

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Extração de Bioativos Derivados de *Cannabis* via Fluidos Pressurizados

Daniel Ribeiro Grijó
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
Coorientador: Prof. Dr. Ignacio Alberto Vieitez Osorio

Maringá – PR – Brasil
Fevereiro de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Extração de Bioativos Derivados de *Cannabis* via Fluidos Pressurizados

Daniel Ribeiro Grijó
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
Coorientador: Prof. Dr. Ignacio Alberto Vieitez Osorio

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos (Equilíbrio de Fases e Propriedades Termodinâmicas).

Maringá – PR – Brasil
Fevereiro de 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

G857e Grijó, Daniel Ribeiro
Extração de bioativos derivados de Cannabis via
fluidos pressurizados / Daniel Ribeiro Grijó. --
Maringá, PR, 2018.
87 f.: il. col.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.
Coorientador: Prof. Dr. Ignacio Alberto Vieitez
Osorio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2018.

1. Cannabis. 2. Canabinóides. 3. Extração sob
alta pressão. 4. Atividade anti tumoral. I. Cardozo
Filho, Lúcio, orient. II. Vieitez Osorio, Ignacio
Alberto, orient. III. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de
Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

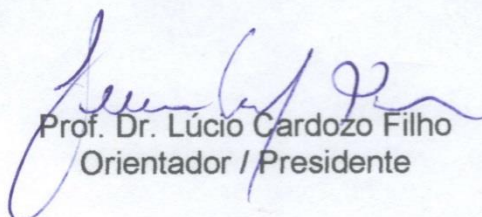
CDD 23.ed. 616.8635

Márcia Regina Paiva de Brito – CRB-9/1267

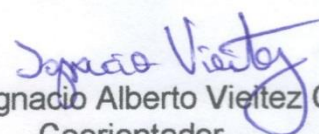
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Daniel Ribeiro Grijó perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 22 de fevereiro de 2018.

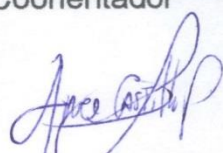
COMISSÃO JULGADORA




Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
Orientador / Presidente



Prof. Dr. Ignacio Alberto Viquez Osorio
Coorientador



Prof. Dr. Pedro Felipe Arce Castillo
Membro



Prof. Dr. Luciano Morais Lião
Membro

“Os dois dias mais importantes na sua vida são: o dia em que você nasce, e o dia em que você descobre o porquê”

Mark Twain

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho pela oportunidade de realização desse estudo e por todo apoio cedido durante os anos de realização do mesmo.

Ao Prof. Dr. Ignacio Alberto Vieitez Osorio pela co-orientação durante as análises realizadas na Faculdade de Química da Universidade da República do Uruguai (FQ-UdelaR), entre fevereiro e maio de 2017, bem como para toda sua equipe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CYTAL). Aproveito aqui para agradecer também ao Dr. Carlos García Carnelli (FQ-UdelaR) pela contribuição de amostra de flores e de padrões de canabinóides, o que permitiu grande parte da realização dessa pesquisa.

Ao doutorando (FQ/UdelaR) Daniel Alberto Carbo Dabove (Canuevo Biotechnology Inc.), pelo fornecimento de amostras de canabidiol de alta pureza, bem como aos que colaboraram durante as análises: Gryele Karen Piva (PEQ/UEM) (equilíbrio de fase) e Leandro Couto Silva (UNIOESTE - Toledo) (análises térmicas).

Aproveito também para agradecer aos amigos que ajudaram em cálculo e revisões: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva (UNIOESTE - Toledo) (modelagem de Sovová), Prof. Dr. Vladimir Ferreira Cabral (PEQ/UEM) (modelagem de equilíbrio de fases) e ao Dr. Gerardo Oscar Pisoni (Universidad de Córdoba/UCO) (dúvidas, equilíbrio de fases).

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura por autorizar as análises de atividades antitumorais dos extratos estudados e a Dr. Danielle Lazarin Bidóia pela realização das análises.

Ao Prof. Dr. Carlos E. Barão do Instituto Federal do Paraná (Paranavaí) por possibilitar a análise de composição centesimal das sementes estudadas. Agradeço também a estudante Patrícia Sanches, de Engenharia do Petróleo (UFES), e sua família, por cederem acomodações em sua residência durante estas análises. E por fim, aos estudantes de doutorado Sílvio M. P. Marcucci e Alexandre Diório (PEQ/UEM) pela colaboração com análises de propriedades físico-químicas de extratos das sementes.

À toda equipe da Polícia Científica de Curitiba (Brasil), especialmente à Perita Mariana Ulysséa, por colaborar com as primeiras pesquisas de *Cannabis* durante meu mestrado. Agradeço também a Francisco Javier Planelles Gil por ceder acomodações em sua residência durante este período de análises.

Ao Prof. Dr. Cid Marcos Gonçalves Andrade por aceitar ser o docente responsável para a realização do evento “I Encontro Acadêmico Multidisciplinar sobre *Cannabis* (UEM)”.

À Dr. Margareth Borges Coutinho Gallo por ceder acomodações em sua residência durante o período em que ocorreu o 1st IbMASS (IberoAmerican Conference on Mass Spectrometry, Rio de Janeiro – Brasil – 2016), cujo no qual apresentei um trabalho.

Aos amigos uruguaios Guillermo Fariña, Martín Suñol e Dony da Silva, dos Clubs Canábico no Departamento de Bella Unión (Uruguai). Agradeço também ao meu amigo brasileiro Pablo Dornelles, estudante de psicologia na UdelaR.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

De uma forma geral, todos aqueles que também colaboraram com essa pesquisa.

Grijó, Daniel Ribeiro. **Extração de Bioativos Derivados de *Cannabis* via Fluidos Pressurizados**. Orientador: Lúcio Cardozo Filho. Maringá: UEM / Pós-graduação em Engenharia Química, 2018. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos).

RESUMO

As plantas do gênero *Cannabis* possuem substâncias específicas chamadas canabinóides. O canabidiol (CBD) e o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) são canabinóides que possuem importantes aplicabilidades medicinais. Altos teores de canabinóides são encontrados na resina de flores de plantas fêmeas não polinizadas. O CBD e o Δ^9 -THC estão em baixas concentrações em flores recém-colhidas, mas são potencializados com o aquecimento de uma amostra. O cânhamo é uma variedade de *Cannabis* com baixos teores de canabinóides e suas sementes são ricas em ácidos graxos poli-insaturados. A obtenção destes princípios ativos com alta pureza e livre de solventes são amplamente requisitadas. Este trabalho tem como objetivo aplicar a tecnologia de fluidos pressurizados analisando a variação de parâmetros para otimizar a obtenção de extratos com propriedades bioativas a partir de flores e sementes de *Cannabis*. Foram analisadas três variedades de flores em parceria com a Universidade da República do Uruguai, utilizando um método cromatográfico certificado. Foi avaliado o comportamento térmico das amostras de flores a 90, 100 e 140 °C, a umidade, bem como a influência do tamanho de partículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As extrações de flores foram feitas com dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) sendo comparadas as metodologias de pré-aquecimento das amostras, de uso de co-solvente e de extração fracionada. Avaliou-se a atividade anti-tumoral dos extratos por um método quantitativo colorimétrico chamado MTT. Devido ao grande interesse medicinal no CBD foi analisado o equilíbrio sólido-fluido deste com o CO₂-SC a fim de determinar condições favoráveis de manipulação. Foi utilizado o método sintético visual na faixa de temperatura e fração molar de 45 a 65 °C e 2 a 3 (10⁻⁴), respectivamente. Paralelamente foi analisada a composição centesimal de sementes descascadas de cânhamo, bem como extrações com CO₂-SC e propano pressurizado, sendo ainda avaliada nos extratos a composição de ácidos graxos, tocoferóis totais e β -caroteno, bem como os índices de acidez e umidade. Os extratos de flores obtidos com co-solvente apresentaram maiores rendimentos, porém menores concentrações de canabinóides. Por outro lado nos extratos com pré-aquecimento foi possível obter elevadas e distintas concentrações de CBD e Δ^9 -THC. A extração fracionada para flores também se apresentou eficiente. Os melhores resultados de atividade anti-tumoral foram relacionados ao câncer de útero. As análises de equilíbrio de fase apresentaram baixos desvios e bons ajustes. O propano pressurizado se demonstrou uma alternativa interessante para a obtenção de óleo das sementes frente ao CO₂-SC, visto que foi necessária uma menor quantidade de solvente, obteve-se maiores teores de tocoferóis totais e β -caroteno, menores índices de umidade e acidez, bem como os mesmos elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados.

Palavras-chave: *Cannabis*; canabinóides, extração sob alta pressão, atividade anti-tumoral; equilíbrio de fases; flores fêmeas não polinizadas; sementes de cânhamo.

Grijó, Daniel Ribeiro. ***Cannabis* Derived Bioactive Extraction with Pressurized Fluids**. Advisor: Lúcio Cardozo Filho. Maringá: UEM / Post-graduate in Chemical Engineering, 2018. Dissertation (Master in Process Development).

ABSTRACT

Plants of the genus *Cannabis* have specific substances called cannabinoids. Cannabidiol (CBD) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) are cannabinoids that have important medicinal applications. High levels of cannabinoids are found in the flower resin of non-pollinated female plants. CBD and Δ^9 -THC are at low concentrations in freshly harvested flowers, but are potentiated by heating a sample. Hemp is a variety of *Cannabis* with low levels of cannabinoids and their seeds are rich in polyunsaturated fatty acids. Obtaining these active substances with high purity and solvent-free are widely required. This work aims to apply pressurized fluid technology analyzing the variation of parameters to optimize the obtaining of extracts with bioactive properties from *Cannabis* flowers and seeds. Three varieties of flowers were analyzed in partnership with the University of the Republic of Uruguay using a certified chromatographic method. The thermal behavior of flower samples at 90, 100 and 140 °C, moisture, as well as the influence of particle size by scanning electron microscopy (SEM) was evaluated. The flower extractions were made with supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), comparing the sample pre-heating, co-solvent and fractionation extraction methodologies. The antitumor activity of the extracts was evaluated by a quantitative colorimetric method called MTT. Due to the great medicinal interest in the CBD the solid-fluid equilibria of this with the SC-CO₂ was analyzed in order to determine favorable conditions of manipulation. The visual synthetic method was used in the temperature and molar fraction range from 45 to 65 °C and 2 a 3 (10⁻⁴), respectively. In parallel, the centesimal composition of hulled hemp seeds was analyzed, as well as SC-CO₂ and pressurized propane extractions. Compositions of fatty acids, total tocopherols and β -carotene were evaluated in the extracts, as well as acidity and moisture indexes. The extracts of flowers obtained with co-solvent showed higher yields, but lower concentrations of cannabinoids. However in extracts with preheating it was possible to obtain high and different concentrations of CBD and Δ^9 -THC. The fractionated extraction for flowers was also efficient. The best results of anti-tumor activity were related to cervical cancer. The phase equilibrium analyzes showed low deviations and good adjustments. The pressurized propane showed an interesting alternative to obtain oil of the seeds compared to SC-CO₂, since a smaller amount of solvent was required, higher contents of total tocopherols and β -carotene, lower moisture and acidity indexes, as well as the same high levels of polyunsaturated fatty acids.

Keywords: *Cannabis*; cannabinoids, extraction under high pressure, anti-tumor activity; phase equilibria; non-pollinated female flowers; hemp seeds.

NOMENCLATURA

Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol;

Δ^9 -THCA: ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico;

ΔH_{FUS} : entalpia de fusão

ΔH_{SUB} : entalpia de sublimação

ΔH_{VAP} : entalpia de vaporização

ω : fator acêntrico

ω_3 : ômega 3

ω_6 : ômega 6

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil);

CBD: canabidiol;

CBDA: ácido canabidiólico;

CBN: canabinol;

CBNA: ácido canabinólico;

CO₂-SC: dióxido de carbono supercrítico;

ECE-PR: equação cúbica de estado de Pening-Robinson;

EtOH: etanol;

HPLC: cromatografia líquida de alta performance;

Hz: Hertz

IRCCA Instituto de Regulação e Controle de Cannabis (Uruguai);

MPa: Mega Pascal;

P_c: pressão crítica

T_c: temperatura crítica;

T_m: temperatura de fusão

T_b: temperatura de vaporização

UdelaR: Universidade da República (Uruguai);

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Descarboxilação dos canabinóides	16
Figura 2 – Ausência de resina nas sementes	20
Figura 3 – Produção mundial de sementes de cânhamo entre 1961 e 2014.....	21
Figura 4 – Extrator de alta pressão (1).....	30
Figura 5 – Extrator de alta pressão (2).....	31
Figura 6 – Aparato experimental: equilíbrio de fases (método sintético visual)	35
Figura 7 – Amostras de flores utilizadas	41
Figura 8 – Sementes de cânhamo descascadas.....	47
Figura 9 – Comportamento térmico dos canabinóides (variedade: A)	54
Figura 10 – Degradação do Δ^9 -THC e formação do CBN (var: A)	55
Figura 11 – Energia de ativação e fator pré-exponencial (var: A).....	56
Figura 12 – Variação do teor de Δ^9 -THC sob aquecimento (var: B)	56
Figura 13 – Variação do teor de CBD e Δ^9 -THC sob aquecimento (var: C).....	57
Figura 14 – Cinéticas de extração com pré-aquecimento (var: B e C).....	60
Figura 15 – Superfície de resposta dos rendimentos com pré-aquecimento (var: B e C). 61	
Figura 16 – Diagrama de Pareto dos rendimentos com pré-aquecimento (var: B e C).....	62
Figura 17 – Cinética de extração com co-solvente (var: B e C).....	64
Figura 18 – Comparação estrutural das superfícies por MEV (var: B).....	66
Figura 19 – Comparação estrutural das superfícies por MEV (var: C)	66
Figura 20 – Análises termogravimétricas do CBD: a) TG; b) DSC	71
Figura 21 – Equilíbrio sólido-fluido (CBD + CO ₂ -SC).....	72
Figura 22 – Cinéticas das extrações (sementes de cânhamo)	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da planta pelo teor de Δ^9 -THC e CBD.....	17
Tabela 2 – Dados de solubilidade do CBD em CO ₂ -SC da literatura.....	25
Tabela 3 – Dados de solubilidade do Δ^9 -THC em CO ₂ -SC da literatura	25
Tabela 4 – Métodos de contribuição de grupos.....	40
Tabela 5 – Parâmetros para análise de canabinóides em HPLC.	42
Tabela 6 – Planejamento experimental das extrações (variedade: A).....	45
Tabela 7 – Planejamento da análise de influência de parâmetros (var: A)	45
Tabela 8 – Planejamento experimental das extrações (var: B e C).....	46
Tabela 9 – Controle de temperatura durante digestão: análise de proteínas sementes ...	49
Tabela 10 – Gradiente da fase móvel (HPLC) para análise de tocoferóis nas sementes .	52
Tabela 11 – Perda de massa das flores sob aquecimento de 140 °C (var: A).....	54
Tabela 12 – Velocidades específicas de reações dos canabinóides (var: A).	55
Tabela 13 – Análise comparativa dos extratos (var: A)	57
Tabela 14 – Análise comparativa dos extratos fracionados (var: A).....	59
Tabela 15 – Modelagens das extrações com pré-aquecimento (var: B)	59
Tabela 16 – Modelagens das extrações com pré-aquecimento (var: C).....	60
Tabela 17 – Tabela ANOVA das extrações com pré-aquecimento (var: B e C).....	61
Tabela 18 – Tabela <i>p</i> -valor das extrações com pré-aquecimento (var: B e C)	62
Tabela 19 – Composição (m/m %) dos extratos obtidos com pré-aquecimento (var: B)...	62
Tabela 20 – Composição (m/m %) dos extratos obtidos com pré-aquecimento (var: C) ..	63
Tabela 21 – Modelagens das extrações com co-solvente (var: B e C).....	64
Tabela 22 – Teor de óleos essenciais <i>in natura</i> e em extratos (var: B e C).....	65
Tabela 23 – Concentração citotóxica de extratos para inibir 50 % de células (CC ₅₀)	67
Tabela 24 – Índices de atividade anti-tumoral dos extratos.....	67
Tabela 25 – Estimativas de propriedades críticas e fator acêntrico dos canabinóides	68
Tabela 26 – Estimativas de propriedades de transição de fases dos canabinóides	69
Tabela 27 – Estimativa do volume molar e densidade dos canabinóides a 25 °C	70
Tabela 28 – Pressões (bar) de transição sólido-fluido (CBD + CO ₂ SC)	71
Tabela 29 – Composição centesimal das sementes de cânhamo.	72
Tabela 30 – Modelagens das extrações (sementes de cânhamo).....	73
Tabela 31 – Propriedades físico-químicas dos extratos (sementes de cânhamo).....	75

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 2 – REVISÃO CIENTÍFICA	15
2.1 FLORES FÊMEAS NÃO POLINIZADAS.....	15
2.1.1 ENERGIA DE ATIVAÇÃO DOS CANABINÓIDES	17
2.1.2 APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS	19
2.2 SEMENTES DE CÂNHAMO.....	19
2.3 FLUIDO SOB ALTA PRESSÃO.....	21
2.3.1 ESTIMATIVA DE PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS (CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS)	21
2.3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM DIÓXIDO DE CARBONO	22
2.3.2.1 EXTRAÇÃO FRACIONADA COM DIÓXIDO DE CARBONO	24
2.3.3 EXTRAÇÃO COM PROPANO PRESSURIZADO	25
2.3.4 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	25
2.3.5 EQUILÍBRIO DE FASES	27
2.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS.....	28
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 EXTRAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO	30
3.1.1 EQUIPAMENTOS	30
3.1.2 MODELAGEM MATEMÁTICA (CINÉTICA DE EXTRAÇÃO)	31
3.2 EQUILÍBRIO DE FASES SOB ALTA PRESSÃO	34
3.2.1 EQUIPAMENTO	35
3.2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA (SÓLIDO-FLUIDO)	37
3.2.3 ESTIMATIVA DE PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS (CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS)	39
3.3 FLORES FÊMEAS NÃO POLINIZADAS.....	41
3.3.1 ANÁLISE DA UMIDADE	41
3.3.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO	42
3.3.2.1 CANABINÓIDES	42
3.3.2.1.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	42
3.3.2.1.2 COMPOSIÇÃO NAS FLORES.....	42
3.3.2.1.3 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS.....	43
3.3.2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	43
3.3.3 COMPORTAMENTO TÉRMICO DOS CANABINÓIDES	44
3.3.3.1 ENERGIA DE ATIVAÇÃO DOS CANABINÓIDES	44
3.3.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS (EXTRAÇÕES)	44
3.3.4.1 VARIEDADE A	45
3.3.4.2 VARIEDADES B E C.....	45
3.3.4.2.1 COM PRÉ-AQUECIMENTO E SEM CO-SOLVENTE	46
3.3.4.2.2 SEM PRÉ-AQUECIMENTO E COM CO-SOLVENTE	46
3.3.5 ATIVIDADE ANTI-TUMORAL.....	46
3.4 SEMENTES DE CÂNHAMO.....	47
3.4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	47
3.4.1.1 LIPÍDEOS.....	48
3.4.1.2 FIBRA BRUTA.....	48
3.4.1.3 PROTEÍNAS.....	49
3.4.1.4 UMIDADE	50
3.4.1.5 CINZAS.....	50
3.4.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS	51
3.4.2.1 DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO	51
3.4.2.2 PROPANO.....	51

3.4.3	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS	51
3.4.3.1	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	51
3.4.3.2	COMPOSIÇÃO DE TOCOFERÓIS TOTAL	52
3.4.3.3	COMPOSIÇÃO DE β -CAROTENO.....	52
3.4.3.4	ÍNDICE DE ACIDEZ	53
3.4.3.5	UMIDADE DO ÓLEO	53
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO		54
4.1	FLORES FÊMEAS NÃO POLINIZADAS.....	54
4.1.1	COMPORTAMENTO TÉRMICO DOS CANABINÓIDES.....	54
4.1.1.1	VARIEDADE A	54
4.1.1.2	VARIEDADE B	56
4.1.1.3	VARIEDADE C	56
4.1.2	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	57
4.1.2.1	VARIEDADE A	57
4.1.2.1.1	EFEITO DA PRESSÃO	58
4.1.2.1.2	EFEITO DA TEMPERATURA	58
4.1.2.1.3	EFEITO DO PRÉ-AQUECIMENTO	58
4.1.2.1.4	EXTRAÇÕES FRACIONADAS.....	58
4.1.2.2	VARIEDADES B E C.....	59
4.1.2.2.1	COM PRÉ-AQUECIMENTO E SEM CO-SOLVENTE	59
4.1.2.2.1.1	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RENDIMENTOS	61
4.1.2.2.1.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS COMPOSIÇÕES.....	62
4.1.2.2.2	SEM PRÉ-AQUECIMENTO E COM CO-SOLVENTE	64
4.1.2.2.2.1	CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE CANABINÓIDES.....	64
4.1.2.2.2.2	MISCROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	65
4.1.3	ATIVIDADE ANTI-TUMORAL.....	67
4.1.4	ANÁLISES COM O CANABIDIOL PURO	68
4.1.4.1	ESTIMATIVA DE PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS (CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS)	68
4.1.4.2	ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS	70
4.1.4.3	EQUILÍBRIO DE FASES (MODELAGEM)	71
4.2	SEMENTES DE CÂNHAMO.....	72
4.2.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	72
4.2.2	EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS	73
4.2.2.1	CINÉTICA DE EXTRAÇÃO.....	73
4.2.2.2	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS.....	74
4.2.2.2.1	CO ₂ -SC.....	76
4.2.2.2.2	PROPANO PRESSURIZADO	76
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES		78
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS CIENTÍFICAS.....		80

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

As plantas do gênero *Cannabis* já foram classificadas entre as espécies *Cannabis sativa* L. (¹LANNAEUS, 1753), *Cannabis indica* Lam. (²LAMARK, 1785) e *Cannabis ruderalis* Janisch. (³JANISCHEVKY, 1924). Apesar disso, não existe uma definição cientificamente unânime e muitas vezes o gênero é considerado monotípico, tendo apenas a espécie *Cannabis sativa* L. (⁴FASSIO *et al.*, 2013), como é reconhecida atualmente no Brasil (⁵ANVISA, 2017), por exemplo. Estas plantas foram uma das primeiras a serem cultivadas pelos seres humanos sendo que ao longo da história suas fibras foram utilizadas em têxteis e papel, suas sementes como alimento e suas folhas e flores como medicamento (⁶HIU-LIN, 1973).

No início do século XX países das Nações Unidas começaram a discutir sobre possíveis riscos relacionados à bioatividade da resina presente em flores de plantas fêmeas não polinizadas (⁷WILLOUGHBYM, 1925). Na década de 40 as substâncias presentes na resina começaram a ser isoladas em laboratório e suas estruturas químicas foram parcialmente definidas (⁸ADAMS *et al.*, 1940; ⁹JACOB & TODD, 1940). Na década de 60 as plantas de *Cannabis* com alto teor de resina foram classificadas como droga e o cultivo ficou restrito a pesquisas científicas, porém o cultivo de plantas com baixo teor de resina direcionado exclusivamente à produção industrial de fibras e sementes não foi proibido (¹⁰SCND, 1961). Na mesma década foi finalmente identificada a estrutura do principal bioativo, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (¹¹MECHOULAM & GAONI, 1967), bem como de um importante isômero chamado canabidiol (CBD) (¹²MECHOULAM & SHVO, 1963). Foi observado que estas e outras substâncias com estruturas químicas semelhantes presentes na resina eram exclusivas do gênero *Cannabis* e, com isso, criou-se uma classificação chamada canabinóides (¹³GAONI & MECHOULAM, 1971). Nas últimas décadas do século foram feitos muitos estudos em aplicações medicinais relacionadas aos canabinóides (¹⁴CARLINI *et al.*, 1972; ¹⁵CUNHA *et al.*, 1980;). Atualmente no Brasil a aplicabilidade do CBD e Δ^9 -THC são restritas a importação visto que ainda não existe a produção de medicamentos com essas substâncias no país (¹⁶ANVISA, 2016).

As sementes não apresentam canabinóides em sua composição (¹⁷TURNER *et al.*, 1981; ¹⁸LACHENMEIER & WALCH, 2005; ¹⁹UNODC, 2009), mas durante o processo de industrialização essas substâncias, presente em outras partes da planta, podem ser aderidas na superfície externa das cascas (²⁰GROTENHERMEN *et al.*, 1998; ²¹ROSS *et al.*, 2000; ²²BRENNEISEN, 2007). Por esse motivo, para a produção industrial de

sementes se utiliza uma variedade conhecida como cânhamo que possuem baixo teor de canabinóides (²³MECHTLER *et al.*, 2004). Atualmente a produção mundial de semente de cânhamo tem aumentado significativamente (²⁴CRAWFORD *et al.*, 2012; ²⁵FAOSTATIC, 2014; ²⁶Alberta, 2015). O rendimento de óleo obtido das sementes de cânhamo é alto, sendo superior a 32 % quando utilizadas com cascas (²⁷CALLAWAY, 2004; ²⁸GRIJÓ & MELO, 2016) e aproximadamente 44 % quando utilizadas sem cascas (²⁹CALLAWAY & PATE, 2009). Dentre a composição de ácidos graxos do óleo tem-se que mais de 75 % são de poli-insaturados com uma proporção de ômega 6 e ômega 3 próxima de três (²⁷CALLAWAY, 2004; ²⁸GRIJÓ & MELO, 2016). Esta proporção é indicada como excelente para um bom funcionamento do metabolismo (³⁰SIMOPOULOS *et al.* 2000). Atualmente algumas aplicabilidades já descritas desse óleo foram para alimentícios (³¹MÖLLEKEN, 1998; ³²KOŁODZIEJCZYK *et al.*, 2012; ³³MIERLITA, 2016), cosméticos (³⁴LESON & PLESS, 1998; ³⁵PLESS & LESON, 2001; ³²KOŁODZIEJCZYK *et al.*, 2012; ³⁶KOWALSKA *et al.*, 2015; ³⁷LIGEŻA *et al.*, 2016), biodiesel (³⁸LI *et al.*, 2010; ³⁹SU *et al.*, 2013) e polímeros (⁴⁰SURENDER *et al.* 2016), por exemplo.

A obtenção de extratos de derivados de *Cannabis* utilizando dióxido de carbono em condição supercrítica (CO₂-SC) é o foco de alguns estudos científicos utilizando flores ricas em canabinóides (⁴¹EORY *et al.*, 2001; ⁴²PERROTIN-BRUNEL, 2011; ⁴³OMAR *et al.*, 2013; ⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017) e sementes de cânhamo (⁴⁵KRIESE *et al.*, 2004; ^{46,47}DA PORTO *et al.*, 2012; ⁴⁸TOMITA *et al.*, 2013; ALADIĆ *et al.*, ⁴⁹2014 e ⁵⁰2015; ⁵¹DA PORTO *et al.*, 2015; ⁵²ALADIĆ *et al.*, 2016). Esta técnica também é utilizada pelas principais indústrias produtoras de medicamentos derivados da planta. Estas indústrias costumam misturar o óleo com propriedades medicinais, rico em canabinóides, obtidos de flores, com o óleo de alto valor nutricional, obtido das sementes de cânhamo, a fim de se obter também um produto com boa emulsificação (⁵³HEMPMEDS, ⁵⁴BLUEBIRD, ⁵⁵ENDOCA, ⁵⁶BREDOCAN, 2015). O estudo do equilíbrio de fases nestas condições é importante para garantir a eficiência do processo (⁵⁷FUKNÉ-KOKOT *et al.*, 2000), porém há poucos estudos reportados na literatura científica para estas matérias primas. Alguns dados relacionado à interação entre canabinóides e CO₂-SC foram reportados por ^{58,59}PERROTIN-BRUNEL *et al.* (2010).

A partir dessas informações tem-se como objetivo deste trabalho os seguintes objetivos específicos:

. Viabilizar métodos que possibilitam qualificar e quantificar substâncias presentes em derivados de *Cannabis*;

- . Analisar em amostra de flores ricas em canabinóides o processo de aquecimento visando potencializar a concentração de canabinóides de interesse medicinal;

- . Obter extratos de flores fêmeas não polinizadas, bem como de sementes de cânhamo, utilizando fluidos pressurizados sob diferentes condições, a fim de se analisar influências de variações de parâmetros como: pré-tratamento da amostra, pressão de extração, temperatura de extração e uso de co-solvente;

- . Viabilizar ajuste matemático que possa descrever as cinéticas das extrações;

- . Estudar experimentalmente o comportamento de fases de sistemas relacionados aos extratos obtidos, bem como estimar termodinamicamente os equilíbrios e parâmetros de interação binária utilizando a equação cúbica de estado de Peng-Robinson (ECE-PR);

- . Analisar atividade antitumoral de extratos obtidos a fim de se comprovar e potencializar aplicabilidade dos mesmos;

Considerando os objetivos específicos descritos, apresenta-se no Capítulo 2 uma revisão científica dos tópicos: diferenciação das matérias primas utilizadas, ou seja, flores fêmeas não polinizadas e sementes de cânhamo, bem como extração com fluidos pressurizados e análise da composição dos extratos.

O Capítulo 3 descreve materiais e métodos utilizados, como por exemplo, os de extração e equilíbrio de fases, com suas respectivas modelagem matemáticas para ajuste aos dados experimentais, bem como técnicas para aferir a bioatividade de extratos e a composição destes.

Os resultados e discussões são apresentados no Capítulo 4 e no Capítulo 5 as conclusões. Por fim, estão dispostas as referências científicas, Capítulo 6, utilizadas neste trabalho.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO CIENTÍFICA

2.1 FLORES FÊMEAS NÃO POLINIZADAS

Mais de 500 compostos já foram identificados nas plantas do gênero *Cannabis*. Estas plantas produzem um grande número de metabolitos secundários, como os canabinóides, terpenos e flavonoides (⁶⁰PERTWEE, 2014). Os canabinóides são os mais relevantes, dada a sua atividade biológica (⁶¹THOMAS & ELSOHL, 2015) e produção específica pelo gênero (¹³GAONI & MECHOULAM, 1971). Até à data, foram notificados 104 canabinóides, que por sua vez podem ser classificados em onze subclasses estruturais (⁶⁰PERTWEE, 2014).

Na *Cannabis*, as flores fêmeas, quando não polinizadas, produzem por células chamadas tricomas glandulares alta quantidade de resina que concentra a maior parte dos canabinóides da planta (⁶⁰PERTWEE, 2014). O fenótipo da planta é o principal fator que indica a quantidade de canabinóides que pode ser produzidos (⁶²FETTERMAN *et al.*, 1971; ⁶³SMALL & BECKSTEAD, 1973), porém submeter a mesma a certas condições ecológicas durante seu desenvolvimento também é uma maneira de potencializar isto (⁶⁴BOUQUET, 1950). ⁶⁵BAZZAZ *et al.* (1976) afirmam, por exemplo, que em locais frios é possível produzir uma maior quantidade de canabinóides.

Em materiais vegetais frescos a maior parte dos canabinóides de interesse estão na forma de ácido canabidiólico (CBDA) e ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico (Δ^9 -THCA) (⁶⁶STAMBOULI *et al.*, 2005). Estes, através de uma reação não enzimática de descarboxilação, ou seja, perda uma molécula de dióxido de carbono, como mostrado na Figura 4, são transformados aos respectivos canabinóides neutros, CBD e Δ^9 -THC (⁶⁷GAGNE *et al.* 2012), atualmente requeridos na medicina brasileira (¹⁶ANVISA, 2016). Um estudo demonstrou, por exemplo, uma porcentagem de Δ^9 -THCA aproximadamente 5,5 vezes maior que de Δ^9 -THC em material fresco (⁶⁸TACHWER & SCHMID, 2015). É interessante citar que o Δ^9 -THCA não é psicoativo e possui propriedades farmacológicas interessantes (⁶⁹ROCK *et al.*, 2013). A modelagem cinética de descarboxilação do Δ^9 -THCA em Δ^9 -THC foi estudada por ⁷⁰PERROTIN-BRUNEL (2011).

