno	0,96
óxido de cariofileno	0,96
pulegona	0,86
α -pineno	0,81
<i>p</i> -cimeno	0,35
γ -terpineno	0,29
linalol	0,26
hexadecanoato de metila	0,26
terpinoleno	0,22
carvona	0,21
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	0,19
α -terpineno	0,12
mentona	0,11
9-octadecenoato de metila	0,11
(<i>Z</i>)-9-hexadecenoato de metila	0,06

Pode-se observar que o manool, um terpeno, foi o principal constituinte encontrado na análise. Compostos secundários, como viridiflorol, ambas as tujonas, cânfora, humuleno e outros também são terpenos, classe de substância que como visto compõe a maior parte do extrato.

1.2. Terpenos e terpenoides

1.2.1. Estrutura e formação

Terpenos e terpenoides são comumente encontrados como os principais constituintes em óleos essenciais. Em função deste processo de obtenção, tais compostos são utilizados sob forma de óleo há centenas de anos em diversas aplicações, abrangendo a medicina tradicional, como temperos, perfumes e outros.

Terpenos são alcenos abundantemente encontrados na natureza, seja na sua forma padrão de hidrocarboneto, seja com substituintes (como grupamentos acila, hidroxilas) que os tornem terpenoides. Ambos podem ser cíclicos ou não, e possuir cadeias com até 40 carbonos, contudo todos possuem pelo menos uma insaturação em sua estrutura.

Apesar de serem amplamente diversificados, todos terpenos e terpenoides seguem o que é conhecido como regra de isopreno. Desta forma, todos possuem em sua forma estrutural esqueletos de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), e podem ser considerados como produtos de junção cabeça-cauda entre unidades de isoprenos (carbono 4 de uma unidade com o carbono 1 de uma próxima unidade, Figura 3), na maioria das vezes, embora haja terpenos irregulares, que se unem em posições diferentes desta.

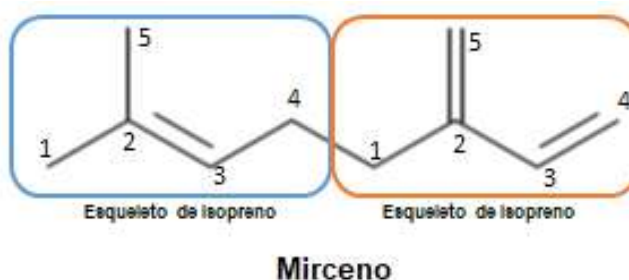


Figura 3: Demonstração da unidade de isopreno presente no mirceno, o terpeno mais simples.
Fonte: Química Orgânica vol 1, John McMurry tradução da 7ª edição 2011. Página 193

Contudo, esta forma de visualização não corresponde à realidade da formação (mais provável) do terpeno ou terpenoide nas plantas. Sua formação advém do difosfato de isopentila (IPP) e do seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), formado por ele mesmo através de uma reação catalisada por isomerase do IPP, como pode ser observado na Figura 4.

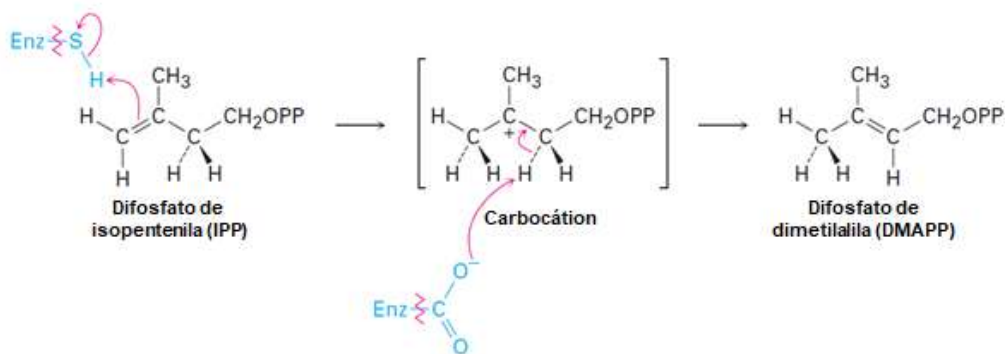


Figura 4: Reação de isomerização do IPP à DMAPP. OPP representa o íon difosfato. Fonte: Química Orgânica vol 2, John McMurry tradução da 7ª edição 2011. Página 1005

Como em uma polimerização, a reação entre IPP e DMAPP funciona como uma reação de iniciação, formando o difosfato de geranila (GPP). Adições sequentes de IPP irão aumentar o tamanho da cadeia terpênica. Essas reações são catalisadas pela sintase do difosfato de farnesila, e exigem a presença de íon Mg^{2+} .

Cadeias com 10 carbonos (proveniente da adição de IPP e DMAPP) são conhecidas como monoterpenos, que passam a ser sesquiterpenos (com 15 carbonos) caso haja uma nova adição de IPP. Havendo uma nova adição de IPP, teremos cadeias de 20 carbonos (diterpenos). Terpenos com 30 (triterpenos) e 40 (quadriterpenos) carbonos costumam ser formados pela dimerização dos sesquiterpenos e diterpenos. Podemos ver um modelo destas reações na Figura 5. Há ainda os sesterpenos, com 25 carbonos, menos comuns na natureza.

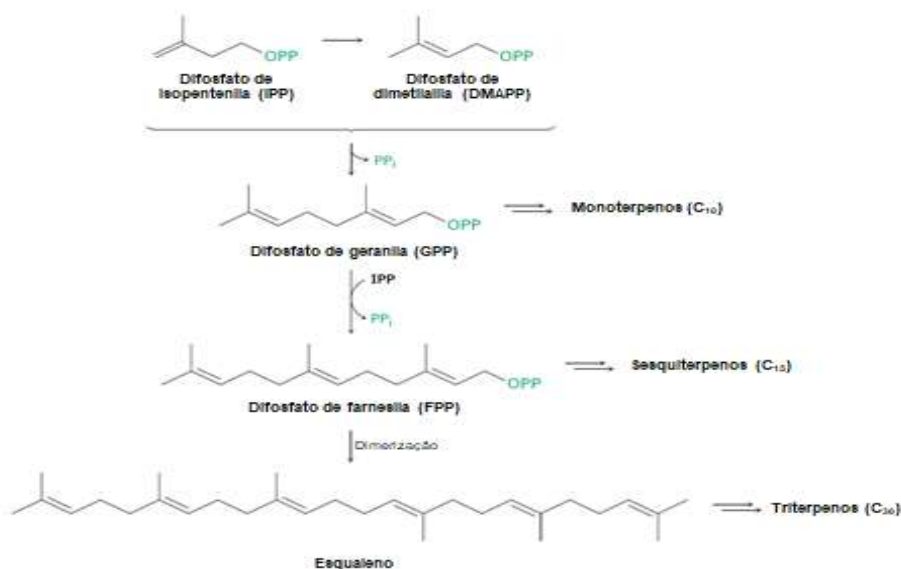


Figura 5: Reações de isomerização do IPP, formação de monoterpeno, adição de IPP, e dimerização. OPP representa difosfato e PP_i o íon pirofosfato. Fonte: Química Orgânica vol 2, John McMurry tradução da 7ª edição 2011. Página 1004

As reações necessárias para a obtenção de terpenos cíclicos ocorrem com auxílio da enzima terpeno ciclase, que isomeriza o difosfato de geranila em difosfato de linalina. Após a perda do grupo fosfato, gera-se um carbocátion intermediário que, com a sua estabilização, fecha a cadeia cíclica, gerando assim o limoneno, o terpeno cíclico mais simples (Fig. 6).

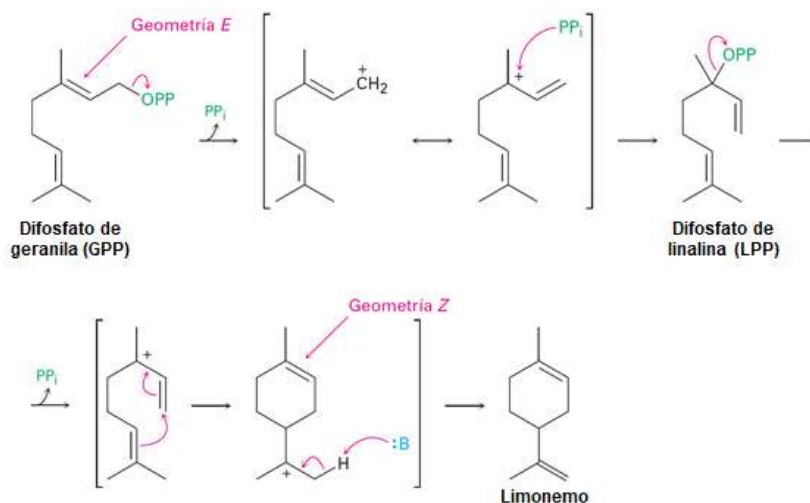


Figura 6: Reação de ciclização de um monoterpeneo. OPP representa difosfato e PP_i o íon pirofosfato. Fonte: Química Orgânica vol. 2, John McMurry tradução da 7ª edição 2011. Página 1006

A formação de outros terpenos e terpenoides mais complexos passará por sequências de reações de adição de IPP, dimerização, ciclização, além de etapas complementares para a adição de diferentes grupos funcionais. Moléculas mais complexas como esteróides hormonais (testosterona, progesterona, hidrocortisona, etc.) são baseadas em triterpenos cíclicos com funções altamente especializadas dentro do corpo humano.

Os terpenos mais leves, como monoterpeneos e sesquiterpenos, são comumente responsáveis por aromas e *flavours* presentes nos óleos essenciais, e são mais comumente encontrados em plantas. Terpenos mais pesados, como os diterpenos, são encontrados também em matriz animal, a exemplo dos esteróides hormonais (Química Orgânica vol. 1 e 2, John McMurry, tradução da 7ª edição, 2011).

1.2.2. Usos de terpenos e terpenoides

Como citado anteriormente, os terpenoides são amplamente utilizados em diversas indústrias, devido a sua disponibilidade natural e alta variabilidade. Além disso, são também alvo de variadas pesquisas atualmente, no ramo de ciência dos alimentos, farmacologia, cosméticos, medicina e outros.

- 1-Mentol: um dos monoterpenoides mais utilizados, responsável pelo sabor mentolado, e pela sensação de refrescância. É amplamente presente em nosso cotidiano, desde balas, chicletes, pasta de dentes, cosméticos e até como aditivo na indústria do tabaco. Sua obtenção por vias naturais se dá principalmente através da extração do óleo de *Mentha arvensis*, congelado para a formação de cristais de mentol que são separados do resto do óleo por centrifugação. Devido à alta demanda associada a este produto, a formação do mesmo por vias sintéticas é um ramo de pesquisa de alto interesse econômico, em função da dificuldade de ofertar quantidade suficiente apenas por extrações (Caputi, L. et al, 2011).
- Limoneno: um monoterpeno, é amplamente utilizado na indústria de alimentos, em comidas, bebidas e chicletes, além de solvente de uso industrial. É utilizado também como precursor do carvona, um monoterpenoide da indústria alimentícia, além de ter características bactericidas. O limoneno é obtido primariamente através da extração de cascas de laranja (<http://www.oleosessenciais.org>).
- Eucaliptol: monoterpeno cíclico utilizado como aditivo de alimentos, cosméticos e perfumes, é conhecido pelo aroma canforáceo. Pode ser obtido facilmente do óleo de eucalipto (Caputi, L. et al, 2011).
- *Hipposponlachnins* A e B: diterpenoides descobertos recentemente com propriedades anti-alérgicas. Foram obtidos a partir de uma espécie de esponja marinha (*Hippospongia lachne*) que pode ser encontrada no sul da China. Em sua forma estrutural, possuem um raro tetraciclo, como pode ser observado na Figura 7 (Hong, L. et al, 2017).

