

Thuany Naiara Silva Laurentino

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DE PALO SANTO (*Bursera graveolens*) PARA
APLICAÇÃO EM PRODUTOS INSETICIDAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Coorientadora: Dr.^a Alessandra Marangoni

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Laurentino, Thuany Naiara Silva

Avaliação do potencial do extrato e do óleo essencial de palo santo (*bursera graveolens*) para aplicação em produtos inseticidas / Thuany Naiara Silva Laurentino ; orientador, Ariovaldo Bolzan ; coorientadora, Alessandra Marangoni Florianópolis, – SC, 2017.

125 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Palo santo (Bursera graveolens). 3. Extração supercrítica. 4. Potencial inseticida. I. Bolzan, Ariovaldo. II. Marangoni, Alessandra. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Thuany Naiara Silva Laurentino

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DE PALO SANTO (*Bursera graveolens*) PARA
APLICAÇÃO EM PRODUTOS INSETICIDAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 16 de Março de 2017.

Prof.^a Dr.^a Cintia Soares
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
UFSC/PósENQ

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
UFSC/PósENQ

Prof.^a Dr.^a Mayra Arauco Livia
ESAN/Peru

Dr.^a Patrícia Francisco de Oliveira
UFSC/PósENQ

Dedico este trabalho aos meus avós, Amauri e Diva, aos meus pais, Serafim e Veralúcia, e a minha irmã Thaíris, por todo amor, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção, força e paz interior. Por me encorajar nos momentos em que tudo parecia impossível e colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

À toda a minha família, a quem devo tudo o que sou. Em especial, aos meus pais, Serafim e Veralúcia, e a minha irmã Tháfris, por todo amor, dedicação, ensinamento e incentivo.

Aos meus avós, Amauri e Diva, pelo exemplo de amor, serenidade e dedicação. Obrigada por me incentivarem e vibrarem a cada vitória minha conquistada.

Ao professor Dr. Ariovaldo Bolzan, pela orientação, paciência, ensinamentos e incentivo. Meu muito obrigada!

À Alessandra Marangoni, pela coorientação, dedicação e incentivo. Obrigada por ser tão prestativa e atenciosa ao nosso grupo de pesquisa. Todos os seus conselhos e ensinamentos foram muito valiosos. Muito obrigada, Ale!

À Mayra Arauco, por todo conhecimento compartilhado, apoio e dedicação, que foram importantes para a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir valiosamente com este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Processos, em especial, as meninas da “supercrítica”, Daniela Gava, Julia Citadin e Deise Tramontin. Obrigada pela companhia, conversas e ensinamentos compartilhados. Pelo apoio nas horas difíceis, pelo carinho.

À minha prima Carla Barra Nova, por sempre me motivar a realizar os meus sonhos. Obrigada por ser esse anjinho na nossa família, que sempre nos presenteia com uma palavra sábia, no momento em que mais precisamos. Obrigada por tudo!

À Roberta e o Marcelo, pela amizade e por dividir momentos de alegria e tristeza no decorrer deste tempo do mestrado. Também agradeço a Monique, pelos momentos de companheirismo e amizade, desde a época da graduação.

Aos meus amigos Iara, Elves, Vanessa, Caio e Jéssica pela amizade; amizade esta que independe a distância.

À todos que torceram, oraram e contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade. Meu muito obrigada!

“Nem tudo é fácil na vida. Mas, com certeza, nada é impossível. Precisamos acreditar, ter fé e lutar para que não apenas sonhemos, mas também tornemos todos esses desejos realidade.”

Cecília Meirelles

RESUMO

A extração supercrítica é considerada uma tecnologia limpa, por envolver processos sustentáveis, ambientalmente corretos e de alta eficiência. Além disso, é caracterizada por utilizar um menor consumo de energia e resíduos menos tóxicos. Deste modo, devido as suas inúmeras vantagens, a utilização desta técnica vem crescendo no meio industrial. No entanto, para a obtenção de extrato de Palo santo (*Bursera graveolens*), pertencente à família Burseraceae, não foram encontrados dados na literatura. O Palo santo é um material lenhoso aromático, de fragrância forte, bastante utilizado na medicina popular devido a sua ação repelente, antiproliferativa, anti-inflamatória e antimicrobiana, dentre outras. Deste modo, visando apresentar uma alternativa aos inseticidas sintéticos, este trabalho teve como objetivo obter extratos naturais e óleo essencial do material lenhoso Palo santo, por meio de diferentes técnicas de extração. Além disso, se buscou determinar uma metodologia com maior seletividade aos compostos de interesse e melhor condição ao processo de extração, baseando-se na qualidade do produto final e menor impacto ambiental. Para isto, diferentes técnicas de extração e condições de operação foram avaliadas. As técnicas estudadas foram hidrodestilação, sohxlet, ultrassom e extração supercrítica. Na extração em sohxlet e ultrassom, foram empregados os solventes hexano e etanol. Já na extração supercrítica, foram usados o CO₂ supercrítico puro e com cossolvente. As condições de operação utilizadas na extração supercrítica foram de 80 bar a 200 bar, 32 °C a 44 °C e 5 % a 25 % de cossolvente. O maior rendimento foi obtido quando o solvente etanol foi utilizado no processo. Dentre os ensaios de extrações supercríticas, o maior rendimento obtido foi de 20,39%, onde foram utilizadas condições de 170 bar, 41 °C e 20 % de cossolvente. A caracterização dos extratos obtidos e do óleo essencial nas diferentes condições de operação foram realizadas por cromatografia gasosa, permitindo a identificação dos seguintes compostos majoritários: Mint-furanone, D-limoneno, Alfa-terpineol, Germacreno D, Beta-gurjunene, D-carvona e Cis-carveol. De acordo com dados obtidos na literatura, o Mint-furanone e o D-limoneno apresentam potencial inseticida, onde se destacam por atuarem contra o mosquito *Aedes aegypti*. Além de apresentar potencial inseticida, o Mint-furanone também apresenta potencial repelente, o que o torna um composto bastante interessante para o desenvolvimento de novos produtos.

Palavras-chave: Palo santo (*Bursera graveolens*). Extração supercrítica. Potencial inseticida.

ABSTRACT

Supercritical extraction is considered a clean technology because it involves sustainable, environmentally correct and high efficiency processes. In addition, it is characterized by lower energy consumption and less toxic waste. Thus, due to its numerous advantages, the use of this technique has been growing in the industrial environment. However, to obtain extract of Palo santo (*Bursera graveolens*), belonging to the family Burseraceae, no data were found in the literature. Palo santo is an aromatic woody material with strong fragrance, widely used in folk medicine due to its repellent, antiproliferative, anti-inflammatory and antimicrobial action, among others. Thus, in order to present an alternative to synthetic insecticides, this work had the objective of obtaining essential oil and natural extracts from the Palo santo ligneous material, through different extraction techniques. In addition, it was sought to determine a methodology with greater selectivity to the compounds of interest and better condition to the extraction process, based on the quality of the final product and lower environmental impact. For this, different extraction techniques and operating conditions were evaluated. The techniques studied were hydrodistillation, blowing, ultrasound and extraction with pure supercritical CO₂ and addition of co-solvent. The operating conditions used in the supercritical extraction were 80 bar at 200 bar, 32 ° C at 44 ° C and 5% at 25% co-solvent. The highest yield was obtained by the techniques in which the ethanol was used in the process. Among the supercritical extractions, the highest yield was 20.39%, where 170 bar, 41 ° C and 20% co-solvent conditions were used. The characterization of the essential oils and the extracts obtained in the different operating conditions were performed by gas chromatography, allowing the identification of the following major compounds: Mint furanone, D-limonene, alpha-terpineol, Germacrene D, Beta-gurjunene, D-carvone and Cis-carveol. According to data obtained in the literature, Mint-furanone and D-limonene present insecticidal potential, where they stand out for acting against the mosquito *Aedes aegypti*. In addition to presenting insecticidal potential, Mint-furanone also presents potential repellent, which makes it a very interesting compound for the development of new products.

Keywords: Palo santo (*Bursera graveolens*). Supercritical extraction. Insecticidal potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tronco da <i>Bursera graveolens</i> com listras de resinas	25
Figura 2 - Aparelho tipo <i>Clevenger</i>	31
Figura 3 - Esquema de extração por soxlet.....	32
Figura 4 - Esquema dos sistemas de ultrassom: (a) banho de ultrassom indireto; (b) sonda de ultrassom; (c) banho de ultrassom direto.....	34
Figura 5 - Diagrama de fases.....	37
Figura 6 - Curvas de extração de diferentes pressões: Rendimento do óleo <i>versus</i> consumo do solvente.....	39
Figura 7 - Variação do rendimento de extração do diuron a partir de um solo poluído contra o volume de CO ₂ em diferentes.....	40
Figura 8 - Diagrama densidade-pressão para o dióxido de carbono.....	41
Figura 9 - Solubilidade <i>versus</i> pressão em diferentes temperaturas.....	42
Figura 10 - Cossolventes mais utilizados em extração com fluidos supercríticos em matrizes vegetais.....	45
Figura 11 - Curva de extração do processo de SFE com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); taxa difusional (DC).....	47
Figura 12 - Matéria prima em: (a) pedaços de madeira, (b) em partículas com granulometrias diferentes e (c) armazenadas em embalagens de polietileno sob refrigeração.....	50
Figura 13 - (a) Moedor de café e (b) Agitador de peneiras.....	50
Figura 14 - Aparelho tipo <i>Clevenger</i>	53
Figura 15 - (a) Preparo da amostra para a realização da extração; (b) Aparelho <i>Clevenger</i> acoplado ao balão e este, por sua vez, a manta térmica e (c) Óleo decantado no tubo graduado do aparelho <i>Clevenger</i>	53
Figura 16 - Aparelho para a realização da extração por soxhlet. (a) Visão geral e (b) com papel alumínio.....	55
Figura 17 - (a) Cartucho com o material particulado; (b) Frasco âmbar com os extratos obtidos por Soxhlet; (c) Rotaevaporador.....	56
Figura 18 - Equipamento de ultrassom assistida de ponteira.....	56
Figura 19 - (a) Preparo das amostras; (b) Filtração a Vácuo; (c) Extrato filtrado para ser rotaevaporado.....	57
Figura 20 - Unidade de extração supercrítica do Laboratório de Controle de Processos: HPLC SC.....	58
Figura 21 - Unidade de extração (HPLC - SC). B - bomba HPLC, E - extrator, BP - válvula <i>back-pressure</i> , H - aquecimento.....	59
Figura 22 - Perfil do extrato da <i>Bursera graveolens</i> utilizando a extração com CO ₂ supercrítico e adição de cossolvente.....	75

Figura 23 - Isotermas de rendimento de extração supercrítica sem adição de cossolvente para a <i>B. graveolens</i>	78
Figura 24 - Influência da densidade no rendimento total de cada ensaio utilizando a extração supercrítica sem adição de cossolvente.....	79
Figura 25 - Efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de <i>B. graveolens</i>	80
Figura 26 - Efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico da <i>Bursera graveolens</i>	80
Figura 27 - Gráfico de pareto. Extração com CO ₂ supercrítico sem cossolvente.....	83
Figura 28 - Gráfico de superfície de reposta para o rendimento global da extração supercrítica de <i>B. graveolens</i> com CO ₂ puro em função da pressão e temperatura.....	83
Figura 29 - Gráfico de linhas de contorno para o rendimento global da extração supercrítica de <i>B. graveolens</i> com CO ₂ puro em função da pressão e temperatura.....	84
Figura 30 - Curva de extração (CO ₂ puro) de <i>B. graveolens</i> na condição de 170 bar e 41 °C.....	86
Figura 31 - Efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de <i>B. graveolens</i> , com adição de 20% de cossolvente no processo.....	89
Figura 32 - Efeito da concentração do cossolvente no rendimento do extrato supercrítico de <i>B. graveolens</i>	90
Figura 33 - Gráfico de pareto. Extração com CO ₂ supercrítico com adição de cossolvente.....	92
Figura 34 - Gráfico de superfície de reposta para o rendimento global da extração supercrítica com CO ₂ e adição de cossolvente em função da pressão e concentração de cossolvente utilizado.....	93
Figura 35 - Gráfico das linhas de contorno para o rendimento global da extração supercrítica com CO ₂ e adição de cossolvente em função da pressão e concentração de cossolvente utilizado.....	93
Figura 36 - Curvas de extração da <i>B. graveolens</i> na condição de 170 bar, 41 °C e 20 % de cossolvente.....	94
Figura 37 - Valores de rendimento global de extração de <i>B. graveolens</i> obtido por diferentes métodos.....	97
Figura 38 - Comparação entre os métodos em relação ao percentual de D-limoneno e Mint-furanone.....	100
Figura 39 - Composição do extrato supercrítico obtido de alguns ensaios da extração supercrítica com adição de cossolvente.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de algumas propriedades físicas do gás, líquido e fluido	44
Tabela 2 - Propriedades críticas dos solventes utilizados nos processos de extração supercrítica.....	49
Tabela 3 - Valores utilizados no planejamento em estrela para dois fatores.....	65
Tabela 4 - Valores codificados e reais do planejamento em estrela para dois fatores, pressão e temperatura.....	65
Tabela 5 - Valores utilizados no planejamento em estrela para dois fatores.....	66
Tabela 6 - Valores codificados e reais do planejamento DCCR para três fatores, pressão, temperatura e cossolvente.....	66
Tabela 7 - Experimentos adicionais.....	67
Tabela 8 - Parâmetros do leito fixo.....	70
Tabela 9 - Composição química do óleo essencial de <i>Bursera graveolens</i> obtido pela técnica de hidrodestilação.....	71
Tabela 10 - Rendimento global (Y) das extrações de <i>Bursera graveolens</i> a baixa pressão, utilizando dois solventes de diferentes polaridades.....	74
Tabela 11 - Composição química do extrato de <i>B. graveolens</i> obtido pela técnica em soxhlet, usando dois solventes de diferentes polaridades.....	75
Tabela 12 - Composição química do extrato da <i>Bursera graveolens</i> obtido pela técnica de ultrassom, usando dois solventes de diferentes polaridades.....	77
Tabela 13 - Rendimento obtido a partir do planejamento em estrela para a extração supercrítica sem adição de cossolvente.....	81
Tabela 14 - Coeficientes de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento global do óleo essencial de <i>B. graveolens</i>	86
Tabela 15 - ANOVA - Análise de Variância para os dados obtidos na extração supercrítica sem adição de cossolvente.....	87
Tabela 16 - Rendimento obtido a partir do planejamento DCCR para extração supercrítica de <i>B. graveolens</i> com adição de cossolvente.....	93
Tabela 17 - Estimativa dos efeitos significativos que influenciaram no rendimento de extração supercrítica com adição de cossolvente.....	95
Tabela 18 - ANOVA - Análise de Variância para os dados obtidos na extração supercrítica com adição de cossolvente.....	96
Tabela 19 - Valores de rendimento global de extração de <i>B. graveolens</i> obtido por diferentes métodos.....	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 PALO SANTO (<i>BURSERA GRAVEOLENS</i>).....	25
3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS	27
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	30
3.3.1 Hidrodestilação.....	31
3.3.2 Extração por soxhlet	32
3.3.3 Extração por ultrassom	33
3.3.4 Extração supercrítica	35
3.3.4.1 Propriedade dos fluidos supercríticos	36
3.3.4.2 Utilização de cossolvente.....	44
3.3.4.3 Curvas de extração.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 MATÉRIA PRIMA	49
4.1.1 Distribuição granulométrica	50
4.1.2 Caracterização do leito de partículas	51
4.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	52
4.2.1 Extração por hidrodestilação	52
4.2.2 Extração por soxhlet	54
4.2.3 Extração por ultrassom	56
4.2.4 Extração supercrítica	58
4.2.4.1 Planejamento experimental	59
4.2.4.2 Curvas de extração.....	63
4.2.5 Caracterização química do óleo essencial e dos extratos obtidos de <i>Bursera graveolens</i>	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	65
5.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	66
5.2.1 Extração por hidrodestilação	66
5.2.2 Extração usando solventes.....	69
5.3 EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	74
5.3.1 Teste preliminar e análise do perfil do extrato.....	74
5.3.2 Extração com CO ₂ supercrítico puro	75
5.3.2.1 Rendimento global da extração supercrítica	75
5.3.2.2 Análise estatística	81
5.3.2.3 Curvas globais de extração.....	85
5.4 EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE	87
5.4.1 Rendimento global da extração supercrítica	87
5.4.2 Análise estatística	90
5.4.3 Curvas globais de extração.....	94
5.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS POR MEIO DA EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO PURO E COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE	95
5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE <i>BURSERIA GRAVEOLENS</i>	96
6. CONCLUSÃO	103
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
REFERÊNCIAS.....	107
APÊNDICES	117
APÊNDICE A – Tabela compostos (Extração com CO ₂ puro)	119
APÊNDICE B – Tabela compostos (Extração com CO ₂ e etanol)	125

1. INTRODUÇÃO

O Palo santo, denominado cientificamente como *Bursera graveolens*, pertence à família Burseraceae e é bastante encontrado em regiões localizadas entre o México e o Peru. É um material lenhoso aromático, caracterizado por apresentar uma forte fragrância; picante, doce e balsâmica (YUKAWA et al., 2006).