Alguns fatores que podem ocasionar a descarboxilação são o tempo de armazenamento (⁷¹MASOUD & DOORENBOS, 1973; ⁷²TURNER *et al.*, 1973), o aquecimento (⁷³KIMURA & OKAMOTO, 1970; ⁷⁴DE ZEEUW *et al.*, 1972) e o uso de condições alcalinas (⁷⁵GRLIĆ & ANDREC, 1961). O aquecimento controlado é uma técnica simples, porém é necessário analisar a influência da temperatura e do tempo de

aquecimento (⁷⁶SMITH, 1975; ⁷⁷KANTER *et al.*, 1979; ⁷⁸TURNER & MAHLBERG, 1984; ⁷⁹VERESS *et al.*, 1990), também porque, o aquecimento transforma os produtos desejáveis em indesejáveis, como, por exemplo, o Δ^9 -THC em canabinol (CBN) e/ou Δ^8 -tetrahydrocanabinol (⁸⁰GARRET, 1974), e o CBD em cannabielsoin (CBE) (⁸¹SHANI & MECHOULAM, 1974) e/ou em Δ^9 -THC (⁸²GRIJÓ & CARDOZO-FILHO, 2017). Uma vertente científica afirma que o CBN não ocorre naturalmente e que é obtido apenas da degradação do Δ^9 -THC (¹⁹UNODC, 2009), outra afirma que este canabinóide também é oriundo do ácido canabinólico (CBNA) (⁶⁶STAMBOULI *et al.*, 2005) e uma terceira fonte afirma ainda que o CBNA é uma forma oxidada do Δ^9 -THCA (⁸³RYMANOWSKY, 2014).

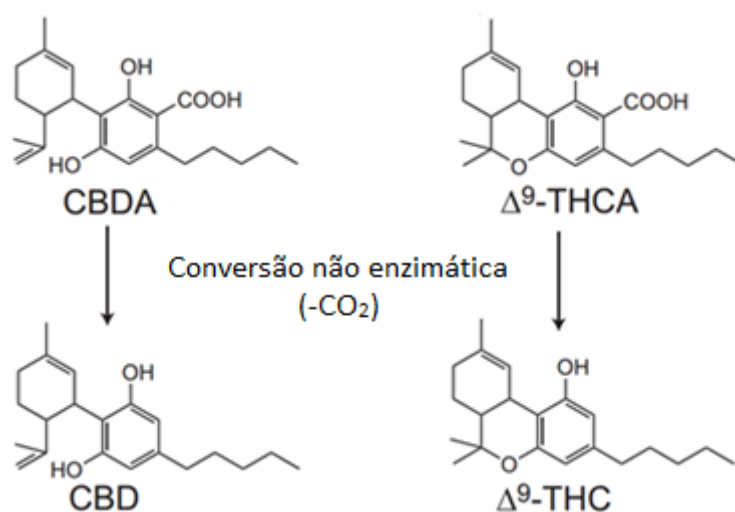


Figura 1 – Descarboxilação dos canabinóides (⁶⁷GAGNE, *et al.* 2012).

Outro detalhe importante é que durante o aquecimento em estufa ocorre a perda dos óleos essenciais (⁸⁴ROMANO & HAZEKAMP, 2013) presentes em alta quantidade (⁸⁵HANUS, 1975; ⁸⁶HENDRICKS *et al.*, 1975) e que contribuem para o odor característico da *Cannabis* (⁸⁷HOOD, 1973). Este fato pode ser responsável pela perda de massa durante a descarboxilação, reportada por ⁴²PERROTIN-BRUNEL (2011). Nos últimos anos foram feitos alguns estudos de aplicabilidade dos óleos essenciais da *Cannabis*, por exemplo, na medicina (⁸⁸RUSSO, 2011) e na indústria de cosméticos e alimentos (⁸⁹DA PORTO *et al.*, 2014). Além de contribuir para as propriedades organolépticas da planta, os terpenos contribuem para a atividade farmacológica, modulando os efeitos dos canabinóides (⁶¹THOMAS & ELSOHLY, 2015). Apesar disso, recentemente um estudo com uma planta da mesma família analisou a toxicidade de alguns óleos essenciais e, com isso, potencializou a aplicação inseticida (⁹⁰BEDINI *et al.*, 2016), característica já descrita para os óleos essenciais da *Cannabis* (⁶⁴BOUQUET, 1950; ⁹¹KHARE *et al.*, 1974).

De acordo com ⁹²DE MEIJER (1992) as plantas de *Cannabis* podem ser classificadas em três tipos: droga, intermediária e fibra. Essa classificação é feita de acordo com as concentrações de Δ^9 -THC e CBD, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação da planta pelo teor de Δ^9 -THC e CBD (⁹²DE MEIJER, 1992).

Tipo químico	Δ^9 -THC (g/g)	Δ^9 -THC/CBD
Droga	1,0 ~ 20,0 %	2,30 ~ 7,40
Intermediária	0,3 ~ 1,0 %	0,50 ~ 2,00
Fibra	$\leq 0,3$ %	0,06 ~ 0,50

Atualmente, cânhamo não é apenas a denominação dada para as fibras da planta e sim variedades de *Cannabis* com baixo teor do Δ^9 -THC. Na Europa, por lei, estas variedades não podem ultrapassar 0,3 % de Δ^9 -THC, apesar de que nos Países Baixos e na Bélgica, por exemplo, esse limite foi reduzido para 0,2 % (⁹³DECORTE, 2011). No Canadá o limite também é de 0,3 % (⁹⁴CANADÁ, 1998). Recentemente o Uruguai autorizou o cultivo de *Cannabis*, sendo o cânhamo variedades com teor de Δ^9 -THC inferior a 1,0 % classificadas como *Cannabis* não psicoativa (⁹⁵URUGUAY, 2013).

²³MECHTLER *et al.* (2004) demonstra que, de fato, a concentração de CBD nas variedades que podem ser consideradas como cânhamo, ou seja, tipo intermediária e tipo fibra, estão dentro do esperado. Em seu estudo a maioria das amostras analisadas mostrou o teor de CBD entre 0,8 e 1,6 % e entre 0,6 e 2,5 %, respectivamente. As plantas do tipo fibra também são classificadas como tipo “não droga”.

2.1.1 ENERGIA DE ATIVAÇÃO DOS CANABINÓIDES

A base do entendimento sobre a energia de ativação está relacionada com a equação de ⁹⁶VAN'T HOFF (1884) (Equação 1), que descreve relações termodinâmicas fundamentais que controlam o deslocamento do equilíbrio de uma reação com a temperatura. Foi demonstrada uma dependência exponencial da taxa de reação com o inverso da temperatura assumindo que as constantes de equilíbrio obedecem a essa relação,

$$k = A \cdot e^{-[\Delta G/(R.T)]} \quad (1)$$

onde ΔG é a variação da energia livre (⁹⁷CALIFANO, 2012). Apesar disso, essa relação é universalmente conhecida como equação de ⁹⁸ARRHENIUS (1889) (Equação 2), já que este foi o primeiro a oferecer sua interpretação física. Na verdade, Van't Hoff, não fez nenhuma hipótese sobre o significado físico do fator pré-exponencial, A , e Arrhenius

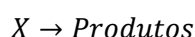
sugeriu que, para que uma reação pudesse ocorrer, as moléculas reagentes teriam que possuir uma energia maior do que um valor limitante que chamou de energia de ativação, E_a . À uma temperatura T , a fração de moléculas possuindo energia cinética maior que E_a é dada pela lei de distribuição estatística de ⁹⁹BOLTZMANN (1892) e é proporcional ao fator $e^{-[E_a/(R.T)]}$. Na equação de Arrhenius, a fração de energia livre disponível para dar origem à reação é, portanto, apenas aquela superior ao valor de E_a .

$$k = A \cdot e^{-[E_a/(R.T)]} \quad (2)$$

A energia de ativação é determinada experimentalmente conduzindo a reação em diferentes temperaturas e aplicando o logaritmo natural à equação de Arrhenius (Equação 3). Com isso, é possível analisar os dados da reta $\ln(k)$ versus $(1/T)$ obtida, onde a energia de ativação está relacionada com o coeficiente angular e o fator pré-exponencial com o coeficiente linear (¹⁰⁰FOGLER, 2009).

$$\ln(k) = \ln(A) - \left[\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} \right) \right] \quad (3)$$

A constante de velocidade de reação, k , também chamada de velocidade específica de reação, é quase sempre fortemente dependente da temperatura. Na realidade não é uma constante, e sim, apenas, independente das concentrações envolvidas na reação. Em reações em fase gasosa, que dependem de catalisador, pode ser uma função da pressão total, e em sistemas líquidos, de parâmetros como força iônica e o solvente escolhido. Essas outras variáveis exercem um efeito muito menor sobre a velocidade específica de reação do que a temperatura, com exceção dos solventes supercríticos, tais como água supercrítica. Para uma reação do tipo



, conduzida em batelada e a volume constante, o balanço molar fornece:

$$\frac{dC_X}{dt} = k_X \cdot C_X^\alpha$$

Esse tipo de análise é aplicada para obter os valores de k_X em uma determinada temperatura, sendo que a integração dessa equação fornecerá uma reta para um α específico, chamado de ordem da reação (¹⁰⁰FOGLER, 2009). ^{41,112}PERROTIN-BRUNEL (2011) fez essa análise para a descarboxilação do Δ^9 -THCA e observou especificamente uma reação de primeira ordem, $\alpha=1$, com $E_a = 84,8 \text{ KJ.mol}^{-1}$ e $A = 3,7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$.

2.1.2 APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Atualmente existe um grande número de estudos de possíveis aplicações para os extratos de flores de *Cannabis*. Alguns destes são de sua atividade antimicrobiana (¹⁰¹NAVEED, *et al.* 2014; ¹⁰²SARMADYAN, *et al.*, 2014; ¹⁰³MONIKA *et al.*, 2014), antioxidante (¹⁰⁴SRIVASTAVA *et al.*, 2012; ¹⁰⁵TIWARI *et al.*, 2014), anti-protozoários (¹⁰⁶CROXFORD, *et al.*, 2005) e anti-câncer (¹⁰⁷TARIQ & REYAZ, 2012), por exemplo.

Muitos estudos sobre aplicabilidades farmacológicas de derivados da *Cannabis* citam também, de uma forma geral, que canabinóides podem ser eficientes para o tratamento de austerio (¹⁰⁸KURZ & BLAAS, 2010; ¹⁰⁹LOPES, 2014), esclerose múltipla (¹¹⁰ZAJICEK & APOSTU, 2011) e dor (¹¹¹RUSSO, 2008). Apesar disso, até o momento, a maior parte dos estudos estão direcionados para o uso do CBD no tratamento de epilepsia (¹⁵CUNHA *et al.*, 1980), Alzheimer (¹¹²WATT & KARL, 2017) e neuroinflamação (¹¹³MORI *et al.*, 2017). Há alguns anos um estudo demonstrou que em condições artificiais ácidas similares a do suco gástrico do estômago humano o CBD poderia ser convertido em Δ^9 -THC (¹¹⁴WARANABE *et al.*, 2007), porém um estudo mais recente demonstra que em condições do trato gastrointestinal isto não é possível (¹¹⁵NAHLER *et al.*, 2017).

2.2 SEMENTES DE CÂNHAMO

Análises demonstraram propriedades antibióticas em sementes de *Cannabis* que as protegeram de micro-organismos facilitando a germinação (¹¹⁶FERENCZY, 1956), isso possivelmente é devido à resina, rica em canabinóides e terpenos, aderida na superfície externa das cascas (¹¹⁷PATE, 1994), já que possuem essa propriedade (¹¹⁸FERENCZY, 1958; ¹¹⁹GAL & VAJDA, 1970). A planta também pode evitar outros tipos de pragas devido à composição de sua resina e a emissão de terpenos voláteis com característica inseticida como os pinenos e os limonenos que correspondem a 75 % da atmosfera circundante, mas apenas 7 % do óleo essencial (⁸⁷HOOD *et al.*, 1973). De uma forma geral os terpenos podem ajudar a suprimir o crescimento de vegetação circundante (¹²⁰MULLER *et al.*, 1964; ¹²¹MULLER & HAUGE, 1967), e isto também pode ser válido para a *Cannabis* (¹²²HANEY & BAZZAZ, 1970). Além disso, a resina protege a planta de raios ultra-violeta e perda d'água (¹²³BDE, 2006) devido ao revestimento formado, que também, devido sua característica pegajosa (¹¹⁷PATE, 1994), pode dificultar a locomoção (¹²⁴LEDBETTER & KRIKORIAN, 1975) ou a mastigação de predadores (¹²⁵LEVIN, 1973). Na Figura 2 é possível ver uma alta concentração de resina próxima às sementes.



Figura 2 – Ausência de resina nas sementes (¹²⁶HOC, 2013).

De modo geral, é possível reduzir o teor de Δ^9 -THC com pré-processamentos das sementes, sendo que com o avanço dessas técnicas diminuíram significativamente os teores destas substâncias nos óleos obtidos das sementes (¹²⁷LESON *et al.*, 2001; ¹²⁸ELSOHLY, 2003). Algumas indústrias estão testando fluidos para limpeza em grande escala (¹²⁹MAASI, 2000). O uso de peneiras, ventilação forçada e secagem são técnicas comuns em indústrias que trabalham com outras matérias primas (¹³⁰LINK, 2011) e podem também ser alternativas viáveis para sementes de cânhamo. Em seres humanos, quantidades por via oral maiores do que 1 a 2 μg de Δ^9 -THC por quilograma corporal podem induzir efeitos neurológicos e psicomotores (¹³¹Bgvv, 1997). Em um estudo atual com sementes de cânhamo descascas não foi detectado Δ^9 -THC dentro do limite de quantificação, já o CBD foi quantificado em pequena quantidade (¹³²PERKIN-ELMER, 2015), repetindo a tendência de resultados reportado por ¹³³LEIZER *et al.* (2000). Isso está de acordo com o descrito por ²³MECHTLER *et al.* (2004), de que as variedades de cânhamo possuem baixa quantidade de canabinóides, sendo o de CBD superior ao de Δ^9 -THC.

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) possui dados estatísticos de muitos países produtores de cânhamo desde 1961, inclusive direcionado a produção de sementes (²⁵FAOSTATIC, 2014), como mostra a Figura 3a. Apesar disso, não é contabilizado, por exemplo, países como o Canadá, que produz grandes quantidades de cânhamo desde 1998, e que 80% do cultivo é dedicado a produção de sementes (ALBERTA, ¹³⁴2012 e ²⁶2015). A Figura 3b mostra os principais países responsáveis pela produção de mais de 122 mil toneladas de sementes de cânhamo em 2014.

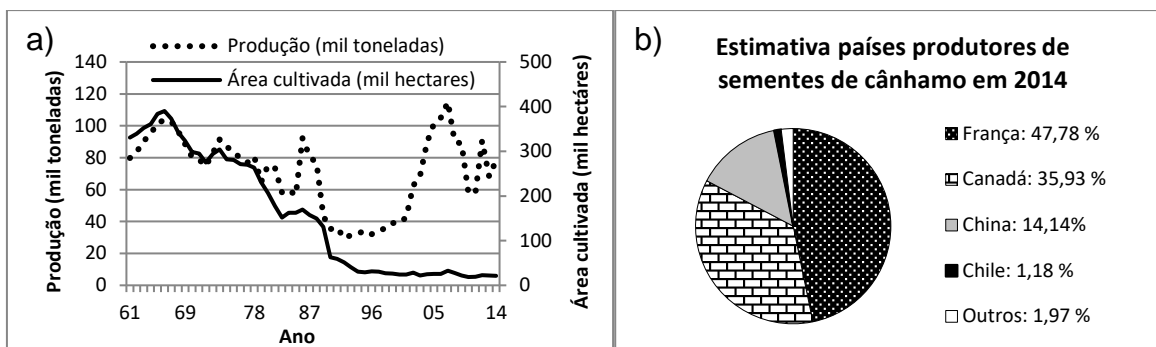


Figura 3 – Produção mundial de sementes de cânhamo até 2014: a) sem o Canadá (²⁵FAOSTATIC, 2014); b) estimativa com o Canadá (²⁶Alberta, 2015; ²⁵FAOSTATIC, 2014).

2.3 FLUIDO SOB ALTA PRESSÃO

A Extração com Fluido Supercrítico (EFS) consiste em submeter um material a um fluido sob condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico, permitindo que o mesmo seja utilizado como solvente em extrações sólido-fluido (¹³⁵CAVERO *et al.*, 2006) ou até mesmo líquido-fluido (¹³⁶NI *et al.*, 2015). De maneira geral entre as vantagens da EFS, em relação aos métodos convencionais, destaca-se que próximo do ponto crítico qualquer alteração na temperatura ou pressão resulta em grandes variações na densidade, e conseqüentemente no poder de solvatação (¹³⁷McHUGH & KRUKONIS, 1986), possibilitando assim obter fluidos altamente seletivos com densidades altas como a dos líquidos usados convencionalmente (¹³⁸KING & BOTT, 1993). A EFS apresenta elevada taxa de transferência de massa devido também a características do fluido semelhantes a dos gases como a alta difusividade, baixa viscosidade e tensão superficial menor do que os solventes líquidos convencionais, tornando os fluidos supercríticos um meio de processamento adequado para técnicas de extração e separação (¹³⁹SIHVONEN *et al.*, 1999).

Para a concepção e simulação da EFS é necessário conhecer propriedades físicas e termodinâmicas dos compostos envolvidos, porém nem sempre é possível encontrar os valores experimentais requeridos. Alternativamente estas propriedades podem ser estimadas por métodos chamados de “contribuição de grupos” (¹⁴⁰MARRERO & GANI, 2001).

2.3.1 ESTIMATIVA DE PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS (CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS)

No princípio as propriedades dos componentes puros eram determinadas pela arquitetura das moléculas, bem como, em certos casos, por variáveis de estado tais

como temperatura e pressão. Para as propriedades que são únicas, como a temperatura crítica, ou que são funções apenas da temperatura, como a capacidade calorífica de um gás ideal, tornaram-se muito utilizados os métodos que consideram a contribuição de grupos moleculares para estimar valores numéricos (¹⁴¹REID *et al.*, 1987). Nestes métodos, a propriedade de um composto é uma função dependente da soma da frequência de cada grupo de uma molécula vezes a sua contribuição (¹⁴²LYDERSEN, 1955; ¹⁴³AMBROSE, 1978; ¹⁴⁴KLINCEWICZ & REID, 1984; ¹⁴⁵JOBACK, 1984; ¹⁴⁶JOBACK & REID, 1987; ¹⁴⁷LYMAN *et al.*, 1990; ¹⁴⁸HORVATH, 1992). Esses métodos fornecem a vantagem de estimativas rápidas sem exigir recursos computacionais substanciais, porém muitos possuem exatidão questionável, são incapazes de distinguir entre isômeros e têm aplicabilidade limitada devido à simplificação excessiva da representação da estrutura molecular, devido a uma abordagem de contribuição de grupo simples e pelo pequeno grupo de dados para estimativa (¹⁴⁰MARRERO & GANI, 2001).

Para superar estas limitações, foram relatadas várias tentativas na literatura. Uma técnica, baseada em elétrons de valência, é capaz de fazer uma estimação precisa, bem como diferenciar isômeros, porém não é trivial e requer um ambiente computacional simbólico (¹⁴⁹PRICKETT *et al.*, 1993; CONSTANTINOU *et al.*, ¹⁵⁰1993 e ¹⁵¹1994). Um método menos complexo foi proposto por ¹⁵²CONSTANTINOU & GANI (1994), baseado em dois níveis de contribuição de grupo. O nível básico usa grupos de primeira ordem simples, enquanto o segundo considera, em certa medida, os efeitos de proximidade e, com isso, permite distinguir isômeros. ¹⁵³MARRERO & PARDILLO (1999) propuseram outra técnica que considera as contribuições de interações entre grupos de ligação em vez das contribuições de grupos simples, o que permite a distinção de um grande número de isômeros. Para estimar com precisão, também, substâncias grandes, complexas e poli-funcionais. ¹⁴⁰MARRERO & GANI (2001) desenvolveram um método baseado em três níveis: o nível básico com um grande conjunto de grupos simples, o segundo nível que permite melhorar a descrição dos efeitos de proximidade e diferenciação entre os isômeros, e o terceiro nível que permite uma melhor análise da estrutura de compostos, incluindo complexos com até 60 carbonos, por exemplo.

2.3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM DIÓXIDO DE CARBONO

O dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) tem sido amplamente utilizado por ser considerado um solvente atóxico, não inflamável, altamente compressível, de baixo custo e impacto ambiental, prontamente disponível, facilmente removível do produto extraído, além de apresentar condições supercríticas, relativamente, de fácil obtenção

(Temperatura Crítica = 31,06 °C e Pressão Crítica = 7,38 MPa) e com isso possibilitar a não degradação de componentes termolábeis (¹⁵⁴LIN *et al.*, 1999).

O uso do CO₂ como solvente segue alguns dos princípios básicos da química verde delineados por ¹⁵⁵ANASTAS & WARNER (1998) possibilitando processos mais sustentáveis em comparação com métodos convencionais. Entre eles podemos citar por ser um solvente mais seguro exibindo um impacto ambiental menor ao prevenir a geração de resíduos problemáticos e por ser naturalmente abundante favorecendo o uso de matérias primas renováveis (¹⁵⁶BECKMAN, 2004). Além disso, tem-se o aumento das exigências dos processos de separação para obtenção de produtos mais seguros, livre de resíduos de solventes e como o dióxido de carbono se apresenta em estado gasoso em condições ambientes, a despressurização é favorecida, pois o mesmo é automaticamente separado do extrato, sendo possível ainda ser recuperado e reutilizado de forma limpa (¹⁵⁷BOTT, 1993). Além disso, é interessante citar que a utilização de dióxido de carbono supercrítico na obtenção de óleos convencionais da indústria pode eliminar processos como a degomagem, desodorização, refino e o branqueamento (¹⁵⁸NASIR *et al.*, 2012).

O procedimento de extração se delimita em alimentar o extrator com a matriz desejada, que será aquecida por um permutador de calor até uma temperatura estabelecida. O CO₂ pressurizado flui através da matriz, dissolve o extrato solúvel e segue até a válvula que libera a pressão. A solubilidade do extrato muda com as condições de pressão e temperatura do separador, com isso o extrato é sedimentado e o CO₂ pode ser condensado e reutilizado como solvente. Além disso, pode ser instalado um sistema para transferir o calor do condensador para o separador (¹⁵⁹LAITINEN, 1999). A extração com CO₂-SC é uma alternativa promissora para obter produtos de alto valor agregado (¹⁶⁰MANSOORI *et al.*, 1988) e tem sido aplicada em diversos tipos de matrizes vegetais como frutos, sementes e cascas, flores, rizomas, folhas, brácteas, raízes e caules (¹⁶¹MELO *et al.*, 2014).

Solutos apolares e de alto peso molecular são altamente solúveis em CO₂-SC (¹⁶²REVERCHON & DE MARCO, 2006), como é o caso dos canabinóides neutros. Pelo contrário, possuem baixo potencial para dissolver os canabinóides ácidos, devido à característica polar destes (⁴¹EORY *et al.*, 2001). Os canabinóides ácidos podem ser extraídos ao se utilizar um co-solvente polar, normalmente o etanol (⁴³OMAR *et al.*, 2013; ⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017). A adição do co-solvente em quantidades pequenas não reduz as vantagens de obtenção de um extrato livre de solventes orgânicos porque o mesmo é evaporado rapidamente na saída do extrator. Assim como o etanol, acetato de

etila e diclorometano estão entre os mais utilizados para extração de componentes bioativos (¹⁶³KITZBERGER *et al.*, 2007). O pré-processamento da matriz, como secagem, descamação e otimização do tamanho, também são parâmetros que pode influenciar o desempenho de extração (¹⁶⁴REVERCHON, 1992).

Muitas indústrias vêm utilizando o cânhamo como matéria prima para medicamentos devido à possibilidade de obter concentração de CBD maior do que Δ^9 -THC. Mesmo sabendo que as flores fêmeas tem maior potencial de produção de canabinóides as principais indústrias vêm utilizando os caules do cânhamo, devido à possibilidade de produção em larga escala. Estes caules são prensados e posteriormente o extrato obtido é purificado utilizando CO₂-SC (⁵³HEMPMEDS, ⁵⁴BLUEBIRD, ⁵⁵ENDOCA, ⁵⁶BREDOCAN, 2015). Atualmente existem também algumas indústrias visando à produção de medicamento a base de CBD a partir de flores, seja da variedade cânhamo (¹⁶⁵PIAUHY, 2017) ou de outra variedade que tenha relativamente baixo teor de Δ^9 -THC (¹⁶⁶ENTOURAGE, 2017). Recentemente, em Israel, a empresa Tikun Olam desenvolveu uma variedade de *Cannabis* chamada Avidkel com alta concentração de CBD e baixa de Δ^9 -THC (¹⁶⁷GALLILY, 2015). A variedade contém aproximadamente 15% de CBD e 1,5% de Δ^9 -THC (¹⁶⁸TIKUNOLAM, 2015). A produção de canabinóides utilizando plantas de *Cannabis* pode ser uma técnica viável, até porque existem efeitos colaterais descritos em literatura devido ao uso de canabinóides sintéticos (¹⁶⁹GURNEY *et al.*, 2014).

2.3.2.1 EXTRAÇÃO FRACIONADA COM DIÓXIDO DE CARBONO

A extração fracionada é um conceito que pode ser útil para melhorar a seletividade do processo. Um exemplo são aplicações de extrações sequenciais, aumentando as pressões utilizadas de forma gradativa para obter o extrato requerido, altamente solúvel nas condições utilizadas. Em vários casos, não é possível evitar a co-extração de algumas famílias compostas de substâncias semelhantes (¹⁶⁴REVERCHON, 1992). ⁴³OMAR *et al.* (2013) realizaram a extração fracionada em flores de *Cannabis*, iniciando com 10 MPa e 35 °C para tentar extrair óleos essenciais, e depois utilizando pressões mais altas para extrair os canabinóides.

Utilizando substâncias padrões purificadas, ^{58,59}PERROTIN-BRUNEL (2010) reportaram diferentes condições ótimas de pressão e temperatura para solubilizar diferentes canabinóides em CO₂-SC. Foram observados melhores resultados de solubilidade do CBD em uma pressão próxima de 15,5 MPa e para o Δ^9 -THC a 22,0 MPa, como mostram as Tabela 2 e 3, respectivamente. No estudo não foi possível aplicar um fracionamento experimental com flores de *Cannabis* porque a variedade utilizada

apresentava alta concentração de Δ^9 -THC e baixa de CBD (⁴²PERROTIN-BRUNEL, 2011).

Tabela 2 – Solubilidade do CBD em CO₂-SC (⁵⁸PERROTIN-BRUNEL, 2010).

	40 °C	50 °C	60 °C
P = 15,5 MPa	$1,87 \cdot 10^{-4} \pm 0,19$	$2,67 \cdot 10^{-4} \pm 0,27$	$1,79 \cdot 10^{-4} \pm 0,18$

Tabela 3 – Solubilidade do Δ^9 -THC em CO₂-SC (⁵⁹PERROTIN-BRUNEL, 2010).

	50 °C	60 °C	70 °C
P = 22,0 MPa	$1,42 \cdot 10^{-4} \pm 0,07$	$2,33 \cdot 10^{-4} \pm 0,12$	$2,95 \cdot 10^{-4} \pm 0,15$

As extrações com CO₂-SC, com ou sem uso de co-solvente, tem o potencial de extrair ceras, além dos óleos essenciais e canabinóides. O processo de separação das ceras pode ser muito viável, também porque estas podem ser aplicadas em diversos produtos, como cosméticos, por exemplo (¹⁷⁰WARTH, 1956). Uma forma de fracionamento utilizada é a aplicação de separadores em série, a diferentes pressões e temperaturas. O âmbito desta operação é induzir a precipitação seletiva de diferentes famílias de compostos em função das suas diferentes condições de saturação no fluido supercrítico. Este procedimento é muito utilizado na separação de óleos essenciais, por exemplo (¹⁶⁴REVERCHON, 1992), e foi aplicado à *Cannabis* por ⁸⁹DA PORTO *et al.* (2014), que demonstraram também que a metodologia é energeticamente viável quando comparado ao método tradicional de hidrodestilação. ⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017 utilizaram separadores em série na obtenção de canabinóides de flores de *Cannabis*.

2.3.3 EXTRAÇÃO COM PROPANO PRESSURIZADO

O propano apresenta temperatura crítica de 96,70 °C e pressão crítica de 4,25 MPa (¹³⁷MCHUGHw & KRUKONIS, 1986), mas apesar da temperatura crítica ser maior que a do CO₂ alguns estudos mostram que este em condições subcríticas também tem sido utilizado para extração de produtos naturais. Algumas das motivações para esse uso são porque também não deixa resíduo tóxico nos extratos e permite maiores solubilidades dos solutos. Além disso, apresentam alto rendimento em um menor tempo, menor consumo de solvente e operação em pressões e temperaturas mais baixas, o que gera menor custo de extração (¹⁷¹ILLÉS *et al.* 1997; ¹⁷²CORSO *et al.*, 2010).

2.3.4 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

O processo de extração com fluidos pressurizados não é linear em relação ao tempo de extração e, em geral, possui três períodos: (1) período de taxa de extração constante (CER – *Constant Extraction Rate*), onde a transferência de massa é governada pelo

mecanismo de convecção na interface entre o sólido e fluido; (2) período de queda na taxa de extração (FER – *Falling Extraction Rate*), onde a convecção na superfície e a difusão no interior do sólido são importantes; e (3) período controlado pela difusão (DCR – *Diffusion Controlled Rate*), caracterizado pela transferência de massa no sólido (¹⁷³CHRISTIANSON *et al.*, 1984).

Do ponto de vista da engenharia, é necessário o conhecimento dos parâmetros relevantes do processo, como cinética e equilíbrio de transferência de massa, e a otimização das condições de operação para realizar o *scale-up*. Estes parâmetros podem ser obtidos usando descrições matemáticas cuidadosas do processo de extração e os dados experimentais de laboratório (¹⁷⁴CARVALHO-Jr *et al.*, 2005).

A modelagem matemática da extração com fluidos pressurizados de produtos derivados de matrizes vegetais é difícil devido à existência de estruturas diferentes no material, como sementes, cascas e folhas. O material vegetal é geralmente triturado, antes do processo de extração, para aumentar a área de contato com o solvente e também para aumentar a acessibilidade ao soluto presente no interior da estrutura celular, aumentando assim a cinética de transferência de massa. Isto permite descrever as partículas resultantes utilizando geometrias básicas como cilindro ou esfera (¹⁷⁵OLIVEIRA *et al.*, 2011). A redução da granulometria do sólido não pode ser realizada indefinidamente, pois partículas muito pequenas podem formar aglomerados e interromper a passagem do solvente pelo leito (¹⁷⁶BRUNNER, 1994).

Há vários modelos empregados para descrever a extração. Todos eles consideram que as partículas estão empacotadas dentro da coluna do extrator. As simplificações empregadas pela maioria dos autores são que a operação é isotérmica, a queda de pressão no interior do extrator é desprezível, e a porosidade do leito e a densidade do sólido são constantes durante a extração. Além disso, é usual assumir que o fluido tem densidade, velocidade e dispersão axial quase constantes. Essas suposições reduzem o número de equações necessárias usadas no balanço de massa, relações de equilíbrio e leis cinéticas para descrever o processo de extração (¹³⁷McHUGH & KRUKONIS, 1986).

O balanço de massa para a fase sólida dentro do extrator é condicionado pelas simplificações assumidas por cada autor, levando em conta a composição da matriz sólida e a cinética de extração. Existem na literatura diferentes tipos de modelagem de extração. Os modelos mais utilizados são os empíricos, os difusivos e os logísticos.

Os modelos empíricos de cinética de extração não consideram a variação da concentração do composto no interior da partícula, e por isso são chamados também de

modelos de parâmetros concentrados. Com isso, o esforço computacional é reduzido, pois a concentração desta substância na matriz sólida depende apenas do tempo e da posição das partículas no interior do leito (¹⁷⁷ESQUÍVEL, 1999).

O modelo logístico considera o balanço diferencial de massa na fase sólida e na fase fluida, dentro do leito de extração. O acúmulo e a dispersão na fase fluida são negligenciados, pois se assume que ambos os efeitos não têm influência significativa no processo quando comparados à convecção. O termo de transferência de massa interfacial é representado por uma das soluções da equação logística. O modelo pode ser aplicado considerando-se o extrato como um único pseudocomponente ou, ainda, como uma mistura de vários grupos de compostos, ou seja, sistema multicomponente, classificados de acordo com suas estruturas químicas. No modelo logístico, quando o tempo tende ao infinito, a massa de extrato tende a um valor fixo, assintoticamente. Este valor fixo pode ser considerado como o total de massa extraível, para determinadas condições operacionais de processo (¹⁷⁸MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

Os modelos difusivos requerem que sejam conhecidas a geometria e a porosidade da matriz sólida. Além disso, para estes modelos o esforço computacional para a resolução das equações é grande, em virtude da necessidade de se determinar o perfil de concentração do composto a ser extraído na partícula (¹⁷⁹REVERCHON, 1997).

Não foram encontrados estudos de modelagem matemática da cinética de extração com extratos de derivados de *Cannabis*, apesar de estudos da cinética sem modelagem já terem sido reportados tanto para as flores (⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017) quanto para as sementes (⁴⁶DA PORTO *et al.*, 2012; ⁴⁸TOMITA *et al.*, 2013; ALADIĆ *et al.*, ⁴⁹2014, ⁵⁰2015; ⁵¹DA PORTO *et al.*, 2015).