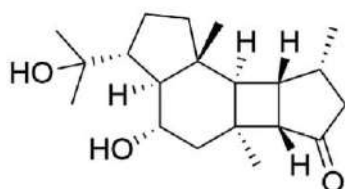


Figura 7: Diterpenoide recentemente descoberto e que possui propriedades anti-alérgicas. Fonte: Unusual Anti-allergic Diterpenoids from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*. Hong, L. et al, 2017

- Taxol: um terpenoide (C₄₇H₅₁NO₁₄) amplamente utilizado para tratamento contra câncer de ovário, mama, pulmão, próstata, leucemia, linfoma, entre outros (Weaver, B. et al).

- Isoestiviol: diterpenoide obtido a partir da estévia (*Stevia rebaudiana*), vem sendo alvo de estudos como monômero para a produção de um polímero (Kataeva, O. et al, 2017).
- Diterpenoides recém-descobertos extraídos da raiz de *Salvia miltiorrhiza*: em um estudo recente, seis novos diterpenos foram descobertos (com outros vinte já conhecidos) e mostraram propriedades imunomoduladoras, auxiliando a proliferação de linfoblastos B (responsáveis pela produção de anticorpos no organismo), entre outras características observadas (Wei, W. et al, 2017).

1.3. Manool

1.3.1. Características gerais

O manool é um diterpenoide de fórmula molecular $C_{20}H_{34}O$, com massa molecular de 290,491g/mol. Também é conhecido como epimanool, ou epi-13-manool, indicando uma inversão na estereoquímica do carbono 13 (carbono ligado ao grupamento hidroxila), em contraste com o comumente encontrado em outros labdadienos. A fórmula estrutural do composto pode ser observada na Figura 8. O nome IUPAC é 5-[(1S,4aS,8aS)-5,5,8a-trimetil-2-metilideno-3,4,4a,6,7,8-hexaidro-1H-naftalen-1-il]-3-metilpent-1-en-3-ol.

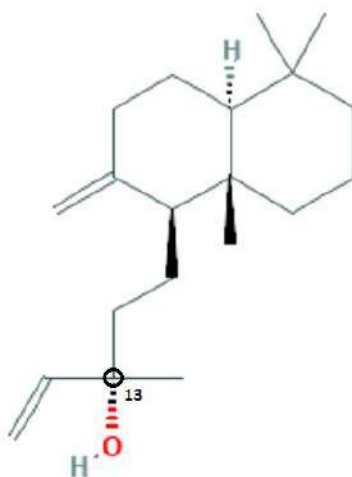


Figura 8: Fórmula estrutural do manool (epimanool), com indicação do carbono 13 que possui estereoquímica invertida. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

1.3.2. Usos atuais

Sendo a sálvia uma planta com tantas possíveis aplicações interessantes, e o manool, o principal composto em seu extrato, é inevitável que pesquisas da área médica e farmacológica também o envolvam. Contudo, seu uso não se restringe a esta área, sendo também interessante avaliar seu potencial papel como um aditivo para indústrias como de alimentos, bebidas, tabaco e até cosméticos, devido a sua obtenção natural e seu *flavour*.

Parte das propriedades farmacológicas associadas à sálvia podem também ser associadas ao manool, segundo a literatura. Em pesquisa realizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, foi avaliado o efeito do manool no sistema cardiovascular de ratos, tanto saudáveis quanto hipertensos. Foi observado que os ratos hipertensos, quando ministrados com manool, mostraram uma diminuição significativa da pressão arterial (Monteiro, A., 2016).

Também é observado no manool a atividade bactericida, principalmente frente a bactérias associadas às cáries (mostrando um potencial uso dele como aditivo a produtos de higiene bucal). Um estudo mostrou que, nas mesmas concentrações que o extrato de sálvia, o manool puro possui resultados de *MIC* melhores, evidenciando que a propriedade bactericida do extrato é proveniente do manool (Moreira, M. et al, 2013).

Outra propriedade medicinal que vem sendo explorada é a citotoxicidade seletiva em células cancerígenas, mantendo intactas as células saudáveis. Os valores de IC_{50} (quantidade mínima do composto para diminuir pela metade a atividade biológica do alvo) encontrados no tratamento com manool foram melhores do que alguns encontrados com o uso de certas drogas quimioterápicas, como VP16, assim como uma seletividade alta, indicando menores riscos à saúde do paciente tratado. Para o experimento, as células alvo foram células de câncer de mama, melanoma, carcinoma, glioblastoma, e como célula saudável de controle, células pulmonares de ratos, para a qual o manool foi o menos tóxico dentre as drogas testadas (Oliveira et al, 2015).

1.3.3. Isolamento de Manool

Com as pesquisas sobre manool sendo realizadas, a necessidade de termos métodos de isolamento adequados é cada vez maior. As metodologias extrativas utilizadas na literatura são variadas, sendo mais ou menos exploradas de acordo com o foco dos artigos. Contudo, é possível destacar algumas.

Dentre elas, Moreira et al, em 2013, fez a moagem de 1 kg de sálvia e realizou uma extração com diclorometano na temperatura ambiente, seguida de extrações líquido-líquido e duas colunas cromatográficas *flash* para purificação. O foco do artigo não era a quantidade obtida de manool, mas sim a determinação do seu caráter bactericida.

Outro experimento, em 2007, moeu a sálvia em partículas de tamanho determinados que foram separados com o auxílio de peneiras com malhas específicas. Várias extrações foram realizadas em diferentes temperaturas, tempos, solventes (todas soluções de etanol e água), razões de solvente e sálvia, assim como diferentes tamanhos de partícula. Como resultado, foi observado maior quantidade de extrato de sálvia em experimentos com menores partículas, temperatura de 40°C, por três horas, em um solvente 55-75% água em etanol, e razão de 6:1 entre solvente e sálvia (Durling et al, 2007).

Em 2007, foi realizado um trabalho com extração por fluido supercrítico, visando comparar este método com uma hidrodestilação simples (também realizada no experimento, 400ml de com 40g de sálvia, por 3h). Foi utilizado CO₂ pressurizado nas condições supercríticas para realizar a extração semelhante à condição na fase líquida (empregada com solventes comuns). O CO₂ supercrítico, ao entrar em contato com a pressão atmosférica, se vaporiza liberando o extrato que é devidamente recolhido sem solvente. A pressão de extração foi de 9-12,8MPa, em 25-50°C. Após análise em CG-MS, 15,28% de manool foi extraído desta forma (Aleksovski et al, 2007).

1.4. Parâmetros de solubilidade de Hansen

Não pode ser subestimada a importância que tem a escolha de um bom solvente para um processo, seja na indústria ou no laboratório. Algumas características devem ser levadas em conta no momento da escolha, com graus de relevância que dependem fortemente do tipo de processo, escala e objetivos.

Legislação e controle ambiental podem impedir o uso de alguns solventes, principalmente no caso dos solventes clorados. A escala do experimento influencia fortemente no peso deste fato.

A escala também é um fator determinante no preço do solvente. Alguns solventes, como a acetonitrila ou o clorobenzeno são significativamente mais caros do que outros, como etanol ou metanol. Nesse ponto, também é importante definir o grau de pureza exigido pelo processo, visto que solventes de níveis mais puros, como CLAE (nível de

pureza para uma cromatografia líquida de alta eficiência), possuirão um preço substancialmente maior do que seu correspondente em nível P.A. (para análise).

Uma consideração que pode passar despercebida, por vezes, é a facilidade do uso do solvente no processo. Solventes que possam danificar a amostra de alguma forma, ou que tragam alguma dificuldade para o processo, podem ser preteridos por outros mais simples. Um exemplo prático disso é que caso o processo exija sua retirada em determinada etapa, um solvente com ponto de ebulição menor pode ser preferível para facilitar separação de um soluto sólido. Caso contrário, se o seu soluto for mais volátil, pode ser ideal que se busque um outro solvente que seja menos volátil para acentuar ainda mais essa diferença.

Contudo, um fato cuja importância não pode ser diminuída é a capacidade do solvente de solubilizar as espécies químicas necessárias para o processo, sejam elas reagentes, extratos ou produtos. Ele deve ser capaz de solubilizar o que for necessário, e talvez até deva especificamente não solubilizar alguma substância que se deseje obter como precipitado.

Todos os outros fatores já citados atuarão na escolha final, mas a sua gama de possibilidades estará limitada pela solubilidade ou não pelas espécies do seu processo. Portanto, é de suma importância ser capaz de determinar quais são os solventes mais adequados para o processo.

Consequentemente, estudos práticos sobre solubilidade de diferentes solutos e solventes são muito importantes para praticamente todo e qualquer processo. Para tal, o uso de parâmetros de solubilidade vem amplamente sendo utilizado para ajudar na predição da solubilidade de diversos pares de solventes e solutos.

Hildebrant e Scott, em 1950, deram início a esse conceito, definindo o parâmetro de solubilidade a partir de uma equação termodinâmica (Eq. 1) baseada na energia molar de coesão das partículas do fluido (energia total necessária para afastar uma unidade de volume do fluido de sua vizinhança para uma separação infinita, onde a partícula pode ser considerada um gás ideal):

$$\delta = \sqrt{\frac{\Delta H_V - R^*T}{V}} \quad (\text{Eq. 1}),$$

onde δ é o parâmetro de solubilidade, ΔH_V o calor latente do fluido, R a constante universal dos gases, T a temperatura, e V o volume. A unidade comumente utilizada para o parâmetro é $\text{MPa}^{1/2}$.

Além disso, os pesquisadores demonstraram que a solubilidade entre duas substâncias (1 e 2) é maior quanto mais próximos forem δ_1 e δ_2 , sendo a melhor possível em $\delta_1 = \delta_2$.

Em 1967, Charles Hansen introduziu nesta teoria uma forma de decompor o parâmetro δ (Eq. 2), levando em conta os tipos diferentes de forças intermoleculares envolvidas no processo de solubilização de uma substância. Segundo ele, um dos termos, δ_d , seria o termo correspondente às forças de dispersão, as interações de London. Haveria também o termo δ_p referente às forças dipolo-dipolo presentes no sistema. E, por fim, o termo δ_h indicaria a força de interação gerada pela existência de ligações de hidrogênio no composto. Desta forma, Hansen compôs o parâmetro global δ como a raiz quadrada da soma dos quadrados de cada um dos termos separados.

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

Desta forma, em um plano espacial \mathbb{R}^3 , é possível posicionar cada substância (soluto ou solvente) em coordenadas baseadas nos parâmetros de Hansen ($\delta_{d1}, \delta_{p1}, \delta_{h1}$). Assim, quanto mais próximos dois pontos estejam neste “espaço de Hansen”, melhor eles solubilizam-se. Contudo, esta distância não é dada simplesmente pela diferença de δ ; empiricamente, Hansen determinou que o peso da influência de dispersão deveria ser dobrado, indicando uma maior importância das forças de dispersão (Eq. 3).

$$D_{1,2} = (2 * (\delta_{d1} - \delta_{d2}))^2 + (\delta_{p1} - \delta_{p2})^2 + (\delta_{h1} - \delta_{h2})^2 \quad (\text{Eq. 3}),$$

Onde os índices 1 e 2 correspondem a duas substâncias diferentes. Podemos, portanto, após localizarmos no espaço de Hansen um soluto, encontrar diversos solventes cujas distâncias do soluto inicial sejam menor do que um determinado número. Desta forma, compõe-se uma esfera (com a devida adaptação à distorção do eixo referente à dispersão) que pode ser tida como uma esfera de solubilidade deste determinado soluto.