Esta espécie exibe uma fonte próspera, já que diferentes partes do seu material estão empregadas na medicina popular. As resinas produzidas podem ser aplicadas para o tratamento de hérnias, distensões dos pés e para extrair corpos estranhos da pele. Os extratos via oral podem ser usados contra asma, diarreia e pedra nos rins (ROBLES et al., 2005). Além disso, o extrato de Palo santo apresenta ação inibitória para o crescimento de células tumorais da mama, bem como para o protozoário *Leishmania amazonensis*, caracterizando-se como um óleo com ação antiproliferativa (MONZOTE et al., 2012). Também apresenta ação anti-inflamatória e antimicrobiana (ROBLES et al., 2005; SANTANA et al., 2009). A madeira e as folhas são usadas como repelente de insetos e para tratar dores de diferentes origens.

Sabe-se que a utilização de muitos inseticidas sintéticos podem ocasionar diversos problemas, tanto para a saúde humana, quanto para o meio ambiente. Assim, a busca por um inseticida de largo espectro e rápida degradação, menos agressivos ao meio ambiente, encontra-se em destaque. Uma das alternativas corresponde a obtenção de inseticidas a base de substâncias químicas presentes nas plantas (MARANGONI, 2011).

Os óleos essenciais e os extratos naturais são substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos produtos, apresentando compostos com ação inseticida, larvicida ou repelente contra diversos insetos. Com relação a *Bursera graveolens*, tanto o óleo essencial, quanto o extrato, apresentam forte potencial para fornecerem produtos alternativos aos inseticidas sintéticos.

Sabe-se que os óleos essenciais e os extratos correspondem a uma mistura de compostos com estruturas orgânicas de baixo e alto peso molecular, respectivamente. São biossintetizados em vários órgãos do vegetal e a sua composição pode variar de acordo com o local onde foi extraído e o tipo de extração utilizada. Além disso, a composição pode ser influenciada por parâmetros relativos as condições edafoclimáticas e a época de colheita das plantas.

Quanto aos processos de extração, os óleos essenciais são obtidos por meio da técnica de hidrodestilação, gerando produtos de grande

interesse comercial e apresentando aplicação na indústria farmacêutica, perfumaria, cosmética e produtos alimentares (REGNAULT-ROGER et al., 2012). Outras técnicas de extração, como soxhlet, ultrassom e fluidos supercríticos, são utilizadas para a obtenção de extratos naturais, pois, além dos compostos de baixo peso molecular, também extraem compostos de alto peso molecular.

A qualidade e a composição final dos extratos obtidos a partir de produtos naturais estão diretamente relacionados com a escolha da técnica empregada. A metodologia de extração é determinada de acordo com a família dos compostos a ser extraída e, também, se a finalidade do processo é qualitativo ou quantitativo (BISCAIA, 2007).

Cada tecnologia aplicada para extração de óleos essenciais e extratos naturais apresenta vantagens e desvantagens. Assim, a definição por um método mais seletivo, com melhores condições de processo, associados a qualidade do produto final e preservação do meio ambiente, foram critérios utilizados neste trabalho para avaliar os processos de extração.

Diante disso, este trabalho utilizou diferentes técnicas de extração e analisou a composição do óleo essencial e dos extratos obtidos por *Bursera graveolens*. As técnicas utilizadas foram hidrodestilação, soxhlet, ultrassom e extração com CO₂ supercrítico, com e sem adição de cossolvente.

Para facilitar a apresentação, este trabalho se encontra estruturado em capítulos, onde o capítulo 2 apresenta o objetivo geral e os objetivos específicos. O capítulo 3 apresenta uma revisão bibliográfica dos métodos de extração utilizados e uma abordagem sobre óleos essenciais e extratos naturais. No capítulo 4 são descritos os materiais e métodos utilizados para a realização dos experimentos. No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos. No capítulo 6 são apresentadas as conclusões desta pesquisa. Nos capítulos 7, 8 e 9 são apresentadas as sugestões de trabalhos futuros, as referências bibliográficas utilizadas e Anexo, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo, tem como principal objetivo a obtenção de extratos naturais e do óleo essencial do material lenhoso Palo santo (*Bursera graveolens*), por meio de diferentes técnicas de extração, para aplicação em produtos inseticidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A seguir, apresenta-se os objetivos específicos deste trabalho.

- a) Utilizar a técnica de hidrodestilação para a obtenção do óleo essencial de Palo santo;
- b) Utilizar as técnicas soxhlet e ultrassom, com dois solventes orgânicos de diferentes polaridades, para a obtenção de extratos do Palo santo;
- c) Utilizar técnica de alta pressão (extração com CO₂ supercrítico puro e com adição de cossolvente) e avaliar o rendimento da extração em função das condições de operação do processo (pressão, temperatura e cossolvente), analisar a adição do cossolvente na extração supercrítica e verificar a dinâmica de extração supercrítica;
- d) Comparar as metodologias aplicadas, de acordo com a composição química do óleo essencial e dos extratos obtidos;
- e) Identificar a técnica mais eficiente e as melhores condições do processo, baseando-se, principalmente, na seletividade dos compostos de interesse.
- f) Verificar a presença de compostos com potencial inseticida no óleo essencial e nos extratos obtidos a partir do Palo santo.

Nas sequências, está apresentada a revisão bibliográfica dos assuntos relacionados ao tema desse trabalho.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O presente capítulo tem como objetivo abordar aspectos encontrados na literatura, bem como contextualizar os principais interesses e relevância do trabalho. A seguir, será apresentada uma breve revisão ressaltando aspectos relacionados as principais características do Palo santo, uma abordagem sobre óleos essenciais e extratos naturais e os métodos de extração utilizados neste trabalho.

3.1 PALO SANTO (*BURSERA GRAVEOLENS*)

O Palo santo corresponde a uma espécie de madeira aromática natural, cientificamente designada como *Bursera graveolens*. É produzida por uma planta lenhosa, com folhas caducifólias, e apresenta características particulares com relação a sua fragrância; picante, doce e balsâmica (YUKAWA et al., 2006). Quando adulta, esta planta pode alcançar entre 8 a 15 metros de altura, com um diâmetro variando entre 30 a 50 cm. Apresenta um crescimento relativamente rápido, facilitando a sua proliferação nas florestas. Como pode ser visualizado na Figura 1, o seu caule apresenta um aspecto liso e uma coloração cinzenta, acrescentado de um listrado branco, onde ocorre a liberação de resinas quando é submetido a cortes ou escoriações (MORGAN e JOSE, 2013).

Figura 1 - Tronco da *Bursera graveolens* com listras de resinas.



Fonte: Morgan e Jose (2013).

O Palo santo é uma planta nativa da América tropical, bastante encontrada em regiões localizadas entre o México e o Peru. Desenvolve-se em diferentes altitudes, próximo ao mar, presentes em algumas regiões do Equador, ou em elevadas altitudes, como no norte do Peru. Podem crescer em ambientes com solos rochosos, áridos e pobres de nutrientes (SANTANA et al., 2009; MORGAN e JOSE, 2013).

A espécie do Palo santo pertence à família Burseraceae, a qual compreende 18 gêneros, com mais de 700 espécies divididas em três grupos: Protieae (três gêneros), Canarieae (oito gêneros) e Bursera (sete gêneros). O gênero *Bursera* envolve cerca de 100 espécies com uma ampla distribuição geográfica. Este gênero é caracterizado por apresentar óleos essenciais constituídos por triterpenos, esteróides, lignanas e flavonóides, obtidos a partir de suas resinas. As lignanas, derivadas de podofilotoxina, podem induzir uma variedade de efeitos biológicos, tais como, antioxidantes, antiviral, antibacteriano, inseticida, fungicida, prevenir doenças coronárias e antitumoral, onde, neste caso, já existem estudos comprovando a sua eficiência para o tratamento de células cancerígenas do pulmão, testículo e linfomas (MALDINI et al., 2009; NOGE et al., 2009; MARQUES et al., 2010; VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ et al., 2011).

Além disso, as resinas produzidas por esta espécie podem ser usadas no tratamento de hérnias, distensões dos pés e para extrair corpos estranhos da pele. Já os extratos podem ser usados contra a asma, diarreia e pedra nos rins (ROBLES et al., 2005).

Durante muitos anos, esse material lenhoso foi utilizado como incenso em igrejas, por ser constituído por resinas aromáticas e óleos essenciais, tornando-se popularmente conhecido como Palo santo. Além disso, diferentes partes desse material lenhoso são utilizadas na medicina popular. A madeira e as folhas são utilizadas como repelente de insetos e para tratar dores de diferentes origens. Nos últimos anos, a produção do óleo essencial desse material se tornou mais atraente, devido os benefícios econômicos, a partir da elaboração de perfumes finos, por exemplo (YUKAWA et al., 2006; MORGAN e JOSE, 2013; CARRIÓN-PALADINES, 2016).

De acordo com Monzote et al. (2012), a composição química do óleo essencial do Palo santo apresenta entre os seus constituintes majoritários, o limoneno. Em suas análises, os autores verificaram que o óleo apresenta ação inibitória para o crescimento de células tumorais da mama, bem como, para o protozoário *Leishmania amazonensis*, caracterizando-se como um óleo com ação antiproliferativa.

Santana et al. (2009), verificaram que o extrato hidroalcolico da espécie *Bursera graveolens* apresenta propriedades anti-inflamatórias. Já os pesquisadores Robles et al. (2005), identificaram ação antimicrobiana no óleo essencial, onde este conseguiu inibir satisfatoriamente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS

Os óleos essenciais e os extratos naturais correspondem a uma mistura de compostos naturais com estruturas orgânicas de baixo e alto peso molecular, respectivamente. São biossintetizados em vários órgãos do vegetal, estando presentes no interior de células oleicas ou em espaços intercelulares, nas folhas, cascas, talos, frutas, sementes, raízes e madeira. Esses compostos são designados como metabólitos secundários e desempenham funções ecológicas e biológicas importantes para a planta, atuando em sua defesa, devido a sua atividade antimicrobiana e antioxidante (BAJPAI et al., 2012; NAJAFIAN, 2014; MOHAMMADHOSSEINI et al., 2017).

De acordo com sua origem sintética, esses metabólitos secundários podem ser divididos em dois grupos, compostos de origem terpenica e compostos aromáticos. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15). Os monoterpenos correspondem as moléculas mais representativas, constituindo 90% da composição desses metabólitos secundários, aproximadamente. Compreendem aos álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos e fenóis (BAKKALI et al., 2008).

Já os compostos aromáticos, ocorrem com menor frequência e seus constituintes compreendem aos aldeídos, álcool, fenóis, metoxi derivados e metileno dioxi (BAKKALI et al., 2008; BAJPAI et al., 2012).

Os óleos essenciais e os extratos naturais podem conter de 20-60 componentes em concentrações bastante diferentes. São caracterizados por dois ou três componentes, onde, geralmente, estes determinam as propriedades biológicas dos extratos, tanto os efeitos benéficos, quanto os prejudiciais, como o seu perfil toxicológico. Esses dois aspectos, benéfico e prejudicial, devem ser levados em consideração para garantir a segurança humana.

A composição dos compostos naturais pode variar dependendo do local onde foi extraído e o tipo de extração utilizada. Além disso, é influenciada fortemente por parâmetros relativos ao tempo e a época de colheita das plantas; o tipo dos órgãos das plantas e dos correspondentes

grupos familiares, geográficos e condições climáticas; idade fisiológica; estágio de desenvolvimento; estado das plantas; secagem pós-colheita; armazenamento das plantas; diversidade; e os métodos de extração (LOZIONE; VENSKUTONIS, 2005; MOHAMMADHOSSEINI et al., 2017).

Sabe-se que os materiais lenhosos são constituídos por três polímeros principais, a celulose, a hemicelulose e a lignina. Além disso, esses materiais lignocelulósicos, como também são designados, são constituídos por compostos que não fazem parte da estrutura da parede celular, os metabólitos secundários, como, por exemplo, os óleos essenciais, que apresentam compostos de bastante interesse no meio industrial (LIMA et al., 2007).

Para a obtenção do óleo essencial, faz-se necessário a utilização de métodos que busquem quebrar a parede celular, sem interferir na qualidade final do óleo. No entanto, conseguir essa ruptura não é algo tão simples, já que a celulose corresponde a um polissacarídeo linear, que apresenta cadeias empacotadas por microfibrilas e estabilizadas por ligações de hidrogênio; a hemicelulose é um heteropolímero curto e com muitas ramificações, que promove a integração da rede celulose-hemicelulose-lignina e ocasiona rigidez; e a lignina que corresponde a um polímero amorfo que acarreta rigidez na parede celular e resistência contra ataque microbiano (CHEMMÉS et al., 2013).

Atualmente, diversos métodos estão sendo estudados com intuito de romper a estrutura lignocelulósica, sem prejudicar os compostos presentes no óleo. Esses métodos podem ser classificados em físicos, químicos ou físico-químicos (CHEMMÉS et al., 2013). Baseando-se nos princípios físicos, de acordo com os dados apresentados na literatura, verifica-se que as técnicas de hidrodestilação e arraste a vapor são as mais usadas. Porém, em termos de investigação da composição química, a hidrodestilação encontra-se em destaque. Nessas técnicas, a parede celular do vegetal sofre uma ruptura pela ação do vapor e libera o óleo, formando uma mistura heterogênea com a água. A partir disso, o vapor d'água atua aumentando a pressão de vapor do sistema, fazendo com que o óleo entre em ebulição mais rapidamente, em uma temperatura abaixo daquela normalmente observada para a substância pura (TANDON, 2008). No entanto, essa temperatura utilizada pode prejudicar os compostos termossensíveis (DONELIAN et al., 2009).

Deste modo, o óleo essencial corresponde ao produto obtido por meio dos métodos como a hidrodestilação, por exemplo, e são produtos de grande interesse comercial, já que apresentam aplicação na indústria farmacêutica, perfumaria, cosmética e de produtos alimentares

(REGNAULT-ROGER et al., 2012). Outros métodos de extração, como a utilização de fluidos supercríticos, além dos compostos de baixo peso molecular, também extraem compostos de alto peso molecular, sendo necessário realizar um fracionamento para separar os compostos. Deste modo, o produto obtido a partir desses métodos de extração são designados de extratos.

Tanto os óleos essenciais, quanto os extratos vegetais, podem apresentar fortes atividades biológicas contra bactérias patogênicas, fungos, vírus, insetos e deterioração por oxidação. Deste modo, a substituição de compostos sintéticos por compostos de origem natural, tem impulsionado o desenvolvimentos de diversos projetos, como o projeto de ecopesticidas, por exemplo, já que os compostos são ambientalmente favoráveis e de fácil utilização (PAVELA, 2015).

Sabe-se que a utilização de muitos inseticidas sintéticos podem ocasionar diversos problemas, tanto para a saúde humana, quanto para o meio ambiente. Além disso, estes inseticidas podem desenvolver populações de mosquitos resistentes, representando um dos problemas mais graves em sua utilização (OMS, 2017). Assim, houve um aumento no número de pesquisas relacionadas a substituição de inseticidas sintéticos por outros inseticidas a base de extratos vegetais, apresentando um largo espectro, uma rápida degradação e uma menor agressividade ao meio ambiente (MARANGONI, 2011; PAVELA, 2015).

Os constituintes presentes nos óleos essenciais ou extratos vegetais atuam em processos bioquímicos, desequilibrando o sistema endocrinológico dos insetos. Podem apresentar uma ação neurotóxica em insetos, provocando uma hiperatividade, seguida por uma hiperexcitação, levando a sua queda e imobilização (ENAN, 2001). De acordo com pesquisas realizadas por Pavela (2015), vários monoterpenos, como D-limoneno e Terpeneol, apresentam neurotoxicidade contra alguns insetos.

Assim, os mecanismos de ação das substâncias químicas presentes nos óleos essenciais e nos extratos vegetais, são caracterizados em vários níveis de acordo com a sua capacidade de penetrar a cutícula do inseto e entrar em seus corpos, relacionando de forma direta a sua capacidade de fornecer o efeito inseticida.