2.3.5 EQUILÍBRIO DE FASES

Para um bom conhecimento de técnicas de separação sob altas pressões é necessário analisar o comportamento de fases de misturas binárias ou multicomponentes (⁵⁷FUKNÉ-KOKOT *et al.*, 2000). As técnicas experimentais utilizadas são classificadas pelo método empregado para determinar as composições, com isso têm-se os métodos analíticos, também chamados de diretos, e os métodos sintéticos, também chamados de indiretos ou estequiométricos. Geralmente os métodos analíticos requerem amostragem e análise de composição após a obtenção do equilíbrio (¹⁸⁰FORNARI *et al.*, 1990), sendo esta uma dificuldade experimental em sistemas a alta pressão porque perto das condições críticas podem ocorrer grandes distúrbios ao equilíbrio quando se retira uma amostra da célula, e existe a possibilidade de amostrar preferencialmente os constituintes

mais voláteis da mistura (¹⁸¹DEITERS & SCHNEIDER, 1986). Atualmente alguns métodos analíticos utilizam abordagens físico-químicas e não necessitam de amostragem. A principal vantagem dos métodos analíticos é que eles podem ser usados para sistemas com mais de 2 componentes sem complicações significativas (¹⁸²DOHRN *et al.*, 2010).

A não necessidade de amostragem durante o procedimento experimental de métodos sintéticos os tornam, muitas vezes, fáceis, rápidos e de custo experimental acessível (¹⁸³SCHNEIDER, 1975), e, além disso, possibilita medições perto de condições críticas (¹⁸⁰FORNARI *et al.*, 1990). Geralmente um pseudocomponente é criado quando se tem componentes com propriedades semelhantes (¹⁸⁴FONSECA *et al.*, 2011). O procedimento para os métodos sintéticos é inicialmente a obtenção de uma mistura de composição conhecida, e posteriormente a observação do comportamento de fase na célula de equilíbrio (¹⁸¹DEITERS & SCHNEIDER, 1986). Para isso temperatura é fixada e a pressão é inicialmente elevada para homogeneização da mistura. Depois, a pressão é reduzida até a formação de uma nova fase (¹⁸⁵SUPPERS & MCHUGH, 1989).

Existem duas subdivisões dos métodos sintéticos, uma para os que as propriedades de equilíbrio são calculadas utilizando o balanço de material e outra em que a detecção da transição de fase é possível de ser feita de maneira visual ou não (¹⁸⁶DOHRN *et al.*, 2010). A vantagem do método sintético visual é que a separação de fases pode ser observada diretamente na célula de equilíbrio através de uma janela para visualização (¹⁸⁰FORNARI *et al.*, 1990), com a identificação de turbidez ou de um menisco (¹⁸²DOHRN & BRUNNER, 1995), por exemplo.

Devido ao interesse em se obter extratos da *Cannabis* utilizando fluidos pressurizados é necessário analisar o equilíbrio de fases relacionado, principalmente, com os canabinóides de interesse. Atualmente tem-se reportado por cálculos teóricos as propriedades críticas de alguns canabinóides, bem como dados experimentais de solubilidade em CO₂-SC do CBD (⁵⁸PERROTIN-BRUNEL, 2010), bem como do Δ⁹-THC (⁵⁹PERROTIN-BRUNEL, 2010), porém esses estudos não identificam pontos de transições de fases.

2.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS

Os canabinóides são termolábeis por isso geralmente as análises são feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que não trabalha com altas temperaturas, ou com cromatografia gasosa (GC) depois de uma etapa de derivatização para estabilizar termicamente estas substâncias (¹⁹UNODC, 2009). Logo, observa-se que tentar

quantificar via GC sem derivatização, ou seja, sem estabilização térmica dessas substâncias, é complexo devido às altas temperaturas intrínsecas do procedimento (¹⁸⁷LEHMANN & BRENNEISEN, 1992; ¹⁸⁸DUSSY *et al.*, 2005; ¹⁸⁹TIPPARAT *et al.*, 2012; ⁸²GRIJÓ & CARDOZO-FILHO, 2017). Mesmo utilizando HPLC a escolha do método de detecção se torna importante para não interferir na estabilidade dos canabinóides. Normalmente utiliza-se detecção por massas (HPLC/MS) (¹⁹⁰OLAIZOLA *et al.* 2014), mobilidade de íons (HPLC/Ionic Mobility) (¹⁹¹TOSE *et al.* 2017) ou rede de diodos (HPLC/DAD) (¹⁹UNODC, 2009; ¹⁹²DE BACKER *et al.*, 2009).

Atualmente os estudos aplicados vêm demonstrando o interesse de se obter extratos com maior pureza em canabinóides. Por isso, caso as ceras ainda não tenham sido removidas durante o fracionamento, é comum a realização de um procedimento a baixa temperatura chamado “winterização” para removê-las. Neste procedimento o extrato obtido com fluido pressurizado é resuspendido, geralmente em hexano ou etanol, homogeneizado sob agitação e resfriado, ocasionando à compactação e decantação destes interferentes. Um processo de filtração a vácuo pode ser aplicado de forma complementar ao processo. Por fim, o solvente orgânico é removido e tem-se um extrato composto basicamente de canabinóides (⁴²PERROTIN-BRUNEL, 2011; ¹⁹³JOSEPH, 2016; ⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017). O Δ^9 -THC, por exemplo, apresenta características importantes relacionadas a esse processo, pois o óleo hidrofóbico viscoso (¹⁹⁴GARRETT & HUNT, 1974) resiste à cristalização (¹³GAONI & MECHOULAM, 1971) e possui baixa volatilidade (¹⁹⁵ADAMS *et al.*, 1941).

A identificação dos óleos essenciais geralmente é feita com o auxílio do uso de hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos e calculando os tempos de retenção pelo Índice de Kovats ou equivalente. Geralmente os cromatógrafos utilizados são em fase gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID) ou massas (GC-MS). Além disso, a técnica chamada Head Space, em que a volatilização prévia dos compostos é feita antes da injeção cromatográfica é muito utilizada (¹⁹⁶NISSEN *et al.*; ¹⁹⁷BERTOLI *et al.*; ¹⁹⁸FISCHEDICK *et al.*, 2010; ¹⁹⁹HAZEKAMP & FISCHEDICK, 2012; ⁴³OMAR *et al.*, 2013; ⁸⁹DA PORTO *et al.*, 2014; ²⁰⁰MARCHINI *et al.*, 2014; ⁹⁰BEDINI *et al.*, 2016).

A técnica de GC-FID utilizada por ²⁸GRIJÓ & MELO (2016) na análise de ácidos graxos de sementes de cânhamo apresentou boa resolução, porém uma pequena melhora na programação dos parâmetros cromatográficos pode ser suficiente para a resolução ótima de todos os ácidos graxos. Uma maneira simples de se analisar os tocoferóis presentes no óleo das sementes de cânhamo é a utilização de HPLC com detector de fluorescência (²⁰¹ANDRIKIPOULOS *et al.*, 1991), por exemplo.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

O Capítulo 3 apresenta os materiais e métodos utilizados durante as análises de obtenção de extratos de flores de *Cannabis* e sementes de cânhamo utilizando fluidos pressurizados, bem como importantes dados relacionados a esta aplicabilidade.

3.1 EXTRAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO

As extrações foram realizadas utilizando dois equipamentos em escala laboratorial. Os mesmos foram identificados como extrator 1 e extrator 2. As diferenças entre eles usufruídas durante as extrações foram as possíveis condições de pressão e temperatura de extração. O extrator 1 possui uma bomba que possibilita extrações a 40 MPa, porém a extração não pode ser realizada com temperatura menor que a ambiente, o que foi possível com o extrator 2. Foi utilizada a modelagem matemática descrita por ²⁰²SOVOVÁ (1994) como método de ajuste à cinética de extração.

3.1.1 EQUIPAMENTOS

O extrator 1, Figura 4, é constituído de uma bomba do tipo “seringa” (Thar Technologies) com capacidade de 300 mL, que comprime o CO₂ a pressão de trabalho. Depois, com a válvula V fechada, abre-se a válvula VS para que o CO₂ pressurizado entre na célula de extração com a amostra moída. A célula de extração (Thar Technologies) tem capacidade de 25 mL, sendo aproximadamente 8,4 cm altura e 2,0 cm diâmetro, e é mantida a uma temperatura sob controle de um forno termostaticado. Depois de aproximadamente 15 minutos, com a válvula micrométrica (Sitec) devidamente aquecida e parcialmente aberta, abre-se a válvula V. O vial coletor de amostra se encontra em condições atmosférica e o CO₂ gasoso é filtrado e conduzido para um medidor e totalizador de fluxo. Este equipamento foi descrito anteriormente por ²⁰³MARGENAT *et al.* (2008).

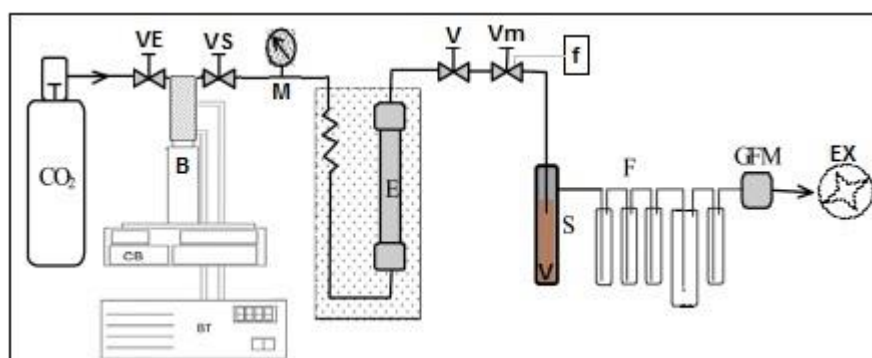


Figura 4 – Extrator 1. VE: válvula de entrada; B: bomba seringa; CB: controlador da bomba; BT: banho termostático da bomba; VS: válvula de saída; M: manômetro; E:

extrator; V: válvula de extração; Vm: válvula micrométrica; f: fonte de voltagem (aquecimento); S: separador com vial coletor de extrato; F: banco de filtros; GFM: medidor de fluxo; Ex: exaustor).

No extrator 2, Figura 5, o cilindro extrator tem o volume aproximado de 58 mL, sendo 19,4 cm de altura e 1,95 cm de diâmetro. As bombas do tipo seringa são da marca ISCO, Modelo 500D, sendo uma abastecida com solvente e outra com co-solvente. A amostra, com seus devidos processamentos prévios, é adicionada no cilindro extrator. O solvente e o co-solvente são pressurizados por meio das bombas até o extrator onde entram em contato com a matriz vegetal e permanecem por 20 minutos a fim de atingir o equilíbrio entre o soluto e o solvente. A válvula é aquecida a uma temperatura de aproximadamente 90 °C, para evitar o congelamento do solvente e o entupimento da mesma. A mistura é levada até a saída do extrator, com uma vazão pré-determinada, e o extrato é instantaneamente separado do solvente por meio da depressurização. O extrator 2 foi descrito anteriormente por ²⁰⁴GONÇALVES *et al.* (2013).

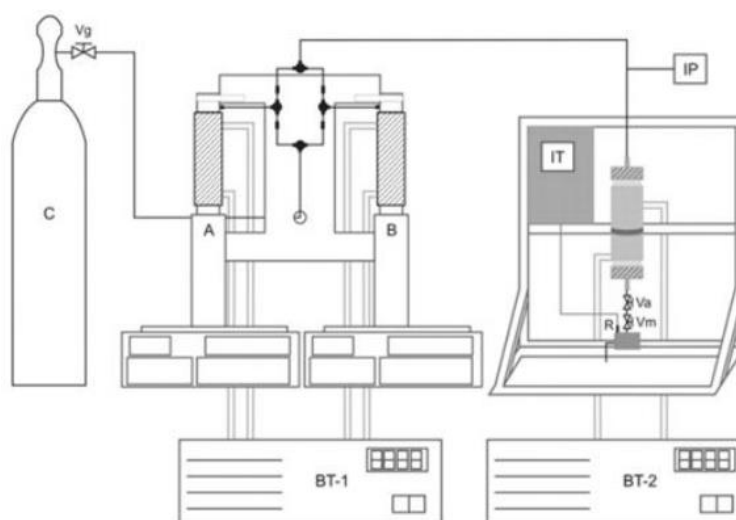


Figura 5 – Extrator 2. C: Cilindro de CO₂; A e B: Bombas do tipo seringa; IP: Indicador de pressão; IT: Indicador de temperatura; Vg: Válvula globo que permite a passagem do solvente do cilindro até a bomba; Va: Válvula agulha para saída dos solventes saturados de extrato; Vm: Válvula micrométrica que permite regulagem do fluxo de solventes; R: Resistência; BT-1 e BT-2: Banhos termostatizados.

3.1.2 MODELAGEM MATEMÁTICA (CINÉTICA DE EXTRAÇÃO)

O primeiro passo foi aferir a densidade dos sólidos com Multipicnometro da marca Quantachrome Instruments modelo 440-C Stainless Steel, com gás Hélio (99,99999 % White Martins) a 20 psi. Foram feitas sete replicatas (n=7) para cada material.

Devido ao difícil controle manual da vazão do solvente durante a extração, bem como a tentativa de utilizar a mesma massa inicial de amostra, foram feitas análises de rendimento versus quantidade de solvente dividida pela massa inicial de amostra. Isso elimina possíveis erros de manipulação do equipamento durante os experimentos.

No extrator 1 o fluxo de CO₂ foi aferido em condições normais de temperatura e pressão. Com isso, teve-se o objetivo de controlar a vazão em 0,5 L de CO₂ por minuto. Como a densidade do CO₂ a 20 °C e 1 atm, condição laboratorial, é 0,00184 g.mL⁻¹ as equações que transformam o tempo em uma função da razão de massa de CO₂ (m_{CO_2}) por massa inicial de amostra (m_0) estão descritas na Equação 4. No extrator 2 o fluxo de solvente foi aferido com fluido nas condições de extração e, com isso, a densidade do mesmo era específica em cada de extração.

$$\frac{0,5 \text{ L } CO_2}{\text{min}} \cdot \frac{0,00184 \text{ g } CO_2}{\text{mL}} = \frac{0,92 \text{ g } CO_2}{\text{min}} = \frac{m_{CO_2} \text{ (g)}}{t \text{ (min)}} \therefore t = \frac{m_0}{0,92} \cdot \frac{m_{CO_2}}{m_0} \quad (4)$$

Foi utilizado o modelo matemático difusivo de ²⁰²SOVOVÁ (1994). Algumas das variáveis importantes durante esta modelagem são: a massa da amostra utilizada (m_a , g), o rendimento máximo de óleo obtido da matriz utilizando determinado solvente ($rend_{MÁX}$), a massa de amostra disponível (m_D , g) e massa de amostra livre de soluto (m_S , g). Neste modelo, considera-se que a porcentagem do óleo no material está dividida em duas frações, uma de fácil acesso (m_{D1} , g) e outra de difícil acesso (m_{D2} , g) (Equação 5).

$$m_D = m_a \cdot \frac{rend_{MÁX}\%}{100} = m_{D1} + m_{D2} \therefore m_S = m_a - m_D \quad (5)$$

Como o soluto é depositado em células da planta protegidas pelas paredes celulares, durante o processo de moagem parte destas paredes são rompidas expondo facilmente parte do soluto ao solvente. Por isso, o óleo de fácil acesso (m_{D1}) é obtido a uma taxa constante (CER), sendo este fenômeno controlado pela transferência de massa que ocorre durante a difusão no filme externo do soluto, ou seja, apenas influenciado pelo coeficiente de transferência de massa do solvente (k_F , min⁻¹). Para a análise de rendimento obtido durante este período é utilizado o parâmetro adimensional (Z) (Equação 6). Para isso, torna-se necessário analisar também a densidade do fluido (ρ_F) e a porosidade do leito (ϵ_{LEITO}) (Equação 7), que é obtida a partir das densidades do leito (ρ_{LEITO}) e do sólido (ρ_S). O volume do leito, obtido com a altura (h) e diâmetro (D), também é muito importante.

$$Z = \frac{k_F \cdot m_S \cdot \rho_F}{\dot{m}_F \cdot (1 - \epsilon_{LEITO}) \cdot \rho_S} \quad (6)$$

$$\varepsilon_{LEITO} = 1 - \frac{\rho_{LEITO}}{\rho_S} = 1 - \frac{\left(\frac{m_S}{V_{LEITO}}\right)}{\rho_S} = 1 - \frac{\left(\frac{4 \cdot m_S}{h \cdot \pi \cdot D^2}\right)}{\rho_S} \quad (7)$$

Neste trabalho não foi realizado cálculos experimentais para obtenção do coeficiente de transferência de massa do solvente (k_F), e considerou-se um valor arbitrário ao adimensional Z que depois, durante o ajuste do modelo, é convergido a um valor adequado. Outros adimensionais importantes são gerados a partir da razão de massa disponível em relação à massa de material inerte (Equação 8). Assim, torna-se possível obter o tempo de extração a velocidade constante (t_{CER} , min) (Equação 9), relacionado com a razão de fácil acesso (q_1) e a solubilidade do óleo no solvente (Y_S , g óleo/g solvente). Para diminuir as variáveis também é gerado o adimensional r . Com isso, para $t < t_{CER}$ tem-se a massa de extrato obtida em função do tempo descrita pela Equação 10.

$$\frac{m_D}{m_S} = \frac{m_{D1}}{m_S} + \frac{m_{D2}}{m_S} \therefore q_0 = q_1 + q_2 \quad (8)$$

$$t_{CER} = \frac{(q_0 - q_2) \cdot m_S}{Y_S \cdot Z \cdot \dot{m}_F} = \frac{\left(\frac{q_0}{q_0} - \frac{q_2}{q_0}\right) \cdot m_S \cdot q_0}{Y_S \cdot Z \cdot \dot{m}_F} = \frac{(1 - r) \cdot m_S \cdot q_0}{Y_S \cdot Z \cdot \dot{m}_F} \quad (9)$$

$$m(t) = \dot{m}_F \cdot Y_S \cdot t [1 - \exp(-Z)] \quad (10)$$

Quando a difusão no interior do soluto começa a ser significativa torna não constante a taxa de extração, e com isso tem-se a contribuição do coeficiente de transferência de massa do soluto (k_S , min⁻¹), que também não foi experimentalmente obtido neste estudo. Com isso, outro parâmetro adimensional, W , que também tem um valor inicial arbitrário qualquer, é usado para os cálculos em que a difusão no soluto é significativa (Equação 11). O tempo até o qual o decaimento da taxa de extração ocorre está relacionado com esse adimensional (Equação 12). Com isso, para $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$ tem-se que os dois parâmetros adimensionais, Z e W , são importantes para se calcular a massa de extrato obtida com tempo (Equação 13), e para $t > t_{FER}$ apenas o adimensional W (Equação 14).

$$W = \frac{m_S \cdot k_S}{\dot{m}_F \cdot (1 - \varepsilon_{LEITO})} \quad (11)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_S}{W \cdot \dot{m}_F} \cdot \ln \left[r + (1 - r) \cdot \exp\left(\frac{W \cdot q_0}{Y_S}\right) \right] \quad (12)$$

$$m(t) = \dot{m}_F \cdot Y_S \cdot \left\{ t - t_{CER} \cdot \exp \left\{ \frac{Z \cdot Y_S}{W \cdot q_0} \cdot \ln \left[\frac{1}{(1 - r)} \left[\exp\left(\frac{W \cdot \dot{m}_F}{m_S}\right) \cdot (t - t_{CER}) - r \right] \right] - Z \right\} \right\} \quad (13)$$

$$m(t) = m_S \left\{ q_0 - \frac{Y_S}{W} \cdot \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{W \cdot q_0}{Y_S}\right) - 1 \right] \cdot \exp\left(\frac{W \cdot \dot{m}_F \cdot (t_{CER} - t)}{m_S}\right) \cdot r \right\} \right\} \quad (14)$$

Seja conhecida a variedade e tamanho de partícula de uma amostra, bem como o tipo de solvente que será aplicado a esta, existirão valores específicos dos dimensionais r e q_0 . Com isso, tem-se a criação de uma função objetivo (Equação 15) que deve ser minimizada como primeiro passo deste ajuste matemático. Durante a solução serão variáveis r , Z e W (²⁰⁵SILVA *et al.* 2016), sendo n_{exp} o número de experimentos realizados e N o número de dados experimentais de cada experimento.

$$FO = \sum_{i=1}^{n_{exp}} \sum_{j=1}^N (m_{i,j}^{cal} - m_{i,j}^{exp})^2 \quad (15)$$

Com o valor de r definido cria-se uma segunda função objetivo (Equação 16), que também deve ser minimizada, com apenas Z e W como variáveis. Estes agora convergirão para os valores exatos para cada extração.

$$FO^* = \sum_{j=1}^N (m_j^{cal} - m_j^{exp})^2 \quad (16)$$

No fim, o percentual de desvio relativo médio (DRM %) de cada extração (Equação 17) é analisado a fim de ser verificar a eficiência do ajuste.

$$DRM (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum \left| \frac{(rend_{EXP} - rend_{CAL})}{rend_{CAL}} \right| \quad (17)$$

3.2 EQUILÍBRIO DE FASES SOB ALTA PRESSÃO

Foi analisado o sistema binário CBD (99,40 %, Phama Hemp) e CO₂-SC (99,99 %, White Martins) utilizando como referência dados de temperatura e fração molar descritos por ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.* (2010). Utilizou-se um equipamento que permite detectar a mudança de fase de forma visual, com validação recente reportada por ²⁰⁶OLIVEIRA *et al.* (2016). Também foi analisada a modelagem matemática para adequação dos dados experimentais a partir da equação cúbica de estado de ²⁰⁷PENG-ROBINSON (1976), sendo utilizados diferentes métodos de contribuições de grupo para estimar propriedades necessárias dos canabinóides estudados. Além das estimativas também foram feitas análises empíricas de algumas destas propriedades utilizando termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

As análises foram feitas em triplicata nas temperaturas 45, 50, 55, 60 e 65 °C e nas frações molares 3,00; 2,69; 2,37 e 2,21 x 10⁻⁴. A massa de CBD a ser usada foi calculada a partir do seu peso molecular de 314,5 g/mol⁻¹ (⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.* 2010). Para o cálculo do volume de CO₂ utilizou-se o peso molecular de 44,009 g.mol⁻¹ e a densidade de 0,85631 g.cm⁻³ (²⁰⁸NIST, 2017), já que 100 bar e 20°C foram as condições na adição.

3.2.1 EQUIPAMENTO

No presente caso, o comportamento de fases foi analisado por meio do método sintético visual, adequado para transições próximas do ponto crítico, devido a não necessidade de amostragem, que pode provocar perturbações no sistema, principalmente na zona onde a densidade é muito elevada. Assim sendo, este método é considerado mais preciso. A disponibilidade do aparato instrumental foi também um fator determinante na escolha do método. O diagrama esquemático apresentado na Figura 6 representa o aparato utilizado nos experimentos de equilíbrio de fases.

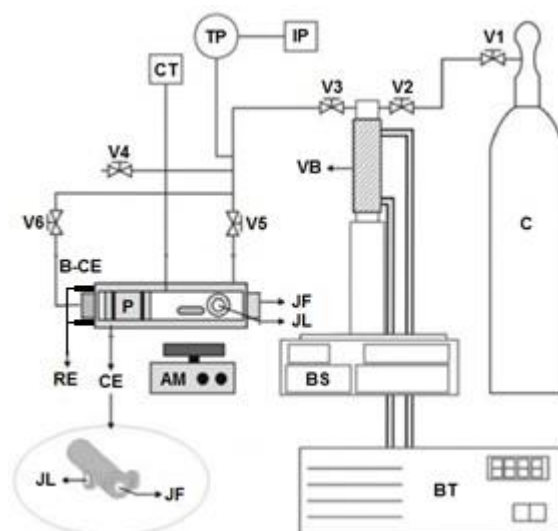


Figura 6 – Aparato experimental equilíbrio de fases método sintético visual. C) cilindro com fluido de trabalho; V1, V3, V4, V5, V6) válvulas; V2) válvula de retenção; BS) bomba de alta pressão do tipo seringa; VB) vaso da bomba; BT) banho termostático; TP) transdutor de pressão; PI) indicador de pressão; CE) célula de equilíbrio; RE) resistência elétrica; JF) janela de safira frontal; JL) janela de safira lateral; P) pistão, CT) sensor do controlador de temperatura; AM) agitador magnético.

O cilindro armazena o dióxido de carbono utilizado nos experimentos. A primeira válvula (V1), quando aberta, permite o fluxo do CO₂ do cilindro para a bomba e a válvula de retenção, V2, impede a volta do mesmo da bomba para o cilindro. A bomba de alta pressão é do tipo seringa, marca ISCO, modelo 260D, com capacidade máxima de 260 mL e 500 bar de pressão. O banho termostático (Marca TECNAL, Modelo TE-184) é utilizado para controlar a temperatura no cilindro da bomba.

A célula de equilíbrio consiste de um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL. No interior da célula há um pistão móvel que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas

superiores, uma para conexão com o termopar e outra com a válvula de alimentação, bem como possui uma entrada lateral onde é fixada uma janela de safira para entrada de luz e uma entrada frontal onde é fixada uma janela de safira frontal para permitir a visualização do interior da célula.

O pistão é inserido no interior da célula e possui dois anéis BUNA N90 localizados em suas extremidades, permitindo seu deslizamento pelo interior da célula para controle de pressão, garantindo a vedação entre a câmara do fundo e da frente da célula. A V3 e V4 são válvulas agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF2), sendo que a primeira permite o fluxo de solvente, e a segunda é utilizada para descarga da célula. A V5 e V6 são válvulas agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF1), sendo que a primeira permite a alimentação de solvente à célula por meio de uma abertura gradual e, conseqüentemente, uma regulagem do fluxo de solvente alimentado à célula, e a segunda é utilizada para a compressão do fundo da célula. Essa compressão é feita com CO₂ e observada utilizando a janela de safira frontal.

O controlador de temperatura (Marca COEL, Modelo HW4200) é composto por um termopar do tipo T e um indicador de temperatura. O termopar é inserido diretamente no interior da célula para leitura da temperatura do sistema, e o controlador PID (DIGI MEC mark, SHM 112 model) possui incerteza de $\pm 1,0$ K. O transdutor de pressão (Smar LD 301) é conectado à linha proveniente da bomba para medir a pressão do sistema. O indicador de pressão (Smar HT2) recebe um sinal digital do TP e indica a pressão na linha.

O agitador magnético (Marca IKA) proporciona a agitação do sistema no interior da célula, acionando uma barra magnética revestida com teflon. O mesmo aparato foi utilizado em trabalhos anteriores (²⁰⁹DE SOUZA *et al.*, 2008; ²¹⁰GIUFRIDA *et al.*, 2011; ²¹¹PINTO *et al.*, 2013; ²¹²LIMA *et al.*, 2015).

Para a montagem do aparato experimental utilizado no estudo de comportamento de fases, o pistão foi ajustado dentro da célula de equilíbrio, o que garantiu resistência adequada e deslizamento de forma uniforme, e o fundo da célula foi fechado. Uma quantidade exata de massa de soluto foi colocada dentro da célula, juntamente com uma barra magnética. Na parte anterior foi primeiramente colocado um anel de teflon que garantisse a vedação da mesma, além da janela de safira e um anel de cobre. Então, ela foi fechada. A linha de alimentação e o termopar foram conectados na célula e uma quantidade exata de solvente foi inserida, por meio de diferença no volume da bomba.

Ao atingir a proporção soluto/solvente desejada, o sistema foi aquecido a uma determinada temperatura e mantido em constante perturbação por meio de um agitador e da barra magnética dentro da célula. O sistema é mantido em equilíbrio por 30 minutos e, então, a pressão na célula foi diminuída de forma gradativa, até ser observada a transição de fases.

3.2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA (SÓLIDO-FLUIDO)

O equilíbrio entre duas fases de uma mistura é descrito através da igualdade de fugacidade para cada componente nestas fases. Neste caso temos que para o equilíbrio sólido-fluido a fugacidade do CBD na fase sólida é igual à fugacidade do CBD no fluido (Equação 18). Algumas variáveis ainda não citadas e importantes para essa análise são o coeficiente de fugacidade (ϕ) e o volume molar do soluto (V_s) (²¹³SPILIOTIS *et al.*, 1994).

$$f_2^S = f_2^F \therefore \phi_2^{sat} \cdot P_2^{sub} \cdot \exp\left[\frac{V_s \cdot (P - P_2^{sub})}{R \cdot T}\right] = \phi_2 \cdot P \cdot y_2 \quad (18)$$

A partir desta igualdade tem-se a fração molar do CBD em equilíbrio com o CO₂-SC (Equação 19), sendo que para o sistema estudado $P_2^{sub} \ll P$ e $\phi_2^{sub} \cong 1$ (²¹⁴ANITESCU & TAVLARIDES, 1997).

$$y_2 = \frac{P_2^{sub} \cdot \phi_2^{sub}}{P \cdot \phi_2} \cdot \exp\left[\frac{V_s \cdot (P - P_2^{sub})}{R \cdot T}\right] \therefore y_2 \cong \frac{P_2^{sub}}{P \cdot \phi_2} \cdot \exp\left(\frac{V_s \cdot P}{R \cdot T}\right) \quad (19)$$

Utilizando a equação de Clapeyron é possível estimar a pressão de sublimação do CBD (P_2^{sub}) (Equação 20), sendo C uma constante que depende de propriedades do sistema (²¹⁵PLASCENCIA & JARAMILLO, 2017).

$$\ln(P_2^{sub}) = C - \frac{\Delta H_2^{sub}}{R \cdot T} \quad (20)$$

Utilizou-se a equação cúbica de estado de Peng-Robinson (ECE-PR) (²⁰⁹PENG-ROBINSON (1976) para ajuste das pressões experimentais obtidas, no qual T é a temperatura absoluta e \bar{V} é o volume molar da mistura. Para o cálculo dos coeficientes a e b foi empregada à Regra de Mistura Quadrática de Van der Waals (²¹⁶VAN DER WAALS, 1873). As Equações 21-25 representam estas relações (²¹⁷SOUZA *et al.*, 2015).

$$P = \frac{R \cdot T}{\bar{V} - b} - \frac{a}{\bar{V}^2 + 2 \cdot b \cdot \bar{V} - b^2} \quad (21)$$

$$a = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i \cdot x_j \cdot \sqrt{a_{ii} \cdot a_{jj}} \cdot (1 - k_{ij}) \quad (22)$$

$$b = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i \cdot x_j \cdot \left(\frac{b_{ii} \cdot b_{jj}}{2} \right) \cdot (1 - l_{ij}) \quad (23)$$

$$a_{ii} = \frac{0,4572 \cdot R^2 \cdot T_{Ci}^2}{P_{Ci}} \cdot \left[1 + (0,37464 + 1,5422 \cdot \omega - 0,26992 \cdot \omega^2) \cdot \left(1 - \sqrt{\frac{T}{T_{Ci}}} \right) \right]^2 \quad (24)$$

$$b_{ii} = 0,07779 \cdot R \cdot \frac{T_{Ci}}{P_{Ci}} \quad (25)$$

Atualmente, poucos estudos sobre as propriedades termodinâmicas dos canabinóides foram feitos, inclusive do CBD. Portanto, algumas propriedades foram estimadas usando métodos de contribuição de grupos, bem como experimentalmente aferidas: termogravimetria (TG) (PerkinElmer, model STA 6000) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Shimadzu, model DSC-60). As análises foram realizadas em atmosfera inerte (N₂) e oxidativa (ar sintético) a 30 mL.min⁻¹. Além disso, utilizou-se taxas de aquecimento de 10, 20 e 50 °C.min⁻¹, sendo a temperatura inicial de 30 °C até a temperatura final de 500 °C.

Os valores das propriedades críticas do CO₂ foram descritas por ²¹⁸ANGUS *et al.* (1976). Os parâmetros de interação binária k_{ij} e l_{ij} , para cada temperatura, bem como a constante C (Equação 30), foram calculados minimizando o valor da função objetivo (Equação 26), onde N é referente à mudança de concentração e n_{exp} a mudança de temperatura. Todos os cálculos foram feitos utilizando o software XSEOS (²¹⁹CASTIER, 2008). Também fez-se a análise de desvio relativo médio (DRM) do ajuste aos dados experimentais em cada temperatura (Equação 27).

$$FO = \sum_{i=1}^{n_{exp}} \sum_{j=1}^N \left(\frac{y_2^{exp} - y_2^{calc}}{y_2^{exp}} \right)^2 \quad (26)$$

$$DRM (\%) = \frac{100}{N} \cdot \left(\frac{y_2^{exp} - y_2^{calc}}{y_2^{exp}} \right)^2 \quad (27)$$

3.2.3 ESTIMATIVA DE PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS (CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS)

A pressão e temperatura crítica dos três canabinóides estudados, bem como a temperatura de ebulição (T_b), a temperatura de fusão (T_m), a entalpia de vaporização (ΔH_{VAP}) e a entalpia de fusão (ΔH_{FUS}) foram estimadas utilizando três métodos de contribuição de grupos. O fator acêntrico é um adimensional de componentes puros importante para estimar diversas propriedades termodinâmicas. Este parâmetro foi definido por ²²⁰PITZER *et al.* (1955) e diversos autores desenvolveram expressões analíticas para calculá-lo (²²¹SCHREIBER & PITZER 1989; ²²²BRANDANI, 1993; ²²³TWU *et al.*, 1994), porém utilizou-se as expressões de ²²⁴AMBROSE & WALTON (1989) para estimar o valor deste, como mostra a Equação 28 descrita na Tabela 4.