O raio da esfera de solubilidade pode ser determinado como a máxima distância D entre o soluto e um solvente ainda considerado bom. É necessário determinar para cada

processo o que será considerado um solvente bom, baseado no quão solúvel é necessário que o seu soluto seja.

A determinação dos parâmetros pode ser feita de diferentes formas, métodos experimentais ou não. Em 1976, Van Krevelen e Hoftyzer (Eq. 4) estimaram os parâmetros.

$$\delta_d = \frac{\sum_i F_{di}}{V}; \quad \delta_p = \sqrt{\frac{\sum_i F_{pi}^2}{V}}; \quad \delta_h = \sqrt{\frac{\sum_i E_{hi}^2}{V}} \quad (\text{Eq. 4}),$$

com F_{di}, F_{pi} e E_{hi} sendo componentes de dispersão, polares, e contribuição das ligações de hidrogênio respectivamente. Para os cálculos, estes fatores podem ser encontrados em tabelas da literatura.

Outra forma de determinar os parâmetros envolve testar experimentalmente a solubilidade do soluto em uma gama de potenciais solventes diferentes (com parâmetros conhecidos). E após determinar todos os solventes e os não-solventes, calculam-se os parâmetros do seu soluto como uma média dos parâmetros do solvente (Eq. 5).

$$\delta_d = \frac{\sum_{S=1}^N \delta_{dS}}{N}; \quad \delta_p = \frac{\sum_{S=1}^N \delta_{pS}}{N}; \quad \delta_h = \frac{\sum_{S=1}^N \delta_{hS}}{N} \quad (\text{Eq. 5})$$

Vale a pena ressaltar que este método leva em conta a temperatura e a concentração do seu soluto (Bordes, C. et al, 2009).

Atualmente, programas como o HSPiP (do grupo do próprio Charles Hansen) promovem o cálculo destes parâmetros de forma automática com base na substância pedida, a partir do seu número de catálogo, comparando com uma base de dados pré-instalada.

2. OBJETIVOS

A meta primordial do projeto é a criação de uma metodologia adequada para a extração e purificação de manool a partir de sálvia, e a obtenção de massa de manool para próximos projetos. Contudo, para que isso possa ser alcançado, uma série de objetivos parciais devem ser atingidos. Inicialmente, para a criação da metodologia, os seguintes pontos devem ser esclarecidos:

- Determinação do tipo de extração com melhores resultados;
- Definição do melhor solvente para a extração;
- Otimização dos outros parâmetros extrativos;
- Desenvolvimento de técnicas de purificação para obtenção de um produto com pureza adequada.

Para a segunda parte do trabalho, a produção de manool em maior escala para utilização em possíveis próximos projetos, as seguintes etapas precisam ser alcançadas:

- Observar a replicabilidade do método obtido anteriormente;
- Determinar a eficiência de cada etapa do processo e do processo como um todo;
- Buscar economizar solventes sempre que possível sem prejudicar a qualidade do manool obtido;
- Avaliar a viabilidade de produção de manool em laboratório.

Devido ao caráter do trabalho, o desenvolvimento (métodos e materiais, e resultados) serão divididos em duas partes para facilitar o acompanhamento do mesmo. A conclusão será unificada para que seja possível dar uma visão geral sobre o projeto.

Capítulo 1: Desenvolvimento da Metodologia

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação da matriz vegetal

A sálvia foi obtida comercialmente na Estrella da Terra Produtos Naturais, situada no Rio de Janeiro (Vargem Pequena), já seca em estufa, e foi triturada com um liquidificador de laboratório para que a sua área de contato com a solução extrativa aumentasse, possibilitando uma melhor extração. Foi estocada uma quantidade de sálvia moída suficientemente grande para todas as etapas do processo.

3.2. Pesquisa bibliográfica sobre a extração

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica com o intuito de determinar quais formas de extração seriam testadas em laboratório.

3.3. Escolha do tipo de Extração Sólido – Líquido

Foram realizadas duas extrações diferentes, uma Soxhlet e outra direta à quente. Para ambos experimentos, foi utilizado como solvente de extração 600mL de uma solução de 70% de etanol em água, e 50g da matriz vegetal de sálvia moída. As extrações foram mantidas em sua devida aparelhagem por uma hora em um balão de 1L. Foram levadas à temperatura de ebulição da solução pela manta de aquecimento Fisatom Mod. 22E, com um condensador ligado por mangueiras à um fluxo de água fria para impedir a perda de solvente.

Ao fim de cada extração, uma alíquota foi retirada das soluções, em seguida passou por um filtro de seringa para retirar resíduos sólidos, sendo então colocadas em vials e injetadas no CG-EM para a análise de qual metodologia possuiu um maior rendimento de manool.

3.4. Escolha do solvente

Foram então realizadas extrações diretas à quente, que ocorreram em frascos de 4 mL, onde foram utilizados 2,4mL de cada um dos solventes puros a serem testados (TBME, acetato de etila, cicloexano, metanol. Água, etanol P.A. e comercial). Foram utilizados 0,2g de sálvia moída, levados a 60°C aquecidos em placas de aquecimento com suporte de silício carbônico, a temperatura foi controlada com um termômetro. A extração

manteve-se por 3h. Para evitar perda de solvente, os frascos foram fechados com tampas herméticas.

Ao final das extrações, todas as amostras foram filtradas novamente com filtro de seringa, transportadas para um vial e injetadas no CG-EM, para que fosse determinado qual dos solventes possuiu o melhor rendimento.

3.5. Planejamento experimental

O próximo passo foi realizar um planejamento fatorial completo para determinação dos melhores parâmetros de extração. As variáveis escolhidas para serem consideradas foram a temperatura (60°C, 69°C, 78°C), o tempo (1h, 2h, 3h) e a proporção de solvente para matriz vegetal (6:1, 9:1 e 12:1), de forma que tivemos um planejamento 3^3 , com três fatores e três níveis.

Os experimentos foram realizados nos moldes da escolha do solvente, salvo diferenças determinadas pelos fatores a serem testados especificamente. Em comum, todos os experimentos foram realizados em vials de 4ml fechados hermeticamente, com 2,4 ml de etanol P.A. como solvente, em placas de aquecimento e suporte de silício carbônico, com termômetros para o controle da temperatura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Segue na Tabela 2 as condições específicas utilizadas em cada experimento.

Tabela 2: Tabela com condições experimentais de cada experimento.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Solvente/amostra (ml/g)	Amostra (g)
1	60	1	6	0,40
2	60	1	9	0,27
3	60	1	12	0,20
4	60	2	6	0,40
5	60	2	9	0,27
6	60	2	12	0,20
7	60	3	6	0,40
8	60	3	9	0,27
9	60	3	12	0,20
10	69	1	6	0,40
11	69	1	9	0,27
12	69	1	12	0,20
13	69	2	6	0,40
14	69	2	9	0,27
15	69	2	12	0,20
16	69	3	6	0,40
17	69	3	9	0,27
18	69	3	12	0,20
19	78	1	6	0,40
20	78	1	9	0,27
21	78	1	12	0,20
22	78	2	6	0,40
23	78	2	9	0,27
24	78	2	12	0,20
25	78	3	6	0,40
26	78	3	9	0,27
27	78	3	12	0,20

Após o tempo indicado, alíquotas foram retiradas, filtradas com filtro de seringa, e colocadas em vials para análise de todas em CG-MS, visando determinação dos melhores parâmetros. Em sequência, foi utilizada a análise da significativa estatística destas variáveis, com 5% de significância, com base na análise de variância (ANOVA) para analisar a importância de cada variável no processo.

3.6. Análise univariável solvente/amostra

Em seqüência, devido aos resultados obtidos anteriormente, foi realizada uma análise univariável da razão solvente/amostra. Para isso foram realizadas mais 4 condições em triplicada, razão de 4:1, 5:1, 7:1 e 8:1. Os dados da razão 6:1 foram aproveitados da última etapa.

Esta análise foi realizada com temperatura de 69°C e com tempo de extração de 2h, novamente em frascos de 4ml hermeticamente fechados, aquecidos em uma placa de aquecimento e em suporte de silício carbônico. Os resultados foram obtidos retirando alíquotas em vials, e injetando no CG-MS.

3.7. Aumento de escala da extração

Foi então realizado um aumento de escala do experimento para 300g de sálvia moída e 1,8L de etanol. Com temperatura de 68°C e tempo de extração de 2h após à chegada à temperatura adequada.

Para a adequação às novas proporções, foi utilizado um balão de 5L, uma manta de aquecimento Fisatom Mod. 302 e um agitador mecânico Fisatom Mod. 713W para homogeneizar o sistema. Um termômetro infra vermelho propiciou o controle adequado de temperatura.

Ao fim da extração, o sistema foi filtrado com o auxílio de um funil de Buchner, em um kitassato de 3L, com o uso do vácuo encanado do laboratório. A solução obtida foi levada a um balão de 1L para evaporar no equipamento de rotaevaporação. Durante esta e todas próximas etapas onde o rotaevaporador foi utilizado, a entrada de água para resfriar o fluido foi construída com um balde com água e gelo, e uma bomba de aquário, a água portanto sai do balde e retorna para o mesmo. Desta forma, é possível evitar boa parte do desperdício que normalmente ocorre ao utilizar água do encanamento.

3.8. Extração Líquido-Líquido

Para esta etapa, a amostra foi ressuspensa em 300mL de solução de metanol e água 9:1, que seria lavada com 300ml hexano (três vezes), na qual o manool seria extraído (que como pode ser visto pelos parâmetros de Hansen, é muito mais solúvel em hexano do que em água e metanol). O rotaevaporador foi novamente utilizado para secar a amostra, após o transporte para um balão de 1L.

3.9. Pesquisa bibliográfica sobre a purificação

Uma nova etapa de pesquisa bibliográfica foi necessária para decidis as próximas etapas da metodologia.

3.10. Primeira Coluna Cromatográfica (C.C.1)

Para esta primeira coluna, foi utilizado 2L de uma solução de 5% de acetato de etila em hexano como fase móvel e 50g de sílica gel 60 como fase estacionária, em uma coluna cromatográfica de 40x5cm. Foi utilizada uma bomba de ar na extremidade superior da coluna para fazer um gradiente de pressão compatível com a técnica de cromatografia líquida *flash*. Um algodão na parte inferior da coluna foi utilizado para impedir a perda de sílica. A amostra foi inserida na coluna ressuspendendo-a com uma pequena quantidade de fase móvel, e com o auxílio de uma pipeta, cuidadosamente despejando-a pelas paredes da coluna sobre a sílica úmida com a fase móvel, para evitar que fossem criadas imperfeições na fase estacionária.

O eluato obtido foi separado em frascos de 5mL, sendo que partes iniciais (antes do início da eluição de faixas de substâncias visíveis na coluna) e finais do eluato (após a eluição de todas faixas com cor na coluna) foram recolhidas em béquers de 100ml.

O eluato foi analisado em CG-EM, em frascos de quatro em quatro com alíquotas transportadas para vials, buscando assim determinar o início e o fim da eluição do manool. Caso essa amostragem não fosse suficiente para determinar, mais frascos ou até os béqueres seriam analisados. As frações adequadas foram selecionadas, transmitidas para um balão de 1L e secas no rotaevaporador.