Atualmente, já existem inseticidas biológicos disponíveis no mercado, como os produtos à base de *Bacillus thuringiensis sub.sp. israelensis*, que apresentam boa atividade contra larvas de *Aedes*, e de *Bacillus sphaericus*, para larvas de *Anopheles* e *Culex*. Porém, a substituição de inseticidas sintéticos por produtos alternativos ainda é

bastante recente e precisa ser melhor estudada, já que, em grande escala, esses produtos apresentam um alto custo (FUNASA, 2001).

Muitas pesquisas buscam utilizar diferentes métodos para aumentar a proteção dos seres humanos contra mosquitos, já que estes são vetores de uma grande variedade de patógenos e parasitas humanos, transmitindo doenças como malária, leishmaniose, doença de chagas e dengue, por exemplo (PAVELA, 2015)

No Brasil, existe uma forte preocupação com o combate ao mosquito *Aedes aegypti*, vetor da dengue. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2016, foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue. Neste ano de 2017, até Fevereiro, já foram registrados 21.174 casos prováveis de dengue no país, onde a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (42,6%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (17,9%), Centro-Oeste (16,9%), Sul (11,4%) e Norte (11,2%) (OMS, 2017).

Portanto, os óleos essenciais e os extratos são substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos produtos com ação inseticida, larvicida ou repelente contra diversos insetos, tornando-se uma boa alternativa para a substituição dos produtos sintéticos.

Inúmeras famílias de plantas apresentam compostos com atividade inseticida, como as famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiata, Canellaceae e Burseraceae. Dentre estas, o presente trabalho busca estudar a família Burseraceae.

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

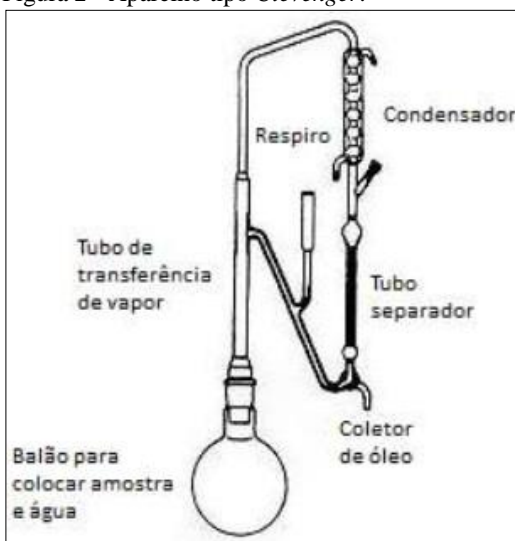
A qualidade e a composição final dos extratos obtidos a partir de produtos naturais estão diretamente relacionados com a escolha da técnica de extração empregada. A metodologia de extração é determinada de acordo com a família dos compostos a ser extraída e, também, se a finalidade do processo é qualitativo ou quantitativo (BISCAIA, 2007).

As substâncias biologicamente ativas podem ser extraídas pelo método de hidrodestilação e pelos métodos de extração com solvente e de alta pressão. Nas extrações com solventes, como soxhlet e ultrassom, diversos tipos de solventes podem ser utilizados, como álcoois metílico, etílico e propílico; hexano; clorofórmio; acetona, entre outros. A técnica de soxhlet é largamente aplicada em indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Já entre os métodos de alta pressão destaca-se a extração com fluido supercrítico, técnica eficiente e de baixo impacto ambiental.

3.3.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação corresponde a uma técnica convencional de extração de óleos essenciais, onde utiliza o equipamento *Clevenger* para a sua realização, Figura 2. Neste equipamento, a matriz a ser tratada é colocada em contato direto com a água, na qual será submetida a aquecimento até a ebulição, provocando a formação de vapor, que arrasta os compostos mais voláteis. Após a condensação, os compostos separam-se da água por meio da decantação (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Figura 2 - Aparelho tipo *Clevenger*.



Fonte: Reverchon e De marco (2006).

A hidrodestilação pode ser utilizada para a extração de óleo essencial de vários tipos de matrizes vegetais, como flores, frutos, folhas, raízes, sementes, casca de caule, castanhas, galhos, entre outros. Apesar de não ser uma técnica de alta eficiência, é bastante utilizada em laboratórios devido a sua versatilidade (LEAL, 2008).

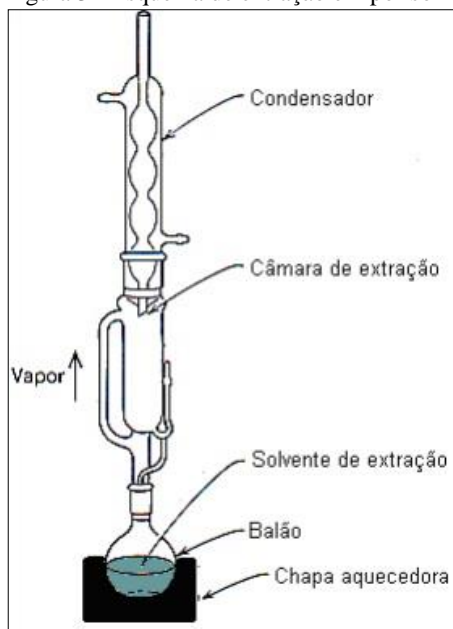
A técnica apresenta vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens, destaca-se a sua simplicidade e fácil execução. Já entre as desvantagens, ela pode ocasionar a degradação térmica dos produtos, a hidrólise e a solubilização de alguns compostos em água. Além disso, apresenta o menor rendimento, perdas de compostos voláteis e altos

tempos de extração (REVERCHON e DE MARCO, 2006; UQUICHEA, 2015).

3.3.2 Extração por soxhlet

Essa metodologia é bastante simples e amplamente utilizada no meio acadêmico, facilitando estudos com as matérias primas e os seus extratos. Corresponde ao método padrão, bastante utilizado como referência para a comparação com outros métodos. Nesta técnica, a amostra é colocada em contato com o solvente várias vezes (Figura 3) facilitando a transferência do extrato presente na matriz vegetal para o solvente (WU et al., 2011).

Figura 3 - Esquema de extração em por soxlet.



Fonte: Google.com.

A técnica por soxhlet apresenta vantagens e desvantagens. Com relação as vantagens, apresenta alto rendimento, permite a renovação do solvente durante todo o processo, através da recirculação, não há necessidade de filtração para separar a matriz vegetal do solvente contendo o soluto, o que simplifica o tempo de manuseio do extrato

após a extração, pequena possibilidade de perdas ou contaminação do extrato (BENELLI, 2010).

Entre as principais desvantagens desta técnica estão a baixa seletividade, a lentidão do processo, utilização de altas temperaturas, necessidade de uma etapa posterior para eliminação do solvente, gerando gastos, parcialmente seletivo, onde o poder de dissolução é determinado pela temperatura e natureza do solvente (MELECCHI, 2005).

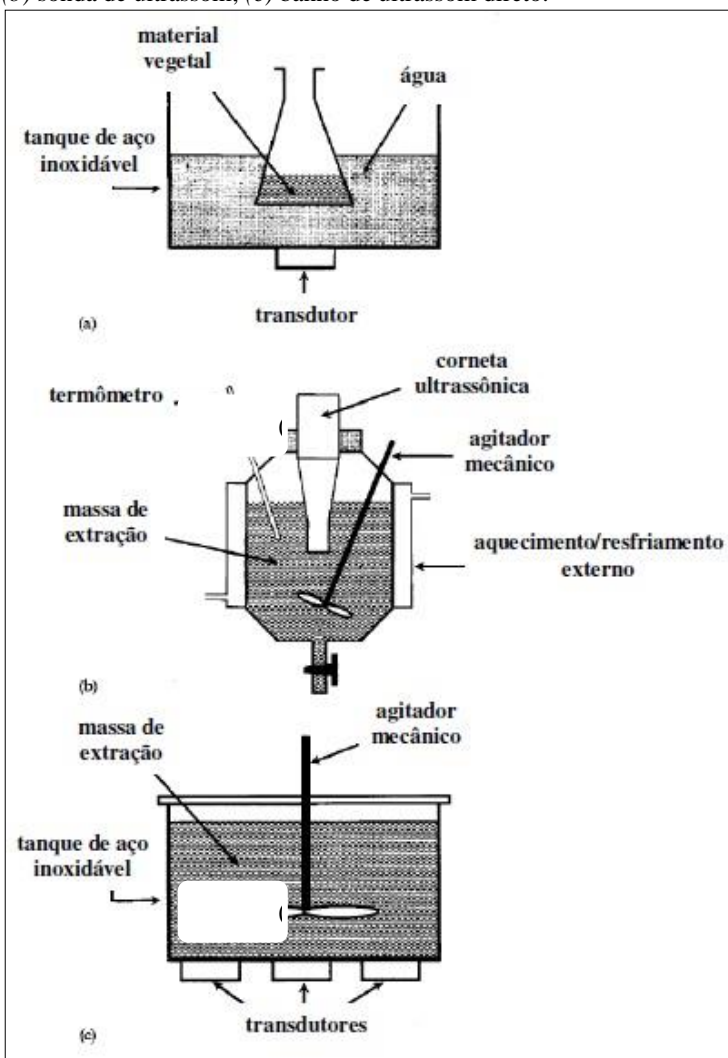
3.3.3 Extração por ultrassom

A técnica de ultrassom utiliza a energia das ondas sonoras (vibrações mecânicas), transmitidas com uma frequência superior à da capacidade auditiva humana, frequências de 20,0 – 100 kHz, podendo propagar-se em meios sólidos, líquidos e gasosos (GUINDANI, 2014).

As ondas sonoras se propagam através de ciclos de compressão e expansão, provocando o afastamento e a aproximação das moléculas repetidas vezes. Essa alteração na pressão do líquido gera cavitação, bolhas ou microfluxos, proporcionando mudanças físicas e químicas permanentes, como aquecimento e ruptura dos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Além disso, nas matrizes vegetais, as ondas causam estresse mecânico das células e aumento da permeabilidade das paredes celulares. O aumento do tecido celular pode ocasionar a quebra da parede celular, liberando os compostos aromáticos, conseqüentemente, aumentando a eficiência de extração e reduzindo o tempo do processo. Deste modo, verifica-se que os principais fatores envolvidos nesta técnica são: intensidade e frequência produzida pelo equipamento de ultrassom (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2003; FREITAS, 2007; BENELLI, 2010).

Os dispositivos mais comuns para aplicação de ondas ultrassônicas são banho (direto ou indireto) e sonda, como podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4 - Esquema dos sistemas de ultrassom: (a) banho de ultrassom indireto; (b) sonda de ultrassom; (c) banho de ultrassom direto.



Fonte: Vinatoru et al. (1997).

Os banhos são os equipamentos mais utilizados. No entanto, eles dificultam a reprodutibilidade experimental e a uniformidade na distribuição da energia ultrassônica (GUINDANI, 2014).

Com relação as vantagens em utilizar a técnica de ultrassom, tem-se a simplicidade do equipamento, economia no custo inicial, possibilidade de usar diferentes solventes para a extração e boa repetibilidade (FREITAS, 2007). Além disso, quando comparada à técnica de extração em soxhlet, a técnica de ultrassom aumenta a polaridade do sistema por meio da cavitação e, conseqüentemente, proporciona uma maior eficiência da técnica. Também permite a adição de um cossolvente, aumentando a polaridade da fase líquida, possibilita a extração de compostos termicamente sensíveis e apresenta um menor tempo de operação (GUINDANI, 2014).

Dentre as desvantagens, pode-se destacar a necessidade de filtração após a extração, aumentando o tempo final do processo e a possibilidade de perda ou contaminação do extrato no decorrer da aplicação da técnica.

3.3.4 Extração supercrítica

A busca por processos tecnológicos alternativos encontra-se em constante crescimento, acentuando-se nos últimos anos. Os processos inovadores devem ter como principal característica os menores impactos ambientais, tais como: menor consumo de energia, resíduos menos tóxicos, melhor utilização de subprodutos e melhor qualidade e segurança do produto final (KNEZ et al., 2014).

Diante disto, o uso das tecnologias de alta pressão encontra-se em destaque. Dentre estas, a tecnologia que envolve os fluidos supercríticos estão entre as mais estudadas e aplicadas no mercado (KNEZ et al., 2014).

A escolha por processos envolvendo fluidos supercríticos, pode ser justificada pela participação deles em processos que são sustentáveis, ambientalmente corretos e eficientes. Dentre as inúmeras vantagens desses processos, pode-se destacar a possibilidade de oferecer separação e secagem do produto por expansão simples, onde o gás pode ser recuperado e reutilizado, sem a necessidade de um processo de purificação (DE MELO et al., 2014; GUINDANI et al., 2014; KNEZ et al., 2014). Além disso, apresentam características nas quais permitem a obtenção de produtos de alto valor agregado e sem resíduos químicos.

Outra vantagem da extração com fluidos supercríticos refere-se a necessidade de ajustar as propriedades termofísicas desses fluidos, como a difusividade, a viscosidade, a densidade ou a constante dielétrica,

alterando apenas o binômio pressão-temperatura (POURMORTAZAVI e HAJMIRSADEGHI, 2007; KNEZ et al., 2014).

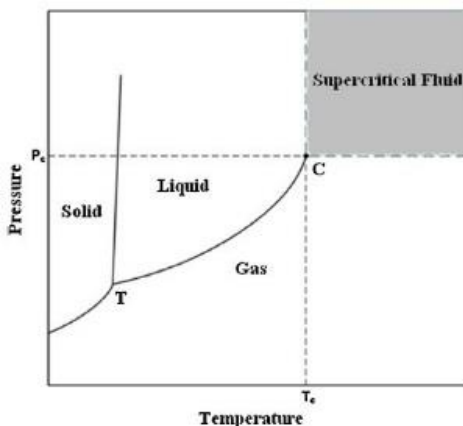
O processo de extração pode ser dividido em duas etapas: extração e separação dos componentes solúveis no solvente supercrítico. Pode ser aplicada a uma matriz sólida, líquida ou viscosa. Na extração, o fluido supercrítico escoia através de um leito fixo de partículas dissolvendo os componentes extraíveis. Posteriormente, a mistura solvente e componentes extraídos é encaminhada ao separador. Neste, a pressão é reduzida, ocasionando a vaporização do solvente e na precipitação do soluto, o qual será coletado e analisado (BRUNNER, 1994; ARAUCO, 2013).

Este processo pode ser aplicado em uma grande variedade de setores industriais, como no processamento de alimentos, processamento de subprodutos, extração de substâncias de produtos naturais e processamentos ambientais (HERRERO et al., 2010). Além disso, pode ser utilizado em indústrias de perfumes e cosméticos, produtos farmacêuticos, têxteis, eletrônicos, aerogeis, materiais cerâmicos e inovadores, indústrias de petróleo, lavanderias de limpeza a seco, processos de cromatografia, processos envolvendo a nanotecnologia, produção de biodiesel e várias outras aplicações novas e futuras (MARCHETTO e AZIZ, 2014).

3.3.4.1 Propriedade dos fluidos supercríticos

Com o intuito de entender o principal fundamento de uma substância em seu estado supercrítico, faz-se necessário analisar a Figura 5. No diagrama, cada substância apresenta um único ponto crítico, definido como a temperatura característica, T_c , e a pressão característica, P_c , no qual não existe diferença entre as fases líquida e gasosa. Como representado na figura, os fluidos supercríticos são definidos como substâncias que apresentam temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico (ESFANDIARI, 2015).

Figura 5 - Diagrama de fases.



Fonte: Esfandiari (2015).

Analisando o diagrama da Figura 5, verifica-se que existem três linhas que delimitam três regiões, que correspondem aos três estados físicos: sólido, líquido e gasoso. Os pontos que se encontram ao longo das linhas, ou seja, entre os estados, definem o equilíbrio entre duas fases. A pressão de vapor inicia-se no ponto triplo, T, e termina no ponto crítico, C. No ponto crítico, a T_c corresponde a maior temperatura na qual um gás pode ser convertido para um líquido, pelo aumento da pressão. Já a pressão crítica, corresponde a maior pressão na qual um líquido pode ser convertido a um gás, pelo aumento da temperatura. Nessa região sombreada, região crítica, as substâncias apresentam propriedades de gás e líquido.

Assim sendo, no estado supercrítico, as substâncias não apresentam as propriedades específicas quando estão presentes no estado líquido ou gasoso. A substância no seu estado supercrítico possui algumas propriedades de gás, como difusão, viscosidade e tensão superficial, e de líquido, como densidade e poder de solvatação. E isto justifica o uso dessas substâncias em processos de separação, extraindo compostos em um menor período de tempo (AZMIR et al, 2013). Ou seja, os fluidos apresentam densidades como os líquidos, propriedades de transportes como os gases e poder solvente que pode ser ajustado por alterações na temperatura e na pressão.