Utilizaram-se três metodologias distintas, como mostra na Tabela 4, definidas como contribuição de grupo. No método de ¹⁴⁶JOBACK & REID (1987) a temperatura de ebulição, além de ser usada para estimar o fator acêntrico, é também importante para a estimativa da temperatura crítica. No método ¹⁴⁹CONSTANTINO & GANI (1994) tem-se que as propriedades podem ser calculadas utilizando grupos de 1ª e 2ª ordem, e que o fator acêntrico também pode ser estimado diretamente (²²⁵CONSTANTINO *et al.*, 1995). Por último, utilizou-se um método mais atual, descrito por ¹⁴⁰MARRERO & GANI (2001), em que são considerados grupos de contribuição em três ordens.

Além disso, utilizando o método de ²²⁶ELBRO *et al.* (1991) também foi estimado o volume molar (V_s) desses canabinóides. Essa propriedade depende da temperatura como mostra a Equação 29, sendo n_i o número de espécies do grupo i na substância e A_i , B_i e C_i as constantes específicas do grupo i . Obtido o volume molar torna-se possível estimar a densidade, sendo a massa molecular dos isômeros CBD e Δ^9 -THC $314,5 \text{ g.mol}^{-1}$ e do CBN $310,5 \text{ g.mol}^{-1}$ (⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.*, 2010).

$$V_s = \sum_i (n_i \cdot \Delta v_i) = \sum_i [n_i \cdot (A_i + B_i \cdot T + C_i \cdot T^2)] \quad (29)$$

Tabela 4 – Métodos de contribuição de grupos

	¹⁴⁶ JOBACK & REID (1987)	¹⁴⁹ CONSTANTINO & GANI (1994)	¹⁴⁰ MARRERO & GANI (2001)
T_b (K)	$198,2 + \sum_i (N_i \cdot T_{bi})$	$204,359 \cdot \ln \left[\sum_i (N_i \cdot T_{bi}) + \sum_j (M_j \cdot T_{bj}) \right]$	$222,543 \cdot \ln \left[\sum_i (N_i \cdot T_{bi}) + \sum_j (M_j \cdot T_{bj}) + \sum_k (O_k \cdot T_{bk}) \right]$
ΔH_{VAP} (KJ/mol)	$15,30 + \sum_i (N_i \cdot \Delta H_{VAPi})$	$6,829 + \sum_i (N_i \cdot \Delta H_{VAPi}) + \sum_j (M_j \cdot \Delta H_{VAPj})$	$11,733 + \sum_i (N_i \cdot \Delta H_{VAPi}) + \sum_j (M_j \cdot \Delta H_{VAPj}) + \sum_k (O_k \cdot \Delta H_{VAPk})$
T_m (K)	$122,5 + \sum_i (N_i \cdot T_{mi})$	$102,425 \cdot \ln \left[\sum_i (N_i \cdot T_{mi}) + \sum_j (M_j \cdot T_{mj}) \right]$	$147,450 \cdot \ln \left[\sum_i (N_i \cdot T_{mi}) + \sum_j (M_j \cdot T_{mj}) + \sum_k (O_k \cdot T_{mk}) \right]$
ΔH_{FUS} (KJ/mol)	$-0,88 + \sum_i (N_i \cdot \Delta H_{FUSi})$	-	$-2,806 + \sum_i (N_i \cdot \Delta H_{FUSi}) + \sum_j (M_j \cdot \Delta H_{FUSj}) + \sum_k (O_k \cdot \Delta H_{FUSk})$
T_c (K)	$T_b \left\{ 0,584 + 0,965 \left[\sum_i (N_i \cdot T_{ci}) \right] - \left[\sum_i (N_i \cdot T_{ci}) \right]^2 \right\}^{-1}$	$181,128 \cdot \ln \left[\sum_i (N_i \cdot T_{ci}) + \sum_j (M_j \cdot T_{cj}) \right]$	$231,239 \cdot \ln \left[\sum_i (N_i \cdot T_{ci}) + \sum_j (M_j \cdot T_{cj}) + \sum_k (O_k \cdot T_{ck}) \right]$
P_c (bar)	$\left[0,113 + 0,0032 \cdot N_{\text{átomos}} - \sum_i (N_i \cdot P_{ci}) \right]^{-2}$	$1,3705 + \left[\sum_i (N_i \cdot P_{ci}) + \sum_j (M_j \cdot P_{cj}) + 0,10022 \right]^{-2}$	$5,9827 + \left[\sum_i (N_i \cdot P_{ci}) + \sum_j (M_j \cdot P_{cj}) + \sum_k (O_k \cdot P_{ck}) + 0,108998 \right]^{-2}$
ω	-	$0,4085 \cdot \left\{ \ln \left[\sum_i (N_i \cdot \omega_i) + W \cdot \sum_j (M_j \cdot \omega_j) + 1,1507 \right] \right\}^{0,5050^{-1}}$	-

Equação 28: $\omega = -\frac{\ln(Pc/1,01325) + f^{(0)}(T_{br})}{f^{(1)}(T_{br})} \quad \therefore \quad \tau = 1 - T_{br} \quad \therefore \quad T_{br} = \frac{T_b}{T_c}$

$$f^{(0)} = \frac{-5,97616(\tau) + 1,29874(\tau)^{1,5} - 0,60394(\tau)^{2,5} - 1,06841(\tau)^5}{0,6285} \quad \therefore \quad f^{(1)} = \frac{-5,03365(\tau) + 1,11505(\tau)^{1,5} - 5,41217(\tau)^{2,5} - 7,46628(\tau)^5}{0,6285}$$

3.3 FLORES FÊMEAS NÃO POLINIZADAS

Em parceria com o “Núcleo Interdisciplinar de Estudios sobre *Cannabis* da Universidad de la República Uruguay (UdelaR)” foram feitas análises quantitativas de três canabinóides, CBD, Δ^9 -THC e CBN, em três variedades de flores fêmeas não polinizadas. As quantificações foram feitas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), técnica científica adequada já que trabalha em temperatura próxima a ambiente e não ocasiona possíveis reações de descarboxilação e degradação.

A primeira variedade foi chamada de A, Figura 7a, e tinha informações sobre espécie e composição desconhecida. A segunda, B, Figura 7b, conhecida como “Girl Scout Cookies”, é uma variedade híbrida, sendo 60 % *C. sativa* e 40 % *C. indica*, bem como possuía a informação de composição prévia de aproximadamente 25 % de Δ^9 -THC (²²⁷TCC, 2017). A terceira, C, Figura 7c, chamada de “Durga Mata II CBD”, também é uma variedade híbrida, 90 % *C. indica* e 10 % *C. sativa*, e tinha a informação de composição prévia de 6,5 % de CBD e 7,5 % de Δ^9 -THC (²²⁸PARADISE SEEDS, 2017). Foi utilizado, respectivamente, 55, 45 e 40 g das variedades citadas.



Figura 7 – Amostras de flores utilizadas: a) variedade A; b) variedade B; c) variedade C.

3.3.1 ANÁLISE DA UMIDADE

As amostras passaram por um procedimento de secagem antes de serem fornecidas, visto ser um procedimento extremamente necessário em flores recém-colhidas para evitar o crescimento de bactérias e fungos (²²⁹COHEN & ZISKIND, 2013). A umidade residual das três variedades foi analisada em quadruplicata. A variedade A foi moída com um triturador manual e as variedades B e C foram trituradas com um moinho de facas da marca Solab modelo SL-30. As três variedades foram secas em estufa a 35 °C, com circulação de ar, por aproximadamente 20 horas utilizando amostras de aproximadamente 3 g, até atingirem peso constante.

3.3.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO

As composições de canabinóides e óleos essenciais das amostras *in natura* e dos extratos obtidos foram analisadas separadamente.

3.3.2.1 CANABINÓIDES

3.3.2.1.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração foram feitas utilizando padrões dos canabinóides Δ^9 -THC, em etanol, e CBD e CBN, em metanol, todos em concentração de 1 mg.mL⁻¹ e obtidos da Grace Davison Discovery Science. Seguiu-se o procedimento descrito em ¹⁹UNODC (2009) utilizando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com pequenas modificações, como mostra a Tabela 5. Para fazer a curva de calibração de cada canabinóide preparou-se diluições nas concentrações 0,001, 0,005, 0,010, 0,050 e 0,100 mg.mL⁻¹. Também foi preparada uma mistura dos três canabinóides, com concentração individual de 0,003 mg.mL⁻¹, para análise de resolução quando injetados juntos.

Tabela 5 – Parâmetros para análise de canabinóides em HPLC.

Coluna:	SUPELCOSIL (TM) LC-8 (250 x 4,5 mm; 5 μ m)
Temperatura:	35 °C
Fase móvel:	acetoneitrila:água (8:2 v.v ⁻¹), isocrático
Tempo:	10 min
Vazão:	1 mL.min ⁻¹
Detector:	arranjo de diodo (λ =220 nm)
Injeção:	10 μ L

3.3.2.1.2 COMPOSIÇÃO NAS FLORES

As análises de composição dos canabinóides das três variedades foram feitas em duplicata utilizando alíquotas de amostra moída de aproximadamente 150 mg, seguindo a metodologia ¹⁹UNODC (2009). Estas foram colocadas em tubos falcons e depois se agregou 3 mL de uma solução metanol:clorofórmio (9:1 v.v⁻¹). Em seguida agitaram-se os tubos em vórtex por 10 segundos e depois em banho ultrassônico, a 37 Hz e 40 °C, por 5 minutos. O procedimento de homogeneização da amostra foi repetido por 3 vezes, totalizando 15 minutos de agitação sob ultrassônico. Por fim, a amostra foi agitada mais uma vez em vórtex e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo falcon e deste foi transferido 200 μ L para um vial e agregado 800 μ L de metanol. A mistura de 1 mL foi então homogeneizada em vórtex e desta aferiu-se 100 μ L para um vial de 2 mL. Por fim, adicionou-se mais 900 μ L de metanol neste último vial que foi homogeneizado antes da análise em HPLC.

3.3.2.1.3 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS

A composição de extratos brutos e extratos submetidos ao método de purificação a frio chamado “winterização”, que visa a tentativa de eliminação das ceras como interferentes, foram comparadas. Para o método de purificação, devido à característica apolar do CO₂, foi adicionado a cada extrato obtido hexano (Panreac, 95,0 % HPLC), também apolar, na proporção de 10 mL.g⁻¹. O extrato foi homogeneizado em vórtex e resfriado por 20 horas, a -18 °C (Freezer: Coder) para a variedade A e -80 °C (Ultra-Freezer: ColdLab, CL580-86V) para as variedades B e C. O sobrenadante foi transferido para um novo vial e ao resíduo inicial adicionado mais hexano e novamente submetido à “winterização”. Depois ambos sobrenadantes foram filtrados para um novo vial. Para a variedade A o solvente foi eliminado com N₂ (g) e para as variedades B e C com um rota-evaporador (Fisatom, modelo 802), ambos utilizando 40 °C. Tentou-se também a separação das ceras utilizando de modo alternativo, utilizando uma centrífuga refrigerada (Beckman Coulter, modelo Avanti J-26 XP).

Os extratos foram analisados transferindo aproximadamente 30 mg para um tubo de ensaio com tampa rosca e adicionado a este 20 mL de metanol, seguido de uma rápida agitação em vórtex e agitação por banho ultrassônico em 37 Hz, 30 minutos e 40 °C. Uma alíquota da amostra homogênea foi diluída na proporção de 1:10 e agitada por mais 20 minutos em banho ultrassônico (⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017). Por fim, transferiu-se parte da solução para um vial específico de análise em HPLC, e fez-se a injeção de 10 µL de amostra. A partir das curvas de calibração aferiram-se as concentrações de cada canabinóides nos extratos obtidos.

3.3.2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Para a análise dos óleos essenciais das diferentes variedades *in natura*, bem como dos extratos obtidos, pesou-se, em vials âmbar de 2 mL, duplicatas de alíquotas de aproximadamente 30 e 10 mg, respectivamente. Estas foram envoltas em papel alumínio e colocadas em um bloco de aquecimento, Tecnal TE-021 Dry Block, a 120 °C por 1 hora. Foi coletado com uma seringa, de forma manual, 2,5 mL do vapor para injeção no modo Head Space em um cromatografo da Thermo Fisher Scientific, modelo FOCUS GC, com injetor a 280 °C, Hélio (Linde, 99,999 %), 1 mL.min⁻¹, como gás de arraste, split 1/10, coluna DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O forno do equipamento seguiu a seguinte programação de temperatura: 50 °C (1 min), até 250 °C (8 °C.min⁻¹), depois até 300 °C (30 °C.min⁻¹) e mantido a esta por 3 minutos. Utilizou-se 280 °C como temperatura do transfer, bem como do detector de massa quadrupolo da marca DSQ II, sendo este reportado a partir de 4 minutos. Para identificação dos compostos utilizou-se a relação

massa carga (²⁰⁸NIST, 2017) oriunda da fragmentação 20 a 400 *uma*, bem como a comparação do Índice de Retenção de Temperatura Linear Programada (LTPRI) mostrado na Equação 30 (²³⁰DOOL & KRATZ, 1963), relativo a alcanos C9-16 (Sigma-Aldrich), descritos em literatura (¹⁹⁷BERTOLI *et al.*, 2010; ²³¹BABUSHAOK *et al.*, 2011).

$$LTPRI = 100.n + 100. \left(\frac{t_{Ri} - t_{Rn}}{t_{R(n+1)} - t_{Rn}} \right) \quad (30)$$

3.3.3 COMPORTAMENTO TÉRMICO DOS CANABINÓIDES

A análise de comportamento térmico da variedade A foi realizada sob aquecimento a 100 e 140 °C em estufa com circulação de ar, utilizado alíquotas entre 100 a 150 mg. Para as variedades B e C as análises foram feitas sob 90, 110 e 140 °C, em estufa da marca Nova Ética, modelo 400/4ND, com circulação de ar, utilizando alíquotas de aproximadamente 30 mg. Todas as análises foram feitas em duplicata e em tempos pré-determinados. A partir de cada extrato obtido nas etapas de aquecimento foi preparada uma solução de 1 mg.mL⁻¹ e analisada a composição em HPLC (¹⁹UNODC, 2009).

3.3.3.1 ENERGIA DE ATIVAÇÃO DOS CANABINÓIDES

Foi considerado que a constante de velocidade de reação depende apenas da temperatura. Devido à importância do comportamento térmico relacionado aos canabinóides foram calculadas as ordens das reações, energias de ativação e as constantes pré-exponenciais de degradação térmica do Δ^9 -THC e da formação do CBN durante as análises de descarboxilação da variedade A.

3.3.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS (EXTRAÇÕES)

As extrações foram feitas utilizando dióxido de carbono supercrítico, um solvente apolar. Devido à baixa concentração inicial de canabinóides neutros, também apolar, nas amostras, foram feitas análises comparativas utilizando duas metodologias. A primeira foi realizando um pré-aquecimento da amostra baseando-se nos dados obtidos durante as análises de comportamento térmico, para potencializar os canabinóides neutros. A segunda maneira foi utilizar um co-solvente polar para extrair os canabinóides ácidos, já que esses são majoritários nas amostras brutas. As condições de extração foram baseadas em dados descritos por ^{58,59}PERROTIN-BRUNEL, *et al.*, (2010), onde indicam que se pode obter uma solubilidade maior do CBD a 50 °C e do Δ^9 -THC a 70 °C, como mostrado nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Para a realização de um amplo número de análises foram utilizadas quantidades de amostra inferiores a capacidade máxima dos extratores, sendo então a diferença de volume dos mesmos de esferas de vidro.

3.3.4.1 VARIEDADE A

Os parâmetros de extrações aplicados nas amostras da variedade A estão descritos na Tabela 6, em que se variou o tempo de aquecimento em estufa a 140 °C, bem como a pressão e a temperatura aplicadas durante a extração. A partir dos resultados destas extrações foram realizadas análises da influência de cada tipo de mudança de parâmetro, como mostra a Tabela 7. Estas extrações foram feitas com o extrator 1, utilizando 90 L de CO₂ aferido pelo medidor de fluxo. Em cada extração foi utilizado aproximadamente 5,5 g de amostra.

Tabela 6 – Planejamento experimental das extrações (variedade A).

Extração	Aq. 140°C (h)	P (MPa)	T (°C)
#1	0,5	22	70
#2	0,5	40	70
#3	2,0	22	70
#4	2,0	40	50
#5	0,5	40	50

Tabela 7 – Planejamento da análise de influência de parâmetros (variedade A).

Efeito	Comparação	
Descarboxilação	# 1 e # 3	# 4 e # 5
Pressão	# 1 e # 2	
Temperatura	# 2 e # 5	

Para amostras da variedade A também foram realizadas extrações, # 6 e # 7, com o objetivo de fracionar os óleos essenciais dos canabinóides, sendo em cada extração utilizada aproximadamente 3 g de amostra. Para isso aplicou-se uma etapa a 10 MPa e 35 °C (⁴³OMAR *et al.*, 2013), sendo utilizado 60 L de CO₂, e em sequência 40 MPa e 70 °C, por mais 60 L. Para a extração # 7 se pré-aqueceu a amostra por 30 minutos a 140 °C e utilizou-se 5 % de etanol na segunda etapa de extração.

3.3.4.2 VARIEDADES B E C

As amostras das variedades B e C foram previamente moídas. Utilizou-se peneiras de 10, 14, 20, 28, 35, 48, 65 e 100 mesh, da marca Bertel, bem como um agitador mecânico, da marca Bertel, tipo magnético e série 9702, para caracterização do tamanho de partículas. Para essas foi definido o Diâmetro de Sauter (Equação 31), em que $\Delta\phi$ é a razão entre a massa de amostra que ficou retida na peneira e a massa inicial de amostra e o \bar{D} é a média do diâmetro da peneira em que a amostra passou e a qual ficou retida (²³²GREEN & PERRY, 2008). Para essas duas variedades utilizou-se o extrator 2 e foram feitas análises da cinética de extração e modelagem matemática de ²⁰²SOVOVÁ (1994).

$$D_{Sauter} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \left[\frac{\Delta\phi_n}{D_n} \right]} \quad (31)$$

3.3.4.2.1 COM PRÉ-AQUECIMENTO E SEM CO-SOLVENTE

Para ambas as variedades foram aplicados planejamentos fatoriais 2^2 (Tabela 8), com replicatas no ponto central, utilizando em média 2 g de amostra em cada extração.

Tabela 8 – Planejamento experimental das extrações (variedade B e C).

Variedade	Parâmetros	-1	+1
B	T (°C)	50	70
	P (bar)	165	249
C	T (°C)	50	70
	P (bar)	128	240

3.3.4.2.2 SEM PRÉ-AQUECIMENTO E COM CO-SOLVENTE

Essas extrações foram feitas utilizando 6 % de etanol (Panreac 99,8%, grau analítico) como co-solvente, sendo em cada extração utilizados, em média, 6 g de amostra. Realizaram-se as extrações supercríticas das amostras da variedade B a 50 °C e 16,5 MPa e da variedade C sob 24 MPa, aplicando 20, 50 e 70 °C. Para o cálculo da densidade da mistura de solventes (mol.L^{-1}) utilizou-se a função `prb2soundspeedl`, ou `prb2soundspeedv`, do software XSEOS (²¹⁹CASTIER, 2008), a partir das frações molares experimentais e utilizando os dados de propriedades críticas e interação binária, k_{ij} 0,048 e l_{ij} -0,079 obtidos pela Regra de Mistura de Van der Waals, descritos por ²³³WU *et al.* (2006). Para essa metodologia também foi avaliado a influência do tamanho de partículas na obtenção dos extratos para ambas variedades, bem como a análise de algumas superfícies sólidas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca FEI Company, modelo Quanta 250.

3.3.5 ATIVIDADE ANTI-TUMORAL

Para a avaliação da atividade antitumoral das substâncias foi utilizado o ensaio de MTT (²³⁴MOSMANN, 1983). Este ensaio colorimétrico baseia-se na capacidade das mitocôndrias viáveis de converter o MTT, ou seja, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio em cristais de púrpuras formazan. Para isso, uma suspensão de células tumorais, na concentração de $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ em meio RPMI 1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), foi dispensada em placa estéril de 96 poços e incubadas por 24 h, a 37 °C e 5% de tensão de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se concentrações crescentes dos extratos. Após

48 h de incubação, nas mesmas condições citadas anteriormente, as células foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) 0,01 M e adicionou-se 50 μL de MTT (2 mg. mL^{-1}). Depois foram incubadas na ausência de luz, a 25 °C. Após 4 h, foi adicionado 150 μL de DMSO, a fim de romper as células e solubilizar os cristais de púrpuras formazan, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BIO-TEK Power WaveXS) a 570 nm. Com isso, analisaram-se os valores de concentração para 50 % de inibição das células (CC_{50}). Foram utilizadas 5 linhas celulares tumorais humanas: Caco-2 (intestino), PC3 (próstata), Hela (útero), SiHa (útero) e C33 (útero), bem como 3 linhas de células normais: HaCat (humana), Cell Vero (macaco) e Fibroblastos L929 (camundongo).

3.4 SEMENTES DE CÂNHAMO

As amostras de sementes de cânhamo foram obtidas descascadas, sem potencial de germinação, da Indigo Herbs, localizada no Reino Unido, em pacote de 1 kg, como mostra a Figura 8.



Figura 8 – Sementes de cânhamo descascadas.

A partir destas foram utilizadas metodologias para análises de composição centesimal, extração com fluidos pressurizados e análise de algumas propriedades físico-químicas.

3.4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Foram analisados os teores de lipídeos, fibra bruta, proteínas, umidade, cinzas e carboidratos, sendo este último por diferença.

3.4.1.1 LIPÍDEOS

As sementes foram moídas, em pequenas quantidades, em um triturador de grãos (Bosch) por 5 segundos. Pesou-se, em triplicata, aproximadamente 1 g de amostra em falcons e adicionou-se 20 mL de uma mistura de solventes hexano:isopropanol (3:2). Essa mistura foi utilizada por apresentar baixa toxicidade (²³⁵HARA & NORMAN, 1978) e rendimentos equiparáveis ao comumente utilizado hexano (²³⁶GANDHI *et al.*, 2003). Esta mistura de solventes foi aplicada anteriormente em sementes de cânhamo com cascas por ²⁸GRIJÓ & MELO (2016), que apresentou teores de lipídeos dentro do esperado (²³⁷KIRALAN *et al.*, 2010).

A extração foi realizada em temperatura ambiente com agitação magnética vigorosa por 1 hora. O extrato resultante foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos em uma centrífuga da marca Hermle modelo Z 200A e posteriormente o líquido sobrenadante foi transferido para um novo e respectivo falcon. O primeiro tubo foi lavado duas vezes com 5 mL da mistura para o esgotamento da matriz e os sobrenadantes foram juntados, sendo o solvente eliminado com uma corrente de nitrogênio a 40 °C até obter peso constante.

3.4.1.2 FIBRA BRUTA

O teor de fibra bruta foi aferido seguindo o método Ba 6a-05 da ²³⁸AOCS (2009). Os sólidos desengordurados obtidos de extração em triplicata foram secos em estufa a 60 °C por 1 hora. Na sequência, aproximadamente 2 g foram colocadas em cada um dos respectivos tubos do Determinador de Fibras da marca TECNAL, modelo TE – 146 8/50, acoplados a um Controlador de Temperatura da marca TECNAL, modelo TE 007A. A primeira etapa foi adicionar 150 mL de solução 1,25 % de ácido sulfúrico, grau analítico da marca Alphatec (95 a 99 %), em água destilada. O processo seguiu sob aquecimento de 200 °C por 30 minutos após o início da fervura.

Em sequência, com o líquido ainda quente, foi realizada a filtração utilizando um papel filtro e um filtro de porcelana, sob vácuo, para um kitasato. O sólido retido pelo papel filtro foi coletado com o auxílio de uma espátula e colocado novamente em seu respectivo tubo. Depois adicionou a este 150 mL de solução 1,25 % de hidróxido de sódio em água destilada e repetiu o procedimento de aquecimento e filtragem sob mesmas condições e especificações antes mencionadas. Paralelamente foram separados 3 cadinhos de porcelana. Os mesmos foram numerados, na parte de baixo, com um lápis, fazendo uma marcação forte, e colocados em uma mufla da marca JUNG (2011), modelo 0712, com auxílio de uma pinça adequada, por 1 hora a 550 °C, para remoção da

umidade. Depois foram colocados em um dessecador até atingirem peso constante. A massa aferida foi registrada como respectiva massa do cadinho seco e sem amostra.

O sólido então obtido depois da segunda filtração foi colocado em seu respectivo cadinho de porcelana e levado a uma estufa, sem circulação de ar, a 105 °C, por 4 horas. Depois desse tempo o cadinho foi deixado novamente em um dessecador e depois se aferiu o peso do mesmo com o material sólido residual. Por fim os cadinhos com sólidos residuais foram colocados na mufla a 550 °C por 2 horas, seguindo o passo de deixá-los em um dessecador antes da aferição das massas finais. As porcentagens de fibra bruta foram calculadas pela Equação 32, porém essa quantidade é menor do que o valor de fibras alimentares, geralmente informada em embalagens, já que durante os tratamentos químicos ocorre perda de material fibroso (²³⁹DHINGRA *et al.*, 2012).

$$Fibra\ bruta\ (\%) = \frac{(A - B) \cdot 100}{C} \quad (32)$$

Onde: A = massa do cadinho + resíduo (em gramas);

B = massa do cadinho + cinza (em gramas);

C = massa da amostra seca (em gramas).

3.4.1.3 PROTEÍNAS

A análise de proteínas foi feita em quadruplicata utilizando o Método de Kjeldahl. Para isso aferiu-se alíquotas de aproximadamente 200 mg de sementes, sem moer, em respectivos tubos de Kjeldahl. A cada um destes foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico grau analítico da marca Alphatec com pureza de 95 a 99 %, bem como, com o auxílio de uma espátula pequena, uma pequena quantidade de uma mistura catalítica, grau analítico e na forma de pó fino, de sulfato de potássio e sulfato de cobre pentaidratado, na proporção 10:1. As amostras foram colocadas para serem aquecidas em um bloco digestor dentro de uma capela. A temperatura foi manipulada utilizando um Controlador de Temperatura da marca TECNAL, modelo TE 007D, sendo gradativamente aumentada como mostra a Tabela 9. Em seguida desligou-se o bloco digestor e esperou-se o esfriamento dos tubos.

Tabela 9 – Controle de temperatura durante a digestão para análise de proteínas.

T (° C)	Tempo (min)
100	15
150	15
250	45
350	45
400	180

Em um Destilador de Nitrogênio da marca TECNAL, modelo TE 036/1 acoplou-se um Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de ácido bórico 2 % e 5 gotas de um indicador misto preparado utilizando 0,132 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol, em 200 mL de álcool etílico 70 % (v.v⁻¹) e reservado em frasco âmbar. Depois, foi adaptado o primeiro tubo de Kjeldahl e adicionado vagarosamente uma solução de hidróxido de sódio 50 % até o escurecimento da solução contida no tubo. Em seguida iniciou-se o processo de destilação ligando a caldeira do equipamento e observando a mudança da cor rosada da solução do Erlenmeyer para uma cor verde. A destilação procedeu até se obter aproximadamente 75 mL de solução. Por fim seguiu-se o processo de titulação com ácido clorídrico 37 %, grau analítico, da marca NEON, 0,1 M até a viragem do indicador para a cor rosa inicial. A porcentagem de nitrogênio total foi calculada utilizando a Equação 33.

$$\text{Nitrogênio total (\%)} = \frac{V \cdot M \cdot f \cdot 0,014 \cdot 100}{P} \quad (33)$$

Onde: V = volume de solução de ácido utilizado (mL);

M = concentração molar teórica da solução de ácido utilizado;

f = fator de correção da solução de ácido utilizado = 0,9;

P = massa da amostra úmida (g).

Para calcular o percentual em proteínas a porcentagem de nitrogênio total foi multiplicada por um fator de conversão (F), como mostra a Equação 34. Para as sementes de cânhamo foram utilizados dois fatores distintos, visto que ²⁴⁰HOUSE *et al.* (2010) utilizou 6,25, valor geralmente utilizado em matérias primas de forma geral (²⁴¹AL, 2008), e ²⁴²JONES (1941) e ²⁴³USDA (2016) citam um valor mais específico, de 5,30.

$$\text{Proteína (\%)} = \text{Nitrogênio total (\%)} \cdot F \quad (34)$$

3.4.1.4 UMIDADE

As análises foram feitas em triplicata em cadinhos de porcelana secos de massas conhecidas. Nestes foi adicionado aproximadamente 3 g de amostra. Depois levou-se para estufa a 105 °C por 5 horas. As amostras permaneceram em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente para aferição da massa seca (²⁴¹IAL, 2008).

3.4.1.5 CINZAS

A análise do teor de cinzas foi feita utilizando o método de incineração direta em uma mufla ²⁴¹IAL (2008). Para isso separou-se 3 cadinhos de porcelana previamente limpos, não trincados, não rachados, sem umidade e de massa conhecida. Depois se aferiu massas de 3 g aproximadamente e seguiu-se para o processo de incineração direta 550

°C por 8 horas, obtendo no final do processo material esbranquiçado ou ligeiramente acinzentadas.

3.4.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS

As extrações com fluidos pressurizados foram feitas variando parâmetros de pressão e temperatura a fim de comparar os efeitos destes na obtenção do óleo. Foram feitas extrações com CO₂-SC, bem como com propano pressurizado, visto a aplicabilidade deste como método pressurizado alternativo e não ter sido reportado estudos específicos com sementes de cânhamo.

3.4.2.1 DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

A obtenção de extratos das sementes utilizando CO₂-SC foi feita com o extrator 1. Para cada extração foi utilizado aproximadamente 4 g de amostra moída. As extrações foram feitas sob pressões de 30 e 40 MPa, bem como temperaturas de 40 e 60 °C.

3.4.2.2 PROPANO

Foi feito um planejamento experimental 2² com ponto central. Os níveis inferiores utilizados foram 40 °C e 6 MPa, para a temperatura e pressão, respectivamente, e os níveis superiores iguais a 60 °C e 10 MPa. Com o objetivo de se obter uma extração em condição de fase homogênea estes parâmetros foram baseados no estudo de ²⁴⁴NDIAYE *et al.* (2006), que analisa dados de equilíbrio entre o propano e a soja, visto que esta possui teor similar do ácido graxo majoritário, ácido linoleico.

3.4.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS

Algumas propriedades físico-químicas foram determinadas com o objetivo de obter-se uma caracterização mais completa dessa interessante matéria prima. Foram feitas análises de composição de ácidos graxos, tocoferóis e β -caroteno, bem como determinação do índice de acidez e da umidade dos óleos obtidos.

3.4.3.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Os triglicerídeos extraídos foram esterificados por metilação a frio (²⁴⁵IUPAC,1987). Para isso pesou-se 80 mg do extrato a agregou-se 2 mL de hexano e 0,1 mL de KOH em metanol (2N). Antes de se fechar o tubo foi adicionado também nitrogênio gasoso para tornar a atmosfera do recipiente inerte. Aplicou-se agitação magnética por 30 minutos. Em seguida foi adicionado Na₂SO₄ anidro para remoção da umidade e centrifugado, para separação dos ésteres metílicos correspondentes.

A análise cromatográfica dos ésteres foi conduzida utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-2010 equipado com detector de ionização de chama (FID) e

coluna capilar Supelco SP 2330 (30 m x 0,25 mm x 0,2 μm) na qual a fase estacionária é um copolímero de silicone (80% biscianopropil / 20% cianopropilfenil siloxano). Utilizou-se nitrogênio de alta pureza a 70 kPa como gás de arraste, com relação de split de 1:80. O programa de temperatura iniciou a 150 °C, seguido de um aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 230 °C, que depois se manteve por 10 min. Utilizou-se uma mistura de padrões correspondentes: palmítico (16:0), palmitoleico (16:1 ω 7), esteárico (18:0), oleico (18:1 ω 9), linoleico (18:2 ω 6), α -linolênico (18:3 ω 3), eicosenoico (20:1 ω 9) e erúcido (22:1 ω 9) (Sigma Aldrich).