3.11. Segunda Coluna Cromatográfica (C.C.2)

Para esta segunda coluna, o procedimento foi semelhante, mas com uma coluna de 40x1,5cm, 10g de sílica gel 60 e 2,5L de uma fase móvel gradiente entre hexano puro e 1% de acetato de etila em hexano. A bomba de ar foi novamente utilizada, e a amostra foi inserida de forma semelhante, contudo dissolvida apenas em hexano. O gradiente de fase móvel foi realizado de acordo com a seguinte tabela.

Tabela 3: Gradiente da fase móvel da segunda coluna cromatográfica

Volume (L)	% Acetato de etila
0,5	0
0,5	0,1
0,5	0,2
0,5	0,5
0,5	1

Novamente, as fases iniciais e o finais da cromatografia foram recolhidas em béqueres, sendo apenas as frações intermediárias (onde era possível observar cor no eluato da coluna) recolhidas em frascos menores de 5mL foram analisados a cada 4 frascos (para diminuir o número de utilizações do equipamento) no CG-EM após o recolhimento de alíquotas e vials.

O eluato de interesse foi reunido e seco no rotaevaporador. Até o momento, a evidência de que se tratava do manool era de 91%, com base na comparação com a biblioteca de espectros NIST 2014 sobre o espectro de massas da substância que foi presumida como tal. Para confirmação de sua identidade, o eluato foi encaminhado para o RMN ¹³C e ¹H. Para tal, uma alíquota da amostra foi recolhida (30mg) e solubilizada em clorofórmio deuterado em um tubo de RMN.

3.12. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O fim da purificação deu-se em um CLAE Shimadzu LC-6AD, com uma coluna em nível preparativo Luna 5 µm C18 250 x 21.2 ηm. Como fase móvel foi utilizado acetonitrila nível de pureza HPLC. A menor quantidade possível da fase móvel utilizada para solubilizar o manool e injetá-lo no equipamento, com o auxílio da seringa de 500µL. A detecção foi realizada por um detector UV/VIS Shimadzu SPD-20AVO, no comprimento de 201ηm, e a vazão utilizada foi de 10ml/min. O eluato adequado foi recolhido, novamente seco no HPLC e encaminhado para a realização do RMN.

Uma alíquota também foi retirada e levada para injeção no CG-DIC para uma melhor avaliação da pureza do manool.

3.13. Métodos de análise

Nas etapas de análise CG-EM necessárias durante o processo, foi utilizado o cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 7820A. A coluna utilizada (também da

Agilent technologies) era de fase estacionária DB-17HT, com dimensões de 10m x 250 μ m x 0,15 μ m. Como fase móvel, fluxo de hélio foi mantido constante em 1ml/minuto. A injeção do tipo *split* 20:1 e a temperatura do forno variou de 70 até 330°C com uma taxa de 4°C/min, durante 65 minutos.

Para o espectrômetro de massas, as temperaturas da fonte, do quadrupolo e da linha de transferência foram respectivamente: 230°C, 150°C e 290°C.

Para a etapa final, a injeção foi realizada no cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 6890N. A coluna e as condições cromatográficas foram as mesmas, exceto a composição da fase móvel, que era de hidrogênio, e a taxa de variação da temperatura do forno, que foi de 15°C/min durante 17,33 minutos.

A detecção realizada no DIC (detector de ionização de chama) foi feita com fluxo de hidrogênio e de ar de 40 e 450 ml/min respectivamente, e temperatura de chama de 250 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pesquisa bibliográfica sobre a extração

Segundo os dados observados na literatura (Glisic et al., 2010 e 2011), a extração por Soxhlet fornece um rendimento superior a outros tipos de extração, como ultrassom, hidrodestilação e extração por fluido supercrítico. Baseado nisso, decidiu-se comparar a extração por Soxhlet com outra técnica utilizada comumente com muito sucesso em nosso laboratório (LAROMA/UFRJ): a extração direta a quente.

4.2. Escolha do tipo de extração Sólido-Líquido

Os resultados foram analisados por CG-EM (Figuras 9 e 10) e, apesar da falta de um padrão de manool, a biblioteca de espectros NIST foi capaz de determinar com 91% de certeza que o pico no tempo de 37,945 seria o referente ao manool (Figura 11).

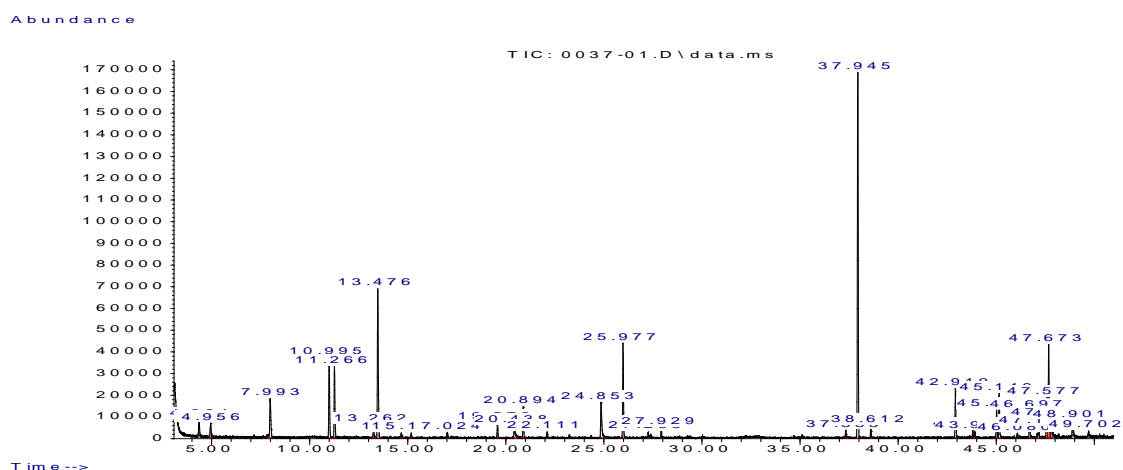


Figura 9: Cromatograma referente à extração direta da sálvia à quente realizada

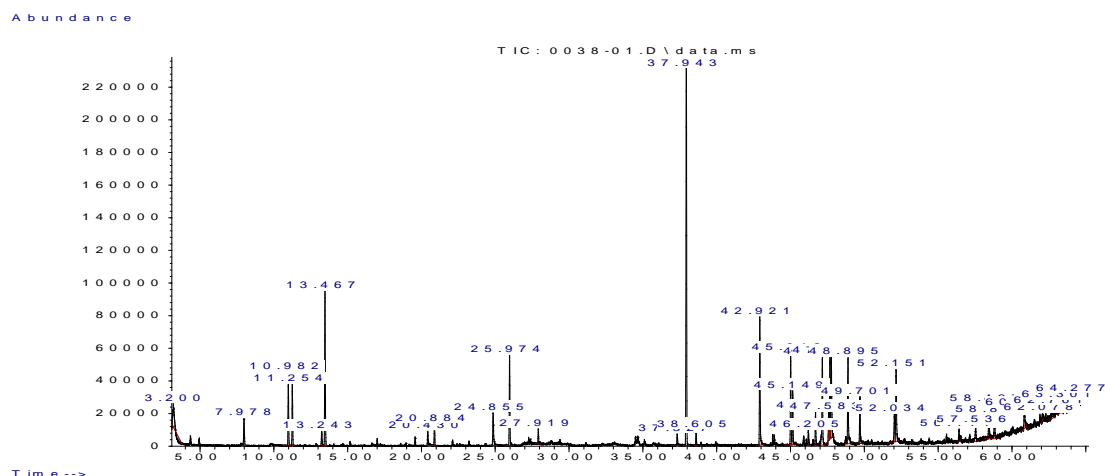


Figura 10: Cromatograma referente à extração por Soxhlet

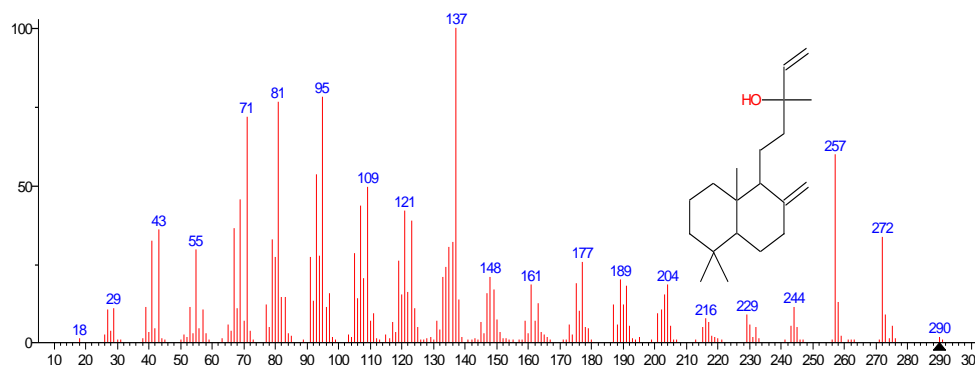


Figura 11: Espectro de massas da substância considerada Manool pela biblioteca NIST com 91% de certeza

A melhor técnica foi determinada baseando-se na observação preliminar da área relativa do pico referente ao manool por CG-EM. Desta forma, a técnica de extração direta a quente teve um melhor resultado (26,1% contra 18,7%), o que determinou portanto a sua utilização no resto do projeto.

Apesar de já termos um solvente extrator satisfatório, decidiu-se testar outros possíveis solventes de acordo com os parâmetros de Hansen, para que fosse realizada uma extração seletiva de melhor qualidade. Os parâmetros para o manool foram calculados com auxílio do programa HSPiP no laboratório LABCOM; para tal, foi necessário o uso do código SMILE (*simplified molecular-input line-entry system*, sistema simplificado de entrada linear de molécula) de correspondente, CC1(CCCC2(C1CCC(=C)C2CCC(C)(C=C)O)C)C. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros de Hansen como observados pelo programa HSPiP, e a sua variação em referência ao manool

Substância	δ_p	δ_d	δ_h	δ_{total}	$\Delta\delta$
Manool	1,3	3,2	16,8	17,151385	0
Acetona	10.4	7.0	15.5	19,9	2,748615
Acetonitrila	18.0	6.1	15.3	24,4	7,248615
1-Butanol	5.7	15.8	16.0	23,2	6,048615
2-Butanol	5.7	14.5	15.8	22,2	5,048615
Álcool benzílico	6.3	13.7	18.4	23,8	6,648615
Álcool t-butílico	5.1	14.7	15.2	21,8	4,648615
Cicloexano	0.0	0.2	16.8	16,8	-0,35138
Cicloexanol	4.1	13.5	17.4	22,4	5,248615
Dimetilsulfóxido	16.4	10.2	18.4	26,7	9,548615
1,4-Dioxano	1.8	7.4	19.0	20,5	3,348615
<i>N,N</i> -Dimetilacetamida	11.5	10.2	16.8	22,8	5,648615
<i>N,N</i> -Dimetil formamida	13.7	11.3	17.4	24,9	7,748615
Etanol	8.8	19.4	15.8	26,5	9,348615
Acetato de etila	5.3	7.2	15.8	18,2	1,048615
Etilbenzeno	0.6	1.4	17.8	17,9	0,748615
Álcool isobutílico	5.7	15.9	15.1	22,7	5,548615
Metanol	12.3	22.3	15.1	29,6	12,44862
Diclorometano	6.3	6.1	18.2	20,2	3,048615
Heptano	0.0	0.0	15.3	15,3	-1,85138
Hexano	0.0	0.0	14.9	15,3	-1,85138
Xileno	1.0	3.1	17.6	17,9	0,748615
Água	16.0	42.3	15.5	47,8	30,64862
Tolueno	1.4	2.0	18.0	18,2	1,048615
Tetraidrofurano	5.7	8.0	16.8	19,5	2,348615
<i>N</i> -Metil-2-pyrrolidona	12.3	7.2	18.0	23	5,848615
2-Propanol	6.1	16.4	15.8	23,6	6,448615
1-Propanol	6.8	17.4	16.0	24,6	7,448615
Metil- <i>t</i> -butil éter (TBME)	4.3	5.0	14.8	16,2	-0,95138
Clorometano	7,48	2,98	1,91	8,2751979	-8,87619
Dietil éter	7,09	1,42	2,49	7,6475225	-9,50386

Com base nos parâmetros observados, foram escolhidos como potenciais solventes o cicloexano, acetato de etila, TBME, além dos citados na literatura: água e etanol. Testou-se então estes solventes, realizando com eles extrações diretas a quente, método de extração que apresentou um rendimento melhor do que a por Soxhlet na última etapa do experimento.