Como pode ser verificado a seguir, Tabela 1, o fluido supercrítico apresenta uma densidade próxima a de líquidos, uma viscosidade comparável à dos gases e uma difusividade com um valor maior que a

de líquidos. Além disso, quando um fluido encontra-se acima de suas condições críticas, como na condição de pressão equivalente a quatro vezes mais a sua pressão crítica, suas propriedades físicas também são comparáveis aos líquidos e gases (SANTOS, 2012).

Tabela 1 - Comparação de algumas propriedades físicas do gás, líquido e fluido.

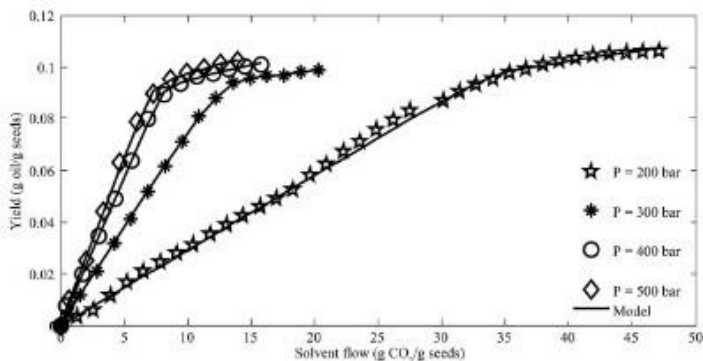
<i>Propriedades físicas</i>	<i>Gás</i> (1atm-30°C)	<i>Fluido supercrítico</i>		<i>Líquido</i> (15-30°C)
		Tc, Pc	Tc, 4Pc	
Coefficiente de difusão (cm ² .s ⁻¹)	0,1-0,4	0,7 x 10 ⁻³	0,2 x 10 ⁻³	(0,2-2) x 10 ⁻⁵
Viscosidade (g.cm ⁻¹ .s ⁻¹)	(1-3) x 10 ⁻⁴	(1-3) x 10 ⁻⁴	(3-9) x 10 ⁻⁴	(0,2-3) x 10 ⁻²
Densidade (g.L ⁻¹)	(0,6-2) x 10 ⁻³	0,2-0,5	0,4-0,9	0,6-0,6

Fonte: Santos (2012).

Diante disto, o processo de extração com fluido supercrítico corresponde a uma das tecnologias de alta pressão. Dentre as inúmeras variáveis envolvidas neste processo, a pressão é a que mais influência na extração, sendo a principal responsável por estabelecer as respostas sobre os aspectos técnicos e econômicos do processo. Além disso, a pressão pode influenciar outros pontos, o mais propenso corresponde a densidade. É a partir dela, que consegue-se verificar o quão próximo o CO₂ supercrítico atinge o seu poder solvente semelhante a um líquido (DE MELO et al., 2014).

O efeito da pressão do CO₂ supercrítico na dinâmica de extração está bem estabelecida na literatura, onde indica que o aumento na pressão operacional tem um efeito positivo no rendimento global. Isto ocorre, porque um aumento na pressão, em uma temperatura constante, faz com que a densidade de CO₂ supercrítico aumente, o que aumenta o seu poder solvente e, conseqüentemente, a taxa de extração (DUBA et al., 2015). Este fato pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 - Curvas de extração de diferentes pressões: Rendimento do óleo versus consumo do solvente.

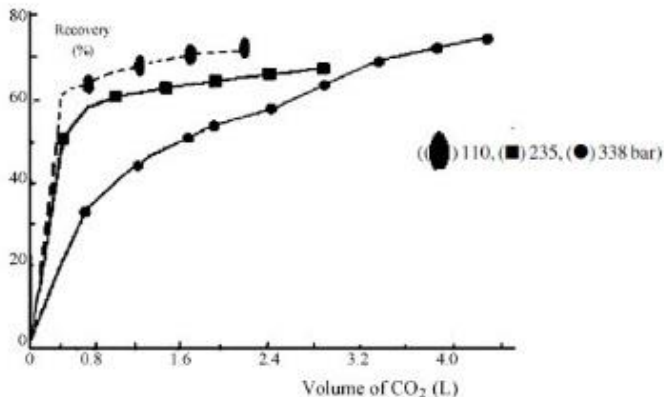


Fonte: Duba et al. (2015).

A Figura 6 expressa a cinética de extração supercrítica do óleo da semente de uva, utilizando como solvente o CO_2 . Duba et al. (2015) plotaram os resultados do rendimento da extração *versus* o consumo do solvente, trabalhando em um intervalo de pressão de 200 a 500 bar, em uma determinada temperatura. Observando o gráfico, verifica-se que quanto maior a pressão, maior a solubilidade do solvente e, conseqüentemente, maior o rendimento da extração. No entanto, a viabilidade econômica em se usar altas pressões deve ser estudada para cada extração.

O aumento da pressão poderá estar associado não só a um aumento no consumo de energia, mas também a um aumento na quantidade de solvente necessário para o processo de extração, como pode ser visualizado na Figura 7.

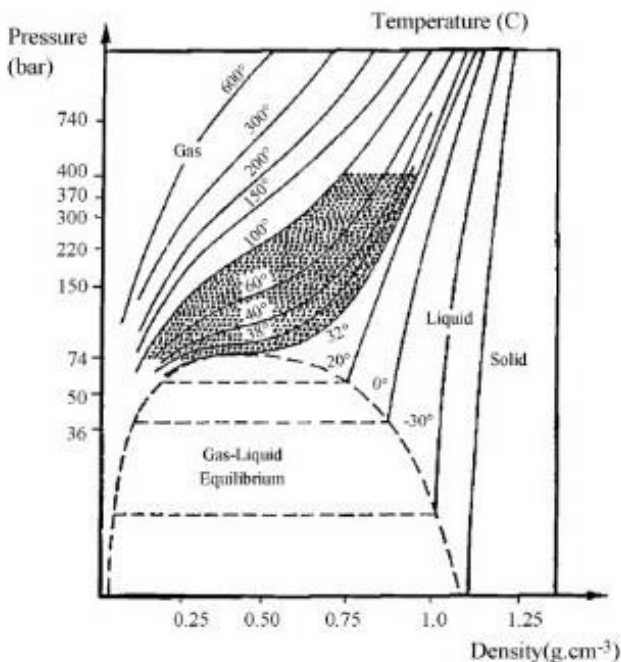
Figura 7 - Variação do rendimento de extração do diuron a partir de um solo poluído contra o volume de CO₂ em diferentes pressões.



Fonte: Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007).

Ao observar os resultados dos seus trabalhos, Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007) verificaram que ao aumentar a pressão no processo seria necessário aumentar o volume do solvente. Deste modo, verifica-se que a pressão do fluido corresponde a um dos principais parâmetros que influenciam a eficiência da extração. Analisando o gráfico a seguir, Figura 8, é possível confirmar que a elevação da pressão, a uma determinada temperatura, ocasiona um aumento na densidade do fluido, melhorando a solubilidade dos solutos (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Figura 8 - Diagrama densidade-pressão para o dióxido de carbono.

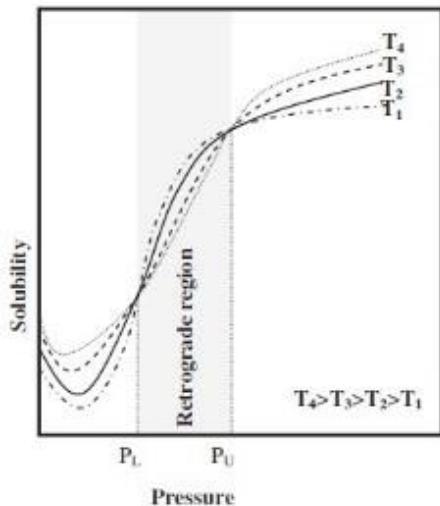


Fonte: Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007).

Além disso, analisando a Figura 8, verifica-se que aumentando a temperatura, a densidade do CO₂ supercrítico diminui, para uma determinada pressão. Isto torna-se mais evidente nos maiores valores de pressão. Além disso, a temperatura também causa um efeito na volatilidade do soluto. Deste modo, prever o efeito do aumento da temperatura em uma amostra é bastante complexo. Para um soluto não-volátil, um aumento da temperatura pode resultar em uma menor taxa de extração devido a diminuição da solubilidade. Já para um soluto volátil, a taxa de extração dependerá do fator que interferirá mais fortemente: a solubilidade no fluido supercrítico, que diminui à medida que a temperatura aumenta, ou a volatilidade, que aumenta com o aumento da temperatura (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Esse efeito complexo da temperatura, pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 9 - Solubilidade versus pressão em diferentes temperaturas.



Fonte: Teor et al., (2013).

Uma vez determinada a pressão de vapor, o aumento da temperatura pode afetar tanto a densidade do solvente supercrítico, quanto a pressão de vapor do soluto. A região retrograde, corresponde a uma região, entre a pressão inferior de passagem (P_L) e a pressão superior de passagem (P_U), onde a solubilidade de um soluto diminui com o aumento da temperatura. Essa diminuição da solubilidade do soluto é ocasionada pelo efeito dominante de uma rápida diminuição da densidade. Acima e abaixo da região retrograde, a solubilidade aumenta com a temperatura, onde o efeito da pressão de vapor de um soluto domina (TEOR et al., 2013).

No processo de extração supercrítica, vários solventes podem ser utilizados para o processo. Entretanto, a viabilidade da técnica, correspondente as propriedades críticas, a toxicidade, o custo e o poder de solvatação, são os principais fatores que determinam o solvente mais adequado. Alguns solventes e suas propriedades críticas podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades críticas dos solventes utilizados nos processos de extração supercrítica.

<i>Solvente</i>	<i>Temperatura crítica (K)</i>	<i>Pressão crítica (MPa)</i>	<i>Volume crítico (cm³/mol)</i>	<i>Referência</i>
Amônia	405,4	11,35	72,5	Jacobson et al. (1997)
CO ₂	304,1	7,37	94,1	See main text for examples
Éter dimetil	400,1	5,27	171,0	Cathpole et al. (2003)
Etanol	305,3	4,87	145,5	Mohamed et al. (2002)
Etileno	282,3	5,04	131,0	Shende e Lombardo (2002)
Metanol	512,6	8,09	118,0	Capriel et al. (1986)
n-Hexano	507,5	3,02	368,0	Joyce e Thies (1997)
Propano	369,8	4,25	200,0	Catchpole et al. (2003)
Água	647,1	22,06	55,9	Leal et al. (2008)
Xenon	290,1	5,80	118,0	Liang e Tilotta (1998)

Fonte: Pereira e Meirelles (2010).

Entre os solventes na tabela, alguns merecem destaque. A água de alta pressão é bastante utilizada em várias matrizes, tais como solo, madeira e alimentos, as propriedades de mudanças físico-químicas da água é explorada, para extrair os solutos desejáveis. O etanol é um outro solvente que vem sendo investigado. Ele apresenta uma temperatura crítica próxima ao do CO₂, é inofensivo para produtos alimentares termossensíveis. O propano e o éter dimetilico, também têm sido estudados como solventes alternativos. Ambos têm pressões mais baixas do que a pressão crítica do CO₂ (PEREIRA e MEIRELLES, 2010).

O solvente mais utilizado corresponde ao dióxido de carbono, pois é de baixo custo, inócuo, não tóxico, não reativo, não inflamável, não poluente e tem uma baixa temperatura crítica ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$) e uma pressão crítica moderada ($P_c = 7,38 \text{ MPa}$) (ESFANDIARI, 2015). Além disso, o CO₂ também é atraente por causa de sua alta

difusividade, combinado com a sua força solvente facilmente ajustável. Outra vantagem é que o CO₂ é gasoso à temperatura ambiente e sob pressão, o que torna a recuperação do analito muito simples e fornece analitos sem solventes (HERRERO et al., 2010).

A principal desvantagem do dióxido de carbono é a sua baixa polaridade, mesmo em altas densidades. Porém, este problema pode ser superado empregando-se modificadores polares, cossolventes, para alterar a polaridade do fluido supercrítico e para aumentar o seu poder de solvatação, melhorando a eficiência da extração. Normalmente, uma pequena quantidade de um modificador é considerada como útil para melhorar significativamente a polaridade do dióxido de carbono. Acredita-se que a razão para o melhoramento do processo é devido a interação cossolvente-soluto (PEREIRA e MEIRELLES, 2009).

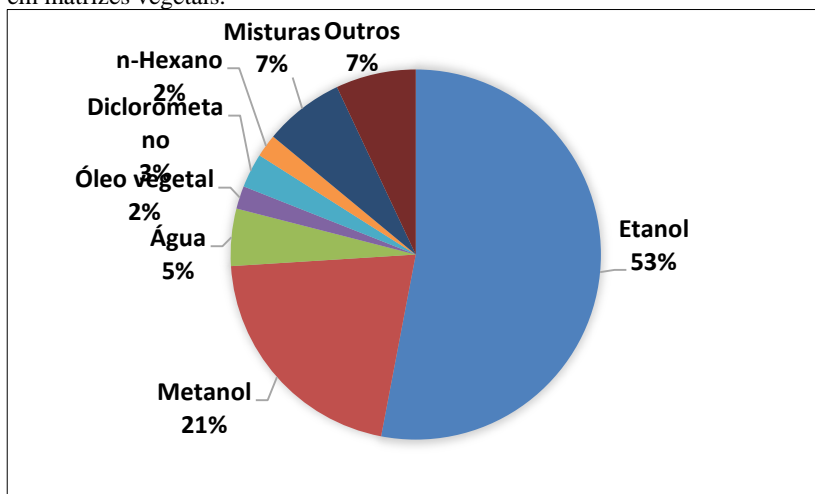
Além disso, vale salientar que a estrutura física da matriz vegetal apresenta grande importância, já que a eficiência do processo está relacionada à capacidade do fluido supercrítico de se difundir na matriz. Assim, diferentes fatores, tais como, tamanho da partícula, forma, superfície, porosidade, umidade, nível de solutos extraíveis e a natureza da matriz vegetal podem interferir significativamente em extrações com fluidos supercríticos (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

O tamanho de partícula apresenta um papel importante na taxa de extração. Quando as partículas são utilizadas com tamanhos muito pequenos, elas permitem uma difusão mais rápida do solvente na matriz, devido ao aumento da área superficial e redução do caminho difusivo. Todavia, partículas muito pequenas podem ocasionar a adsorção do soluto já extraído; formação de caminhos preferenciais no leito de extração; ou ainda, provocar perdas de compostos voláteis durante o seu processo de redução de tamanho. A dimensão ótima deve ser escolhida cuidadosamente, analisando o conteúdo de água da matéria prima e a quantidade de compostos líquidos extraíveis, já que podem interferir negativamente no processo, devido a presença do fenômeno de coalescência entre as partículas (REVERCHON e DE MARCO, 2006; POURMORTAZAVI e HAJUMIRSADEGHI, 2007; ARAUCO, 2013).

3.3.4.2 Utilização de cossolvente

Com relação aos cossolventes, os autores De Melo et al. (2014) plotaram o seguinte gráfico, conforme Figura 10, onde apresentam uma estatística dos cossolventes mais utilizados, analisando 166 publicações com estudos baseados na extração com fluidos supercríticos.

Figura 10 - Cossolventes mais utilizados em extração com fluidos supercríticos em matrizes vegetais.



Fonte: Adaptado de De Melo *et al.* (2014).

Dentre os cossolventes, o etanol correspondeu ao modificador mais utilizado, selecionado em 53% dos trabalhos analisados. Isso é justificável, pois, assim como o CO₂ supercrítico, o etanol é considerado um solvente seguro, tanto ao nível da saúde humana, quanto ao nível ambiental. O etanol é uma substância polar, deste modo, a adição de pequenas quantidades pode aumentar de forma significativa a polaridade do solvente supercrítico (De Melo *et al.*, 2014).

O segundo modificador mais utilizado correspondeu ao metanol, usado em 21% dos trabalhos analisados, seguido por água e diclorometano, com 5% e 3%, respectivamente. Apesar do metanol ser mais polar que o etanol, ele pode apresentar perigos para a saúde humana.

É necessário avaliar de forma cuidadosa todos os parâmetros que podem influenciar no processo, fazendo boas escolhas, em relação ao solvente e a necessidade em se utilizar cossolvente, para que estes atuem de forma eficiente e garantam um ótimo rendimento, sem custos desnecessários.