3.4.3.2 COMPOSIÇÃO DE TOCOFERÓIS TOTAL

Os tocoferóis total foram quantificados empregando a metodologia descrita por ²⁰¹ANDRIKOPOULUS *et al.* (1991). Aproximadamente 30 mg de amostra foi diluída em 1 mL de isopropanol grau HPLC, sendo injetado 10 μL em um (HPLC Shimadzu modelo 20A com coluna Macherey-Nagel C18 (comprimento: 25 cm; diâmetro: 4,6 mm; tamanho de partícula: 100 μm) a 40 °C, equipado com detector de fluorescência Shimadzu RF 20A XS, comprimento de onda de excitação de 290 nm e de emissão de 330 nm. A fase móvel utilizada está descrita na Tabela 10, e a curva de calibração, (mg tocoferóis total) = (área - 602525) / (1,01.10¹¹), foi validada em um trabalho anterior (²⁴⁶JACHMANIÁN *et al.*, 2014) utilizando os padrões α , β , γ e δ tocoferol (Sigma Aldrich).

Tabela 10 – Gradiente da fase móvel em HPLC para análise de tocoferóis.

Tempo (min)	Fase móvel (%)			
	Acetonitrila	Metanol	Isopropanol	Água
0	47,5	42,8	4,7	5
6	47,5	42,8	4,7	5
10	50	45	5	0
45	50	45	5	0
46	0	0	100	0
53	0	0	100	0

3.4.3.3 COMPOSIÇÃO DE β -CAROTENO

As concentrações de β -caroteno foram determinadas em amostras de 100 mg de cada extrato e a estas adicionado 2,5 mL de hexano (Panreac, 95,0 %, grau HPLC). O teor de β -caroteno foi determinado por meio da leitura da absorbância a 450 nm em um espectrofotômetro UV/VIS da Thermo Fisher Scientific modelo Genesys 10-S. A curva de calibração, (mg β -caroteno.L⁻¹) = (3,7197 . ABS) – (0,01265), foi obtida com soluções padrão de β -caroteno (Sigma-Aldrich) diluído em hexano nas concentrações de 1 – 100 mg.L⁻¹ (²⁴⁷DIORIO *et al.*, 2017).

3.4.3.4 ÍNDICE DE ACIDEZ

O índice de acidez foi determinado empregando amostras de aproximadamente 200 mg de cada óleo extraído. As amostras foram acondicionadas em Erlenmeyer e 25 mL de solução éter de petróleo:etanol (2:1), ambos grau analítico da Anidrol, foi adicionado. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína e fez-se a titulação com NaOH (99 %) (0,01 M) (aq,deionizada) (²⁴¹IAL, 2008). O índice é calculado como mostrado na Equação 35.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{\text{mL de NaOH} \cdot (10^{-3} \cdot 0,01 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}) \cdot f \cdot 56,1 \text{ g KOH} \cdot \text{mol}^{-1}}{x \text{ g óleo}} \quad (35)$$

3.4.3.5 UMIDADE DO ÓLEO

A umidade de cada extrato foi aferida pelo Método de Karl Fisher (²⁴⁸SUPARTONO *et al.* 1998). O procedimento de análise foi pesar uma seringa com um extrato e desta adicionar 5 gotas em um titulador automático Karl Fischer Coulometric, da marca Metrohm, modelo 899, com reagentes: hydranal coulomat AG e CG (Sigma Aldrich). Em seguida, transmite-se ao equipamento a massa de amostra injetada por diferença.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FLORES FÊMEAS NÃO POLINIZADAS

As curvas de calibração dos três canabinóides estudados, CBD, Δ^9 -THC e CBN apresentaram R^2 igual a 0,99950, 0,99997 e 0,99991, respectivamente. Observou-se que mesmo com pequenas modificações da metodologia de identificação (¹⁹UNODC, 2009), os resultados foram satisfatórios. As umidades residuais das amostras foram baixas, sendo $3,19 \pm 0,39$; $2,76 \pm 0,13$; $2,30 \pm 0,03$ % para as variedades A, B e C, respectivamente.

4.1.1 COMPORTAMENTO TÉRMICO DOS CANABINÓIDES

Observou-se que os tempos ótimos para otimização das concentrações dos canabinóides requeridos são específicos em cada espécie.

4.1.1.1 VARIEDADE A

A variação da composição dos três canabinóides estudados, aquecidos a 140 °C e 110 °C, da variedade A está mostrada na Figura 9.

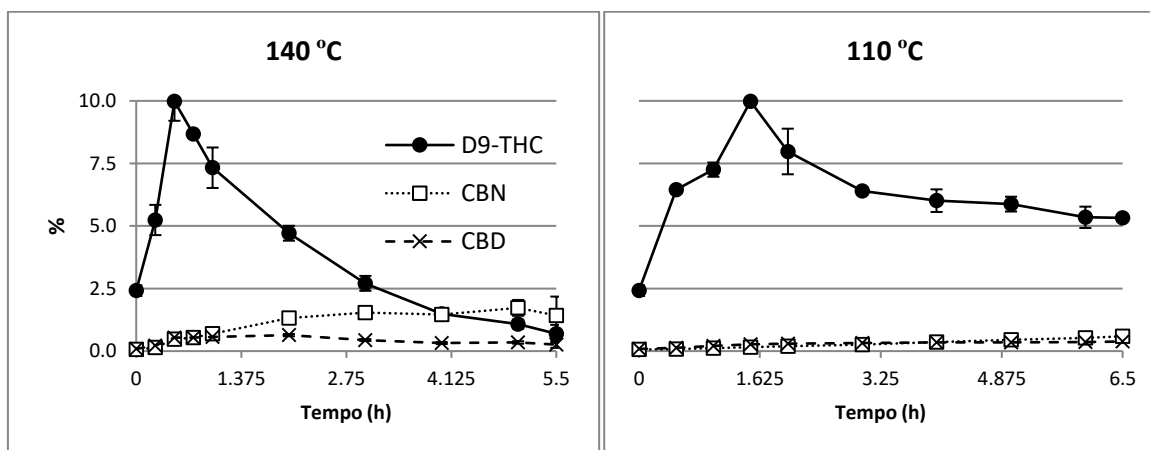


Figura 9 – Comportamento térmico dos canabinóides (variedade A).

Devido às flores utilizadas não terem um alto teor de CBD não foi viável realizar a tentativa de fracionamento de canabinóides comentado por ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL (2010), que observou ainda perda de massa durante o processo de aquecimento. A perda de massa observada durante o aquecimento da variedade A está na Tabela 11.

Tabela 11 – Perda de massa das flores sob aquecimento de 140 °C (variedade A).

Tempo (h)	Perda massa (%)	Número de experimentos
0,5	$8,11 \pm 0,84$	4
2,0	$10,19 \pm 0,28$	2

Utilizando 220 e 240 nm, mesmo nas amostras sem aquecimento, não foi observado respostas com áreas significativas de Δ^9 -THCA no tempo de retenção indicado por ¹⁹UNODC (2009). O mesmo comprimento de onda, 220 nm, também foi indicado por ⁴²PERROTIN-BRUNEL (2011). Observa-se que esse canabinóide pode apresentar outro tempo de retenção ou outro comprimento de onda adequado. Sugere-se fazer análises mais detalhadas para analisar o fenômeno da descarboxilação, bem como testar condições cromatográficas reportada em literaturas mais atuais para análise também de canabinóides ácidos. Talvez o aumento da concentração dos canabinóides neutros pode ser explicado pela perda de massa dos óleos essenciais.

Os resultados da análise de ordem de reação a 110 °C e 140 °C da variedade A, obtidos pelo Método Integral (¹⁰⁰FOGLER, 2009), foram de primeira ordem para a degradação do Δ^9 -THC e de ordem zero para a formação do CBN (Figura 10). A Tabela 12 mostra as velocidades específicas obtidas em cada uma das condições analisadas.

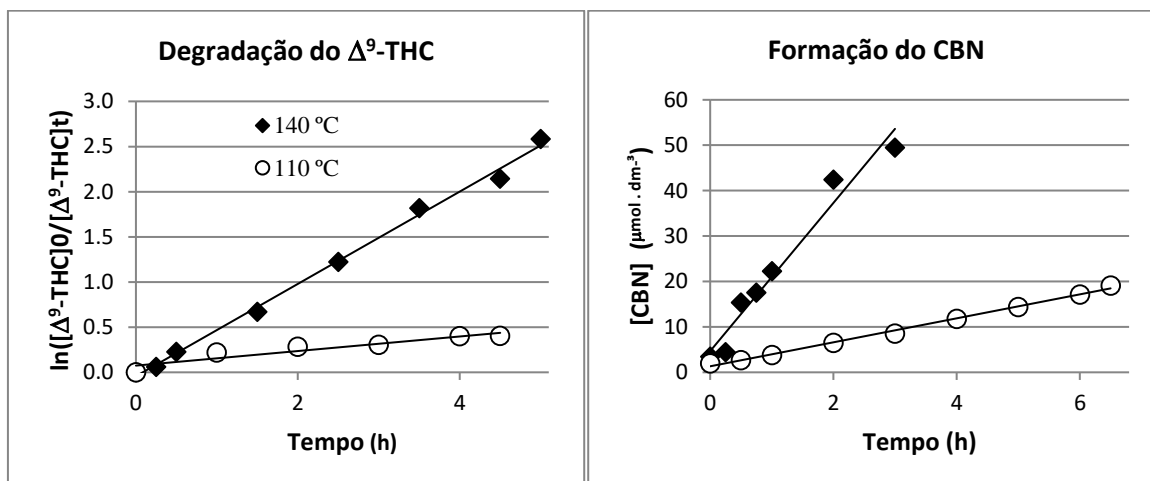


Figura 10 – Degradação do Δ^9 -THC e formação do CBN (variedade A).

Tabela 12 – Velocidades específicas de reações dos canabinóides (variedade A).

T (K)	Degradação do Δ^9 -THC 1ª ordem (h^{-1})	Formação do CBN Ordem zero ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{dm}^{-3}$)
383.15	0,081	2,639
413.15	0,511	16,310

A energia de ativação e o fator pré-exponencial foram obtidos aplicando Equação de Arrhenius (Equação 3), como mostra a Figura 11. Como esperado, os valores de energia de ativação obtidos foram próximos ao de energia de ativação para a descarboxilação do Δ^9 -THCA, 85 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ reportado por ⁷⁰PERROTIN-BRUNEL *et al.* (2011), devido a similaridade estrutural destas substâncias.

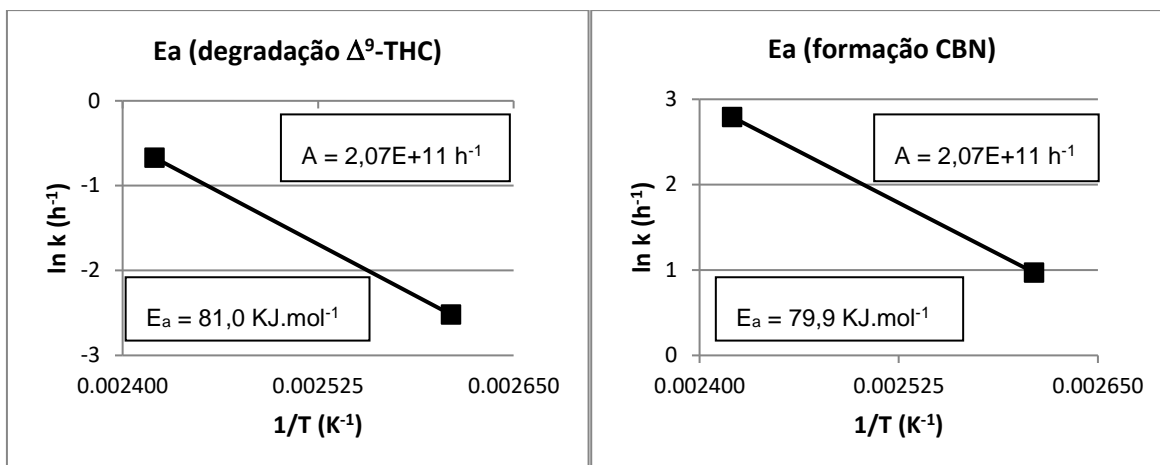


Figura 11 – Energia de ativação e fator pré-exponencial (variedade A).

4.1.1.2 VARIEDADE B

Não foi observada variação significativa da concentração do CBD, com aquecimento, na variedade B, visto que como esperado essa variedade não apresentaria grandes quantidades desse canabinóide. O comportamento térmico deste canabinóide a 90 e 140 °C é mostrado na Figura 12, sendo obtido um valor máximo de Δ^9 -THC de aproximadamente 15 %.

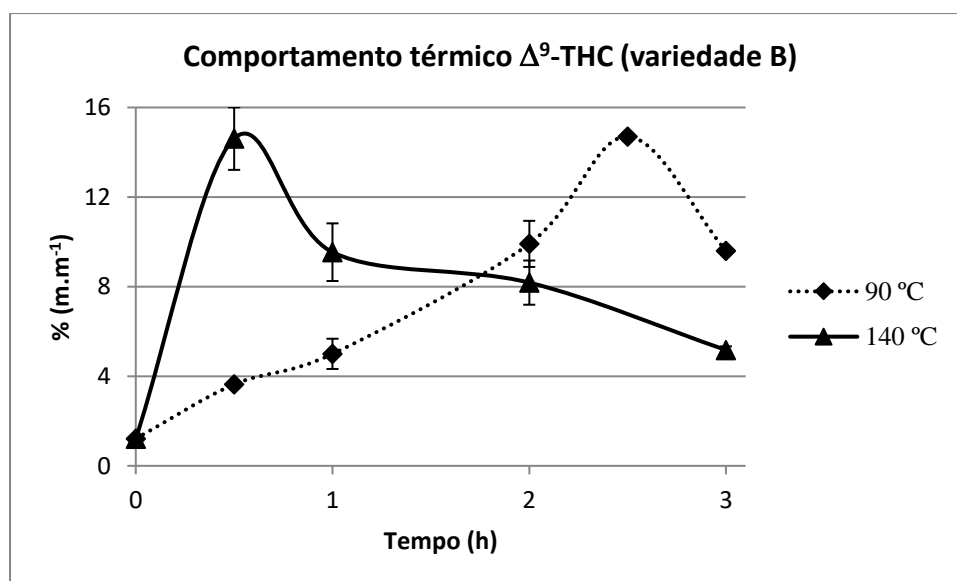


Figura 12 – Variação do teor de Δ^9 -THC sob aquecimento (variedade: B).

4.1.1.3 VARIEDADE C

Na variedade C, como esperado, foi observada a variação de ambos os canabinóides de interesse medicinal, CBD e Δ^9 -THC, a 90, 110 e 140 °C, como mostra a Figura 13. A concentração máxima obtida destes canabinóides foi de aproximadamente 6 e 5 %, respectivamente.

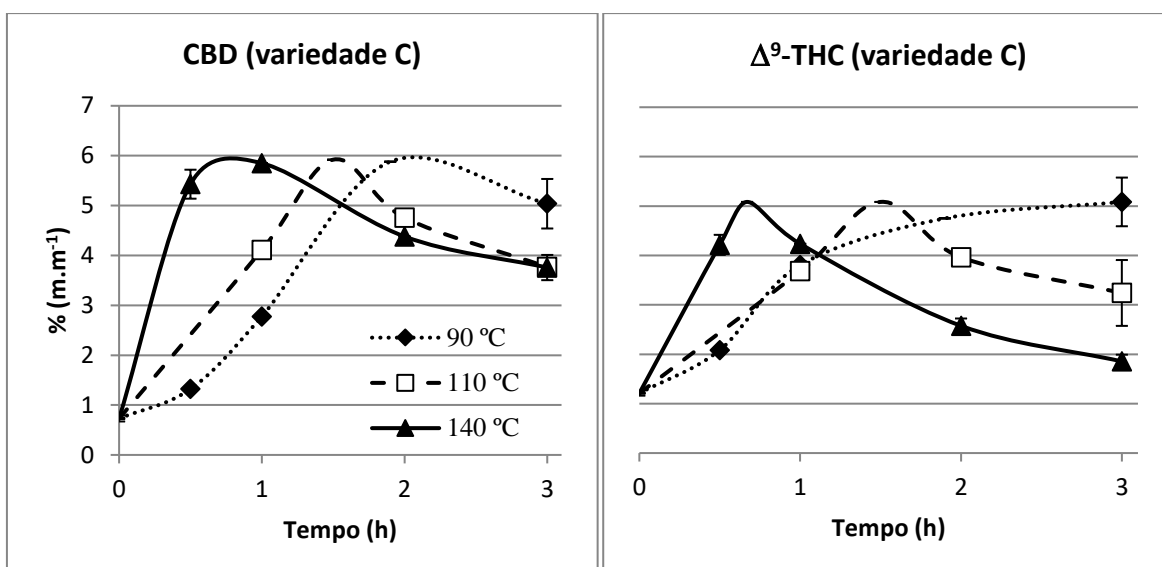


Figura 13 – Variação do teor de CBD e Δ^9 -THC sob aquecimento (variedade: C).

4.1.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

4.1.2.1 VARIEDADE A

Os extratos obtidos da variedade A são mostrados na Tabela 13. Para este foram feitas análises comparando os efeitos da pressão, temperatura e do pré-aquecimento.

Tabela 13 – Análise comparativa dos extratos (variedade A).

Extrato Bruto	Parâmetros	Substâncias	Purificado (%)	Relativo (%)
# 1 Rendimento: 8,35 %	Aq 140 °C: 0,5h P = 22 MPa T = 70 °C	CBD	3,15	3,52
		Δ^9 -THC	83,58	93,29
		CBN	2,86	3,19
		Outros	10,41	-
# 2 Rendimento: 9,43 %	Aq 140 °C: 0,5h P = 40 MPa T = 70 °C	CBD	3,08	3,79
		Δ^9 -THC	75,30	92,61
		CBN	2,93	3,60
		Outros	18,69	-
# 3 Rendimento: 5,88 %	Aq 140 °C: 2,0h P = 22 MPa T = 70 °C	CBD	0,25	0,37
		Δ^9 -THC	54,38	81,52
		CBN	12,08	18,11
		Outros	33,23	-
# 4 Rendimento: 7,13 %	Aq 140 °C: 2,0h P = 40 MPa T = 50 °C	CBD	2,76	6,25
		Δ^9 -THC	40,43	91,49
		CBN	1,00	2,26
		Outros	55,81	-
# 5 Rendimento: 7,88 %	Aq 140 °C: 0,5h P = 40 MPa T = 50 °C	CBD	2,71	3,66
		Δ^9 -THC	68,31	92,25
		CBN	3,03	4,09
		Outros	25,95	-

4.1.2.1.1 EFEITO DA PRESSÃO

Comparando os extratos # 1 e # 2 observou-se, como esperado, um maior rendimento do extrato # 2 devido à aplicação de uma maior pressão, porém ao analisar a composição específica de cada extrato observou-se que o em # 1 se continha menos interferentes. Ao analisar a composição relativa dos canabinóides observou-se a mesma tendência nos dois extratos. Logo, observa-se que apesar do maior rendimento na extração com maior pressão, houve também uma maior extração de interferentes nesta.

4.1.2.1.2 EFEITO DA TEMPERATURA

Comparando o extrato # 2 e # 5 observou-se um maior rendimento do primeiro, visto que como descrito por ⁵⁹PERROTIN-BRUNEL (2010) tem-se uma maior solubilidade do canabinóide predominante, Δ^9 -THC, na temperatura de 70 °C.

4.1.2.1.3 EFEITO DO PRÉ-AQUECIMENTO

Para discutir os efeitos do tempo de descarboxilação a 140 °C aplicado nas amostras antes da extração é necessário lembrar que quando aplicado este pré-tratamento por 30 minutos teve-se o máximo em concentração de Δ^9 -THC e quando aplicado por 2 horas teve-se relativamente uma concentração de Δ^9 -THC baixa e de CBD alta, como mostrado na Figura 14.

Aos extratos # 1 e # 3 foi aplicada uma temperatura de extração de 70 °C, a fim de se tentar otimizar a extração de Δ^9 -THC (⁵⁹PERROTIN-BRUNEL, 2010). Comparando estes se observou um menor rendimento do extrato # 3 devido ao tempo excessivo de pré-aquecimento.

Comparando os extratos # 4 e # 5 vemos que em ambos foram aplicadas extrações a 50 °C, o que favorece uma possível extração de CBD (⁵⁸PERROTIN-BRUNEL, 2010). Observou-se, como esperado, uma maior concentração relativa de CBD no extrato # 4, já que este foi submetido a um pré-aquecimento de 2 horas.

4.1.2.1.4 EXTRAÇÕES FRACIONADAS

Durante as extrações fracionadas da variedade A, mostradas na Tabela 14, foi possível observar que o pré-aquecimento aplicado potencializou consideravelmente a obtenção de extrato com Δ^9 -THC, mesmo em condição próxima a do ponto crítico do CO₂. Com a ausência do pré-aquecimento a concentração obtida de Δ^9 -THC é baixa, mesmo em condições de temperatura e pressão favoráveis. Durante essas análises foi possível comprovar que utilizando 5 % de metanol como co-solvente gera um aumento considerável na polaridade do solvente como um todo, já que dessa forma a obtenção de Δ^9 -THC foi fortemente desfavorecida.

Tabela 14 – Análise comparativa dos extratos fracionados (variedade A).

Extrato Bruto	Parâmetros	Substâncias	Purificado (%)	Relativo (%)
# 6.1 EtOH: 0% Rendimento: 1,267 %	Aq 140 °C: 0,0h P = 10 MPa T = 35 °C	CBD	0,26	2,70
		Δ^9 -THC	9,22	94,25
		CBN	0,30	3,04
		Outros	90,22	-
# 6.2 EtOH: 0% Rendimento: 5,357 %	Aq 140 °C: 0,0h P = 40 MPa T = 70 °C	CBD	0,27	1,23
		Δ^9 -THC	21,44	95,82
		CBN	0,66	2,95
		Outros	77,63	-
# 7.1 EtOH: 0% Rendimento: 3,602 %	Aq 140 °C: 0,5h P = 10 MPa T = 35 °C	CBD	1,99	3,04
		Δ^9 -THC	60,93	93,33
		CBN	2,37	3,63
		Outros	34,71	-
# 7.2 EtOH: 5% Rendimento: 5,413 %	Aq 140 °C: 0,0h P = 40 MPa T = 70 °C	CBD	0,05	2,07
		Δ^9 -THC	0,84	34,71
		CBN	1,53	63,22
		Outros	97,58	-

4.1.2.2 VARIEDADES B E C

Utilizando metanol:clorofórmio (9:1 v.v⁻¹) (¹⁹UNODC, 2009) obteve-se, respectivamente, rendimentos máximos durante as extrações de $37,32 \pm 1,44$ e $30,78 \pm 0,22$ %.

4.1.2.2.1 COM PRÉ-AQUECIMENTO E SEM CO-SOLVENTE

Para as modelagens da variedade B (Tabela 15) tem-se $q_0 = 3,28E-01$ e $r = 5,77E-01$.

Tabela 15 – Modelagens das extrações com pré-aquecimento (variedade B).

Extrato	1	2	3	4	5.1	5.2	5.3
T (°C)	50		70		60		
P (MPa)	16,5	24,9	16,5	24,9	20,7		
ρ_F (g.mL ⁻¹)	0,732	0,833	0,566	0,736	0,734		
\dot{m}_F (g.min ⁻¹)	2,365	2,816	1,884	2,349	2,412	2,395	2,342
m_s	1,597	1,555	1,508	1,598	1,555	1,748	1,638
ϵ_{LEITO}	0,957	0,956	0,955	0,953	0,956	0,950	0,953
Y_s (g.g ⁻¹)	4,17E-03	7,80E-03	4,10E-03	8,20E-03	7,70E-03	7,90E-03	6,20E-03
Z	5,95E+00	6,15E+00	4,53E+00	1,08E+01	1,08E+01	4,72E+00	8,86E+00
W	5,32E-02	7,01E-02	9,24E-03	2,49E-02	3,09E-02	3,98E-02	5,99E-02
t_{CER} (min)	3,87E+00	1,60E+00	5,98E+00	1,07E+00	1,08E+00	2,72E+00	1,77E+00
t_{FER} (min)	4,62E+01	1,86E+01	3,89E+01	1,59E+01	1,71E+01	2,15E+01	2,94E+01
K_F (min ⁻¹)	6,78E-01	7,69E-01	5,84E-01	1,31E+00	1,31E+00	5,68E-01	1,06E+00
K_S (min ⁻¹)	3,42E-03	5,62E-03	5,19E-04	1,71E-03	2,12E-03	2,71E-03	4,06E-03
DRM (%)	3,79	2,14	3,51	1,29	6,36	4,69	4,68

Para as modelagens da variedade C (Tabela 16) tem-se $q_0 = 2,26E-01$ e $r = 5,10E-01$.

Tabela 16 – Modelagens das extrações com pré-aquecimento (variedade C).

Extrato	1	2	3	4	5.1	5.2
T (°C)	50		70		60	
P (MPa)	12,8	24	12,8	24	18,4	
ρ_F (g.mL ⁻¹)	0,627	0,826	0,390	0,724	0,695	
\dot{m}_F (g.min ⁻¹)	1,975	2,677	1,182	2,422	2,283	3,278
m_s	1,665	1,313	1,659	1,767	1,665	1,717
ϵ_{LEITO}	0,959	0,959	0,959	0,959	0,959	0,959
Y_s (g.g ⁻¹)	4,10E-03	7,20E-03	1,34E-03	1,00E-02	7,30E-03	8,40E-03
Z	1,31E+01	5,48E+00	2,34E+00	4,07E+01	4,04E+01	4,02E+01
W	2,41E-02	4,41E-02	3,19E-07	8,27E-02	7,20E-02	5,44E-02
t_{CER} (min)	1,14E+00	9,10E-01	4,96E+01	1,31E-01	1,81E-01	1,63E-01
t_{FER} (min)	2,36E+01	8,45E+00	1,66E+02	9,14E+00	1,34E+01	1,03E+01
K_F (min ⁻¹)	1,53E+00	8,40E-01	2,66E-01	4,79E+00	4,95E+00	4,77E+00
K_s (min ⁻¹)	1,18E-03	3,73E-03	8,69E-09	4,70E-03	4,09E-03	3,00E-03
DRM (%)	5,25	1,44	7,8	2,54	2,03	1,41

Para as variedades B e C foram obtidas as densidades das amostras $1,30 \pm 0,15$ e $1,50 \pm 0,10$ g.mL⁻¹, bem como o Diâmetro de Sauter de 0,24 e 0,32 mm, respectivamente. Ambas as variedades foram aquecidas a 140 °C por 30 minutos, baseando-se nos dados de comportamento térmico, sendo as cinéticas de extração apresentadas na Figura 14.

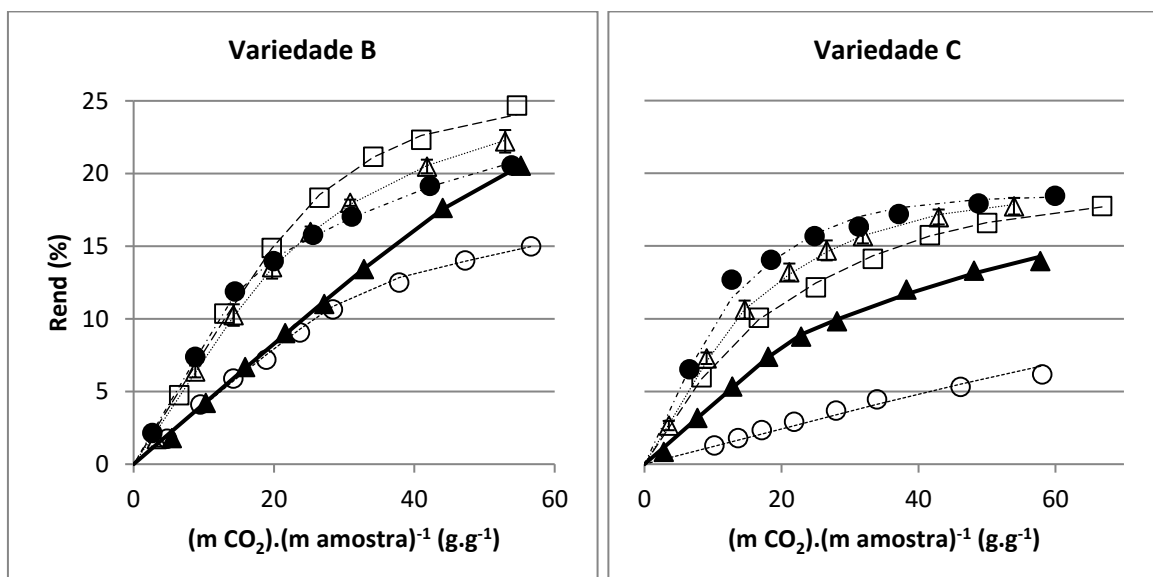


Figura 14 – Cinética de extração com pré-aquecimento (variedades B e C): ▲ 1, — mod 1, □ 2, - - - mod 2, ○ 3, - - - - mod 3, ● 4, - · - mod 4, △ 5, mod 5.

Durante as análises de rendimento foi possível observa que em análises comparativas, nem sempre a maior densidade do solvente (ρ_F) forneceu o maior

rendimento. Comparando extrações sob mesma pressão observa-se a maior densidade com a menor temperatura, porém na maior temperatura se tem a maiores solubilidades do soluto no solvente (Y_s). Esses dois efeitos são concorrente e, com isso, em alguns casos o maior rendimento pode ser obtido com a menor densidade do solvente. Esse fenômeno é chamado “crossover” (¹³⁷McHUGH & KRUKONIS, 1986).

De maneira geral obtiveram-se baixos desvios relativos médios de ajustes a partir da modelagem matemática de ²⁰²SOVOVÁ (1994). Utilizando o software STATISTICA 8.0 foram feitas análises estatísticas dos rendimentos e composições dos extratos.

4.1.2.2.1.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RENDIMENTOS

Os rendimentos foram comparados considerando uma razão de massa de CO₂ por massa de amostra (g.g⁻¹) de aproximadamente 55. Com a Análise de Variância (ANOVA, Tabela 17) foi possível calcular os coeficientes de correlação (R²) das superfícies de resposta (Figura 15), em 0,91 e 0,82, respectivamente, bem como comparar os valores de F_{CAL} com $F_{TAB}^B(1,3; 95\%) = 10,13$ e $F_{TAB}^C(1,2; 95\%) = 18,51$.

Tabela 17 – Tabela ANOVA das extrações com pré-aquecimento (variedades: B e C).

	B				C			
	SQ	G.L.	MQ	F _{CAL}	SQ	G.L.	MQ	F _{CAL}
T	23,67	1	23,67	14,99	10,14	1	10,14	1,05
P	21,95	1	21,95	13,90	59,52	1	59,52	6,15
TxP	0,60	1	0,60	0,38	19,40	1	19,40	2,01
Resíduo	4,74	3	1,58		19,35	2	967	
Total	50,96	6			108,42	5		

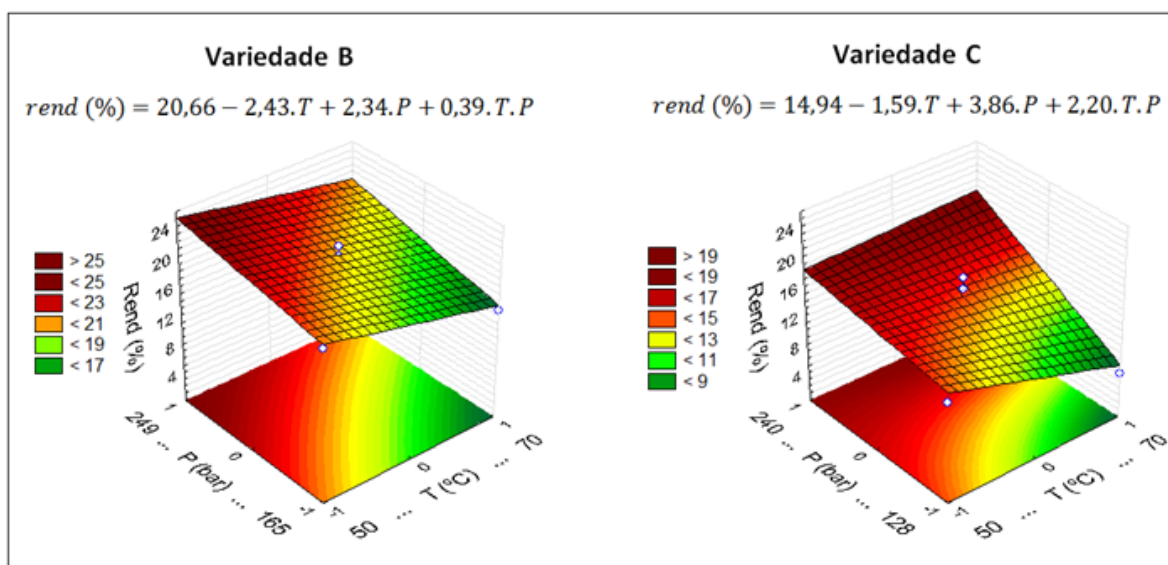


Figura 15 – Superfície de resposta dos rendimentos com pré-aquecimento em variáveis codificadas (variedades B e C).