4.3. Escolha do Solvente

O melhor resultado entre os solventes testados foi determinado novamente de acordo com a área do seu pico referente ao manool nos cromatogramas, aqui comparando a área absoluta do manool obtida em cada cromatograma. Segue a Tabela 5 com os resultados obtidos.

Tabela 5: Tabela de solventes x área absoluta obtida por CG-EM para a extração de manool de sálvia

Solvente	Área_{Manool} CG-EM
Acetato de etila	9714818
Cicloexano	10278840
MeOH	10818160
TBME	11621703
EtOH p.a.	11661539
EtOH comercial	10558482

Os solventes com melhor resultados foram o TBME e o etanol P.A. (Tabela 6), contudo este último foi escolhido devido ao menor preço e maior ponto de ebulição. Desta forma, seria facilitada a recuperação do solvente no rotaevaporador, possibilitando inclusive a reutilização do mesmo no processo.

4.4. Planejamento experimental

Pode ser visto na Tabela 6 o resultado dos 27 experimentos em triplicata realizados para o planejamento experimental. A área mostrada é dividida pela quantidade de sálvia utilizada em cada experimento para compensar a diferença de entrada de matriz vegetal.

Tabela 6: Resultados do planejamento experimental para a extração de manool de sálvia obtidos por CG-EM

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Solvente/amostra (ml/g)	Área média Manool/gSálvia
1	60	1	6	21160533
2	60	1	9	16753308
3	60	1	12	12240367
4	60	2	6	22516522
5	60	2	9	15545046
6	60	2	12	11422237
7	60	3	6	21468134
8	60	3	9	16382087
9	60	3	12	12309580
10	69	1	6	16312426
11	69	1	9	15924096
12	69	1	12	12143871
13	69	2	6	24005088
14	69	2	9	16275110
15	69	2	12	12956734
16	69	3	6	23188813
17	69	3	9	15810696
18	69	3	12	11863496
19	78	1	6	23278611
20	78	1	9	15622386
21	78	1	12	11694539
22	78	2	6	24252574
23	78	2	9	15368679
24	78	2	12	10352523
25	78	3	6	23903230
26	78	3	9	14466703
27	78	3	12	10457676

O experimento que originou a maior área absoluta de manool foi o de número 22, contudo, este opera a 78 °C, temperatura na qual a solução extrativa está em processo de ebulição. Para evitar possíveis perdas de materiais durante a ebulição, e como a diferença em relação à segunda maior área (experimento 13) é de apenas 1,02%, o experimento 13 com a temperatura de 69 °C foi utilizado como base para o resto da análise.

Uma análise significativa estatística (ANOVA) destes dados (Figura 12) indicou que a variável da razão entre solvente e amostra é a mais relevante para o processo. Com base nisso, a próxima etapa foi uma análise univariada desta razão. A análise também indicou que a temperatura e a razão são relacionadas, contudo esse fator não foi mais investigado em experimentos seguintes.

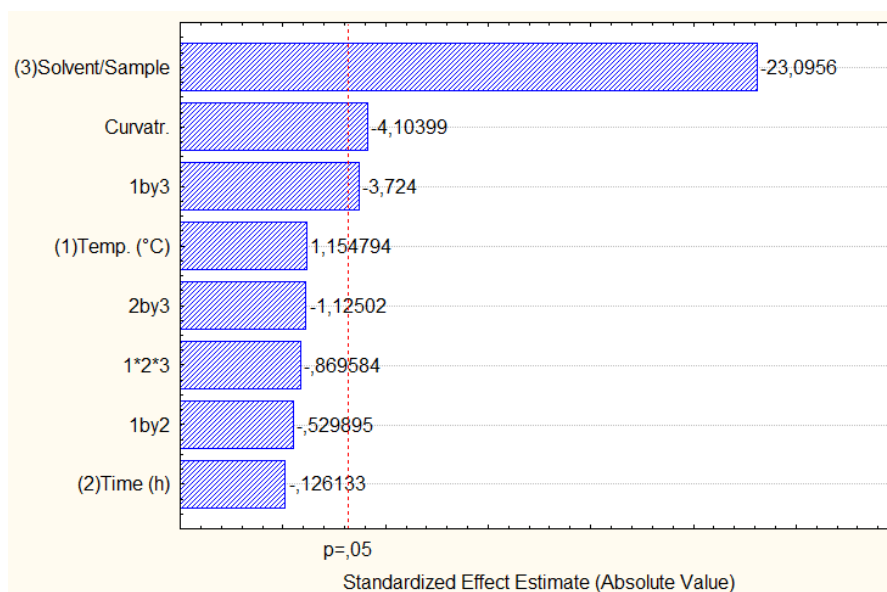


Figura 12: Análise estatística de variância

4.5. Análise univariada solvente/sálvia

Podemos observar na Tabela 7 os resultados (as médias das triplicatas) dos experimentos para a escolha da proporção de solvente por amostra adequada.

Tabela 7: Análise univariável da razão entre solvente e sálvia obtida por CG-EM

Relação solvente/sálvia	Área absoluta média	Sálvia (g)	Área média Manool/gSálvia
4	32123245	0,6	53538741,67
5	28028236	0,48	58392157,64
6	22919801	0,4	57299503,61
7	18875522	0,34	55516240,2
8	17343648	0,3	57812160

Com base nos resultados obtidos pode-se observar que a área na razão 5:1 foi maior, entretanto novamente razões referentes à facilidade e praticidade do uso do solvente em laboratório foram determinantes para a escolha de uma outra razão. Devido às características físicas da sálvia moída (a qual retém muito líquido), o processo de reaproveitamento de solvente é dificultado nesta proporção. Desta forma, e como a

diferença entre a razão 5:1 e a 6:1 foi de apenas 1,87%, a razão 6:1 foi escolhida para o restante do projeto.

4.6. Pesquisa bibliográfica

Diversas metodologias foram encontradas na literatura, com diferentes tipos de matrizes vegetais, que podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8: Tabela referente à pesquisa bibliográfica sobre forma de purificação do Manool

Autor	Origem	Procedimento de purificação		Rendimento
Moreira et al.,2013 Nicolella et al., 2015 Oliveira et al.,2015	<i>S. officinalis</i>	Cromatografia a vácuo. FE: Sílica gel FM: Hexano - acetato de etila	Cromatografia a vácuo. FE: Sílica gel FM: Hexano - acetato de etila	200mg _{manool} /kg _{sálvia} 0,02%
Ulubelen et al, 1994	<i>S. clarea</i>	FE: Sílica gel FM: Gradiente éter de petróleo-etanol	FE: Sephadex LH-20 FM: Éter de petróleo - clorofórmio - metanol (7:4:2)	5mg _{manool} /kg _{sálvia} 0,0005%
Rout et al. 2010	<i>Murraya</i>	FE: Sílica gel FM: Pentano e 2% de éter etílico	Recromatografia com 2-8% de benzeno em pentano	45mg _{manool}
Yang et al 2010	<i>Abies Georgei</i>	FE: Sílica gel FM: gradiente clorofórmio-propanona	FE: Resina MCl, sephadex e sílica gel	4,2mg _{manool} 0,001%
Mondolis et al, 2013	<i>Resina de P. caribaea</i>	FE: Sílica gel FM: Gradiente hexano - diclorometano		245mg _{manool} /45g _{sálvia} 0,77%

Em virtude da utilização da mesma matriz, o procedimento de purificação com coluna cromatográfica descrito pelos pesquisadores da Universidade de Franca (Moreira et al., 2013; Nicolella et al., 2014 e Oliveira et al., 2015) foram adotados no presente trabalho, com pequenas alterações no processo.

Dentre as alterações para a primeira cromatografia está o uso de uma fase móvel constante, com 5% de acetato de etila em hexano, acarretando em um menor gasto de solventes. Isso foi possível devido à existência de uma próxima cromatografia líquida, que promoveu uma melhor separação do manool.

4.7. Segunda coluna cromatográfica (C.C.2)

A análise de RMN de C^{13} do eluato da segunda coluna cromatográfica pode ser observada na Figura 13. O excesso de pequenos sinais, não pertencentes ao manool, foi determinante para a realização da próxima etapa no CLAE, assim como a sua coloração escurecida, não esperada para o mesmo dada a ausência de ligações duplas conjugadas ou outros cromóforos.

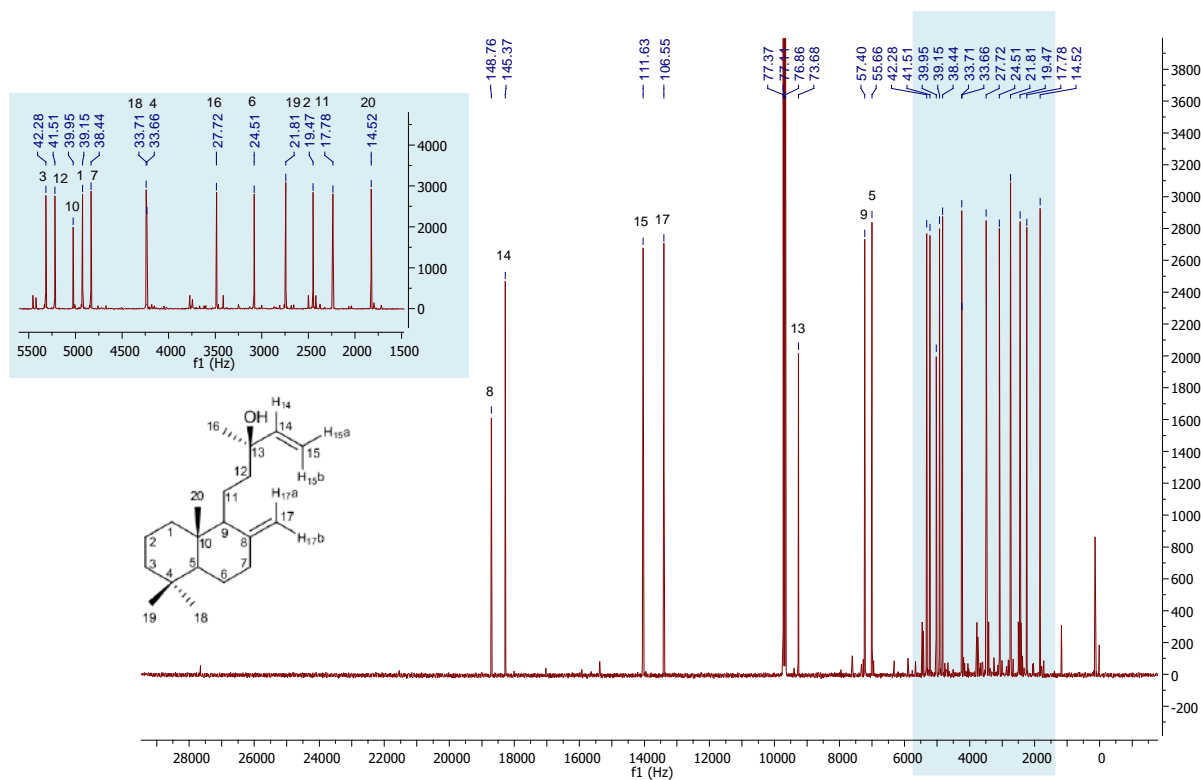


Figura 13: RMN ^{13}C do manool impuro, ressaltando a área povoada por carbonos primários e secundários, a posição de cada carbono observado pelo RMN é indicada na estrutura do manool.