3.3.4.3 Curvas de extração

Uma curva de extração é construída a partir da quantificação do extrato bruto em um fluxo contínuo de solvente. Normalmente, é

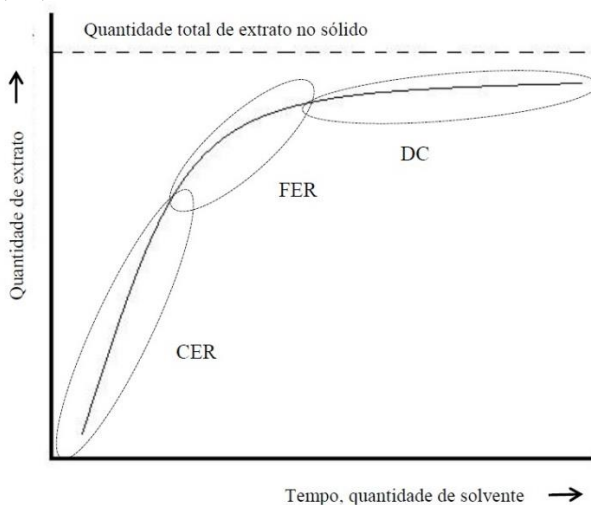
representada por um gráfico de massa de extrato acumulada em função do tempo ou quantidade de solvente consumido. Como a taxa de extração não é uma função linear do tempo, diversos comportamentos podem ser analisados através dessas curvas.

Essas curvas dependem dos parâmetros do processo e dos fenômenos envolvidos durante a extração. Desta forma, é difícil comparar curvas obtidas a partir de matérias-primas diferentes e de diferentes equipamentos, porém, as informações que ela pode fornecer, como a duração da taxa constante de extração, são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

De acordo com Silva (2013), os processos de extração apresentam uma curva típica, caracterizada por três etapas, controlados por três mecanismos de transferências de massa:

- I. Etapa com taxa constante de extração (CER): o soluto encontra-se presente em grandes quantidades na superfície das partículas da matriz, denominado de “soluto de fácil acesso”. Neste período, a convecção corresponde ao mecanismo dominante, controlado pelo fluxo do solvente. A inclinação da curva é dada pela solubilidade do soluto no solvente;
- II. Etapa com taxa decrescente de extração (FER): a camada de soluto de fácil acesso é reduzida. Como nem todas as partículas estão revestidas pelo soluto, apresentando falhas na sua cobertura, a taxa de transferência de massa diminui rapidamente. Nesta etapa, os mecanismos de transferência de massa por difusão e por convecção ocorrem simultaneamente;
- III. Etapa difusional (DC): a camada externa do soluto praticamente desaparece. O mecanismo de transferência de massa ocorre por difusão do solvente no interior das partículas sólidas. Na Figura 11 é possível observar a curva típica de extração.

Figura 11 - Curva de extração do processo de SFE com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); taxa difusional (DC).



Fonte: SILVA (2013).

A representação dessa curva de extração pode ser utilizada para determinar alguns parâmetros do processo, como tempo de extração e caracterizar as etapas de extração supercrítica, por exemplo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

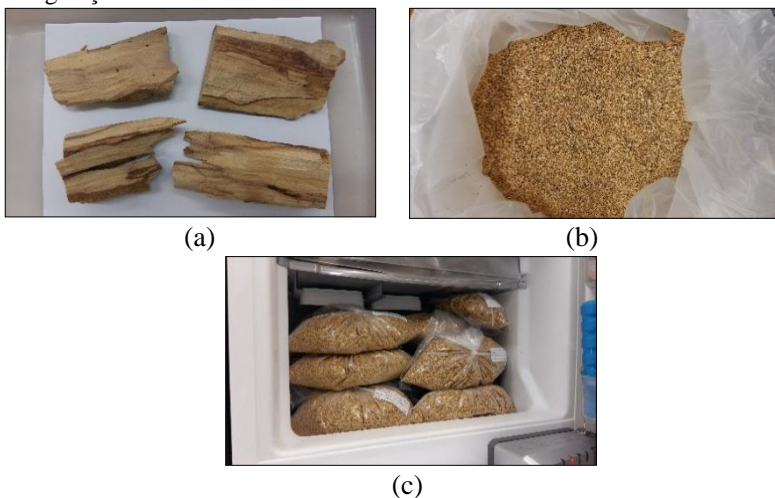
O presente trabalho consistiu em obter o óleo essencial e o extrato de *Bursera graveolens*, utilizando técnicas de extração de baixa e alta pressão. Dentre as técnicas de baixa pressão, foram realizadas extrações via hidrodestilação, soxhlet e ultrassom de ponteira. Na hidrodestilação, a água foi utilizada como solvente. Já nas extrações em soxhlet e ultrassom, dois solventes de polaridades diferentes foram empregados, o hexano e o etanol. A técnica de extração de alta pressão utilizada foi a extração com CO₂ supercrítico puro e com adição de cossolvente, no caso o etanol. As dinâmicas de extração e a análise estatística foram estudadas. Além da verificação do rendimento, foi realizada a caracterização do óleo essencial e dos extratos obtidos de acordo com a sua composição química. Buscou-se identificar os compostos que apresentam atividade repelente e inseticida contra o *Aedes aegypti*, onde a escolha desses compostos foi baseada em dados presentes na literatura. Além disso, comparou-se as metodologias aplicadas e determinou-se uma técnica, com as melhores condições operacionais, fornecendo uma metodologia que proporcione uma maior seletividade dos compostos de interesse quando o processo de extração do material lenhoso da *Bursera graveolens* for empregado.

4.1 MATÉRIA PRIMA

O Palo santo (*Bursera graveolens*) foi cedido pela Escuela Superior de Administracion y Negocios - ESAN, localizada em Lima, no Peru. O material lenhoso foi coletado na cidade de Piura, Costa Norte do Peru, importado e direcionado para o Laboratório de Controle e Processos Poliméricos - LCP, do Departamento da Engenharia Química e Engenharia de alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - EQA/UFSC.

Quando recebida no LCP, a matéria prima foi submetida a uma primeira moagem e acondicionada em embalagens de polietileno, contendo aproximadamente 300 g, identificadas e mantidas sob refrigeração em um freezer doméstico a -18 °C. A Figura 12 mostra a matéria prima em pedaços de madeira, em partículas com granulometrias diferentes e em embalagens de polietileno.

Figura 12 - Matéria prima em: (a) pedaços de madeira, (b) em partículas com granulometrias diferentes e (c) armazenadas em embalagens de polietileno sob refrigeração.

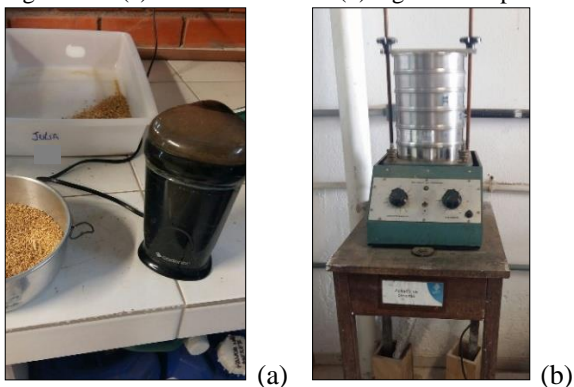


Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.1.1 Distribuição granulométrica

Inicialmente, a matéria prima foi moída grosseiramente, em um comércio de madeira serrada. Posteriormente, a matéria prima foi submetida a uma segunda moagem, em um moedor de café, e classificada em um agitador de peneiras vibratório vertical, Figura 13.

Figura 13 - (a) Moedor de café e (b) Agitador de peneiras.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Vale salientar que este procedimento foi realizado diversas vezes, em dois/três dias antes da realização de uma determinada extração, com intuito de diminuir as perdas dos compostos voláteis do material lenhoso. Então, baseando-se na quantidade necessária para a realização de um ou mais ensaios de extração, a moagem foi executada. Assim, em determinados dias, retirou-se uma quantidade suficiente de matéria prima, colocou-se em uma bandeja de plástico e secou em estufa com circulação de ar, por 20 minutos, a 35 °C. Posteriormente, o material foi submetido a uma segunda moagem e classificada por um agitador de peneiras. Foi empregado o sistema de peneiras da série de *Tyler*, com aberturas sequenciais de 35 *mesh* (500 μm), 45 *mesh* (355 μm), 60 *mesh* (250 μm), 70 *mesh* (212 μm), 80 *mesh* (180 μm), e fundo, onde foi submetido a uma agitação por 20 minutos. Grande parte do material ficou retido na granulometria de 45 *mesh*. Dessa forma, optou-se por utilizar essa fração para a realização dos experimentos.

Após a separação granulométrica, a matéria prima foi acondicionada em embalagens de polietileno, de acordo com as suas frações, identificadas e mantidas sob refrigeração. A fração ± 35 *mesh* não foi armazenada durante muito tempo, pois foi submetida ao reprocessamento no moinho e reclassificada granulometricamente.

4.1.2 Caracterização do leito de partículas

A caracterização do leito de partículas, dentre os diversos aspectos analisados, busca representar as características físicas necessárias para avaliar as propriedades de transporte, como a porosidade do leito e a densidade específica do leito.

A **densidade real** (ρ_r) ou absoluta da matriz vegetal seca foi determinada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), utilizando-se a metodologia de picnometria de gás hélio.

Esse método apresenta bons resultados, uma vez que o gás hélio penetra nos menores poros do material sólido e nos espaços vazios entre as partículas.

A **densidade aparente** (ρ_a) do leito de partículas foi calculada por meio da medida da massa de *B. graveolens* suficiente para ocupar um recipiente de volume conhecido. No presente trabalho, o volume conhecido corresponde ao volume do extrator utilizado nos experimentos em meio supercrítico, onde apresenta um volume de 10 cm^3 . Essa medida é expressa em g/cm^3 e definida de acordo com a Equação 1:

$$\rho_a = \frac{\text{massa de } B.\textit{graveolens (g)}}{\text{volume ocupado (cm}^3\text{)}} \quad (1)$$

A **porosidade total do leito** (ϵ) de partículas de *B. graveolens* foi calculada utilizando a massa específica aparente do leito, de acordo com a Equação 2:

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (2)$$

4.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

Foram utilizadas técnicas de extração de baixa e alta pressão. O método de extração de baixa pressão aplicado foi a extração por hidrodestilação e a extração por solventes de diferentes polaridades, extração em soxhlet e ultrassom de ponteira. O método de alta pressão estudado foi o de extração com dióxido de carbono no estado supercrítico puro e com adição de cossolvente.

Os métodos aplicados foram comparados em termos de rendimento e composição química do óleo essencial e dos extratos obtidos da *B. graveolens*. Os três métodos de baixa pressão foram realizados no LATESC e o método de alta pressão foi executado no LCP, ambos do EQA/UFSC.

Vale salientar que, antes da realização de qualquer técnica de extração utilizada no presente trabalho, a matéria prima foi submetida a secagem em estufa, por 20 minutos, em temperaturas de 25-28 °C, com intuito de remover a umidade adquirida durante o seu armazenamento na geladeira.

4.2.1 Extração por hidrodestilação

Para a realização dos experimentos, utilizou-se um aparelho tipo *Clevenger*, como apresentado na Figura 14. As extrações foram realizadas de acordo com o método adaptado descrito por Santos (2004), com tempo total de extração de 5 horas.

Figura 14: Aparelho tipo *Clevenger*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O experimento foi realizado em triplicata. Pesou-se 30g de matéria prima, 45 *mesh* (355 μm), em uma balança analítica e transferiu-se para um balão de vidro de fundo redondo, com auxílio de um funil, Figura 15 (a). Em seguida, utilizando uma proveta, foi adicionado o solvente, água destilada, aplicando uma proporção 3:100 g/L.

Figura 15 - (a) Preparo da amostra para a realização da extração; (b) Aparelho *Clevenger* acoplado ao balão e este, por sua vez, a manta térmica e (c) Óleo decantado no tubo graduado do aparelho *Clevenger*.



(a)

(b)

(c)

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

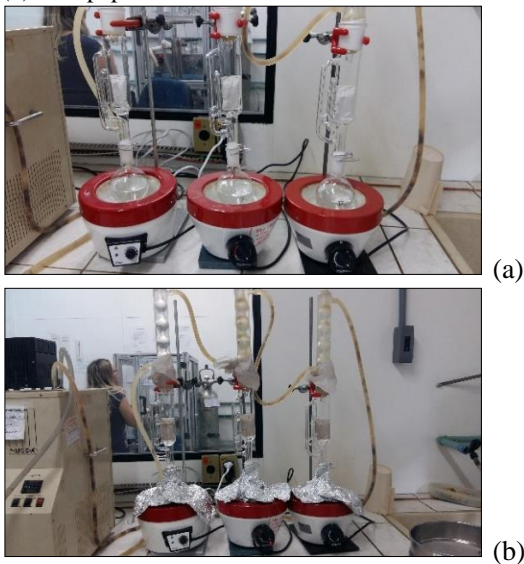
O balão foi conectado ao aparelho *Clevenger* e o conjunto foi conectado a uma manta de aquecimento para elevar a temperatura de ebulição do solvente (100°C), Figura 15 (b). O sistema operou em circuito fechado por um tempo suficiente para que o volume do óleo no tubo graduado do equipamento decantasse e permanecesse constante, Figura 15 (c). Ao final do tempo de extração, o volume de óleo obtido foi medido na coluna graduada do aparelho *Clevenger*, transferido para um frasco âmbar por meio da válvula presente na base da coluna e armazenado sob refrigeração em um freezer doméstico. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.2 Extração por soxhlet

O método de extração em soxhlet foi aplicado com intuito de analisar o teor dos compostos presentes no extrato de *B. graveolens* e compará-los com os resultados obtidos pela extração com fluido supercrítico. Foram utilizados dois solventes de diferentes polaridades separadamente, hexano P.A. (apolar) e álcool etílico P.A. (polar), seguindo a metodologia descrita por Santos et al. (2015).

O aparelho utilizado para esse tipo de extração foi composto por um balão de vidro de fundo redondo contendo o solvente, conectado a um extrator e um condensador, onde o cartucho da matéria prima ficou retido dentro do extrator. O sistema foi acoplado a uma manta de aquecimento para elevar a temperatura de ebulição do solvente. Em volta dos balões, foi usado papel alumínio com intuito de evitar a dissipação de energia e ter um maior controle da temperatura de aquecimento, Figura 16.

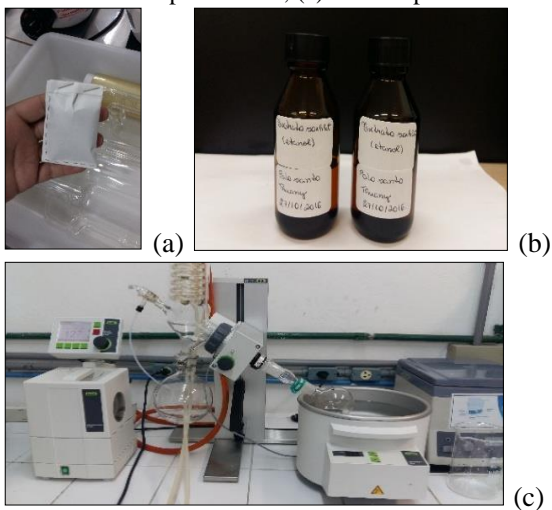
Figura 16 - Aparelho para a realização da extração por soxhlet. (a) visão geral e (b) com papel alumínio.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Para realizar a extração, pesou-se 5 g da matéria prima em cartuchos de papel de filtro, Figura 17 (a), a serem extraídos em 150 mL de solvente, ou seja, uma proporção amostra-solvente de 1:30 (g/mL). Foi determinado um tempo de extração de 5 horas. Após a extração, foram selecionados dois balões para a retirada de duas alíquotas de extrato de 30 mL, onde foram transferidas para dois frascos âmbar separadamente, Figura 17 (b), e armazenadas sob refrigeração para análises posteriores. Em seguida, utilizou-se o rotaevaporador para eliminar o solvente presente nos balões, Figura 17 (c), e determinar o rendimento do óleo obtido. As extrações foram realizadas em triplicata.

Figura 17 - (a) Cartucho com o material particulado; (b) Frasco âmbar com os extratos obtidos por soxhlet; (c) Rotaevaporador.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.2.3 Extração por ultrassom

O processo de extração foi realizado em um equipamento de ultrassom de ponteira, representado na Figura 18.

Figura 18 - Equipamento de ultrassom assistida de ponteira.