Também foi analisado o erro padrão e os limites de confiança, Tabela 18, que indicam, pelo p -valor, se a intensidade de uma variável é estatisticamente significativa, como mostra o Diagrama de Pareto (Figura 16). Para estas análises tem-se que $t^B_{TAB}(3 g.l; 95\%) = 3,18$ e $t^C_{TAB}(2 g.l; 95\%) = 4,30$. Com isso, observou-se que para a variedade B a temperatura e a pressão são individualmente significativas, visto que o módulo do valor de t_{CALC} foi maior que t_{TAB} , o que não foi observado para a variedade C.

Tabela 18 – Tabela p -valor das extrações com pré-aquecimento (variedades: B e C).

	B				C			
	Coef	Erro	t_{CALC}	p	Coef	Erro	t_{CALC}	P
Média	20,66	0,47	43,49	0,000	14,94	1,27	11,75	0,007
T	-2,43	0,63	-3,87	0,030	-1,59	1,56	-1,02	0,414
P	2,34	0,63	3,73	0,034	3,86	1,56	2,48	0,132
TxP	0,39	0,63	0,62	0,581	2,20	1,56	1,41	0,293

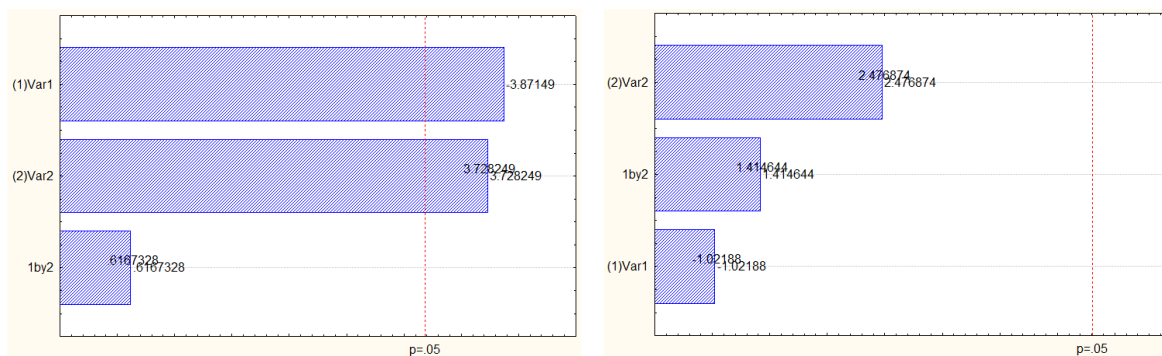


Figura 16 – Diagrama de Pareto dos rendimentos com pré-aquecimento (variedades B e C, respectivamente).

4.1.2.2.1.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS COMPOSIÇÕES

Cada extrato teve sua composição analisada em duplicata antes e depois do método de “winterização” como mostram as Tabelas 19 e 20, respectivamente. Para ambas as variedades observou-se que o procedimento de purificação não melhorou significativamente a concentração dos canabinóides. A tentativa de separação das ceras utilizando a centrífuga refrigerada também não foi eficiente porque as mesmas voltaram a se solubilizar com a aceleração do equipamento. Com isso, fizeram-se as análises estatísticas desconsiderando esta etapa.

Tabela 19 – Composição (m/m %) dos extratos obtidos com pré-aquecimento (var: B).

Extratos	Canabinóides	50°C;165bar	50°C;249bar	70°C;165bar	70°C;249bar	60°C;207bar
Bruto	CBD	5,08 ± 2,01	1,21 ± 0,17	1,35 ± 0,04	1,81 ± 0,31	2,40 ± 0,15
	Δ^9 -THC	87,91 ± 1,10	80,80 ± 0,85	77,00 ± 0,22	88,29 ± 1,94	80,82 ± 5,29
	CBN	0,53 ± 0,59	0,62 ± 0,04	0,50 ± 0,07	1,18 ± 0,41	0,74 ± 0,02
Purificado	CBD	2,22 ± 0,74	1,38 ± 0,14	1,94 ± 0,39	4,09 ± 2,70	2,24 ± 0,10
	Δ^9 -THC	85,41 ± 4,26	84,12 ± 6,45	80,59 ± 0,93	88,51 ± 1,54	76,20 ± 3,82
	CBN	0,96 ± 0,09	3,56 ± 0,28	2,18 ± 0,03	3,71 ± 0,66	2,54 ± 0,12

Tabela 20 – Composição (m/m %) dos extratos obtidos com pré-aquecimento (var: C).

Extratos	Canabinóides	50°C;128bar	50°C;240ar	70°C;128bar	70°C;240bar	60°C;184bar
Bruto	CBD	35,23 ± 6,69	33,81 ± 0,43	43,00 ± 3,54	33,42 ± 2,48	38,66 ± 3,59
	Δ^9 -THC	31,10 ± 4,17	27,96 ± 0,57	30,45 ± 3,44	29,42 ± 1,51	38,72 ± 1,14
	CBN	0,31 ± 0,02	0,23 ± 0,13	0,50 ± 0,29	0,22 ± 0,08	0,39 ± 0,01
Purificado	CBD	29,18 ± 8,66	29,48 ± 0,94	43,08 ± 2,79	32,69 ± 3,12	33,60 ± 0,98
	Δ^9 -THC	34,43 ± 2,89	35,13 ± 2,65	33,88 ± 3,07	31,75 ± 3,15	37,76 ± 1,87
	CBN	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,55 ± 0,05	0,48 ± 0,12	0,62 ± 0,10

A análise de otimização de CBD só pôde ser feita na variedade C, visto que a variedade B não apresentou alto potencial desse canabinóide. Para esta, nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa sendo a superfície de resposta igual a:

$$CBD(\%) = 36,824 + 1,845.T - 2,75.P - 2,04.T.P, \text{ com } R^2 = 0,935.$$

Ainda analisando a variedade C, foi observado um maior teor de CBD quando utilizando condições mais brandas de extração. Essa condição é interessante visto que atende as primeiras especificações da ANVISA para aplicação de extratos para epilepsia e enfermidades semelhantes, de que a concentração de CBD deve ser maior do que a de Δ^9 -THC (²⁴⁹ANVISA, 2015). Observou-se ainda que no ponto central foi possível obter um extrato com concentrações equilibradas de CBD e Δ^9 -THC sendo também interessante porque permite usufruir das propriedades medicinais do Δ^9 -THC, que mesmo sendo psicoativo é indicado na medicina quando em formulação balanceada com o CBD (antipsicoativo) (²⁵⁰NIESINK, R. & VAN LAAR, 2013; ²⁵¹MOLNAR *et al.* 2014).

Analisando a otimização de Δ^9 -THC foi observado que para a variedade B foi possível obter extratos com alta concentração, entre 75 a 90 %, assim como mostrado em estudos anteriores (⁴²PERROTIN-BRUNEL, 2011; ⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017). Nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa sendo a superfície de resposta:

$$\Delta^9\text{-THC}(\%) = 218,97 - 2,35.T - 6,32.10^{-1}.P + 1,10.10^{-2}.T.P, \text{ com } R^2 = 0,941.$$

Para a variedade C obteve-se a superfície de resposta:

$$\Delta^9\text{-THC}(\%) = 31,53 + 0,2025.T - 1,0425.P + 0,5275.T.P, \text{ com } R^2 = 0,080.$$

O baixo coeficiente de correlação pode estar relacionado à alta concentração de CBD e sua possível isomerização ($CBD \xrightarrow{\Delta} \Delta^9\text{-THC}$) (⁸²GRIJÓ & CARDOZO-FILHO, 2017), bem como a degradação do Δ^9 -THC em CBN e/ou Δ^8 -THC (⁸⁰GARRET, 1974), por exemplo. Além disso, as diferentes temperaturas e pressões também podem influenciar nestas variações.

4.1.2.2.2 SEM PRÉ-AQUECIMENTO E COM CO-SOLVENTE

4.1.2.2.2.1 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE CANABINÓIDES

Considerou-se como amostra fina a que passou pela peneira de 35 mesh, ou seja, menores que 0,42 mm. Os dados de modelagem estão descritos na Tabela 21 e as cinéticas de extração são mostradas na Figura 17. Foi obtida $\epsilon_{LEITO} = 0,776$.

Tabela 21 – Modelagens das extrações com co-solvente (variedades B e C).

Variedade	B		C		
Extrato	B1	B2	C1	C2	C3
Partículas (mm)	< 0,42	> 0,42	< 0,42		> 0,42
T (°C)	50		20	50	70
P (MPa)	16,5		24		
ρ_F (g.mL ⁻¹)	0,763	0,763	0,981	0,846	0,745
\dot{m}_F (g.min ⁻¹)	2,198	2,266	2,917	2,484	2,174
m_s	4,489	4,467	4,144	3,287	4,899
q_0	4,07E-01	3,40E-01	3,77E-01	3,56E-01	2,32E-01
r	8,29E-01	7,79E-01	9,56E-01	9,98E-01	9,99E-01
Y_s (g.g ⁻¹)	4,60E-02	5,02E-02	2,10E-02	1,40E-02	1,40E-02
Z	9,58E-02	8,30E-02	1,11E-01	8,05E-03	2,56E-03
W	7,39E-02	8,88E-02	1,00E+00	2,74E-01	4,49E-01
K_F (min ⁻¹)	9,02E-03	7,92E-03	1,14E-02	1,04E-03	2,23E-04
K_S (min ⁻¹)	8,37E-03	1,12E-02	1,74E-01	5,19E-02	5,02E-02
t_{CER} (min)	3,13E+01	3,22E+01	9,05E+00	6,11E+00	7,06E+00
t_{FER} (min)	3,52E+01	3,55E+01	2,81E+01	1,04E+01	9,99E+00
DRM (%)	9,00	26,29	4,31	1,44	3,48

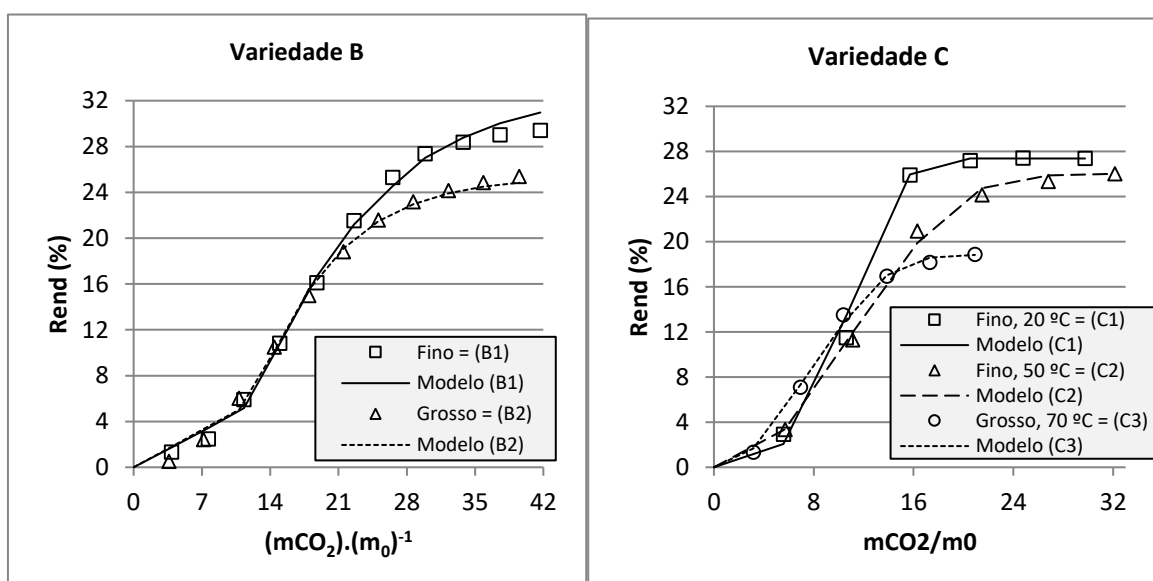


Figura 17 – Cinética de extração com co-solvente (variedades B e C).

Apesar de rendimentos maiores do que os obtidos com pré-aquecimento, as concentrações de canabinóides foram inferiores. A concentração de Δ^9 -THC nas amostras fina e grossa da variedade B foram, respectivamente, 12,65 e 11,84 %. Já nos extratos da variedade C as concentrações de CBD e Δ^9 -THC foram, respectivamente, 2,40 % e 4,12 para o extrato 1; 5,57 % e 9,20 % para o extrato 2; 4,30 % e 10,05 % para o extrato 3. As amostras menores que 0,42 mm favoreceram os rendimentos, enquanto, como esperado, 50 °C e 70°C favoreceu, respectivamente, a obtenção de CBD e Δ^9 -THC (^{58,59}PERROTINBRUNEL *et al.*, 2010). Os óleos essenciais foram conservados (Tabela 22), sendo os mais voláteis parcialmente perdidos durante a extração. A razão massa carga é identificada por um pico base (100%), um pico secundário e um pico terciário, sendo os dois últimos com respectivas porcentagens em relação ao pico base.

Tabela 22 – Teor de óleos essenciais *in natura* e em extratos (variedades B e C).

Óleo essencial; Índice de retenção m/z referência; m/z experimental	%						
	B	B1	B2	C	C1	C2	C3
α -Pineno ; 937 93;91(44);92(42) 93,02;91,00(45,30);92,04(41,62)	22,18 ± 2,76	4,79 ± 0,45	6,19 ± 0,26	27,47 ± 0,08	12,95 ± 0,78	17,99 ± 1,32	20,95 ± 2,19
β -Pineno ; 983 93;41(61);69(36) 93,03;41,03(18,22);69,03(30,28)	8,15 ± 1,38	2,20 ± 0,08	2,12 ± 0,06	14,24 ± 0,22	7,57 ± 1,44	6,08 ± 0,86	7,55 ± 0,85
Mirceno ; 992 41;93(87);69(80) 40,98(54,02);93,01(100);68,95(81,92)	30,57 ± 2,21	15,35 ± 2,83	16,81 ± 0,01	17,99 ± 0,41	23,56 ± 3,95	12,34 ± 0,50	14,49 ± 1,54
D-Limoneno ; 1033 68;93(60);67(45) 68,04;93,02(76,53);67,06(78,93)	1,42 ± 0,23	0,81 0,13	1,16 ± 0,03	9,00 ± 0,15	8,62 ± 1,95	7,45 ± 0,44	8,06 ± 0,84
Cariofileno ; 1431 93;133(91);91(86) 93,03;133,02(93,99);90,99(77,93)	15,18 ± 2,36	31,67 ± 0,28	24,70 ± 0,80	12,80 ± 0,59	23,11 ± 2,83	20,97 ± 1,78	21,05 ± 1,30
α -Humuleno; 1467 93;80(31);121(30) 93,03;80,04(23,62);121,06(30,48)	4,85 ± 0,80	11,09 ± 0,63	9,78 ± 0,57	4,35 ± 0,19	7,40 ± 0,99	8,75 ± 0,26	7,63 ± 1,35
β -Panasinseno ; 1549 161;105(60);133(52) 161,04;104,98(50,97);133,05(51,93)	4,92 ± 1,47	12,62 ± 1,57	14,82 ± 0,54	2,44 ± 0,38	4,20 ± 0,95	9,15 ± 1,96	5,96 ± 1,32
Selina-3,7(11)-diene ; 1553 161;122(62);107(61) 161,06;122,07(62,71);107,05(53,30)	6,69 ± 2,15	16,49 ± 2,10	18,63 ± 1,09	3,18 ± 0,37	5,09 ± 1,33	11,17 ± 2,15	7,64 ± 1,81

4.1.2.2.2 MISCROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises em MEV foram feitas utilizando amostras menores que 0,42 mm. Foi observado que para ambas as variedades, B (Figura 18) e C (Figura 19), as superfícies retilíneas potencializadas pelo moinho de facas foram pouco modificadas depois de submetidas a extrações sob altas pressões, e totalmente modificadas na extração convencional. Isso demonstra a alta seletividade das extrações com fluidos pressurizados.

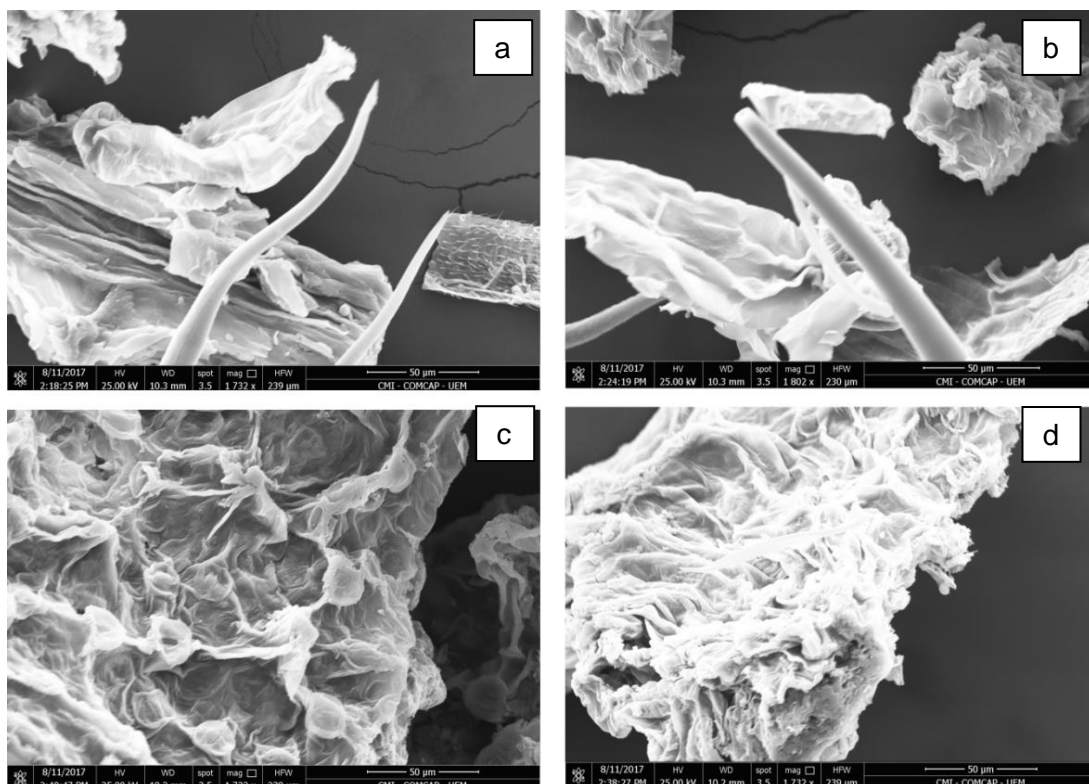


Figura 18 – Comparação estrutural das superfícies da variedade B por MEV: antes (a), depois da extração supercrítica a 50 °C e 16,5 MPa (b) e depois do processo de extração pelo método convencional em duplicata (c,d).

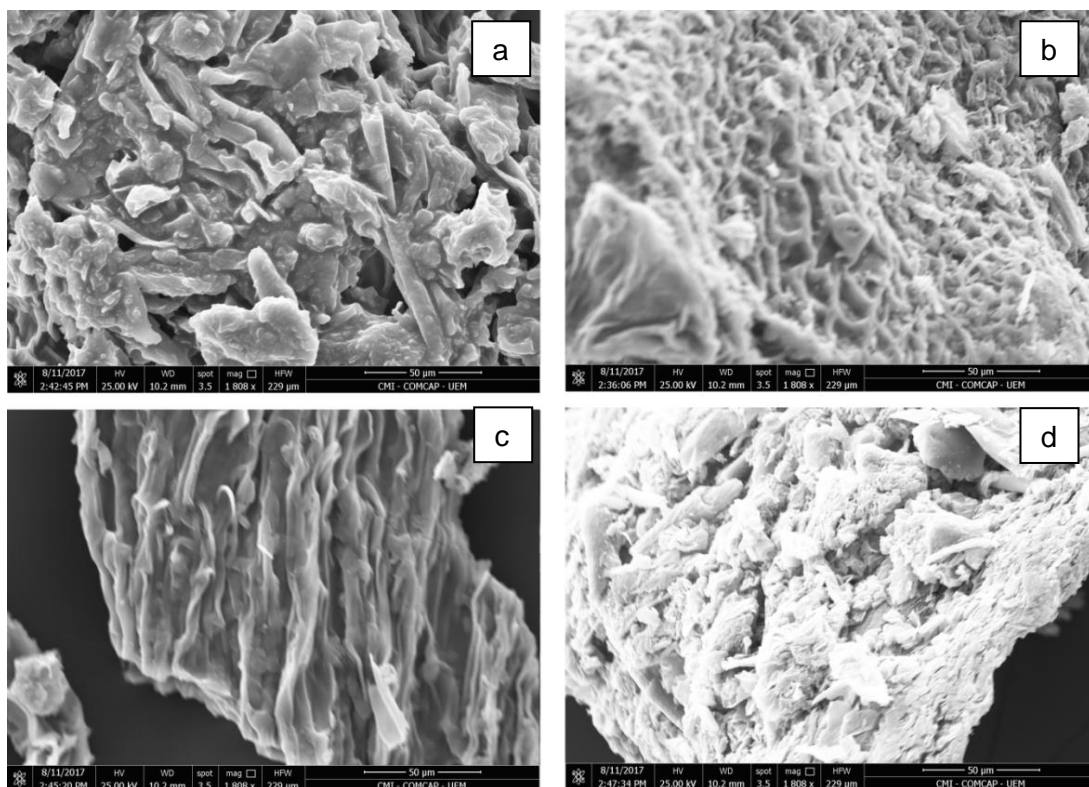


Figura 19 – Comparação estrutural das superfícies da variedade B por MEV: antes (a), depois da extração convencional (b), depois das extrações supercríticas a 24,0 MPa e 50 °C (c) e a 24 MPa e 20 °C (d).

4.1.3 ATIVIDADE ANTI-TUMORAL

As concentrações citotóxicas ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de onze extratos para a inibição de 50 % (CC_{50}) de 5 células tumorais e 3 células normais estão descritas na Tabela 23. O objetivo é se obter menores concentrações para células tumorais e maiores para células normais.

Tabela 23 – Concentração citotóxica de extratos para inibir 50 % de células (CC_{50}).

#	CC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$): Células tumorais					CC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$): Células normais		
	Caco-2	PC3	Hela	SiHa	C33	HaCat	Cells Vero	L929
1	62,8 ± 3,9	80,4 ± 4,1	27,5 ± 3,5	30,9 ± 4,0	25,0 ± 1,4	105,9 ± 4,7	218,1 ± 2,3	145,7 ± 5,0
2	87,9 ± 3,5	92,4 ± 5,4	39,7 ± 5,1	42,3 ± 3,4	30,9 ± 2,5	128,0 ± 5,5	240,1 ± 3,5	165,7 ± 3,6
3	91,4 ± 5,6	121,5 ± 5,7	32,9 ± 4,2	43,8 ± 4,7	23,5 ± 3,0	130,5 ± 3,9	225,8 ± 3,9	187,6 ± 1,1
4	116,7 ± 5,1	136,9 ± 3,9	42,3 ± 5,4	54,8 ± 4,9	44,2 ± 5,1	139,1 ± 4,6	232,5 ± 5,7	194,0 ± 5,8
5	21,5 ± 1,2	32,1 ± 2,8	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,7	2,8 ± 0,4	80,4 ± 2,3	131,9 ± 0,9	121,3 ± 2,7
6	49,8 ± 0,9	54,3 ± 1,2	14,0 ± 2,7	14,6 ± 1,4	8,3 ± 0,9	93,7 ± 5,7	146,7 ± 4,5	112,9 ± 2,9
7	84,4 ± 3,9	96,3 ± 0,9	32,5 ± 2,6	36,9 ± 3,3	32,4 ± 4,7	102,7 ± 3,8	198,5 ± 5,3	131,0 ± 3,7
8	52,8 ± 5,4	67,9 ± 3,6	13,4 ± 2,1	15,7 ± 0,9	10,3 ± 0,4	116,5 ± 5,3	207,7 ± 5,6	146,3 ± 2,7
9	47,2 ± 4,9	83,1 ± 1,1	12,6 ± 0,9	13,2 ± 1,4	9,6 ± 1,3	101,9 ± 5,9	225,8 ± 5,3	138,1 ± 3,0
10	39,6 ± 2,7	62,9 ± 3,9	9,8 ± 0,6	10,2 ± 1,8	7,1 ± 1,1	97,4 ± 5,7	187,1 ± 5,1	131,5 ± 4,2
11	49,5 ± 1,4	50,8 ± 4,6	10,1 ± 0,3	10,8 ± 0,4	8,2 ± 0,8	93,5 ± 2,7	176,0 ± 1,8	138,8 ± 5,8

NOTA: as composições dos cinco primeiros extratos estão descritas na Tabela 13 e dos extratos 6 e 7 na Tabela 14, sendo estes, respectivamente, # 6.2 e # 7.2. O extrato 8 foi o obtido com co-solvente da variedade B e granulometria fina, sendo o 9 este purificado. O extrato 10 foi o obtido com co-solvente da variedade C a 50 °C e o 11 é este purificado.

Na Tabela 24 são mostrados os resultados dos índices de atividade anti-tumoral (CC_{50} célula normal).(CC_{50} célula tumoral)⁻¹ das 3 células normais usadas (N1 = HaCat, N2 = Cells Vero e N3 = Fibroblatos L929) em relação as 5 células tumorais.

Tabela 24 – Índices de atividade anti-tumoral dos extratos.

#	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3
	Caco-2			PC3			Hela			SiHa			C33		
1	1,7	3,5	2,3	1,3	2,7	1,8	3,9	7,9	5,3	3,4	7,1	4,7	4,2	8,7	5,8
2	1,5	2,7	1,9	1,4	2,6	1,8	3,2	6,0	4,2	3,0	5,7	3,9	4,1	7,8	5,4
3	1,4	2,5	2,1	1,1	1,9	1,5	4,0	6,9	5,7	3,0	5,2	4,3	5,6	9,6	8,0
4	1,2	2,0	1,7	1,0	1,7	1,4	3,3	5,5	4,6	2,5	4,2	3,5	3,1	5,3	4,4
5	3,7	6,1	5,6	2,5	4,1	3,8	29,8	48,9	44,9	25,9	42,5	39,1	28,7	47,1	43,3
6	1,9	2,9	2,3	1,7	2,7	2,1	6,7	10,5	8,1	6,4	10,0	7,7	11,3	17,7	13,6
7	1,2	2,4	1,6	1,1	2,1	1,4	3,2	6,1	4,0	2,8	5,4	3,6	3,2	6,1	4,0
8	2,2	3,9	2,8	1,7	3,1	2,2	8,7	15,5	10,9	7,4	13,2	9,3	11,3	20,2	14,2
9	2,2	0,5	2,9	1,2	0,3	1,7	8,1	1,8	11,0	7,7	1,7	10,5	10,6	2,4	14,4
10	2,5	4,7	3,3	1,5	3,0	2,1	9,9	19,1	13,4	9,5	18,3	12,9	13,7	26,4	18,5
11	1,9	3,6	2,8	1,8	3,5	2,7	9,3	17,4	13,7	8,7	16,3	12,9	11,4	21,5	16,9

NOTA: As células normais são: N1 = HaCat, N2 = Cells Vero e N3 = Fibroblatos L929.

Observou-se que o extrato # 5 apresentou maiores índices de atividade anti-tumoral em todos os casos (Tabela 24). Esse extrato foi obtido com um pré-aquecimento para potencializar o Δ^9 -THC, temperatura de extração de 50 °C e pressão de extração de 40 MPa. Ao analisar as concentrações CC_{50} do extrato # 5 na Tabela 23 observa-se que esse tipo de extrato se demonstrou bastante eficiente para a inibição das três células relacionadas ao câncer no útero, Hela, SiHa e C33, indo ao encontro de estudos específicos que demonstram esse potencial para o Δ^9 -THC (²⁵²VELASCO *et al.*, 2016), CBD (²⁵³LUKHELE & MOTADI, 2016) e endocanabinóides (²⁵⁴CONTASSOT *et al.*, 2004).

4.1.4 ANÁLISES COM O CANABIDIOL PURO

Algumas das estimativas de propriedades do CBD, por métodos de contribuição de grupos, foram comparadas com análises térmicas experimentais a fim de se obter importantes dados para a modelagem de equilíbrio de fases do mesmo com CO_2 -SC.

4.1.4.1 ESTIMATIVA DE PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS (CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS)

A Tabela 25 apresenta as estimativas de pressão e temperatura crítica, bem como fator acêntrico, obtidas utilizando o método de ¹⁴⁶JOBACK & REID (1987) “JR”, ¹⁴⁹CONSTANTINOU & GANI (1994) “CG” e ¹⁴⁰MARRERO & GANI (2001) “MG”. Algumas estimativas foram feitas considerando grupos de primeira ordem “1^aO”, segunda ordem “2^aO” e terceira ordem “3^aO”. Para o método de “CG” o fator acêntrico pode ser calculado pelo método tradicional (Tabela 4) e pelo método específico (Equação 28), sendo apresentado na linha de cima e linha de baixo da tabela, respectivamente.

Tabela 25 – Estimativas de propriedades críticas e fator acêntrico dos canabinóides.

	Pc (MPa)			Tc (K)			ω		
	CBD	Δ^9 -THC	CBN	CBD	Δ^9 -THC	CBN	CBD	Δ^9 -THC	CBN
JR	1,77	1,67	1,82	1120	1074	1097	1,095	0,971	1,040
CG (1 ^a O)	1,57	1,60	1,72	870	853	898	0,660	0,517	0,465
							1,455	1,229	0,963
CG (2 ^a O)	1,03	1,13	1,01	868	851	896	0,386	0,313	0,197
							1,509	1,280	1,054
MG (1 ^a O)	1,65	1,58	1,82	891	854	848	0,588	0,621	0,629
MG (2 ^a O)	1,61	1,51	1,67	861	834	825	0,685	0,622	0,503
MG (3 ^a O)	1,61	1,51	2,02	861	834	862	0,685	0,622	0,222
PB	1,60	1,95	1,65	932	988	920	0,497	0,882	0,431

Foi observado que ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.* (2010), identificada por “PB”, descreve estimativas distintas utilizando também o método de “CG”, apesar de não citar se utilizou “1^o” ou “2^o”. Além disso, também foi observado que as pressões e temperaturas críticas calculadas pelo método de “JR” foram iguais as disponíveis no site ²⁵⁵CHEMÉO (High Quality Chemical Properties), que também utilizou este mesmo método, porém as estimativas dos fatores acêntricos foram diferentes ao do mesmo site

Na Tabela 26 são apresentadas algumas estimativas relacionadas a propriedades termodinâmicas de transição de fase como a temperatura de ebulição (T_b), entalpia de vaporização (ΔH_{VAP}), temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH_{FUS}), bem como as temperaturas de fusão experimentais (*) reportadas por PB.

Tabela 26 – Estimativas de propriedades de transição de fases dos canabinóides.

	T_b (K)			ΔH_{VAP} (KJ.mol ⁻¹)			T_m (K)			ΔH_{FUS} (KJ.mol ⁻¹)		
	CBD	Δ^9 -THC	CBN	CBD	Δ^9 -THC	CBN	CBD	Δ^9 -THC	CBN	CBD	Δ^9 -THC	CBN
JR	888	846	863	91,8	83,1	85,7	590	578	613	46,5	44,8	44,4
CG1 ^a	664	636	659	165,3	138,8	167,9	348	334	376	-		
CG2 ^a	661	634	660	184,9	151,2	185,3	399	377	423			
MG1 ^a	670	647	636	164,0	144,7	145,0	409	370	377	41,1	32,0	23,7
MG2 ^a	657	635	612	169,8	151,1	156,3	372	313	326	37,0	25,3	19,6
MG3 ^a	657	635	604	-			372	314	346	37,0	25,3	19,2
PB	-			-			340	<298	350	-		

Como apresentado na Equação 20 o conhecimento da entalpia de sublimação (ΔH_{SUB}) dos canabinóides, especificamente do CBD, é uma propriedade importante para a modelagem do equilíbrio sólido-fluido. Os valores das entalpias de sublimação dos canabinóides foram reportados por “PB” (⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.*, 2010), sendo para o CBD igual a 49,1 KJ.mol⁻¹.