Foi também realizada uma comparação dos picos obtidos no RMN de C^{13} com aqueles observados em trabalhos prévios na literatura (Tabela 9), para confirmar a identidade do composto até agora considerado manool.

Tabela 9: Dados de RMN ¹³C do Manool experimental e da literatura

¹³ C	Bastardet al. (1984) 200 MHz; CDCl ₃	Experimental 500 MHz; CDCl ₃ (Fig. 4)
1	39,0	39,2
2	19,0	19,5
3	42,1	42,3
4	33,5	33,7
5	55,5	55,7
6	24,4	24,5
7	38,3	38,4
8	148,4	148,8
9	57,2	57,4
10	39,8	40,0
11	17,6	17,8
12	41,3	41,5
13	73,4	73,7
14	144,9	145,4
15	111,4	111,6
16	27,9	27,7
17	106,2	106,6
18	33,5	33,6
19	21,7	21,8
20	14,4	14,5

Pela comparação dos resultados obtidos com os dados fornecidos pela literatura, foi possível observar que o composto isolado ao longo de todo o procedimento de fato se tratava do manool.

Devido a sinais pequenos observados no RMN, e ao aspecto âmbar oleoso encontrado na amostra, presumiu-se que a mesma ainda não contava com um nível de pureza satisfatório. Portanto, foi realizada uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O método utilizado no CLAE foi também baseado no grupo da Universidade de Franca, porém decidiu-se utilizar acetonitrila pura como fase móvel, e não uma solução de acetonitrila e água 9:1 como indicado pelo grupo. Tal deve-se ao fato de que para que a água fosse retirada da amostra, temperaturas muito altas deveriam ser alcançadas no rotaevaporador, o que poderia comprometer a integridade do manool, e observou-se que o procedimento de separação não foi comprometido pela mudança.

4.8. CLAE preparativo

Após a utilização do CLAE para aumentar a pureza do manool, foi possível obter o seguinte RMN ¹³C (Fig. 14):

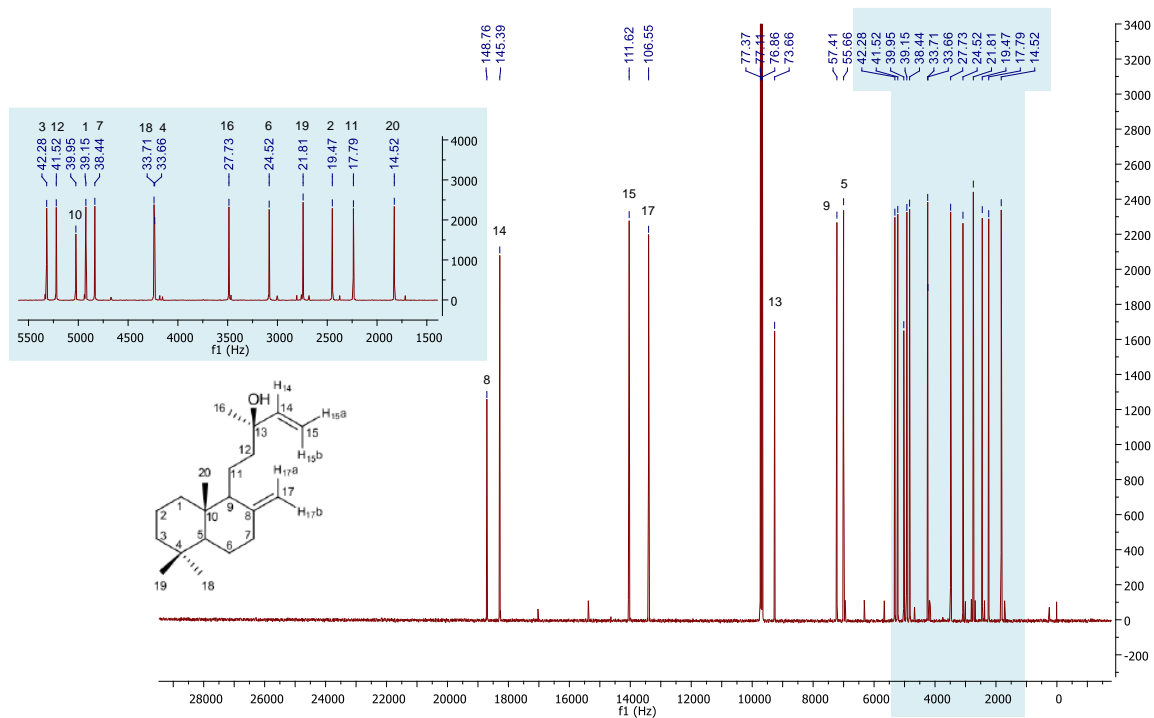


Figura 14: RMN ¹³C do manool purificado, com a região dos carbonos primários e secundários explicitada, a posição de cada carbono observado pelo RMN é indicada na estrutura do manool

Observa-se portanto que de fato os picos menores que conotavam impureza diminuíram em relação ao primeiro RMN realizado, demonstrando a eficácia esperada do CLAE quanto à purificação do manool.

Após a análise no CG-DIC (Fig. 15), foi realizada uma integração de área que resultou em uma pureza de manool (pico com 6,311 minutos) de 93,59%.

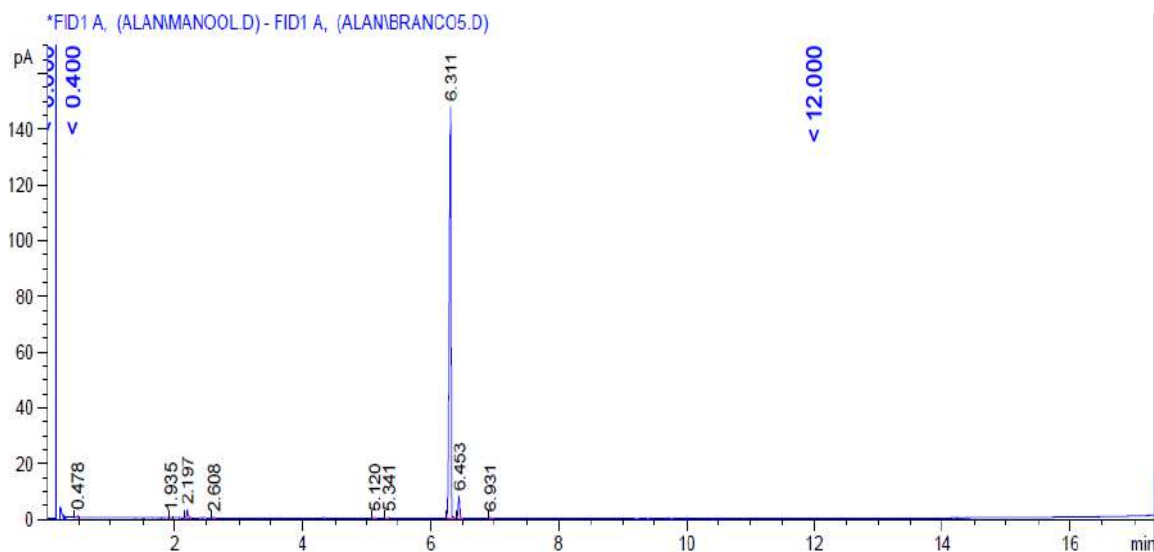


Figura 15: Cromatograma do Manool purificado após CLAE.

Capítulo 2: Acúmulo de massa de manool

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Preparo da matriz vegetal

A matriz vegetal (folhas secas de *Salvia officinalis* obtidas comercialmente na Estrella da Terra Produtos Naturais) é triturada em quantidade o suficiente para o processo com o auxílio de um liquidificador de laboratório.

5.2. Extração Sólido-Líquido

Em um balão de 5L, foram colocados 300g da matriz vegetal triturada e 1,8L de etanol P.A. com o auxílio de um funil adequado. Em seguida, foi acionado um agitador mecânico Fisatom Mod. 713 W, e o balão foi alocado em uma manta de aquecimento Fisatom Mod. 302 que iria aquecê-lo a 68°C e mantê-lo aquecido por 2h, sendo feito um acompanhamento com um termômetro infravermelho para impedir que a temperatura ultrapassasse ou reduzisse muito.

Em seguida, filtrou-se todo o conteúdo do balão em um funil de Buchner, e o extrato então presente no kitassato foi movido para um balão de 1L para que secasse com o auxílio de um rotaevaporador. O etanol recuperado pelo rotaevaporador poderia ser utilizado novamente em uma próxima extração.

5.3. Extração Líquido-Líquido

A amostra contida no balão foi ressuspensa em 300mL de uma solução 9:1 de metanol e água destilada. A solução foi dividida em duas frações menores de 150mL, e cada uma foi lavada em um funil de separação três vezes com 150mL de hexano. Como resultado, ao final do processo havia 900mL de fase orgânica, a fase de interesse.

A solução foi movida novamente para um balão para que fosse seca no rotaevaporador, e o hexano obtido nessa etapa poderia ser reutilizado para a mesma.

5.4. Primeira Coluna Cromatográfica (C.C.1)

Para a primeira cromatografia líquida flash, foi utilizada uma coluna 40x5cm, com 70g de fase estacionária de sílica gel 60 e como fase móvel 1L uma solução de 5% de acetato de etila em hexano. Um bomba de ar foi colocada ao topo da coluna (e sendo

retirada e colocada novamente para entrada da amostra e de mais fase móvel quando necessária), para promover a diferença de pressão de uma cromatografia flash. Um pequeno pedaço de algodão foi utilizado no fundo da coluna para impedir a perda de sílica.

Parte inicial do eluato foi recolhida em béqueres de 100mL, até que estivesse perto de sair uma coloração no eluato. Então ele foi recolhido em frascos de cerca de 5mL, até que a coloração da coluna acabasse. Esses frascos de 5ml foram analisados no CG-FID de 4 em 4 para seleção da parcela de interesse. Caso fosse necessário, os béqueres poderiam também ser analisados. Foram realizadas análises em cromatografia de camada final (CCF, fase móvel de 10% de acetato de etila em hexano) para auxiliar no acompanhamento, contudo os resultados não foram claros o suficiente para eliminar a necessidade do CG-EM.

O eluato de interesse foi então novamente movido para um balão e seco no rotaevaporador. O hexano e acetato de etila obtidos puderam ser utilizados novamente apenas na extração líquido-líquido, para não comprometer a coluna cromatográfica.

5.5. Segunda Coluna cromatográfica (C.C.2)

Para a segunda cromatografia líquida flash, a coluna utilizada foi de 40x1,5cm, com 10g de sílica gel 60 de fase estacionária, e 1,5L de fase móvel gradiente, entre hexano e 1% de acetato de etila em hexano, de 300 em 300 mL. A bomba de ar foi utilizada novamente, assim como o algodão. A sequência dos gradientes pode ser observada na tabela 10.