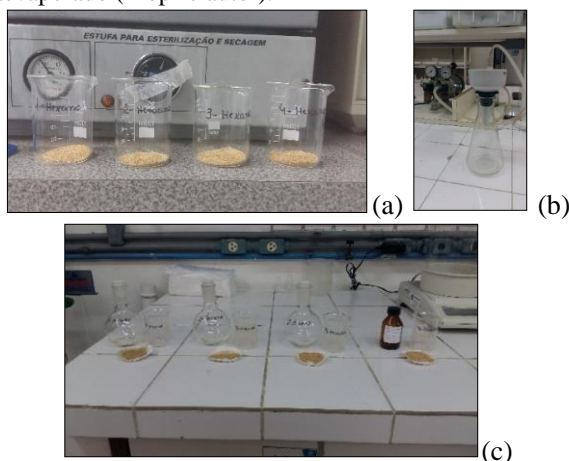
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

As especificações aplicadas para esse tipo de extração foram: Modelo Ultrassom de Ponteira, Macroponteira, Potência 500 W, Frequência 20 KHZ e Amplitude 70%. Os solventes utilizados e a proporção amostra:volume de solvente foram os mesmos empregados na extração com soxhlet (seção 3.2.2), seguindo a metodologia adaptada de Luque-García e Castro, 2003.

Inicialmente, pesou-se 1g da matéria prima, com auxílio de uma balança analítica, em um bécker de vidro de 100 mL e adicionou-se 30 mL do solvente, medido com auxílio de uma proveta de vidro de 100 mL. Em seguida, esse bécker foi colocado em uma caixa de isopor contendo gelo e submetido as ondas de ultrassom por um tempo de 4 minutos. Depois, as amostras foram filtradas a vácuo, utilizando um kitasato e uma bomba de vácuo.

O experimento foi realizado em triplicata e um ensaio extra, onde o primeiro, o segundo e o terceiro extrato obtidos foram transferidos para um balão de vidro, onde, após a filtração, as amostras foram submetidas a rotaevaporação para eliminação do solvente e determinação do rendimento. O quarto extrato, ensaio extra, foi transferido para um frasco âmbar. A Figura 19 apresenta as amostras preparadas para a execução do experimento, o kitassato e a bomba de vácuo utilizados para o procedimento de filtração e o material filtrado, armazenado tanto em balões, para ser rotaevaporado, quanto no frasco âmbar, para ser refrigerado.

Figura 19 - (a) Preparo das amostras; (b) Filtração a Vácuo; (c) Extrato filtrado para ser rotaevaporado (Próprio autor).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.2.4 Extração supercrítica

O processo de extração com dióxido de carbono em estado supercrítico foi realizado no LCP, no EQA-UFSC.

O equipamento utilizado foi um HPLC-SC da Jasco Inc, com opção de extração e cromatografia supercrítica, como pode ser visualizado na Figura 20.

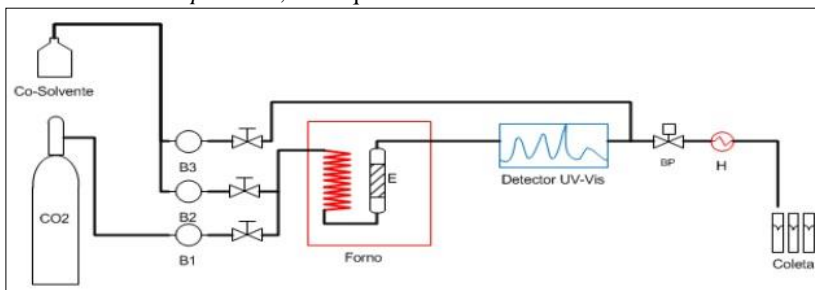
Figura 20 - Unidade de extração supercrítica do Laboratório de Controle de Processos: HPLC SC.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Este equipamento é constituído por três bombas: bomba de CO₂ (B1), bomba de cossolvente (B2) e bomba de eluente (B3); forno de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-vis em linha, válvula *back-pressure* automatizada (BP), sistema de aquecimento (H), responsável por controlar o efeito do resfriamento provocado pela expansão do CO₂. Utilizou-se o vaso de extração (E), com volume interno de 0,010 L ($1,0 \times 10^{-6} \text{ m}^3$), com filtro de 10 μm na saída do extrator, evitando uma contaminação na linha com particulados sólidos. O equipamento possui uma interface de comunicação LC-net II (Jasco Inc.) com um computador, onde é possível controlar as variáveis operacionais, por meio do *software* ChromNAV, como temperatura, vazão de solvente, cossolvente e eluente, além da pressão mediante a *back-pressure* automatizada.

Figura 21 - Unidade de extração (HPLC - SC). B - bomba HPLC, E - extrator, BP - válvula *back-pressure*, H - aquecimento.



Fonte: Arauco, 2013.

A técnica de extração supercrítica foi empregada para a determinação do rendimento global de extração, com o emprego de CO₂ puro ou com cossolvente, e também para a obtenção de curvas de extração, necessárias para comparação e futuras aplicações.

No processo de extração supercrítica, foi utilizado o método dinâmico, que consiste na passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida, nos experimentos cinéticos e na determinação do rendimento global de extração (FERREIRA, 2009).

O tempo de extração foi determinado por meio de um teste preliminar de extração com CO₂ supercrítico e adição de cossolvente, aplicando uma pressão de 140 bar, 38 °C, 15 % de cossolvente e vazão de 3 ml/min. Assim, além de determinar o tempo de extração, também foi possível analisar o perfil do extrato supercrítico obtido da *B. graveolens*.

Deste modo, o tempo de extração utilizado em todos os ensaios envolvendo a extração supercrítica foi fixado em 120 min, já que neste tempo, o rendimento de extração aproximou-se da etapa de taxa nula de extração. Com relação a vazão de solvente, empregou-se 3ml/min em todos os ensaios supercríticos.

4.2.4.1 Planejamento experimental

Para analisar a influência da pressão e da temperatura no rendimento global de extração, bem como na seletividade de compostos de interesse, aplicou-se um planejamento fatorial completo, com dois fatores, cinco níveis e 2 repetições no ponto central, designado como planejamento em estrela. Este planejamento consistiu na análise de uma série de 10 experimentos, onde a pressão e a temperatura foram as

variáveis empregadas. Na tabela 3, é possível observar os valores das variáveis e dos níveis utilizados nesse planejamento.

Tabela 3 - Valores utilizados no planejamento em estrela para dois fatores.

<i>Variáveis</i>	<i>Código</i>	<i>-α</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>+α</i>
Pressão (bar)	P (bar)	80	110	140	170	200
Temperatura (°C)	T (°C)	32	35	38	41	44

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No planejamento em estrela, os níveis estudados foram: $\pm \alpha$, ± 1 e 0, onde o valor de α foi calculado da seguinte forma:

$$\alpha = 2^{\frac{n}{4}} = 2^{\frac{2}{4}} = 1,41$$

E n corresponde ao número de fatores estudados.

A tabela 4, a seguir, apresenta a matriz do planejamento em estrela.

Tabela 4 - Valores codificados e reais do planejamento em estrela para dois fatores, pressão e temperatura.

<i>Ensaios</i>	<i>P_{Cod} (bar)</i>	<i>T_{Cod} (°C)</i>	<i>P_{Real} (bar)</i>	<i>T_{Real} (°C)</i>
1	-1	-1	110	35
2	-1	+1	110	41
3	+1	-1	170	35
4	+1	+1	170	41
5	-α	0	80	38
6	+α	0	200	38
7	0	-α	140	32
8	0	+α	140	44
9	0	0	140	38
10	0	0	140	38

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Os experimentos foram realizados utilizando, aproximadamente, 3,0 gramas do material lenhoso. Foram realizados 9 experimentos para estimar os coeficientes do modelo empírico e mais 1 experimento para determinar o erro experimental.

Após cada ensaio de extração, os extratos foram pesados em balança analítica e armazenados em frascos na geladeira, a -18°C . O rendimento global de extração (Y) foi calculado pela razão entre a massa de extrato obtida (M_{extrato}) e massa de *B. graveolens* ($M_{\text{B.graveolens}}$) utilizada para formar o leito, de acordo com a seguinte Equação 3:

$$Y (\%) = \frac{M_{\text{extrato}}}{M_{\text{B.graveolens}}} \times 100 \quad (3)$$

Vale salientar que esta mesma equação foi utilizada para determinar o rendimento nas extrações à baixas pressões.

Para analisar a influência da pressão, temperatura e cossolvente no rendimento global de extração e a seletividade de compostos de interesse, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR, que corresponde a um fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 2 repetições no ponto central, totalizando 16 ensaios. A Tabela 5 apresenta os valores utilizados no planejamento DCCR e a Tabela 6 os codificados e reais do planejamento DCCR.

Tabela 5: Valores utilizados no planejamento em estrela para dois fatores.

<i>Variáveis</i>	<i>Código</i>	<i>-α</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>	<i>+α</i>
Pressão (bar)	P (bar)	80	110	140	170	200
Temperatura (°C)	T (°C)	32	35	38	41	44
Cossolvente (%)	CS (%)	5	10	15	20	25

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Tabela 6: Valores codificados e reais do planejamento DCCR para três fatores, pressão, temperatura e cossolvente.

<i>Ensaio</i>	P_{Cod}	T_{Cod}	CS_{Cod}	P_{Real}	T_{Real}	CS_{Real}
1	-1	-1	-1	110	35	10
2	+1	-1	-1	170	35	10
3	-1	+1	-1	110	41	10
4	+1	+1	-1	170	41	10
5	-1	-1	+1	110	35	20
6	+1	-1	+1	170	35	20
7	-1	+1	+1	110	41	20
8	+1	+1	+1	170	41	20
9	-1,68	0	0	80	38	15
10	+1,68	0	0	200	38	15
11	0	-1,68	0	140	32	15
12	0	+1,68	0	140	44	15
13	0	0	-1,68	140	38	5
14	0	0	+1,68	140	38	25
15	0	0	0	140	38	15
16	0	0	0	140	38	15

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Para o cálculo do rendimento global (Y) em extrações com adição de cossolvente, faz-se necessário evaporar o solvente, inicialmente, e depois utilizar a equação e determinar o rendimento. Deste modo, os frascos contendo os extratos com o etanol, foram colocados em uma estufa por 72 horas, utilizando uma temperatura de 40°C. Em seguida, os frascos foram pesados em uma balança analítica até peso constante. A massa obtida após a evaporação do solvente corresponde a massa do extrato supercrítico com adição de cossolvente de *Bursera graveolens*

Deste modo, após a obtenção da massa dos extratos, a equação de rendimento pode ser utilizada.

Além dos 26 ensaios realizados nos dois planejamentos experimentais, extrações adicionais foram realizadas, com intuito de apresentar o comportamento das variáveis estudadas utilizando outras opções de gráficos, não ficando restrita apenas aos gráficos obtidos pelo *software Statistica*, Tabela 7.

Tabela 7: Experimentos adicionais.

<i>Ensaio adicionais</i>	<i>Pressão (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Cossolvente (%)</i>
1	110	35	0
2	110	38	0
3	110	41	0
4	110	35	20
5	110	41	20
6	140	35	0
7	140	38	0
8	140	41	0
9	140	35	20
10	140	41	20
11	170	35	0
12	170	38	0
13	170	41	0
14	170	35	20
15	170	41	20

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Todos os ensaios adicionais foram realizados em triplicata. Porém, nos ensaios que apresentam as mesmas condições das extrações realizadas no planejamento, este resultado foi considerado, tonando-se necessário a realização de apenas duas extrações para que a média fosse obtida.

A partir dos dados adquiridos, a análise estatística foi realizada utilizando-se o *software Statistica*, versão 10, onde foi possível a obtenção de tabelas e gráficos para um melhor entendimento do resultado. Além disso, em algumas tabelas aplicou-se o teste de Tukey, com um nível de 95% de confiança.

4.2.4.2 Curvas de extração

Os experimentos da dinâmica de extração correspondem a determinação da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração. Estes experimentos foram realizados, tanto para obtenção das curvas de extração supercrítica com CO₂ supercrítico puro de *Bursera graveolens*, quanto de extração com adição de cossolvente.

Para a determinação das curvas de extração foram utilizados frascos de coleta previamente pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempos pré-determinados.

Ao final da coleta, os frascos foram novamente pesados objetivando obter a massa de extrato em função do tempo de extração.

As curvas de extração podem ser obtidas de diferentes formas: I - plotando-se a massa de extrato acumulado em função do tempo; II - massa de CO₂ consumido; ou III - rendimento de extração versus a razão massa de solvente por massa de amostra. No presente trabalho, as curvas de extração foram obtidas de acordo com o item I.

Os experimentos foram realizados utilizando o CO₂ puro ou com adição de cossolvente, nas mesmas condições de pressão, temperatura e cossolvente descritas nos dois planejamentos utilizados. Foram realizadas duas curvas, uma com uma condição ótima do planejamento de extração supercrítica com CO₂ puro, planejamento em estrela, e a outra com uma condição ótima escolhida do planejamento de extração supercrítica com adição de cossolvente, planejamento em DCCR.

4.2.5 Caracterização química do óleo essencial e dos extratos obtidos de *Bursera graveolens*

Para a caracterização química do óleo essencial e dos extratos de *Bursera graveolens* obtidos pelas diferentes técnicas de extração, estudadas no presente trabalho, foram realizadas as análises de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GC-FID), elaboradas no Laboratório de Análises, no EQA-UFSC.

As análises cromatográficas com espectro de massa foram realizadas com um equipamento GC 7890^a, associado a um detector MS Agilent 5975C. A coluna, uma coluna capilar de sílica fundida com HP-5MS (Agilent) (30 m de comprimento x 250 µm i.d. x 0,25 µm de espessura de película composta de fenilmetilpolissiloxano a 5%) foi ligada a um detector quadripolar, que opera no modo EI a 70 eV. O gás hélio foi utilizado como o gás de arraste, a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. As temperaturas de injeção e interface foram de 250 °C e 250 °C, respectivamente, com uma relação de divisão de 1:50. O volume de injeção foi de 1 µL com o auto amostrador Agilent GC Sampler 80 e o programa de temperatura do forno consistiu em subir gradualmente de 40 °C durante 2 min, depois de 3 °C / min para 145 °C, depois de 10 °C / min para 250 °C durante 10 min. Os compostos foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos, inicialmente, a caracterização do leito de extração e da matriz vegetal utilizada nos experimentos. Posteriormente, serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao rendimento e a composição química dos extratos obtidos pelas técnicas de baixa pressão (hidrodestilação, soxhlet e ultrassom) e de alta pressão (extração supercrítica, utilizando CO₂ supercrítico, com e sem adição de cossolvente). Juntamente, serão discutidos os efeitos dos parâmetros pressão, temperatura e cossolvente no rendimento dos extratos supercríticos e as curvas de extração.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

A caracterização do leito de partículas que constitui o leito da extração supercrítica é de fundamental importância para entender a dinâmica de extração e os fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo e, a partir disso, facilitar futuras aplicações desse material lenhoso.

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para massa específica real dos sólidos, massa específica aparente do leito, porosidade do leito e o diâmetro de partículas de *Bursera graveolens*, onde este foi indicado pela análise de granulometria.

Tabela 8 - Parâmetros do leito fixo

Parâmetros	
Densidade real (ρ_r , Kg/m ³)	1,3307 (\pm 0,008)
Densidade aparente (ρ_a , Kg/m ³)	0,3156 (\pm 0,04)
Porosidade do leito (ϵ)	0,763
Diâmetro da partícula (mm)	0,355

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Romero (2007), pesquisando a extração do óleo de *Sacha inchi*, utilizou três tamanhos de partículas diferentes para a extração do óleo com CO₂ supercrítico. O autor observou um pequeno aumento no rendimento de extração com a diminuição do tamanho de partícula, já que o acesso ao óleo tornou-se mais fácil. O maior rendimento de extração foi com a utilização de um tamanho de partícula de 0,387 mm. Deste modo, o presente trabalho utilizou uma partícula com diâmetro de 0,355 mm, mostrando-se de acordo com o autor citado. Além disso, vale

ressaltar a dificuldade para reduzir o diâmetro das partículas de *Bursera graveolens*, material lenhoso de difícil fragmentação, o que justifica a não utilização de um diâmetro de partícula menor.

Para todos os métodos de extração, as amostras foram submetidas a secagem em estufa. Deste modo, a análise de umidade não foi realizada.

5.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

5.2.1 Extração por hidrodestilação

A extração do óleo essencial de *Bursera graveolens* foi realizada pela técnica tradicional de hidrodestilação, já que esta corresponde a uma técnica bastante utilizada para a obtenção de óleo essencial de materiais lenhosos.

Assim, com intuito de analisar a composição química presente no óleo essencial de *Bursera graveolens*, foi realizada a hidrodestilação. Os experimentos foram realizados em triplicata. A média do rendimento do óleo essencial obtido foi de 3,55% ($\pm 0,19\%$).