Por fim foram feitas as estimativas dos volumes molares (Equação 29) e densidades dos canabinóides estudados, sendo na Tabela 27 mostrada apenas para 25 °C. As estimativas dos volumes molares do CBD nas temperaturas experimentais da análise de equilíbrio de fases, ou seja, 318,56, 323,81, 328,48, 333,18 e 339,15 K, foram 287,69, 288,56, 289,35, 290,17 e 291,24 cm³.mol⁻¹, respectivamente.

Tabela 27 – Estimativa do volume molar e densidade dos canabinóides a 25 °C.

Grupo	Parâmetros			298,15 K	Quantidade		
	A (cm ³ /mol)	10 ³ B (cm ³ /mol.K)	10 ⁵ C (cm ³ /(mol.K ²))	Δv_i	CBD	Δ^9 -THC	CBN
-CH ₃	18,96	45,58	0	32,55	3	3	2
>CH ₂	12,52	12,94	0	16,38	5	5	3
=CH ₂	20,63	31,43	0	30,00	1	0	0
>CH-	6,297	-21,92	0	-0,24	1	1	0
=CH-	6,761	23,97	0	13,91	1	1	0
=C<	-0,3971	-14,1	0	-4,60	2	1	0
C	1,296	-59,66	0	-16,49	0	1	1
CO	30,12	-247,3	40,69	-7,44	0	1	1
AcCH ₃	23,58	24,42	0	30,86	0	0	1
AcCH ₂	18,16	-8,589	0	15,60	1	1	1
AcCH	8,925	-31,86	0	-0,57	1	1	0
AcH	10,09	17,37	0	15,27	2	2	5
AcC	7,369	-83,6	0	-17,56	0	0	3
AcOH	41,2	-164,2	22,78	12,49	2	1	1
				V _s (cm ³ /mol)	284,6	222,7	172,9
				ρ (g/cm ³)	1,11	1,41	1,80

4.1.4.2 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS

Foi observado nas análises termogravimétricas (Figura 20a) utilizando atmosfera de nitrogênio que quando se aumenta a taxa de aquecimento à amostra degrada mais lentamente. Esse comportamento também foi descrito por ²⁵⁶LUCAS *et al.* (2001) em análises de polímeros. Além disso, observou-se que as faixas das temperaturas de degradação foram similares as reportadas por ²⁵⁷THUMMA *et al.* (2008), que analisaram um derivado do isômero Δ^9 -THC. Alterando a atmosfera para ar sintético a amostra também demorou mais para degradar, porém esse comportamento foi oposto ao apresentado por ²⁵⁶LUCAS *et al.* (2001).

Nas análises de calorimetria diferencial de varredura (Figura 20b), de forma geral, observaram-se dois picos distintos em cada condição de análise. O primeiro está representando a fusão do CBD, sendo a temperatura de fusão (T_m) e a entalpia de fusão (ΔH_{FUS}) mostrada de forma comparativa. Observou-se que estes valores não foram muitos distantes aos estimados seguindo o método de ¹⁴⁰MARRERO & GANI (2001) (Tabela 26). Além disso, nota-se que a temperatura de fusão foi próxima a 340 K, valor experimentalmente reportado por ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.* (2010). Por ser caracterizado por variação de massa o segundo pico em cada análise não representa uma transição física (transição de fase) e sim uma transição química (²⁵⁸GIOLITO, 2004), que devem estar relacionadas com a instabilidade térmica do CBD já mencionada.

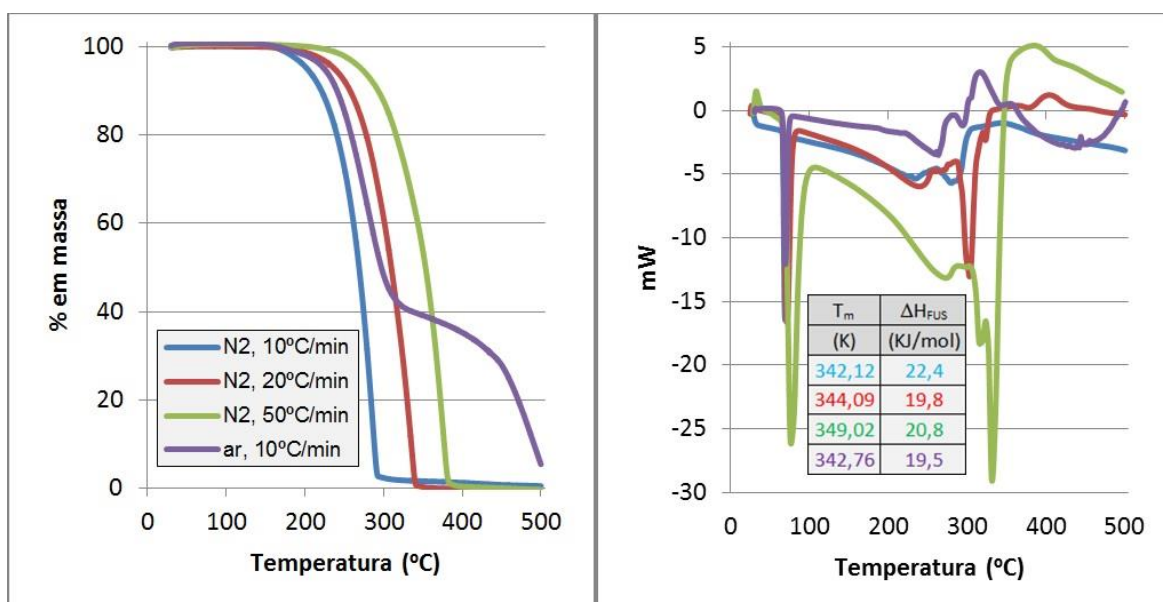


Figura 20 – Análises termogravimétricas do CBD: a) TG; b) DSC.

4.1.4.3 EQUILÍBRIO DE FASES (MODELAGEM)

Na Tabela 28 estão dispostas as pressões de transição de fase sólido-fluido obtidas em suas respectivas temperatura e composição do sistema binário CBD e CO₂-SC.

Tabela 28 – Pressões (bar) de transição sólido-fluido (CBD + CO₂SC).

T (°C)	T (K)	Fração molar de CBD			
		2,21.10 ⁻⁴	2,37.10 ⁻⁴	2,69.10 ⁻⁴	3,00.10 ⁻⁴
45,4 ± 0,7	318,56 ± 0,68	83,7 ± 1,4	89,3 ± 0,7	88,7 ± 0,3	94,7 ± 1,3
50,7 ± 0,5	323,81 ± 0,51	90,5 ± 0,9	97,5 ± 0,7	98,5 ± 0,4	103,9 ± 1,4
55,3 ± 0,6	328,48 ± 0,65	93,4 ± 0,8	102,3 ± 1,1	106,3 ± 0,1	112,2 ± 0,2
60,0 ± 0,5	333,18 ± 0,48	99,0 ± 1,2	103,8 ± 1,3	112,7 ± 0,7	117,8 ± 0,2
66,0 ± 0,5	339,15 ± 0,48	-	109,5 ± 0,5	122,1 ± 0,7	121,4 ± 2,0

Esses valores não são comparáveis aos descritos por ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL (2010), já que aplicou-se diferente metodologia para análise. No estudo citado foram obtidas condições de temperatura e pressão para que a composição molar do sistema binário ficasse homogênea. De fato, essas condições foram próximas às observadas para homogeneizar o sistema e iniciar o procedimento de decaimento da pressão do sistema até se observar a transição de fase.

Na Figura 21 são mostrados os dados experimentais de equilíbrio obtidos neste estudo, bem como os ajustes da equação cúbica de estado de ²⁰⁷PENG-ROBSON (1976) com as respectivas porcentagem de desvio relativo médio (*DRM*, %) e os coeficientes de interação binária (*k_{ij}* e *l_{ij}*). Durante a modelagem matemática foram utilizadas as estimativas de pressão crítica, temperatura crítica e fator acêntrico obtidas pelo método MG 3^oO (Tabela 29). O valor da constante C, descrita na Equação 30, foi de 12,31.

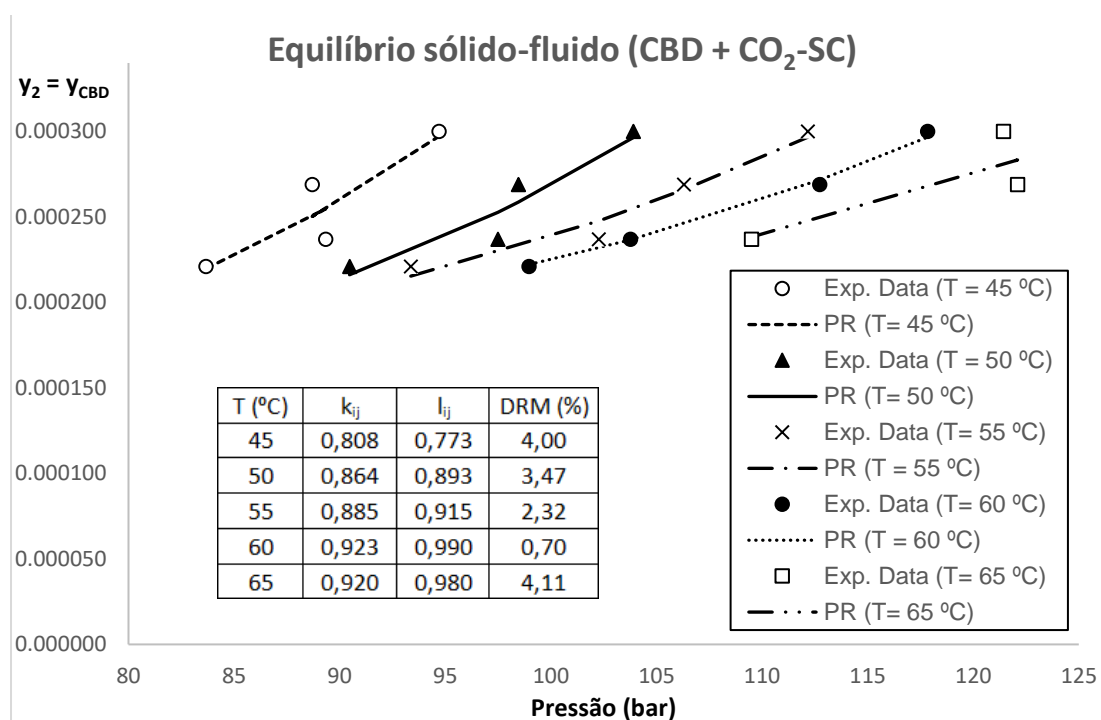


Figura 21 – Equilíbrio sólido-fluido (CBD + CO₂-SC).

Foi considerado que as temperaturas utilizadas não interferiram significativamente a pureza do CBD, já que em análise de comportamento térmico ⁶⁸TASCHWER & SCHMID (2015) demonstrou que a 50 °C um canabinóide semelhante, o Δ^9 -THCA, sofre apenas uma pequena variação do teor de pureza em 25 horas de aquecimento. Apesar disso, observa-se que a 65 °C os parâmetros de interação binária diminuíram, o que pode estar relacionado a algum tipo de degradação significativa.

4.2 SEMENTES DE CÂNHAMO

4.2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os dados de composição centesimal foram calculados utilizando fatores de proteínas distintos, 6,25 e 5,30 (Equação 34), e estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Composição centesimal das sementes de cânhamo.

Fator Proteico	6,25	5,30
	%	
Lipídeos	51,96 ± 0,38	
Fibra bruta	2,67 ± 0,81	
Umidade	5,39 ± 0,02	
Cinzas	4,91 ± 0,20	
Proteínas	29,36 ± 1,22	24,90 ± 1,04
Carboidratos*	5,70 ± 2,63	10,17 ± 2,45
NOTA: * calculado por diferença		

As porcentagens obtidas utilizando fator proteico de 6,25 foram bem próximas aos da embalagem do produto que cita 49,1 % de lipídeos, 31,1 % de proteínas, 4,1 % de carboidratos. A embalagem do produto informa ainda 8,3 % de fibras dietéticas, sendo então o valor encontrado de fibra bruta plausível visto que esta é apenas uma parte das fibras dietéticas (²³⁹DHINGRA *et al.*, 2012). Com isso, sendo o teor de carboidratos calculado por diferença e sabendo que um teor de fibra dietética não foi contabilizado tem-se um possível valor de carboidratos um pouco menor, tornando-o mais próximo do citado. Esses resultados também estão próximos aos descritos por ²⁹CALLAWAY & PATE (2009), ou seja, 44 % de lipídeos, 33 % de proteína, 12 % de carboidratos, 5 % de umidade e 6 % de cinzas. Vale a pena lembrar que a variedade das sementes é outro fator que pode influenciar pequenas variações nestes teores.

4.2.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS

4.2.2.1 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

A densidade obtida das sementes foi de $1,88 \pm 0,50 \text{ g.mL}^{-1}$. Na Tabela 30 são apresentados os dados referentes às modelagens matemáticas para as extrações com CO₂-SC e propano pressurizado, e na Figura 22 são demonstradas as respectivas cinéticas de extração. Para o CO₂-SC teve-se $r = 7,08\text{E-}1$ e $q_0 = 7,58\text{E-}1$, e para o propano $r = 5,13\text{E-}1$ e $q_0 = 6,08\text{E-}1$. Devido ao alto teor de lipídeos das sementes não foi possível fazer a classificação do tamanho de partículas.

Tabela 30 – Modelagens das extrações (sementes de cânhamo).

Extrato	CO ₂ -SC				Propano pressurizado				
	1	2	3	4	1	2	3	4	5
T (°C)	40		60		40		60		50
P (MPa)	30	40	30	40	6	10	6	10	8
ρ_F (g/mL)	0,911	0,956	0,830	0,890	0,484	0,496	0,451	0,467	0,470
\dot{m}_F (g/min)	2,393	2,315	2,310	2,234	1,480	1,053	1,019	1,098	1,232
ρ_{LEITO} (g/mL)	0,394	0,381	0,380	0,368	0,647	0,678	0,790	0,709	0,573
ϵ_{LEITO}	0,791	0,798	0,798	0,805	0,657	0,640	0,581	0,624	0,696
Z	4,1E-1	1,2E+0	7,9E-1	4,8E-1	2,4E+0	1,3E+1	1,8E+0	1,9E+0	1,1E+0
W	8,6E-3	1,2E-2	7,7E-3	1,5E-2	4,8E-1	1,0E-1	6,2E-1	9,4E-1	8,2E-1
Y _s (g/g)	1,5E-2	2,0E-2	1,3E-2	1,9E-2	3,0E-1	7,1E-1	6,3E-1	5,7E-1	5,1E-1
t _{CER} (min)	8,9E+1	2,3E+1	5,0E+1	5,7E+1	2,8E+0	3,2E-1	2,6E+0	2,6E+0	4,7E+0
t _{FER} (min)	1,3E+2	5,1E+1	9,2E+1	8,6E+1	1,1E+1	5,3E+1	9,9E+0	8,9E+0	1,1E+1
K _F (min ⁻¹)	3,1E-2	9,4E-2	6,2E-2	3,9E-2	4,8E-1	1,8E+0	2,9E-1	3,0E-1	1,5E-1
K _s (min ⁻¹)	3,7E-4	5,4E-4	3,4E-4	6,9E-4	2,5E-2	3,7E-2	2,6E-2	3,7E-2	2,9E-2
DRM (%)	7,32	1,11	2,74	1,79	5,13	0,90	1,12	3,1	2,11

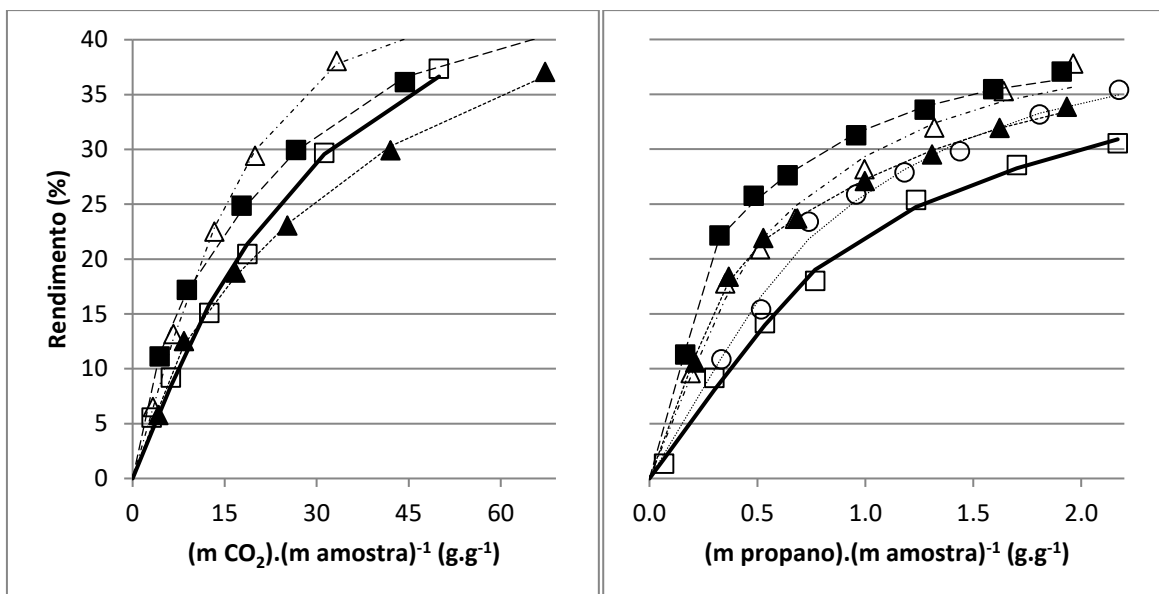


Figura 22 – Cinéticas das extrações de sementes de cânhamo com CO₂-SC e propano pressurizado: □ 1, — mod 1, ■ 2, - - - mod 2, ▲ 3, - - - - mod 3, △ 4, - · - mod 4, ○ 5, ······· mod 5.

A análise estatística dos rendimentos de extratos obtidos com propano pressurizado foi feita considerando uma razão de massa de solvente por massa de amostra (g.g⁻¹) de aproximadamente 1,87. Nesta análise nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa, sendo a superfície de resposta igual a:

$$rend(\%) = 34,162 + 1,7325.T + 3,3475.P - 1,3325.T.P, \text{ com } R^2 = 0,997.$$

Para obtenção de rendimentos equiparáveis ao CO₂-SC o propano pressurizado apresentou as mesmas vantagens descritas para outras matérias primas. Algumas dessas vantagens as menores pressões de extração, o que gera menores custos, bem como as maiores solubilidades do soluto no solvente (Y_s), o que gera a necessidade de menores quantidades de solvente.

O teor de proteína do farelo residual obtido com o propano no ponto central do planejamento estatístico foi analisado, sendo obtidos $56,60 \pm 1,98$ e $48,00 \pm 1,68$ % utilizando os fatores 6,25 e 5,30, respectivamente. Esse alto valor proteico do farelo demonstra a grande aplicabilidade industrial que as sementes de cânhamo apresentam (²⁹CALLAWAY & PATE, 2009).

4.2.2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS

A análise comparativa da composição de ácidos graxos, tocoferóis totais, β-caroteno, índice de acidez e umidade do óleo utilizando a mistura de solventes convencionais (hexano:isopropanol 3:2), CO₂-SC e propano pressurizado é mostrada na Tabela 31.

Tabela 31 – Propriedades físico-químicas dos extratos (sementes de cânhamo).

Propried. Fis.-Quí.	Conv.	CO ₂ -SC				Propano pressurizado				
		40°C 30MPa	40°C 40MPa	60°C 30MPa	60°C 40MPa	40°C 6MPa	40°C 10MPa	60°C 6MPa	60°C 10MPa	50°C 8MPa
16:0 (%)	6,15	6,25	6,14	6,20	6,28	6,09	6,07	6,08	5,76	5,85
16:1 ω 7 (%)	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10
18:0 (%)	2,60	2,52	2,61	2,53	2,58	2,83	2,83	2,85	2,82	2,82
18:1 ω 9 (%)	12,75	12,54	12,64	12,50	12,59	13,16	13,03	12,99	12,96	13,08
18:2 ω 6 (%)	57,84	57,98	57,97	57,99	57,64	57,11	57,08	56,99	57,26	57,17
18:3 ω 3 (%)	18,31	18,54	18,43	18,42	18,33	18,53	18,66	18,55	18,63	18,65
20:1 ω 9 (%)	0,31	0,29	0,31	0,31	0,31	0,35	0,35	0,33	0,37	0,38
22:1 ω 9 (%)	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,21	0,23	0,22	0,24	0,24
Total (%)	98,07	98,24	98,21	98,05	97,85	98,37	98,36	98,12	98,16	98,30
ω 6/ ω 3	3,16	3,13	3,15	3,15	3,14	3,08	3,06	3,07	3,07	3,06
Tocoferóis total (ppm)	746,44 ± 0,78	237,78 ± 6,76	192,28 ± 5,74	877,25 ± 14,71	545,29 ± 20,99	935,47 ± 12,24	935,65 ± 2,53	950,57 ± 14,94	973,68 ± 8,85	952,71 ± 12,74
β -caroteno (ppm)	12,65 ± 0,23	6,96 ± 0,62	6,89 ± 0,17	6,22 ± 0,21	9,42 ± 0,18	16,84 ± 0,09	7,83 ± 0,22	7,36 ± 0,81	6,40 ± 0,03	6,42 ± 0,75
$\frac{\text{mg KOH}}{\text{mg óleo}}$	7,31 ± 0,44	7,42 ± 0,11	7,13 ± 0,14	5,21 ± 0,08	11,21 ± 0,28	4,82 ± 0,18	5,07 ± 0,02	5,05 ± 0,07	5,03 ± 0,24	4,69 ± 0,20
Umidade (%)	0,077	0,150	0,101	0,092	0,104	0,069 ± 0,005	0,046 ± 0,002	0,028 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,041 ± 0,002

A análise de ácidos graxos feita em duplicata utilizando solventes convencionais resultou desvios menores que 0,01 %. Os teores dos ácidos graxos não variaram significativamente com a mudança de solvente, bem como das condições de extração. Em média, os teores de ácidos graxos saturados, mono-insaturados e poli-insaturados foram $8,8 \pm 0,1$, $13,4 \pm 0,4$ e $76,0 \pm 0,3$ %, respectivamente, sendo ainda uma razão de ω 6/ ω 3 de $3,1 \pm 0,0$ muito próxima a de 3:1 descrita por ³⁰SIMOPOULOS *et al.* (2000) como boa para um bom metabolismo. As condições utilizadas para a análise dos ácidos graxos neste trabalho apresentou a melhora na resolução requerida por ²⁸GRIJÓ & MELO (2016).

Os índices de acidez experimentais foram calculados utilizando o fator de $0,927 \pm 0,01$. Estes índices foram maiores que o descrito por ²⁵⁹BORHADE (2013), de 2,15 mg KOH / g de óleo. Isto pode estar associado ao fato de que esta referência utilizou sementes de cânhamo com cascas e como descrito por ²⁹CALLAWAY & PATE (2009) tem-se que a maior parte do óleo está concentrada na polpa da semente, ou seja, quando se utiliza sementes com casca o óleo obtido terá maior concentração de substâncias que não são ácidos graxos livres. Os extratos obtidos com propano pressurizado apresentaram menores índices de acidez, bem como menores teores de umidade do óleo e maiores teores de tocoferóis totais. Além disso, observou-se que a

mistura de solventes convencional se mostrou mais eficiente que os solventes pressurizados na obtenção de β -caroteno.

4.2.2.2.1 CO₂-SC

Analisando o efeito da temperatura, observou-se que nos extratos obtidos a 30 e 40 MPa foram obtidos maiores teores de tocoferóis total na temperatura mais elevada. Analisando o efeito da pressão, observou-se que nos extratos obtidos a 40 e 60 °C foram obtidos maiores teores de tocoferóis total na pressão mais baixa.

Analisando o efeito da temperatura, observou-se nos extratos obtidos a 30 MPa que esta não influenciou significativamente o nível de β -caroteno, porém nas extrações a 40 MPa obteve-se uma maior quantidade de β -caroteno na temperatura mais elevada. Analisando o efeito da pressão, observou-se nos extratos obtidos a 40 °C que esta não influenciou significativamente o teor de β -caroteno, porém nas extrações a 60 °C obteve-se uma maior quantidade de β -caroteno na pressão mais elevada.

Analisando o efeito da temperatura, observou-se nos extratos obtidos a 30 MPa que obteve-se um maior índice de acidez na temperatura mais baixa, porém nas extrações a 40 MPa obteve-se um maior índice de acidez na temperatura mais elevada, indo de acordo com o citado por ²⁶⁰NAWAR (1969) ao dizer que os ácidos graxos livres podem ser formados com o aquecimento. Analisando o efeito da pressão, observou-se nos extratos obtidos a 40 °C que esta não influenciou significativamente o índice de acidez, porém nas extrações a 60 °C obteve-se um maior índice de acidez na pressão mais elevada.

Analisando o efeito da temperatura, observou-se nos extratos obtidos a 30 MPa que obteve-se uma menor umidade do óleo na temperatura mais alta, porém nas extrações a 40 MPa notou-se que esta não influenciou significativamente a umidade do óleo. Analisando o efeito da pressão, observou-se nos extratos obtidos a 40 °C que se obteve uma menor umidade do óleo na pressão mais alta, porém nas extrações a 60 °C notou-se que esta não influenciou significativamente na umidade do óleo.

4.2.2.2.2 PROPANO PRESSURIZADO

Nas análises com propano foi observado que um maior teor de β -caroteno foi obtido utilizando condições mais brandas de extração, os teores de tocoferóis e acidez pouco variaram e a umidade dos extratos foi menor quando obtida com a temperatura mais alta. Nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa nas análises de tocoferóis, β -caroteno e acidez, porém na análise da umidade observou-se que a temperatura foi uma variável estatisticamente significativa visto que o módulo do valor de $t_{\text{CALC}} = 16,21$ foi

maior que o de t_{TAB} (1g.l;95%) = 12,71 fornecendo um $p = 0,039$. Apenas na análise de acidez foi observado um coeficiente de regressão baixo, isto pode estar relacionado à possíveis exposições a aquecimento e, involuntariamente a luz, por exemplo, de cada extrato, fatores estes que interferem na acidez dos mesmos (²⁶¹FREIRE *et al.*, 2013) e podem ter dificultado uma análise estatística coerente. As superfícies de respostas obtidas e seus respectivos coeficientes de correlação foram:

Tocoferóis totais (ppm) = $949,616 + 13,2825T + 5,8225P + 5,7325.T.P$, com $R^2 = 0,988$;

β-caroteno (ppm) = $8,97 - 2,7275.T - 2,4925.P + 2,0125.T.P$, com $R^2 = 0,897$;

Acidez (mg KOH/mg óleo) = $4,932 + 0,0475T + 0,0575.P - 0,0675.T.P$, $R^2 = 0,356$;

Umidade do óleo (%) = $0,0426 - 0,0145.T - 0,0055.P + 0,006.T.P$, com $R^2 0,997$.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

A obtenção de extratos com alta concentração de canabinóides utilizando dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) vem sendo o método empregado pelas grandes indústrias do setor, porém mesmo com a importância desses extratos em todo o mundo foram encontradas poucas publicações científicas relacionadas a esta metodologia (⁴¹EORY *et al.*, 2001; ⁴²PERROTIN-BRUNEL, 2011; ⁴³OMAR *et al.*, 2013; ⁴⁴ROVETTO & AIETA, 2017).

De maneira geral os extratos pressurizados apresentam menores rendimentos quando comparados aos extratos obtidos de maneira convencional, porém a concentração de canabinóides nestes é significativamente maior, visto tratar-se de uma metodologia mais seletiva. Neste estudo, os extratos de flores obtidos com CO₂-SC apresentaram maiores rendimentos quando utilizado um co-solvente, porém menores concentrações de canabinóides. Por outro lado, nos extratos com pré-aquecimento foi possível obter diferentes composições de interesse medicinal, como, por exemplo, concentração de CBD maior que de Δ^9 -THC, concentração desses dois canabinóides balanceada, bem como concentração de até 90 % de Δ^9 -THC. Destaca-se novamente o resultado inédito de obtenção de extrato com alta concentração de CBD, sendo até 43 %.

As técnicas cromatográficas usadas para análise da composição de canabinóides e óleos essenciais se demonstraram eficientes e adequadas. Além disso, comprovou-se que o comportamento térmico dos canabinóides está relacionado com o tipo de variedade da amostra, visto que os teores iniciais destes são específicos. Os tipos e teores dos óleos essenciais também variam entre diferentes variedades de flores. Uma eficiente secagem das flores pós-colheita é uma etapa fundamental para o processo, visto o alto teor de umidade nestas. Foi possível realizar a extração fracionada a alta pressão de óleos essenciais e canabinóides. A utilização do método de “winterização” não apresentou resultados expressivos para aumentar o teor de canabinóides nos extratos.

Os melhores índices relacionando a atividade anti-tumoral e a citotoxicidade dos extratos foram obtidos com células tumorais de útero, sendo resultados promissores da eficiência dos canabinóides para essa aplicabilidade também descrita em literatura (²⁵²VELASCO *et al.*, 2016; ²⁵³LUKHELE & MOTADI, 2016). Com isso, conclui-se que estudos mais detalhados aplicando extratos obtidos com fluidos pressurizados devem ser realizados com esse propósito, sendo inclusive feitas análises *in vivo* e com diferentes modelos, indispensável para a possível aplicação e tratamento seguro dessa enfermidade. Paralelamente a elucidação do mecanismo de ação das substâncias presentes torna-se também importante.

A análise do equilíbrio sólido fluido do CBD e CO₂-SC utilizando o método de volume variável apresentou, em triplicata, baixos desvios de pressão e temperatura. Comparando com dados solubilidade de CBD em CO₂-CS utilizando frações molares e temperaturas similares, descritos por ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL *et al.* (2010), obteve-se resultados diferentes, visto que no presente trabalho foi aplicado um método distinto a fim de se obter dados de transição de fase. As estimativas de propriedades dos canabinóides, bem como as análises térmicas empíricas apresentaram resultados coerentes com a literatura e foram fundamentais para obter ajustes coerentes utilizando a equação de estado cúbica de Peng-Robinson com interação binária de dois fatores dependentes da temperatura descritos pela Regra de Mistura de Van der Waals. A partir das análises termogravimétricas com CBD também foi observado que até 150 °C não ocorre perda de massa.

As sementes analisadas apresentaram alto teor de lipídeos e proteínas, sendo aproximadamente 52 e 30 %, respectivamente, demonstrando-se como um insumo atraente para a agricultura do país já que pode ajudar na rotação de cultura. As técnicas utilizadas para análise de composição das sementes foram eficientes e adequadas. Para esse insumo o propano pressurizado se demonstrou uma alternativa inovadora e vantajosa para a obtenção de óleo quando comparado ao CO₂-SC, visto que foi utilizado uma menor quantidade de solvente, obteve-se maiores teores de tocoferóis totais e β -caroteno, menores índices de umidade e acidez, bem como os mesmos elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados e inclusive a excelente razão de ômega 6 e ômega 3 descrita como boa para o bom funcionamento do metabolismo.