Tabela 10: Gradiente da fase móvel da segunda coluna cromatográfica

Volume (L)	% Acetato de etila
0,3	0
0,3	0,1
0,3	0,2
0,3	0,5
0,3	1

O volume de fase móvel utilizado variou um pouco, pois o processo cromatográfico deve continuar até que saia toda a coloração âmbar da coluna. Novamente, foi utilizada cromatografia em camadas finas para auxiliar no monitoramento da coluna.

O eluato obtido foi recolhido em frascos de 5mL, novamente coletando-se em béqueres frações que eluíssem antes e depois da coloração, que foram encaminhados para análise no CG-FID. Caso fosse adequado, novamente os béqueres poderiam ser também analisados. A parcela de interesse passou pelo mesmo processo de evaporação no rotaevaporador, e o hexano e acetato de etila obtidos puderam ser reutilizados na extração líquido-líquido.

5.6. CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com uma coluna 250x21.2 η m, de fase estacionária Luna 5 μ m C18 e fase móvel de acetonitrila grau de pureza HPLC, filtrada e sonicada para impedir a existência de bolhas de ar no sistema.

Devido à necessidade de reservar o equipamento em outro laboratório (PILAB-IQ/UFRJ), essa etapa só foi realizada após o acúmulo de massa, de forma que toda massa proveniente da segunda coluna cromatográfica foi solubilizada em conjunto na menor quantidade possível de acetonitrila. Em seguida essa solução foi filtrada com filtro de seringa, e encaminhada para a injeção no equipamento com o auxílio de uma seringa de 500 μ l.

Foi utilizado um detector UV/VIS no comprimento de onda de 201nm. Neste equipamento é possível o reciclo de solvente quando o operador achar adequado, portanto sempre que possível era recirculada a acetonitrila para diminuir os gastos do processo.

Varias injeções foram necessárias até que o material fosse completamente purificado, visto que o volume máximo de entrada era de 500 μ L.

5.7. Métodos de análise

Após ambos os procedimentos na cromatografia em coluna flash, o eluato foi analisado no CG-DIC para determinar a presença ou não do eluato de interesse, o manool. Para ambos os casos, o método utilizado foi o mesmo.

Para a cromatografia, era utilizada uma coluna de comprimento nominal, diâmetro e espessura de 10m x 250 μ m x 0,15 μ m, de fase estacionaria DB-17HT, e gás hidrogênio como fase móvel. O fluxo foi constante de 1ml/minuto, e a injeção do tipo *split* 20:1. A temperatura do forno variou de 70 até 330 $^{\circ}$ C, com uma taxa de 15 $^{\circ}$ C/min, durante 17,33 minutos.

Ao fim da cromatografia gasosa, a amostra foi analisada no detector de ionização de chama (DIC), com fluxo de hidrogênio e de ar de 40 e 450ml/min, respectivamente, a 250°C.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Extração Sólido da sálvia

Na extração realizada, para cada 300g de matriz vegetal, foram obtidos cerca de 40g de um extrato etanólico esverdeado após secagem.

Temos portanto a seguinte eficiência desta primeira operação:

$$Ef = 40g/300g = 13,33\%$$

6.2. Extração Líquido-Líquido do extrato de sálvia

Após a extração líquido-líquido realizada foram obtidos na fase de interesse (fase orgânica) cerca de 3,5 g de produto de interesse, para 40g de amostra. Além disso, 70% do hexano utilizado foi recuperado para a utilização na próxima extração realizada.

Desta forma, a eficiência encontrada foi obtida:

$$Ef = 3,5g/40g = 8,75\%$$

6.3. Primeira Coluna Cromatográfica (C.C.1)

Os resultados obtidos (Tabela 11) nesta coluna cromatográfica foi mais variável do que os das etapas anteriores, contudo em média foram produzidos 1,07g de amostra no eluato da coluna cromatográfica. O manool eluiu majoritariamente entre as frações 24 e 40.

Tabela 11: Resultados referentes à primeira coluna cromatográfica nas quatro vezes na qual o processo de extração e purificação foi realizado.

C.C.1	Massa obtida (g)
1	0,897
2	1,083
3	1,084
4	1,215
Média	1,06975

Variância	0,012829688
Desvio Padrão	0,11326821

De acordo com os dados obtidos, a eficiência da primeira coluna cromatográfica é dada por:

$$Ef = 1,07g / 3,5g = 30,57\%$$

6.4. Segunda Coluna Cromatográfica (C.C.2)

Assim como a primeira coluna, a segunda também possuiu resultados variáveis, mas produziu em média 0,51g de material no eluato para os 1,07g que em média entravam na coluna. Nesta etapa, o manool eluiu principalmente entre as frações 16 e 36.

Tabela 12: Resultados obtidos na segunda coluna cromatográfica nas quatro vezes na qual o processo de extração e purificação foi realizado

C.C.2	Massa Obtida
1	0,166
2	0,6709
3	0,6754
4	0,557
Média	0,517325
Variância	0,043394087
Desvio Padrão	0,208312474

Com estes dados, foi obtida a seguinte eficiência para a segunda coluna:

$$Ef = 0,51g / 1,07g = 47,66\%$$

6.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os resultados observados na cromatografia líquida de alta eficiência forneceram cromatogramas similares à Figura 16, não havendo grandes diferenças entre as injeções realizadas.



Figura 16: Cromatograma do CLAE, em azul o manool, e em laranja as áreas de reciclo de solvente

Para este processo, todas as amostras (um total de 2,0693g) foram agrupadas e injetadas. A soma do resultado de todas as amostras foi 1,0523g de manool.

$$Ef = 1,0523g / 2,0693g = 50,85\%$$

Como o resultado apresentado é referente a quatro entradas de 300g de sálvia no início do processo, em média foi obtido 0,2631g de manool por 300g de sálvia. Para essa quantidade de amostra, foram utilizados 5,35L de acetonitrila nível HPLC, ou 1,34L por 300g de sálvia.

6.6. Resumo geral das condições do processo

Com a finalização do processo, foi possível criar um fluxograma que indicasse todas as etapas utilizadas e as condições em cada parte do processo, facilitando assim a observação das operações realizadas (Figura 17).



Figura 17: Fluxograma do processo de otimização da extração de manool a partir da sálvia

6.7. Reaproveitamento de solventes

Durante o processo, em determinadas etapas, após o uso do rotaevaporador, foi possível recuperar parte dos solventes para utilização posterior. Os seguintes solventes puderam ser recuperados:

- Etanol: utilizado apenas na etapa de extração direta a quente, 50% do etanol inicial colocado na extração foi recuperado. Desta forma, dos 1,8L usados, 0,9L foram recuperados, efetivamente diminuindo o gasto de etanol para 0,9 L por extração.

- Hexano: utilizado na extração líquido-líquido, e em ambos os procedimentos de cromatografia em coluna flash, possuindo um alto grau de recuperação: 70%. Contudo, considerou-se inadequado utilizar o hexano recuperado nas colunas cromatográficas, pois nele havia pequenas porcentagens de acetato de etila e possíveis outras impurezas, que comprometeriam a integridade dos processos cromatográficos. A extração líquido-líquido em questão não é tão sensível, portanto todo o hexano recuperado foi gasto nessa etapa, de forma que, após o primeiro processo, os subsequentes não tiveram nenhum gasto de hexano novo nesta operação. Foram recuperados mais de 2,5L de hexano ao todo.

- Acetonitrila: durante o procedimento no CLAE, a acetonitrila foi recirculada em momentos da operação onde não há detecção de nenhuma substância. Desta forma, dos 25 minutos gastos em uma corrida, em 9 deles há o reciclo. Graças a isso, 0,75L de acetonitrila grau de pureza HPLC foram economizados (o valor gasto já leva em conta esse reaproveitamento, pois ele é imediato dentro do equipamento CLAE utilizado).

6.8. Eficiência total do projeto

A eficiência do projeto como um todo pode ser calculada com base na quantidade de matriz vegetal na entrada do processo, e na quantidade de manool produzido ao final:

$$Ef = 0,2631g / 300g = 0,0877\%$$

E a quantidade obtida por 100g ou 1kg de *Salvia officinalis*:

$$0,2631g / 300g = 0,0877g / 100g_{\text{Sálvia}} = 877mg / kg_{\text{Sálvia}}$$

Desta forma, é possível por fim montar um novo fluxograma geral do processo, desta vez com as eficiências, as entradas e saídas de material, no lugar das condições de cada etapa. O mesmo pode ser observado na Figura 18.

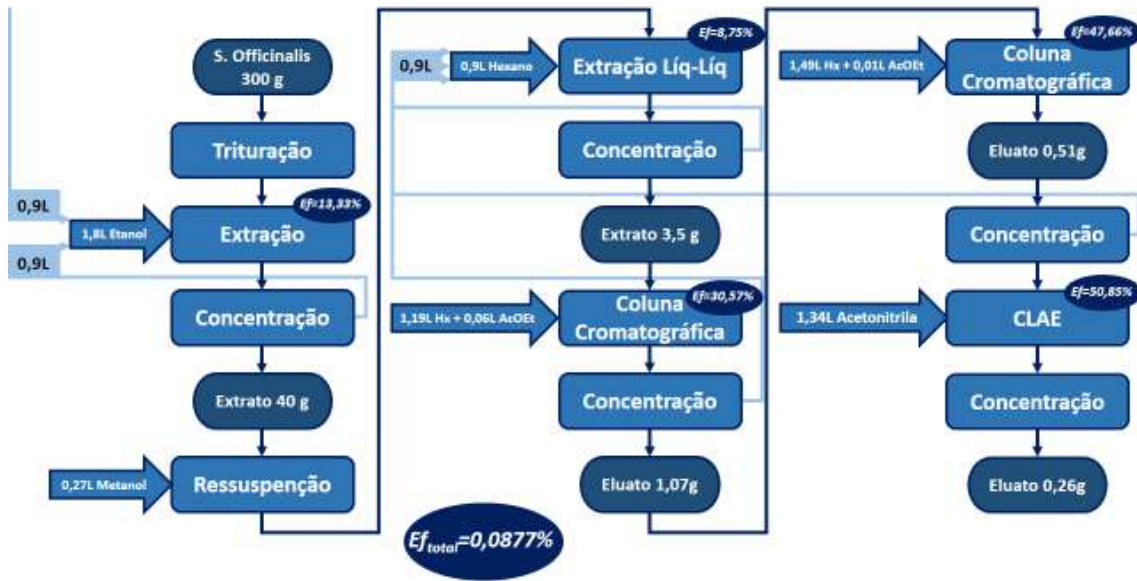


Figura 18: Fluxograma com fluxo de solventes e eficiência de cada operação assim como a do processo como um todo.

6.9. Análise Econômica

Para a avaliação econômica de viabilidade da produção de manool em laboratório, deve-se avaliar o preço de cada um dos materiais e solventes de entrada no processo. É considerado que já foi realizado uma primeira extração e purificação, para que se tenha solventes já em reciclo, e que todos os equipamentos necessários já são existentes no laboratório. Tendo isto em vista, os seguintes fatores serão parte da avaliação econômica:

- Preço da matéria prima
- Preço dos solventes utilizados

A sálvia obtida comercialmente custou R\$52/kg. Para que se saibam os solventes, cotações simples foram feitas no site comercial da Sigma-Aldrich Co. (SG) e da Hexis Científica. Os solventes analisados foram: etanol, metanol, hexano, acetato de Etila, e acetonitrila grau de pureza HPLC. Gastos de sílica (Tabela 13) e solventes em menor quantidade como o clorofórmio deuterado não foram considerados.

Tabela 13: Tabela de preços de produção de 1g de manool pela metodologia desenvolvida. SA representa a empresa Sigma-Aldrich Co.