Santana et al. (2009), analisando o efeito anti-inflamatório e a composição química do óleo de *Bursera graveolens*, utilizaram esta técnica e obtiveram um rendimento de 0,05%. Essa diferença no rendimento pode ser justificada pelo menor tempo de duração na extração, já que os autores utilizaram 3,5 horas, enquanto no presente trabalho foi utilizado 5 horas. E, também, pelos diversos fatores inerentes ao material lenhoso, como em relação aos fatores edafoclimáticos e ao período de colheita do material vegetal.

Na Tabela 9 é possível verificar os componentes identificados no óleo essencial de *Bursera graveolens* obtido por hidrodestilação. Foram identificados 48 compostos.

Dentre os compostos identificados, os que apresentaram picos de maior área relativa no cromatógrafo do óleo essencial foram: D-limoneno (14,19%), Alfa-terpineol (12,81%), Germacreno D (8,53%), D-carvona (6,03%) e Cis-carveol (5,23%).

Tabela 9 - Composição química do óleo essencial de *Bursera graveolens* obtido pela técnica de hidrodestilação.

<i>N</i> ^o	<i>Composto</i>	<i>Área relativa (%)</i>
1	D-limoneno	14,1922
2	Alfa-terpineol	12,8126
3	Germacreno D	8,5314
4	D-carvona	6,0338
5	Cis-carveol	5,2293
6	Trans-sesquisabineno hidratado	4,8485
7	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene	4,5259
8	Delta-candineno	2,1787
9	Carveol	2,1066
10	Neoisolongifoleno	1,8688
11	Beta-bisaboleno	1,8498
12	Epizonareno	1,7316
13	Allo-aromadendrene	1,1480
14	Didehydro-cycloisolongifolene	1,1423
15	Orto-cimeno	1,0853
16	Spathulenol	0,9683
17	Trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	0,9573
18	(E,E)-cosmene	0,9558
19	1,3,8-menthatriene	0,8591
20	3,4,4-trimethyl-3-(3-oxo-but-1-enyl)- bicyclo[4.1.0]heptan-2-one	0,7621
21	Mint-furanone	0,6942
22	Beta-elemene	0,5851
23	Cycloheptane,4-methylene-1-methyl-2-(2- methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl-	0,5770
24	Alfa-gurjunene	0,5541
25	Gama.-muurolene	0,5511
26	Perilla alcohol	0,4105
27	Pulegone	0,3949
28	M-methylacetophenone	0,3753
29	Menthol	0,3749
30	Dihydrocarvone	0,3421
31	Dihydrocarveol	0,3292
32	Alfa-amorphene	0,3285
33	Cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0,3142
34	2-methylenebornane	0,2739
35	Perilla aldehyde	0,2584
36	1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7- oxabicyclo[4.1.0]heptan-2one	0,2321
37	Alfa-calacorene	0,2226
38	Calamenene	0,2195
39	Elemol	0,2090

40	Tricyclo[3.2.1.02,7]oct-3-ene, tetramethyl-	2,3,4,5-	0,1957
41	Beta-terpineol		0,1840
42	Eremophilene		0,1722
43	6-isopropenyl-4,8a-dimethyl- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalene-2-ol		0,1558

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

De acordo com SILVA et al. (2016), o óleo essencial obtido de 10 espécies diferentes da família Burseraceae, gênero *Protium*, foi extraído usando a técnica de hidrodestilação. Os autores observaram que o rendimento de óleo essencial entre as espécies variou de 0,8%, o menor rendimento, a 5,4%, o maior rendimento. No entanto, a grande maioria apresentou um rendimento em torno de 2-3%, corroborando com o resultado do presente trabalho. Com relação a composição química dos extratos obtidos, os mesmos autores observaram uma grande complexidade e variação entre os compostos presentes nas amostras, que pode estar relacionada com as condições ambientais, como temperatura e umidade, por exemplo. As substâncias mais comuns encontradas nos extratos foram: hidrocarbonetos monoterpênicos alfa - pineno, limoneno, beta-fellandreno, p-cimeno e o álcool monoterpêneo alfa -terpineol, onde, dentre as espécies analisadas, a *Protium occultum* (Daly), apresentou o limoneno e o alfa-terpineol como seus componentes majoritários, estando de acordo com a composição do extrato obtido no presente trabalho.

Zuniga et al. (2005) extraíram óleo essencial de 8 espécies diferentes de casca do gênero *Bursera*, através da técnica de arraste a vapor, e obtiveram um rendimento de 0,02% a 0,29%. Os mesmos autores identificaram 45 componentes no óleo essencial das cascas, onde os mais abundantes foram o alfa-terpineol, terpin-4-ol, alfa-thujene, linalool e limoneno, corroborando com os resultados da composição do extrato obtido por hidrodestilação de *Bursera graveolens*.

Já Monzote et al. (2012), estudaram a composição química e as propriedades anti-proliferativas do óleo essencial da *Bursera graveolens*. Eles também verificaram em seus resultados que o óleo obtido pela técnica de hidrodestilação apresentou uma composição química complexa e dominada pelo limoneno (26,5%).

Com relação ao composto limoneno, verifica-se que ele corresponde a um monoterpêneo cíclico natural e é um dos constituintes mais comuns em diversos óleos cítricos. Geralmente, é um composto reconhecido como seguro pela FDA (Administração de Alimentos e

Medicamentos) para um agente aromatizante e tem uma toxicidade relativamente baixa. Não apresenta um risco mutagênico, carcinogênico ou nefrotóxico para os seres humanos (SUN, 2007). É um composto que apresenta uma alta atividade repelente. Atualmente, já se tem relatos na literatura sobre a sua atividade inseticida contra ectoparasitas de animais, ácaros, microrganismos e insetos. Além disso, com relação aos insetos, foi verificado que o limoneno apresentou atividade repelente, larvicida e inseticida contra o *Aedes aegypti* (HOLLINGSWORTH, 2005; COLE et al., 2008; ASSUNÇÃO, 2013), tornando-se uma alternativa aos inseticidas sintéticos. Deste modo, é um composto de bastante interesse comercial. Já o alfa-terpineol, dentre as diversas atividades, apresenta ação biocida (OLIVEIRA, 2008).

5.2.2 Extração usando solventes

As técnicas de extrações em soxhlet e ultrassom foram aplicadas com intuito de comparar o rendimento e a composição química do extrato de *Bursera graveolens* com as outras técnicas usadas no decorrer do presente trabalho. Dois solventes de diferentes polaridades foram utilizados, o hexano e o etanol.

Os experimentos foram realizados em triplicata. A média do rendimento mássico do extrato de *Bursera graveolens*, para cada técnica e solvente utilizado, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Rendimento global (Y) das extrações de *Bursera graveolens* a baixa pressão, utilizando dois solventes de diferentes polaridades.

Método de extração	Solventes	
	Hexano [IP ⁽¹⁾ – 0]	Etanol [IP ⁽¹⁾ – 5,2]
	Y(%)	Y (%)
Soxhlet	14,75 (± 0,74)	29,05 (± 0,51)
Ultrassom	11,49 (± 2,45)	22,65 (± 1,94)

⁽¹⁾ Índice de polaridade do solvente.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ao comparar os rendimentos obtidos para um mesmo solvente, constata-se que a técnica de extração em soxhlet apresentou os maiores rendimentos em relação a técnica de ultrassom. Diversos fatores podem justificar tal resultado, como a temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações entre o solvente e a matéria prima, por exemplo,

que podem contribuir para uma maior solubilização dos compostos em soxhlet (MEZZOMO et al., 2010).

Além disso, o resultado também indica que o solvente mais polar promoveu um maior rendimento de extração, sugerindo que os compostos presentes no material lenhoso da *Busera graveolens* apresentaram uma polaridade intermediária ou alta.

Na Tabela 11 é possível verificar os componentes identificados no extrato de Palo santo obtido por extração em soxhlet, para os dois tipos de solventes. Foram identificados 19 compostos com o solvente hexano e 21 com o solvente etanol. Com o solvente hexano, os compostos que apresentaram os picos com maior área relativa foram: D-limoneno (23,52%), Beta-gurjunene (12,16%), Mint-furanone (11,59%), Alfa-terpineol (11,15%) e Beta-bisabolene (10,17%). Já com o solvente etanol, os compostos com os picos de maior área foram Mint-furanone (13,60%), D-limonene (9,20%), Alfa-terpineol (8,32%), Alfa-amorphene (6,22%) e D-carvone (3,24%).

Tabela 11 - Composição química do extrato de *B. graveolens* obtido pela técnica em soxhlet, usando dois solventes de diferentes polaridades.

<i>Solvente: Hexano</i>			<i>Solvente: Etanol</i>		
Nº	Composto	Área relativa (%)	Nº	Composto	Área relativa (%)
1	D-limonene	23,5163	1	Mint-furanone	13,5981
2	Beta-gurjunene	12,1619	2	D-limonene	9,2030
3	Mint-furanone	11,5900	3	Alfa-terpineol	8,3226
4	Alfa-terpineol	11,1486	4	Alfa-amorphene	6,2203
5	Beta-bisabolene	10,1686	5	D-carvone	3,2414
6	D-carvone	4,7416	6	Beta-bisabolene	3,1553
7	Aristolene	2,1936	7	Cis-carveol	2,3138
8	Gama-murolene	1,6290	8	Longifolene	1,9359
9	Beta-selinene	1,0534	9	Beta-selinene	1,7100

10	Alfa-amorphene	0,9867	10	Alfa-bisabolol oxide B	1,4921
11	O-cymene	0,9005	11	1,4trans1,7cis-acorenone	1,2154
12	7.beta.-ethyl-8.beta.-hydroxy-2,6-dimethylbicyclo[4.4.0]dec-1-ene	0,6563	12	Alloaromadrendrone oxide-(1)	0,8237
13	1,3,8-p-menthatriene	0,6508	13	Gama-muurolene	0,7692
14	Cis-Z-.alpha.-Bisabolene epoxide	0,6291	14	Isoledane	0,7068
15	EE-cosmene	0,5846	15	Beta-cadinene	0,6888
16	E-11-Hexadecenoic acid, ethyl ester	0,5215	16	1,3,8-p-Menthatriene	0,6163
17	Octadecanoic acid, ethyl ester	0,4789	17	P-Cymene	0,5589
18	4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane	0,3989	18	Isolongifolene, 9,10-dehydro-	0,4554
19	Hexadecanoic acid, ethyl ester	0,1276	19	Alloaromadrendrone	0,4551
			20	Sec-Butyl acetate	0,4227
			21	1,3,8-p-Menthatriene	0,2759

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Os componentes identificados no extrato de *Bursera graveolens* obtido pela técnica de ultrassom de ponteira, para os dois tipos de solventes, podem ser visualizados na Tabela 12. Foram identificados 28 compostos no óleo obtido com o solvente hexano e 13 compostos no óleo obtido por etanol. Os três compostos que apresentaram os picos

com maior área foram: D-limoneno, Alfa-terpineol e Mint-furanone, para os dois tipos de solventes.

Tabela 12 - Composição química do extrato da *Bursera graveolens* obtido pela técnica de ultrassom, usando dois solventes de diferentes polaridades.

<i>Solvente: Hexano</i>			<i>Solvente: Etanol</i>		
Nº	Composto	Área relativa (%)	Nº	Composto	Área relativa (%)
1	D-limonene	13,0575	1	Mint-furanone	13,2130
2	Alfa-terpineol	9,7456	2	D-limonene	11,2284
3	Menti-furanone	9,0371	3	Alfa-terpineol	9,3774
4	Epizonarene	6,8669	4	Gama-murolene	8,0956
5	Beta.-bisabolene	5,7047	5	Beta-bisabolene	3,7506
6	D-carvone	3,2443	6	D-carvone	3,5689
7	Alfa bisabolol oxide B	2,5054	7	Cis-carveol	3,5059
8	Aristolene	2,4741	8	1h-indene, 2,3,3a,4- tetrahydro- 3,3a,6-trimethyl- 1-(1- methylethyl)-	2,1222
9	Cis-carveol	2,2814	9	1,4- ethanoazulen-7- ol,decahydro4,8, 8,9-tetramethyl-, (+)-	1,3341
10	Alfa-amorphene	2,0987	10	Isoaromadendren e epoxide	0,9628
11	Octadecanoic acid, ethyl ester	1,7239	11	Beta-elemene	0,6636
12	Ethyl oleate	1,2593	12	M-cymene	0,5891
13	Beta-elemene	0,9921	13	Beta-vatirenene	0,5885
14	Gama-murolene	0,9318			
15	1,3,8-p- Menthatriene	0,9175			
16	O-cymene	0,7358			
17	Hexadecanoic acid, ethyl ester	0,7332			
18	Alfa- himachalene	0,6779			
19	Alpha-murolene	0,6243			

20	Cadalene	0,5030
21	Menthone	0,4978
22	3,4,4-Trimethyl-3-(3-oxo-but-1-enyl)-bicyclo[4.1.0]heptan-2-one	0,4508
23	Cis-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene	0,4145
24	Alloaromadendrene	0,4086
25	Isoaromadendrene epoxide	0,4008
26	1H-Indene, 5-butyl-6-hexyloctahydro-	0,363
27	Toluene	0,2195
28	7-pentadecyne	0,1157

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Munoz-Acevedo et al. (2013), utilizaram a destilação, simultaneamente a uma extração com solvente (clorofórmio), para determinar a composição química das frações voláteis dos frutos imaturos, folhas, ramos, cascas de caule e resina de *Bursera graveolens*. Os autores observaram que o limoneno foi identificado como o principal componente (23,2%) em óleos essenciais de oleorresinas de Burseraceae, corroborando com os extratos obtidos com a utilização do hexano como solvente, tanto para a técnica de extração em soxhlet, quanto para a técnica de ultrassom.

Além disso, os mesmos autores observaram que a casca do caule da *Bursera graveolens* foi caracterizada por Mint-furanone (44,6%), 3-hidroxi-mentofuranone (16,2%), iso-mentofuranone (6,4%), limoneno (3,4%), limoneno-1,2-diol (3,2%), trans-carveol (1,8%), carvona (1,7%) e derivado de mint-furanone (1,4%). Deste modo, estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho para as extrações que utilizaram o etanol como solvente, em que o componente majoritário foi o mint-furanone.

Yukawa et al. (2006), aplicando a técnica de extração com éter dietílico, conseguiram obter um rendimento de extrato da *Bursera graveolens* de 32,2%. Com relação a composição do extrato, os autores também conseguiram obter como componentes majoritários o limoneno, β -bisaboleno, carvona, trans-carveol, cis-carveol e juneol, mostrando-se de acordo com a composição do extrato obtido no presente trabalho com o solvente hexano.

Além disso, ao observar relatórios disponíveis na literatura sobre a estrutura química dos metabólitos secundários encontrados na madeira do Palo santo, verificou-se que os compostos apresentam quatro estruturas benzofuranicos (3-hidroxi-mentofuranona; 2,3-didehidromentofuranona; mint-furanona e isomintfuranona) (Yukawa; Iwabuchi, 2003; Yukawa et al, 2004). Deste modo, estando de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, já que essas estruturas químicas também foram encontradas na composição do extrato da *Bursera graveolens* obtido pelas técnicas de extração em soxhlet e ultrassom.

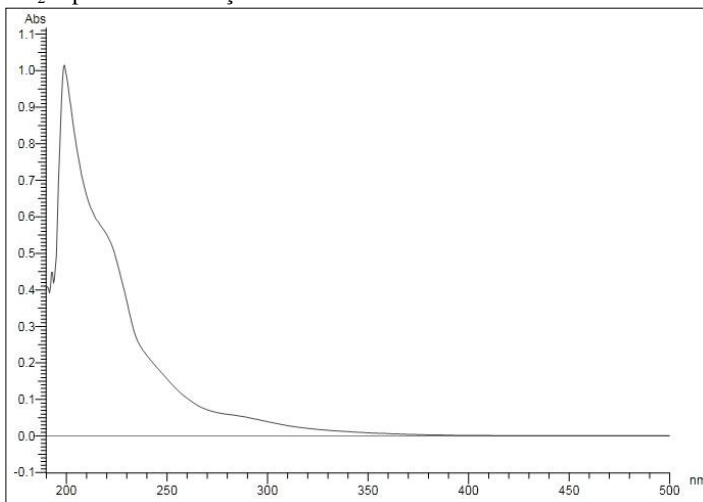
5.3 EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO

5.3.1 Teste preliminar e análise do perfil do extrato

O teste preliminar de extração foi realizado com objetivo de definir o tempo de extração e analisar o perfil do extrato. Dessa forma, utilizou-se uma pressão de 140 bar, 38 °C e 15 % de cossolvente, condições intermediárias de pressão, temperatura e cossolvente que serão empregadas posteriormente nos ensaios de rendimento, e vazão 3ml/min.