Em todas as extrações realizadas, com flores e com sementes, o modelo matemático de ²⁰²SOVOVÁ (1994) foi capaz de reproduzir as curvas cinéticas, sendo assim uma ferramenta fundamental para o “scale up” de forma otimizada. Logo se conclui que a obtenção de extratos de *Cannabis* utilizando fluidos pressurizados apresentou potencial para ser futuramente utilizada na produção em escala nacional para diversas aplicações, inclusive na medicina. No entanto, estudos relacionados com as viabilidades econômicas dos processos de extração devem ser realizados.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS CIENTÍFICAS

- ¹LANNAEUS, C.; *Specues Plantarum. Holmiae* (Stockholm), 1753. Página 1027.
- ²LAMARCK, J. B.; *Encyclopédique méth, Botanique I* (part 2). Páginas 694 e 695. (1785).
- ³JANISCHEVSKY, D. E.; *Černyševskogo Universiteta* 2(2): 3–17. (1924).
- ⁴FASSIO, A., RIDRÍGUEZ, M. J., CARETTA, S.; *Cáñamo (Cannabis sativa L.)*. Noviembre, (2013) – INIA – Instituto Nacional de Investigación Agropecuária – Uruguay.
- ⁵ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 156, de 5 de Maio, (2017).
- ⁶HIU-LIN, L.; *Economic Botany*, (1973), Vol.28(4), pp.437-448.
- ⁷WILLOUGHBY W. W.; *Opium as an international problem. The Geneva Conferences*. Baltimore. The Johns Hopkins Press., 1925. Chapter XIX: Indian hemp (hashish).
- ⁸ADAMS R. *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, 62 (1), pp 196-200.
- ⁹JACOB, A.; TODD, A. R.; *J. of the Chem. Society*, 1940, 649-653.
- ¹⁰SCND; *Single Convention on Narcotic Drugs*, 1961. United Nations.
- ¹¹MECHOULAM, R.; GAONI, Y.; *Tetrahedron Letters* nº.12, pp. 1109-1111, 1967.
- ¹²MECHOULAM, R.; SHVO, Y.; *Tetrahedron*. 1963. Vol. 19. pp. 2073 to 2078.
- ¹³GAONI, Y.; MECHOULAM, R.; *J. American Chem. Soc.*, 1971, 93 (1), pp 217–224.
- ¹⁴CARLINI, E. *et al. Cannabis and Its Derivatives*, 154-175, (1972).
- ¹⁵CUNHA, M.; *J. et al. Pharmacology*; 21: 175-185, (1980).
- ¹⁶ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 87, de 28 de Junho, (2016).
- ¹⁷TURNER, J. C. *et al.*; *Boletín Estupefacientes Naciones Unidas*, (1981) v. XXXIII, nº2.
- ¹⁸LACHENMEIER, D.; WALCH, S.; *J. of Envir.l, Agri. Food Chem.*, (2005) 4, 1, 812-826.
- ¹⁹UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. *Recommended methods for the identification and analysis of Cannabis and Cannabis products*, (2009).
- ²⁰GROTENHERMEN, F. *et al.*; *J. of the Intern. Hemp Assoc*, (1998) 5(2): 101-105.
- ²¹ROSS, S. A. *et al.*; *J. Anal. Toxicol.*, (2000) 24, 715-717.
- ²²BRENNEISEN, R.; *Forensic Science/Medicine: Marijuana and Cannabinoids*, 2007, ch2.
- ²³MECHTLER, K. *et al.*; *Industrial Crops and Products* 19 (2004) 19–24.
- ²⁴CRAWFORD, F. *et al.*; *Human consumption of hemp seed: prospects for Australian production*. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, 2012.
- ²⁵FAOSTATIC; *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Hemp statistics*. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Dados de 2014. Acessado em: 23 Ago, 2016.
- ²⁶ALBERTA; *Government. Industrial Hemp Enterprise*. Agdex 153/830-1. Nov, 2015.
- ²⁷CALLAWAY, J. C.; *Euphytica* 140: 65–72, 2004.
- ²⁸GRIJÓ, D. R.; MELO, B. N.; *Análise Potencial de Ácidos Graxos Poli-insaturados em Sementes de Cânhamo*. *Revista BiomassaBR*, ed. 25, p. 30, (2016). ISSN: 2525-7129.
- ²⁹CALLAWAY, J. C.; PATE, D. W.; *Hempseed oil*. Chapter 5, pp. 185-213 In: *Gourmet and Health- Promoting Specialty Oils*, American Oil Chemists Society Press, (2009).
- ³⁰SIMOPOULOS, A. P. *et al.*; *Prostag., Leukot. Ess. FattyAcids* (2000) 63(3),119-121.
- ³¹MÖLLEKEN, H.; *J. of the International Hemp Association* 5(1): 21-23 (1998).

- ³²KOŁODZIEJCZYK, P. *et al.*; Handbook of Natural Fibres, (2012). pp.329-366.
- ³³MIERLITA, D.; South African J. of Animal Science 2016, 46 (No. 3).
- ³⁴LESON, G.; PLESS, P.; Hemp oil in body care products. Leson Environmental Consulting, November 1998.
- ³⁵PLESS, P.; LESON, G.; Assessing the impact of THC uptake from hemp oil cosmetic on workplace drug testing. Leson Env. Cons., 2001.
- ³⁶KOWALSKA, M. *et al.*; International J. of Cosmetic Science, 2015, 37, 408–416.
- ³⁷LIGĘZA, M. *et al.*; Family Medicine & Primary Care Review 2016; 18, 4: 443–447.
- ³⁸LI, S. Y. *et al.*; Oil into Biodiesel, Bioresour Technol. (2010) Nov; 101(21):8457-60.
- ³⁹SU, M. *et al.*; Fuel 103 (2013) 398–407.
- ⁴⁰SURENDER, R. *et al.*; J. of Thermal Analysis and Calorimetry, (2016), 123: 525.
- ⁴¹EORY, L. *et al.*; Problems of Forensic Sciences, vol. XLVII, (2001) 328–332.
- ⁴²PERROTIN-BRUNEL, H. *et al.*; Sustainable Production of Cannabinoids with Supercritical Carbon Dioxide Technologies. Delft University of Technology, 2011.
- ⁴³OMAR, J. *et al.*; J. Sep. Sci. (2013), 36, 1397–1404.
- ⁴⁴ROVETTO, L. J.; AIETA, N. V.; J. Supercritical Fluids v.129, Nov 2017, Pages 16-27.
- ⁴⁵KRIESE, U. *et al.*; Euphytica 137: 339–351, 2004.
- ⁴⁶DA PORTO, C. *et al.*; J. of Supercritical Fluids 68 (2012), 45– 51.
- ⁴⁷DA PORTO, C. *et al.*; Industrial Crops and Products 36 (2012), 401–404.
- ⁴⁸TOMITA, K. *et al.*; J. of Supercritical Fluids 79 (2013), 109–113.
- ⁴⁹ALADIĆ, K. *et al.*; Chem. Biochem. Eng. Q., 28 (4) 481–490 (2014).
- ⁵⁰ALADIĆ, K. *et al.*; Industrial Crops and Products 76 (2015) 472–478.
- ⁵¹DA PORTO, C. *et al.*; J Food Sci Technol (March 2015) 52(3):1748–1753.
- ⁵²ALADIĆ, K. *et al.*; Internatioal J. of Food Science and Technology 2016, 51, 885–893.
- ⁵³HEMPMEDS; HempMeds Px. Real Scientific Hemp Oil (RSHO) CBD 14~25% 3~10g (pasta). Hempmeds 12255 CrosthwaiteCircle - Poway, CA 92064. US, 2015.
- ⁵⁴BLUEBIRD; BlueBird Botanicals. Hemp CBD Oil - 2000 mg Canabidiol - 240 mL. 580 Burbank St. Broomfiel, CO 80020 (EstadosUnidos da América), 2015.
- ⁵⁵ENDOCA; Copenhagen. Denmark. 2015.
- ⁵⁶BREDOCAN; Veendam. Nertherland. 2015.
- ⁵⁷FUKNÉ-KOKOT, K. *et al.*; Fluid Phase Equilibria, v. 173, pp. 297-310, 2000.
- ⁵⁸PERROTIN-BRUNEL, H. *et al.*; J. of Supercritical Fluids 55 (2010) 603–608.
- ⁵⁹PERROTIN-BRUNEL, H. *et al.*; J. of Supercritical Fluids 52 (2010) 6–10.
- ⁶⁰PERTWEE, R. G.; Handbook of *Cannabis*. University of Aberdeen, UK. Oxford. 2014.
- ⁶¹THOMAS, B. F.; ELSOHLY, M. A.; The Analytical Chemistry of *Cannabis*. Elsevier, 2015.
- ⁶²FETTERMAN, P.S. *et al.*; J. of Pharmaceutical Sciences 60:1246-1249 (1971).
- ⁶³SMALL, E.; BECKSTEAD, H. D.; Lloydia, (1973) 36: 144-165.
- ⁶⁴BOUQUET, J.; *Cannabis*. UN Bulletin on Narcotics, (1950) 2: 1430.

- ⁶⁵BAZZAZ, F. A. *et al.*; Biochemical Systematics and Ecology, (1975), Vol.3, pp. 15–18. Pergamon Press, Printed in England.
- ⁶⁶STAMBOULI, H. *et al.*; Bulletin on Narcotics, vol. LVII, Nos, 1 and 2, (2005).
- ⁶⁷GAGNE, S. J. *et al.*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS. July 31, (2012), vol. 109, no. 31, 12811–12816.
- ⁶⁸TASCHWER, M.; SCHMID, M. G.; Forensic Science International 254 167–171, (2015).
- ⁶⁹ROCK, E. M. *et al.*; British J. of Pharmacology (2013) 170 641–648.
- ⁷⁰PERROTIN-BRUNEL, H. *et al.*; J. of Molecular Structure 987 (2011) 67–73.
- ⁷¹MASOUD, A. N.; DOORENBOS, N. J.; J. Pharmac. Sciences, (1973) 62: 313315.
- ⁷²TURNER, C.E. *et al.* Journal of the Pharmaceutical Sciences (1973) 62: 1601-1605.
- ⁷³KIMURA, M.; OKAMOTO, K.; Experientia, (1970) 26: 81920.
- ⁷⁴DE ZEEUW, R.A. *et al.*; J. Pharm. Pharmacology, (1972) 24:16.
- ⁷⁵GRLIĆ, L.; ANDREC, A.; Experientia, (1961) 17: 325326.
- ⁷⁶SMITH, R. N.; J. Chromatogr. A, (1975), v 105. p.101-106.
- ⁷⁷KANTER, S. L. *et al.*; J Chromatogr. 1979 Apr 1;171:504-8.
- ⁷⁸TURNER, J. C.; J. Chromatogr. A, (1984), v.283, p.165-171
- ⁷⁹VERESS, T. *et al.*; J. Chromatogr. 520: 339-347, (1990).
- ⁸⁰GARRET, E. R.; Stability of Tetrahydrocannabinols I. University of Florida, 1974.
- ⁸¹SHANI, A.; MECHOULAM, R.; Tetraedron, v30, issue 15, pages 2437-2446, (1974).
- ⁸²GRIJÓ, D. R.; CARDOZO-FILHO, L. F.; Blucher, (2016). v. 4. nº 1. p. 23-27. Abril.
- ⁸³RYNABIWSKI, M.; Problemy Kryminalistyki 285(3), (2014).
- ⁸⁴ROMANO, L; HAZEKAMP, A.; Cannabinoids; (2013) 1(1):1-11;
- ⁸⁵HANUS, I.; The present state of knowledge in the chemistry of substances of *Cannabis sativa* L. III. Terpenoid substances. Palackiana Olomucensis, (1975) 73: 233-239.
- ⁸⁶HENDRICKS, H. *et al.*; Phytochemistry, (1975) 14: 81415.
- ⁸⁷HOOD, L. V. S. *et al.*; Nature, (1973) 242: 402403.
- ⁸⁸RUSSO, E. B.; British J. of Pharmacology (2011) 163 1344–1364 1345.
- ⁸⁹DA PORTO, C. *et al.*; Industrial Crops and Products, (2014) 58 ; 99–103.
- ⁹⁰BEDINI, S. *et al.*; Industrial Crops and Products 85 (2016) 318–323.
- ⁹¹KHARE, B. P. *et al.*; Indian J. of Agricultural Research, (1974) 8: 243-248.
- ⁹²DE MEIJER, E. P. M. *et al.*; Euphytica (1992) 62: 187-200.
- ⁹³DECORTE, T.; Fibre hemp and marijuana: assessing the differences between distinct varieties. Police Reforms & Community Safety Working Paper nº 38, September, (2011).
- ⁹⁴CANADÁ; SOR/98-156. Controlled Drugs and Substances Act. Industrial Hemp Regulations. March, 2, (1998). PC 1998-352.
- ⁹⁵URUGUAY; Ley Nº 19.172. Diciembre, (2013).
- ⁹⁶VAN'T HOFF, J. H.; Etudes de Dynamique Chimique, pp 114–118 (1884).
- ⁹⁷CALIFANO, S.; Pathways to Modern Chemical Physics. 2012. Springer-Verlag Berlin.
- ⁹⁸ARRHENIUS, S.; Z Phys Chem 4:226–248 (1889).

- ⁹⁹BOLTZMANN, L.; "Further Studies on the Thermal Equilibrium of Gas Molecules" Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften, pgs. 275-370, Bd. 66.
- ¹⁰⁰FOGLER, H. S.; Elementos de Engenharia das Reações Químicas. 4 ed. 2009, LTC.
- ¹⁰¹NAVEED, M. *et al.*; International J. of Biosciences. Vol. 4, No. 4, p. 65-70, 2014.
- ¹⁰²SARMADYAN, H. *et al.*; Iranian J. of Toxicology Volume 7, No 23, Winter 2014.
- ¹⁰³MONIKA; N. K.; KAUR, M.; J. of Science / Vol 4 / Issue 2 / 2014 / 123-127.
- ¹⁰⁴SRIVASTAVA, N. *et al.*; Biotechnology Research International v 2012.
- ¹⁰⁵TIWARI, S. S. *et al.*; An International J. of Advances in Pharmaceutical Sciences. Volume 5|Issue 1| January-February 2014.
- ¹⁰⁶CROXFORD, J. L. *et al.*; Cell Microbiol. 2005 Nov;7(11):1592-602.
- ¹⁰⁷TARIQ, A. L.; REYAZ, A. L.; Inter. J. of Drug Develop. & Res., Jan-Mar 2012. v4, i1.
- ¹⁰⁸KURZ, R.; BLAAS, K.; Cannabinoids 2010;5(4):4-6.
- ¹⁰⁹LOPES, R. M.; Revista da Biologia (2014) 13(1): 43–59.
- ¹¹⁰ZAJICEK, J. P.; APOSTU, V. I.; Role of Cannabinoids in Multiple Sclerosis. CNS Drugs 2011; 25 (3).
- ¹¹¹RUSSO, E. B.; Ther Clin Risk Manag. 2008 Feb; 4(1): 245–259.
- ¹¹²WATT, G.; KARL, T.; Disease. Front. Pharmacol. 8: 20 (2017).
- ¹¹³MORI, M. A. *et al.*; Progress in Neuro-Psychoph. & Biolog. Psych. 75 (2017) 94–105.
- ¹¹⁴WATANABE, K. *et al.*; Forensic Toxicology, 2007, v25, Issue 1, pp 16–21.
- ¹¹⁵NAHLER, G. *et al.*; Cannabis Cannabinoid Res. 2017; 2(1): 81–86.
- ¹¹⁶FERENCZY, L.; Nature, (1956) 178:639-640;
- ¹¹⁷PATE, D. W.; J. of the International Hemp Association, 1994 2: 29, 3237.
- ¹¹⁸FERENCZY, L. *et al.*; Naturwissenschaften, (1958) 45: 188.
- ¹¹⁹GAL, I. E.; VAJDA, O.; Elelmez. Ipar., (1970) 23: 336339.
- ¹²⁰MULLER, C. H. *et al.*; Science, (1964) 143: 47173.
- ¹²¹MULLER, W. H.; HAUGE, R.; Bulletin of the Torrey Botanical Club, (1967) 94: 182190.
- ¹²²HANEY, A.; BAZZAZ, F. A.; Discussion in The botany and chemistry of *Cannabis*, (1970) eds. Churchill, London.
- ¹²³Boletín de Estupefacientes; ONU Oficina contra la Droga y el Delito. v.LVII, 2006, n 1,2.
- ¹²⁴LEDBETTER, M. C.; KRIKORIAN, A. D.; Phytomorphology, (1975) 25: 166176.
- ¹²⁵LEVIN, D. A.; Quarterly Review of Biology, (1973) 48: 316.
- ¹²⁶HOC; Hemp Oil Canadian, (2013). <http://www.hempoilcan.com/quality/>
- ¹²⁷LESON, G. *et al.*; J. Anal. Toxicol., (2001), 25, 691–698.
- ¹²⁸ELSOHLY, M. A.; Clin. Chem., (2003) 49, 1037–1038.
- ¹²⁹MAASI; Manitoba Association of Agricultural Societies Inc. Development of Hemp Food Products & Processes, (2000).
- ¹³⁰LINK, D. J.; Fundamentos e estratégias para comercialização de soja e milho e produção de sementes de soja. Centro de Ciências Agrárias, UFSC - Agronomia, (2011).
- ¹³¹BgVV; German Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine. Berlin, Germany, 1997.

- ¹³²PERKIN-ELMER; Analysis of Cannabinoids in Hemp Seed Oils by HPLC Using PDA Detection. Application note, Liquid Chromatography, (2015).
- ¹³³LEIZER, C. *et al.*; J. of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods, (2000) Vol. 2(4).
- ¹³⁴ALBERTA; Serecon Manag. Consulting Inc. Alberta Hemp Cost of production, 2012.
- ¹³⁵CAVERO, S. *et al.*; J. of Supercritical Fluids 38 (2006) 62–69.
- ¹³⁶NI, H. *et al.*; Fuel, (2015) volume 141 pages 74-81.
- ¹³⁷McHUGH, M.; KRUKONIS, V.; Supercritical fluid extraction: Principles and practice, Butterworths, 1986
- ¹³⁸KING, M. B.; BOTT, T. R.; Extraction of Natural Products Using Near-critical Solvents. Springer Verlag, 2013.
- ¹³⁹SIHVONEN, M.; JARVENPA, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALAHTI, R.; Advances in supercritical carbon dioxide technologies. v. 10, p. 217–222, 1999.
- ¹⁴⁰MARRERO, J.; GANI, R.; Fluid Phase Equilibria 183–184 (2001) 183–208.
- ¹⁴¹REID, R. C. *et al.*; The Properties of Gases and Liquids, McGraw-Hill, 4th ed, 1987.
- ¹⁴²LYDERSEN, A. L.; Estimation of critical properties of organic compounds, College Engineering University Wisconsin, April, 1955.
- ¹⁴³AMBROSE, D.; Correlation and estimation of vapor–liquid critical properties. I. Critical temperatures of organic compounds, Report Chem., 92, September 1978.
- ¹⁴⁴KLINCEWICZ, K. M.; REID, R. C.; AIChE Journal (Vol. 30, n^o 1), p 137-142, (1984).
- ¹⁴⁵JOBACK, K. G.; “A Unified Approach to Physical Property Estimation Using Multivariate Statistical Techniques,” Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 1984.
- ¹⁴⁶JOBACK, K. G. REID, R. C.; Chern. Eng. Comm. 1987, vo157, pp. 233-243.
- ¹⁴⁷LYMAN, W. J. *et al.*; Handbook of Chemical Property Estimation Methods, American Chemical Society, Washington, DC, 1990.
- ¹⁴⁸HORVATH, A. L.; Chemical Structure Generation from the Properties of Pure Organic Compounds (Studies in Physical and Theoretical Chemistry). Elsevier, Amsterdam, 1992.
- ¹⁴⁹PRICKETT, S. E. *et al.*; Mol. Simul. 11 (1993) 205–228.
- ¹⁵⁰CONSTANTINOU, L. *et al.*; Ind. Eng. Chem. Res. 32 (1993) 1734–1746.
- ¹⁵¹CONSTANTINOU, L. *et al.*; Ind. Eng. Chem. Res., (1994), 33 (2), pp 395–402.
- ¹⁵²CONSTANTINOU, L.; GANI, R.; AIChE J. 40 (1994) 1697–1710.
- ¹⁵³MARRERO, J. M.; PARDILLO, E. F.; AIChE J. 45 (1999) 615–621.
- ¹⁵⁴LIN, M.; TSAI, M.; WEN, K.; Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix* 1. v. 830, n. July 1998, p. 387–395, 1999.
- ¹⁵⁵ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C.; Green Chemistry, Theory and Practice, Oxford University Press, New York, 1998, p.30.
- ¹⁵⁶BECKMAN, E. J.; J. of Supercritical Fluids 28 (2004) 121–191.
- ¹⁵⁷BOTT, M. B. K. T. R.; Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents. [s.l.] Springer Netherlands, 1993.
- ¹⁵⁸NASIR, J. F. J. A. *et al.*; Iranica J. of Energy & Environment 3 (Special Issue on Environmental Technology): 43-49, 2012.
- ¹⁵⁹LAITINEN, A.; Supercritical fluid extraction of organic compounds from solids and aqueous solutions. Technical Research Center of Finland, 1999. VTT Publications 403.

- ¹⁶⁰MANSOORI, G. A. *et al.*; *Bio/Technology*, 6, 393-396, 1988.
- ¹⁶¹MELO, M. M. R. *et al.*; *J. of Supercritical Fluids* 92 (2014) 115–176.
- ¹⁶²REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; *J. Supercritical Fluids* 38 (2006) 146–166.
- ¹⁶³KITZBERGER, C. S. G. *et al.*; *J. of Food Engineering* 80 (2007) 631–638.
- ¹⁶⁴REVERCHON, E.; *J. Supercritical Fluids* 5 (1992) 256–261.
- ¹⁶⁵PIAUHY; Latin America, 2017.
- ¹⁶⁶ENTOURAGE; Phytolab. Brasil, 2017.
- ¹⁶⁷GALLILY, R. *et al.*; *Pharmacology & Pharmacy*, (2015) 6, 75–85.
- ¹⁶⁸TIKUN OLAM; *Medical Cannabis*, (2015). www.tikun-olam.info
- ¹⁶⁹GURNEY, S. M. R. *et al.*; *Forensic Science Review*, January 2014, Vol.26(1), pp.53-78.
- ¹⁷⁰WARTH, A. H.; *The Chemistry and Technology of Waxes*. Second Edition 1956.
- ¹⁷¹ILLÉS, V. *et al.*; *J. of Supercritical Fluids*. v. 10, p. 209-218, 1997.
- ¹⁷²CORSO, M. P. *et al.*; *J. of Supercritical Fluids* 52 (2010) 56–61.
- ¹⁷³CHRISTIANSON, D. D. *et al.*; *J. Food Sci.*, 1984 49:229–232.
- ¹⁷⁴CARVALHO-Jr., R. N. *et al.*; *J. of Supercritical Fluids*, Vol. 35, 2005, p. 197.
- ¹⁷⁵OLIVEIRA, E. L. G. *et al.*; *Chem. Eng. Res. and Design*, v. 89, pp. 1104-1117, 2011.
- ¹⁷⁶BRUNNER, G.; *Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and application to separation process*, Steinkopff, New York, 1994.
- ¹⁷⁷ESQUÍVEL, M. M. *et al.*; *J. of Supercritical Fluids* 16 (1999) 43–58.
- ¹⁷⁸MARTÍNEZ, J. *et al.*; *Ind. Eng. Chem. Res.* 2003, 42, 1057-1063.
- ¹⁷⁹REVERCHON, E.; *J. of Supercritical Fluids*, Volume 10, Issue 1, 1997.
- ¹⁸⁰FORNARI, R. E. *et al.*; *Fluid Phase Equilibria*, Vol.57(1), pp.1-33, 1990.
- ¹⁸¹DEITERS, U. K.; SCHNEIDER, G. M.; *Fluid Phase Equilibria*, (1986) 29: 145-160.
- ¹⁸²DOHRN, R. *et al.*; *Fluid Phase Equilibria* 288 (2010) 1–54.
- ¹⁸³SCHNEIDER, G. M.; *Phase Equilibria of Liquid and Gaseous Mixtures at High Pressures*, *Experimental Thermodynamics*, Vol. II, Chapter 16, Part 2, 787 – 801, (1975).
- ¹⁸⁴FONSECA, J. M. S. *et al.*; *Fluid Phase Equilibria* 300 (2011) 1–69.
- ¹⁸⁵SUPPERS, G.J.; MCHUGH, M. A.; *J. Chem. Eng. Data* 34:310 – 312, 1989.
- ¹⁸⁶DOHRN, R.; BRUNNER, G.; *Fluid Phase Equilibria* 106 (1995) 213-282.
- ¹⁸⁷LEHMANN T.; BRENNEISEN, R.; *Phytochemical Analysis*, vol. 3, 88-90 (1992).
- ¹⁸⁸DUSSY, F. E. *et al.*; *Forensic Science International* 149 (2005) 3–10.
- ¹⁸⁹TIPPARAT, P. *et al.*; *Forensic Science International* 215 (2012) 164–170.
- ¹⁹⁰OLAIZOLA, O. A. *et al.*; *Anal Bioanal Chem.* 2014 Nov;406(29):7549-60.
- ¹⁹¹TOSE, L. V. *et al.*; *Intern. J. of Mass Spectrometry*, July 2017, Vol.418, pp.112-121.
- ¹⁹²DE BACKER, B. *et al.*; *J. of Chromatography B*, 877 (2009) 4115–4124
- ¹⁹³JOSEPH, A.; *Methods & Devices Used to Create Cannabis Concentrates*. Apeks Supercritical. *Cannabis World Conference and Business*. New York, June 16-17, 2016.
- ¹⁹⁴GARRETT, E. R.; HUNT, C. A.; *J. of the Pharmac. Sciences* 63: 1056-1064, (1974).

- ¹⁹⁵ADAMS, R. *et al.*; J. of the American Chemical Society 63: 2209-2213 (1941).
- ¹⁹⁶NISSEN, L. *et al.*; Fitoterapia 81 (2010) 413–419.
- ¹⁹⁷BERTOLI, A. *et al.*; Industrial Crops and Products 32 (2010) 329–337.
- ¹⁹⁸FISCHEDICK, J. T. *et al.*; Phytochemistry 71 (2010) 2058–2073.
- ¹⁹⁹HAZEKAMP, A.; FISCHEDICK, J. T.; *Cannabis* - from cultivar to chemovar. Drug Test. Analysis (2012).
- ²⁰⁰MARCHINI, M. *et al.*; J. of Chromatography A, 1370 (2014) 200–215.
- ²⁰¹ANDRIKIPOULOS, N. K. *et al.*; JAOCS, Vol. 68, Nº 6, p 359-364 (1991).
- ²⁰²SOVOVÁ, H.; Chem. Eng. Sci. 49 (1994) 409–414.
- ²⁰³MARGENAT, L. *et al.*; J. of Supercritical Fluids, v.: 45 2, p.: 177 - 180, 2008.
- ²⁰⁴GONÇALVES, R. M. *et al.*; Molecules 18 (2013) 6215–6229.
- ²⁰⁵SILVA, C. M. *et al.*; J. of Supercritical Fluids 112 (2016) 14–21.
- ²⁰⁶OLIVEIRA, L. M. C. *et al.*; Fluid Phase Equilibria 426 (2016) 65-74.
- ²⁰⁷PENG, D.; ROBINSON, D. B.; Ind. Eng. Chem. Fundam., 15, 59-64 (1976).
- ²⁰⁸NIST; National Institute of Standards and Technology, 2017. <https://www.nist.gov/>
- ²⁰⁹DE SOUZA, A. T. *et al.*; J. of Supercritical Fluids, v. 47, n. 2, p. 182–187, dez. 2008.
- ²¹⁰GIUFRIDA, W. M. *et al.*; J. of Chem. & Eng Data, v. 56, n. 12, p. 4333–4341, 2011.
- ²¹¹PINTO, L. F. *et al.*; Fluid Phase Equilibria, v. 349, p. 1–11, jul. 2013.
- ²¹²LIMA, J. C. *et al.*; COBEQ 2014, Blucher, v.1, n.2, 2015. p 16240-16247.
- ²¹³SPILIOTIS, N. *et al.*; Fluid Phase Equilibria 102 (1994) 121–141.
- ²¹⁴ANITESCU, G. *et al.*; J. Supercritical Fluids 10 (1997) 175–189.
- ²¹⁵PLASCENCIA, G.; JARAMILLO, D.; Basic Thermochemistry in Materials Process. 2017.
- ²¹⁶VAN DER WAALS, J. D.; Ph. D. Thesis, Leiden, 1873.
- ²¹⁷SOUZA, L. S. *et al.*; Chemical Engineering Science 132 (2015) 150–158.
- ²²⁸ANGUS, S. *et al.*; Inter.Thermod.TablesFluidState, 3 Carbon Dioxide, Pergamon, 1976.
- ²¹⁹CASTIER, M.; Chemical Engineering Education, v42 n2 p74-81 Spr 2008.
- ²²⁰PITZER, K. S. *et al.*; J. Am. Chem. Soc., 77 (13), pp. 3433-3440, (1955).
- ²²¹SCHREIBER, D. R.; PITZER, K. S.; Fluid Phase Equilibria, 46(2-3), 113-130, (1989).
- ²²²BRANDANI, S.; Ind. Eng. Chem. Res, 32 (4), 756-758.
- ²²³TWU, C. H.; COON, J. E.; CINNINGHAM, J. R.; Fluid Phase Equilib. 96 (1994) 19.
- ²²⁴AMBROSE, D.; WALTON, J.; Pure & Appl. Chem. 61 (1989) 1395.
- ²²⁵CONSTANTINO, L. *et al.*; Fluid Phase Equil., 104: 11 (1995).
- ²²⁶ELBRO, H. S. *et al.*; Ind. Eng. Chem. Res., 30: 2576 (1991).
- ²²⁷TCC; The Cali Connection. Girl Scout Cookies. Flower 60/68 days. 60/40 ; *C. sativa* / *C. indica*. 6 feminized seeds. www.thecaliconnection.com
- ²²⁸PARADISE SEEDS; 2017. www.paradise-seeds.com/pt/durga-mata-ii-cbd
- ²²⁹COHEN, M.; ZISKIND, J.; Preventing Artificial Adulterants and Natural Contaminants in *Cannabis* Production: Best Practices. BOTEC Analysis Corporation. June 28, 2013.

- ²³⁰DOOL, H. van D; KRATZ, P. D.; J. of Chromatography A. V 11, 1963, p 463-471.
- ²³¹BABUSHOK, V. I. *et al.*; J. Phys. Chem. Ref. Data, Vol. 40, nº 4, 2011.
- ²³²GREEN, D. W.; PERRY, R. H.; Perry's chemical engineer's handbook. 8th Ed., McGraw-Hill, 2008.
- ²³³WU, W. *et al.*; J. Chem. Eng. Data 2006, 51, 1398-1403.
- ²³⁴MOSMANN, T.; J. Immunol. Methods, 1983; 65, 55–63
- ²³⁵HARA, A.; NORMAN, S. R.; Analytical Biochemistry 90, 420-426 (1978).
- ²³⁶GANDHI, A. P. *et al.*; Intern. J. of Food Science and Techn. 2003, 38, 369–375.
- ²³⁷KIRALAN, M. *et al.*; Spanish J. of Agricultural Research 8(2), 385-390, (2010).
- ²³⁸AOCS; Crude Fiber Analysis in Feeds by Filter Bag Technique Ba 6a-05. 6 ed, 2009.
- ²³⁹DHINGRA, D. *et al.*; J Food Sci Technol. 2012 Jun; 49(3): 255–266.
- ²⁴⁰HOUSE, J. D. *et al.*; J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 11801–11807.
- ²⁴¹IAL; INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008. 1018p.
- ²⁴²JONES, D. B.; Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. U. S. Department of Agriculture, Circular 183.
- ²⁴³United States Department of Agriculture; Full Report (All Nutrients) 12012, Seeds, hemp seed, hulled. National Nutrient Database for Standard Reference Release, 2016.
- ²⁴⁴NDIAYE, P. M. *et al.*; Brazilian J. of Chem. Eng, v.23, n.03, pp. 405-415, Jul-Sep, 2006
- ²⁴⁵IUPAC 2.301; Standard Methods. 7th Edition, Blackwell, Oxford, 1987.
- ²⁴⁶JACHMANIÁN, I. *et al.*; Effect of the hydrogenation process on the concentration of natural antioxidants of rice bran oil. 12th Euro Fed Lipid Congress, France, 2014.
- ²⁴⁷DIÓRIO, A. *et al.*; Extração de β -caroteno a partir de resíduo da vinificação de uvas bordô. VII Simpósio de Engenharia Química, 25 a 27 out (2017), Maringá - PR.
- ²⁴⁸SUPARTONO, W. *et al.*; Food Science and Techn., April 1998, Vol.31(4), pp.402-405.
- ²⁴⁹ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 17, de 6 de Maio, (2015).
- ²⁵⁰NIESINK, R. J. M.; VAN LAAR, M. W.; Psiquiatria frontal . 2013; 4: 130.
- ²⁵¹MOLNAR, A. *et al.*; Forensic Science International 238 (2014) 113–119.
- ²⁵²VELASCO, G. *et al.*; Curr. Oncol . 2016 Mar; 23 (Suppl 2): S23-S32.
- ²⁵³LUKHELE, S. T.; MOTADI, L. R.; BMC Complementary and Altern. Med. (2016) 16:335.
- ²⁵⁴CONTASSOT, E. *et al.*; Gynecologic Oncology 93 (2004) 182 – 188.
- ²⁵⁵CHEMEO; Official Web site [https://www.chemeo.com/cid/23-811-5/\(-\)-Cannabidiol.pdf](https://www.chemeo.com/cid/23-811-5/(-)-Cannabidiol.pdf) ; .../26-644-8/Dronabinol.pdf ; .../84-684-0/Cannabinol.pdf
- ²⁵⁶LUCAS, E. F. *et al.*; Caracterização de Polímeros. E-papers, 2001.
- ²⁵⁷THUMMA, S. *et al.*; Pharm. Sci. Tech., Vol. 9, No. 3, 2008, 982-990.
- ²⁵⁸GIOLITO, M. I.; Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial. Giz, 2004.
- ²⁵⁹BORHADE, S. S.; Arch. Appl. Sci. Res., 2013, 5 (1):5-8.
- ²⁶⁰NAWAR, W. W. J.; Agric. Food Chem., 1969, 17 (1), pp 18–21.
- ²⁶¹FREIRE, P. C. M. *et al.*; Rev. Nutr. vol.26 no.3 Campinas May/June 2013.