Material	Quantidade (kg ou L)	Preço em R\$/(Kg ou L)	Fonte	Preço R\$/extração	Preço (R\$/g _{manool})
sálvia	0,3	52	Estrella da terra	15,60	59,29
etanol	0,9	21,94	HEXIS 95%	19,75	75,05
metanol	0,3	90	SA analytical standart	27,00	102,62
hexano	2,6821	62	SA analytical standart 10L	166,29	632,04
acetato de etila	0,0679	108,4	SA analytical standart 5L	7,36	27,98
acetonitrila	1,34	220	SAHPLC gradient	294,80	1.120,49
Total					2.017,45

Para efeito de comparação, Manool pode ser comprado com pureza mínima de 80% por 1.200USD/g na empresa *Toronto Research Chemicals*. Com a cotação oficial do dólar do dia 25 de julho de 2017 (3,173USD/BRL, fonte: <http://www.bcb.gov.br>), a grama de manool custa 3.807,60 reais. Portanto, comprar o manool (ainda não considerando frete) representa um aumento de 88,73% no preço em comparação com a sua produção.

Podemos ainda analisar o quanto foi economizado com os reciclados de solvente utilizados no processo. À cada processo, eram reciclados 0,9L de etanol, e 0,9L de Hexano, e a acetonitrila total reciclada foi de 0,75L (o que resultou em 0,1874 por processo). A economia realizada pode ser observada na Tabela 14.

Tabela 14: Solventes economizados com os reciclados realizados durante o processo

Material	Quantidade (L)	Quantidade total (L)	Preço R\$/L	Preço R\$/extração	Preço (R\$/g _{manool})
etanol	0,9	3,60	21,94	19,75	75,05
hexano	0,9	3,60	62	55,80	212,09
acetonitrila	0,1875	0,75	220	41,25	156,78
Total					443,92

Observa-se por fim com base nestes resultados, que sem os reciclados, o processo custaria 2.461,39R\$/g_{manool}, sendo 22,00% mais caro. Podemos portanto ver a diferença e importância de economizar nas etapas possíveis de qualquer processo laboratorial.

7. CONCLUSÃO E PROJEÇÕES FUTURAS

Ao decorrer do trabalho, todas as questões levantadas entre os objetivos puderam ser satisfatoriamente respondidas.

De fato, com a combinação de uma pesquisa bibliográfica, e experimentos no laboratório, conseguiu-se determinar que a extração direta a quente é o melhor método para a extração de manool, em termos de rendimento. Não apenas isso, mas o solvente de extração também foi determinado com sucesso pelos Parâmetros de Hansen.

Em sequência, a otimização das variáveis da extração (temperatura, tempo e relação entre solvente e matriz vegetal) foi realizada com sucesso, com o auxílio da ferramenta ANOVA. Um ponto levantado na introdução foi amplamente utilizado nesta etapa, pois duas vezes foi realizada uma escolha que não gerava a área otimizada, contudo facilitava o trabalho em laboratório nas condições escolhidas (na escolha de 69 °C em vez de 78 °C, e da razão 6:1 no lugar da 5:1).

Por fim, na primeira parte do trabalho, uma metodologia de purificação em 4 etapas foi desenvolvida com sucesso, com o auxílio da literatura, e de pequenas mudanças visando a praticidade e economia no laboratório. O rendimento final de manool mostrou-se satisfatório, legitimando as mudanças realizadas e o método como um todo.

Com o fim da criação do método extrativo e da purificação do manool, a parte inicial do trabalho foi concluída com sucesso. Portanto, foi possível dar início à segunda parte, onde a produção em maior escala de manool era o objetivo principal.

Com a realização do processo em quaduplicata, foi possível observar a reprodutibilidade do processo pois as massas obtidas foram bastante próximas. Desta forma, todas as etapas do processo tiveram a sua eficiência propriamente explicitada, assim como a eficiência total, maior do que outras encontradas na literatura com a mesma matriz vegetal, já demonstrando sucesso nas intenções de extrair uma maior quantidade de manool.

Em tempos de cortes por toda universidade, economia foi um tema presente por boa parte do trabalho. De fato, foi possível economizar quantidades significativas de solvente, promovendo uma economia no valor final por grama de manool produzido de 22%.

Com os custos definidos, é facilitada a decisão de produzir ou não mais manool para determinado projeto futuro. Assim, estudos sobre aplicações do manool podem ser realizados já sendo conhecido parte dos custos associados ao processo.

Conclui-se portanto que o trabalho como um todo cumpriu o que se comprometeu a fazer, abrindo espaço para a utilização do manool obtido em outros estudos. Dentre os ramos ainda pouco explorados está o uso dele como um aditivo na indústria alimentícia ou de cosméticos. Seu *flavour* pode ser um atrativo importante para o produto, e a sua obtenção de forma natural é pode impulsionar uma determinada marca na opinião.

Mas é claro, o principal constituinte de uma planta medicinal milenar cujo nome significa literalmente “cura”, possui muito potencial na indústria farmacêutica, suas propriedades bactericidas podem ser melhor exploradas, assim como o seu auxílio no combate às doenças cardiovasculares. Pode-se também buscar estudar a atuação do manool em outros tipos de tratamento que no momento são apenas ligados ao óleo essencial de sálvia, como por exemplo o uso no tratamento da doença de Alzheimer assim como da ansiedade, uma doença tão atual na nossa sociedade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHONDZADEH, S., NOROOZIAN, M. MOHAMMADI, M. et al. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 28, n. 1, p. 53-59, 2003.

ALEKSOVSKI, S. A. SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of Salvia officinalis L. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 40, n. 2, p. 239-245, 2007.

ANDREWS, ALFRED C. Sage as a condiment in the graeco-roman era. *Economic Botany*, v. 10, n. 3, p. 263-266, 1956.

BAKOTA, ERICA L., WINKLER-MOSER, JILL K. BERHOW, MARK A. et al. Antioxidant Activity and Sensory Evaluation of a Rosmarinic Acid-Enriched Extract of Salvia officinalis. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 4, p. C711-C717, 2015.

Banco Central do Brasil. Bcb.gov.br. Disponível em: <<http://www.bcb.gov.br>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BORDES, C., FRÉVILLE, V. RUFFIN, E. et al. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 383, n. 1-2, p. 236-243, 2010.

BOWER, ALLYSON, MARQUEZ, SUSANDE MEJIA, ELVIRA GONZALEZ. The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 16, p. 2728-2746, 2015.

CAPUTI, LORENZO APREA, EUGENIO. Use of Terpenoids as Natural Flavouring Compounds in Food Industry. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, v. 3, n. 1, p. 9-16, 2011.

DE OLIVEIRA, POLLYANNA FRANCIELLI, MUNARI, CARLA CAROLIN NICOLELLA, HELOIZA DINIZ et al. Manool, a Salvia officinalis diterpene, induces selective cytotoxicity in cancer cells. *Cytotechnology*, v. 68, n. 5, p. 2139-2143, 2015.

DURLING, N, CATCHPOLE, OGREY, J et al. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1417-1424, 2007.

GLISIC, SANDRA B., RISTIC, MIHAJLOSKALA, DEJAN U. The combined extraction of sage (*Salvia officinalis* L.): Ultrasound followed by supercritical CO₂ extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, n. 1, p. 318-326, 2011.

GLISIC, SANDRA, IVANOVIC, JASNARISTIC, MIHAJLO et al. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, n. 1, p. 62-70, 2010.

Hexis Científica. Hexis.com.br. Disponível em: <<http://www.hexis.com.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

HONG, LI-LI, YU, HAO-BINGWANG, JIE et al. Unusual Anti-allergic Diterpenoids from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*. *Scientific Reports*, v. 7, p. 43138, 2017.

KATAEVA, O. N., MAMEDOVA, V. L. NIKITINA, K. A. et al. First coordination polymer based on diterpenoids. Synthesis, structure, and magnetic properties. *Russian Chemical Bulletin*, v. 66, n. 2, p. 362-367, 2017.

KENNEDY, DAVID O, PACE, SONIAHASKELL, CRYSTAL et al. Effects of Cholinesterase Inhibiting Sage (*Salvia officinalis*) on Mood, Anxiety and Performance on a Psychological Stressor Battery. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 4, p. 845-852, 2005.

KIANBAKHT, S., ABASI, B. PERHAM, M. et al. Antihyperlipidemic Effects of *Salvia officinalis* L. Leaf Extract in Patients with Hyperlipidemia: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 12, p. 1849-1853, 2011.

KOGA, TETSURO, HIROTA, NAOKOTAKUMI, KENJI. Bactericidal activities of essential oils of basil and sage against a range of bacteria and the effect of these essential oils on *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiological Research*, v. 154, n. 3, p. 267-273, 1999.

Lista de Espécies da Flora do Brasil. Floradobrasil.jbrj.gov.br. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

MCMURRY, JOHN. Química Organica vol 2. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

MCMURRY, JOHN. Química Orgânica vol 1. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

MONDOLIS, EILY, MORÁN-PINZÓN, JUAN ANTONIOROJAS-MARQUÉZ, FOCIÓN ALBERTO et al. Vasorelaxant effects in aortic rings of eight diterpenoids isolated from three Venezuelan plants††Supporting Information available (1H NMR and 13C NMR spectra data of compounds 1-8) in Supplementary Material. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 5, p. 769-775, 2013.

MONTEIRO, ARIADNE. Efeito do diterpeno Manool sobre a função vascular de ratos normotensos e hipertensos. Mestre em Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, 2016.

MOREIRA, MONIQUE R., SOUZA, ARIANA B.MOREIRA, MAÍSA A. et al. RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 6, p. 870-876, 2013.

NICOLELLA, HELOIZA DINIZ, OLIVEIRA, POLLYANNA FRANCIELLI DEMUNARI, CARLA CAROLINA et al. Differential effect of manool – A diterpene from *Salvia officinalis*, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. Food and Chemical Toxicology, v. 72, p. 8-12, 2014.

Óleos Essenciais | O Guia do Brasil. Oleosessenciais.org. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

PETROVSKA, BILJANABAUER. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Reviews, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PINO, JORGE A., ESTARRÓN, MIRNAFUENTES, VICTOR. Essential Oil of Sage (*Salvia officinalis*L.) Grown in Cuba. Journal of Essential Oil Research, v. 9, n. 2, p. 221-222, 1997.

ROUT, PRASANT KUMAR, RAO, Y. RAMACHANDRANAİK, SATYANARAYAN. Liquid CO2 extraction of *Murraya paniculata* Linn. flowers. Industrial Crops and Products, v. 32, n. 3, p. 338-342, 2010.

STEFANOVIC, OLGICA, STANOJEVIC, DRAGANACOMIC, LJILJANA.
Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *cichorium intybus* extract and antibiotics. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.

The PubChem Project. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

ULUBELEN, A., TOPCU, G.ERIŞ, C. et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*.
Phytochemistry, v. 36, n. 4, p. 971-974, 1994.

WALKER, J. B., SYTSMA, K. J.TREUTLEIN, J. et al. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany*, v. 91, n. 7, p. 1115-1125, 2004.

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, n. 18, p. 2677-2681, 2014.

WEI, WEN-JUN, ZHOU, PAN-PANLIN, CHANG-JUN et al. Diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza* and Their Immune-Modulating Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017.

YANG, XIAN-WEN, FENG, LINLI, SU-MEI et al. Isolation, structure, and bioactivities of abiesadines A–Y, 25 new diterpenes from *Abies georgei* Orr. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 2, p. 744-754, 2010.

Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services. Sigma-Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em: 26 jul. 2017.