A partir do teste, ficou estabelecido um tempo de extração de 120 min. Utilizando o espectro, foi possível analisar o perfil do extrato, onde, inicialmente, ocorreu uma varredura para identificação dos principais picos. Assim, como pode ser observado na Figura 22, os picos principais se encontram em 199 e 200 nm.

Figura 22 - Perfil do extrato da *Bursera graveolens* utilizando a extração com CO₂ supercrítico e adição de cossolvente.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

5.3.2 Extração com CO₂ supercrítico puro

5.3.2.1 Rendimento global da extração supercrítica

Na extração com CO₂ supercrítico, a avaliação do rendimento global de extração, adquirido por diferentes condições de pressão e temperatura empregadas, sinaliza o grau de solubilização do solvente e, conseqüentemente, a influência sobre o rendimento do processo.

A Tabela 13 apresenta o resultado do rendimento global (Y) de *Bursera graveolens* com CO₂ supercrítico, as condições de pressão (bar) e temperatura (°C) empregadas, bem como os valores da densidade do solvente supercrítico (ρ_{CO_2}).

Tabela 13 - Rendimento obtido a partir do planejamento em estrela para a extração supercrítica sem adição de cossolvente.

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	ρ_{CO_2} (g/cm ³)	Y (%)
1	110	35	793,95	3,35
2	110	41	669,31	3,41
3	170	35	838,09	3,69
4	170	41	801,58	4,14
5	80	38	304,14	2,45
6	200	38	850,32	4,21
7	140	32	822,44	3,26
8	140	44	729,45	4,03
9	140	38	793,95	3,11
10	140	38	793,95	3,19

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

De acordo com a Tabela 13, o maior rendimento para o extrato de *B. graveolens* foi obtido na condição de 200 bar e 38 °C. Já o menor rendimento foi obtido em uma condição com o mesmo valor de temperatura, 38 °C, e uma pressão de 80 bar.

Vale ressaltar que os ensaios no ponto central fornecem informações muito úteis sobre o comportamento das respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo. O erro puro é, nesse contexto de pequeno número de repetições num único ponto, extremamente dependente da variabilidade do processo, nesse ponto. Ele é excelente para estimar a falta de ajuste. Assim, verifica-se que o processo de extração com CO₂ supercrítico para o *B. graveolens* apresentou uma boa repetibilidade e uma falta de ajuste estatisticamente insignificante, ao nível de 5 %, como será discutido no item seguinte, a partir da Análise de Variância dos dados.

Ainda de acordo com a Tabela 13, os resultados demonstram que o rendimento de extração aumenta com o aumento da pressão, a temperatura constante. Para a condição isotérmica de 35 °C, o rendimento aumenta de 3,35 % (m/m) para 3,69 % (m/m) quando a pressão de operação é elevada de 110 para 170 bar, respectivamente. O mesmo comportamento também é observado na temperatura de 41 °C. Este desempenho é justificado pela elevação da massa específica do

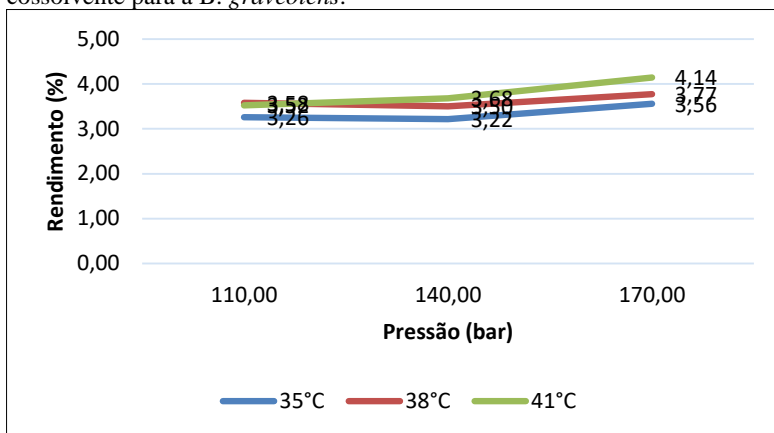
solvente supercrítico com a pressão, ou seja, ocorre um aumento do poder de solvatação do CO₂ com a densidade (BRUNNER, 1994).

Corroborando com Duba et al. (2015), onde buscaram estudar o rendimento de extração *versus* o consumo de solvente, em uma temperatura fixa, os autores verificaram que quanto maior a pressão utilizada no processo de extração, maior a solubilidade do solvente e, conseqüentemente, maior o rendimento. No entanto, antes de estabelecer valores de pressão que poderão ser empregados em um processo industrial, por exemplo, é necessário avaliar a viabilidade econômica do processo, pois, além do aumento no consumo de energia, existe também um aumento na quantidade de solvente necessário para a sua execução, que são fatores de extrema importância.

O efeito da temperatura é um pouco mais complexo. Enquanto a densidade do solvente aumenta com a diminuição da temperatura, aumentando o poder de solvatação, a pressão de vapor do soluto diminui com a temperatura, reduzindo o poder de solvatação (BRUNNER, 1994). Assim, a partir dos dados apresentados na Tabela 13, por exemplo, na condição de 140 bar, o rendimento diminui de 3,26 % (m/m) para 3,11 % (m/m) com a elevação da temperatura de 32 °C para 38 °C, devido à redução na massa específica do CO₂ supercrítico. Porém, um efeito contrário ocorre para pressões de 170 bar. O aumento da temperatura de 35 °C para 44 °C aumenta o rendimento. Desta forma, neste caso, o efeito da pressão de vapor é dominante, enquanto que no outro ponto o efeito da densidade do solvente é mais importante. Esta oposição de efeitos resulta na inversão das isotermas de rendimento, conhecido como fenômeno de retrogradação (MICHIELIN et al., 2009).

Na figura 23, é possível observar as isotermas de rendimento de extração supercrítica utilizando pressões de 110, 140 e 170 bar. Verifica-se que com um aumento da temperatura de 35 °C para 38 °C, existiu-se um aumento nos rendimentos nas três pressões analisadas. Porém, ao comparar-se as isotermas de 38 °C e 41 °C, inicialmente, apresentou um menor rendimento com o aumento da temperatura. Isto pode estar relacionado a retrogradação. Porém, no presente trabalho não foi possível determinar uma clara faixa de inversão, a partir das temperaturas utilizadas, tornando-se necessário, em trabalhos futuros, usar uma faixa de temperatura mais ampla para poder identificar a pressão em que a densidade do solvente apresenta efeito dominante e em que a pressão de vapor do soluto apresenta o principal mecanismo que afeta o processo de extração.

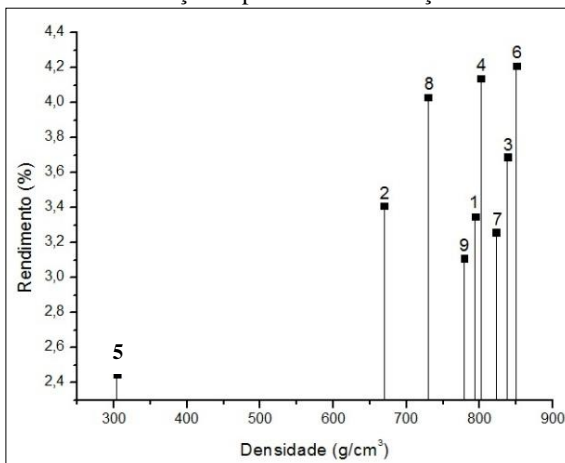
Figura 23: Isotermas de rendimento de extração supercrítica sem adição de cossolvente para a *B. graveolens*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Assim, próximo ao ponto crítico do solvente, um pequeno aumento na pressão aumenta substancialmente a densidade e, conseqüentemente, aumenta o seu poder de solvatação do fluido. Porém, próximo a esse ponto em questão, um aumento na temperatura diminui a densidade do solvente e, conseqüentemente, o seu poder de solvatação. Deste modo, a solubilidade de solutos em fluidos supercríticos aumenta rapidamente com a elevação da pressão em condições isotérmicas. Apesar do aumento da temperatura diminuir o poder de solvatação, isso eleva a pressão de vapor do soluto. Assim, a variação da densidade com a temperatura depende da pressão e este fato explica o rendimento dos extratos, observados na figura 24.

Figura 24 - Influência da densidade no rendimento total de cada ensaio utilizando a extração supercrítica sem adição de cossolvente.



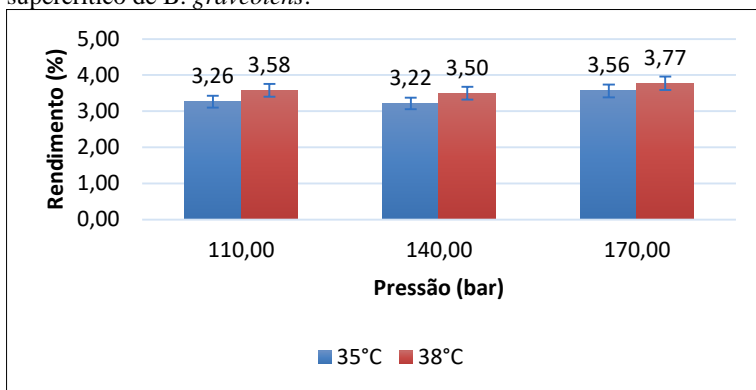
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Na figura 24, é possível verificar o comportamento do rendimento à medida que ocorre o aumento da densidade operacional. Nota-se que, mesmo existindo uma tendência de aumento do rendimento com um aumento da densidade, alguns ensaios apresentaram uma diminuição no rendimento, o que pode estar relacionado a interferência da pressão de soluto.

Este comportamento é bastante comum em extratos vegetais e também foi observado por Santos (2012), quando obteve extratos supercríticos de semente de pitanga, e Arauco (2013), quando obteve extratos de *Schinus terebinthifolius Raddi*.

Para analisar o comportamento da pressão e temperatura, plotaram-se os gráficos seguintes, Figura 25 e 26. A partir da Figura 25 é possível analisar o processo de extração isobárico, assim como isotérmico. Na análise do processo isobárico, observa-se que, independente da pressão utilizada, o aumento da temperatura aumentou o rendimento do processo. Isto pode estar relacionado a interferência da pressão de vapor no extrato da *Bursera graveolens*, além do aumento da difusividade e menor viscosidade do solvente, quando compara-se os rendimentos obtidos usando temperaturas de 35 °C e 38 °C. Este fato corrobora com Arauco (2013), onde também observou um aumento no rendimento de extração com CO₂ supercrítico com o aumento da temperatura, quando trabalhou com a *Schinus terebinthifolius Raddi*.

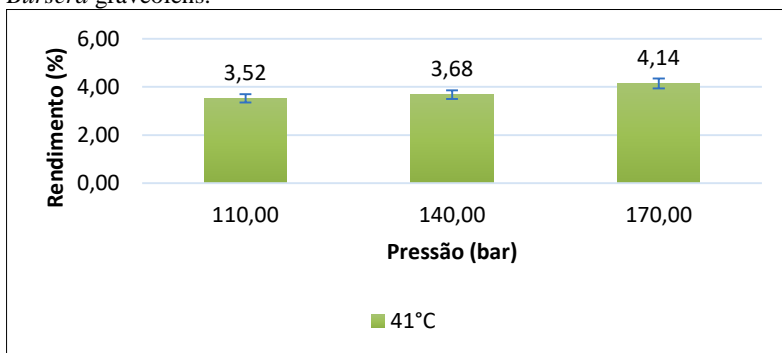
Figura 25 - Efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de *B. graveolens*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Já na Figura 26, é possível analisar isotermicamente o processo de extração a partir de resultados experimentais realizados a 41 °C. Deste modo, observa-se que o rendimento da extração aumentou com o aumento da pressão, indicando que a densidade apresentou um efeito dominante nas condições testadas.

Figura 26 - Efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico da *Bursera graveolens*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

5.3.2.2 Análise estatística

Os resultados da análise estatística, aplicada aos dados do rendimento global de óleo essencial de *B. graveolens*, estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento global do óleo essencial de *B. graveolens*.

<i>Fatores</i> ⁽¹⁾	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t</i> (2)	<i>P</i>	-95%	+95%
Média	3,1500	0,0400	78,7500	0,0081	+ 2,6418	3,6582
(1) P (L)	0,4449	0,0200	22,2439	0,0286	+ 0,1908	0,6990
P (Q)	0,1300	0,0265	4,9135	0,1278	- 0,2062	0,4662
(2) T (L)	0,1999	0,0200	9,9934	0,0635	- 0,0543	0,4540
T (Q)	0,2875	0,0265	10,8665	0,0584	- 0,0487	0,6237
1L x 2L	0,0975	0,0283	3,4472	0,1797	- 0,2619	0,4569

⁽¹⁾ P – Pressão (bar); T – Temperatura (°C)

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Os coeficientes de regressão da equação preditiva do rendimento dos extratos de *B. graveolens* em função das variáveis independentes (P e T) são apresentados na Tabela 14. Verifica-se que apenas o coeficiente linear da pressão foi estatisticamente significativo, ao nível de significância (5 %). O coeficiente quadrático da pressão, o coeficiente linear e quadrático da temperatura, nem mesmo a interação entre P e T, apresentaram coeficientes significativos nos modelos. Isto indica que o efeito da pressão independe da temperatura.

O fato da temperatura não apresentar influência significativa sobre o rendimento global, quando utiliza-se uma pressão de 80 a 200 bar, é devido ao efeito contrário que esta apresenta na região de inversão das isotermas. O efeito da temperatura, apresentado como não significativo estatisticamente, pode estar relacionado à pequena faixa de temperatura avaliada ($\Delta T = 3$ °C) e às diferenças não significativas entre a maioria dos rendimentos.

A análise de variância (ANOVA) indicou uma porcentagem de variação explicada de 86,95 % e F_{cal} superior ao $F_{tabelado}$, Tabela 15. O coeficiente de determinação ou de explicação, R^2 , corresponde a uma medida da qualidade do ajuste da reta de regressão à nuvem de pontos. Assim, fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

Tabela 15: ANOVA - Análise de Variância para os dados obtidos na extração supercrítica sem adição de cossolvente.

Fonte de variação	$SQ^{(1)}$	$GL^{(2)}$	$QM^{(3)}$	F_{cal}	P	$(R^2)^{(4)}$
(1) P (bar) (L)	1,5833	1	1,5833	494,7888	0,0286	0,8695
P (bar) (Q)	0,0773	1	0,0773	24,1429	0,1278	
(2) T (°C) (L)	0,3196	1	0,3196	99,8681	0,0635	
T (°C) (Q)	0,3779	1	0,3779	118,0804	0,0584	
1L x 2L	0,0380	1	0,0380	11,8828	0,1797	
Falta de ajuste	0,3448	3	0,1149	35,9164	0,1219	
Erro puro	0,0032	1	0,0032			
Total SQ	2,6670	9				

⁽¹⁾ SQ – Soma dos Quadrados

⁽²⁾ GL – Graus de Liberdade

⁽³⁾ QM – Quadrado Médio

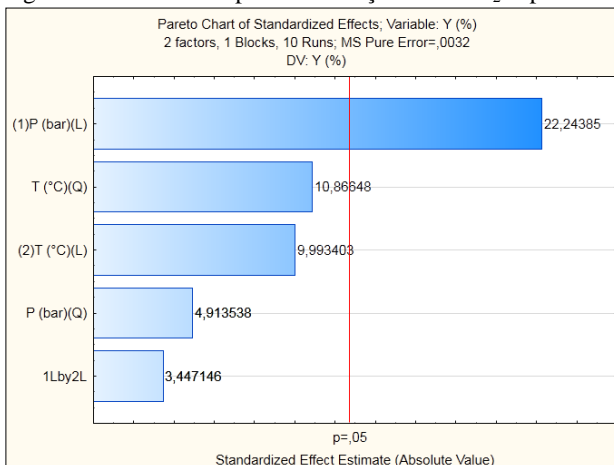
⁽⁴⁾ R^2 – Coeficiente de determinação = SQ_r/SQ_T

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O efeito das variáveis sobre o rendimento de extração supercrítica podem ser analisados pela Figura 27 (Diagrama de pareto). Quando um efeito é positivo este indica que a variável ou a combinação de variáveis apresenta um incremento positivo no valor do rendimento, quando negativo o comportamento é inverso.

Analisando a Figura 27, observa-se que, em um nível de significância de 95%, a variável que interfere significativamente no processo de extração de *B. graveolens* com CO_2 supercrítico sem adição de cossolvente corresponde a pressão, indicando ser um dos principais parâmetros a influenciar o rendimento final da extração.

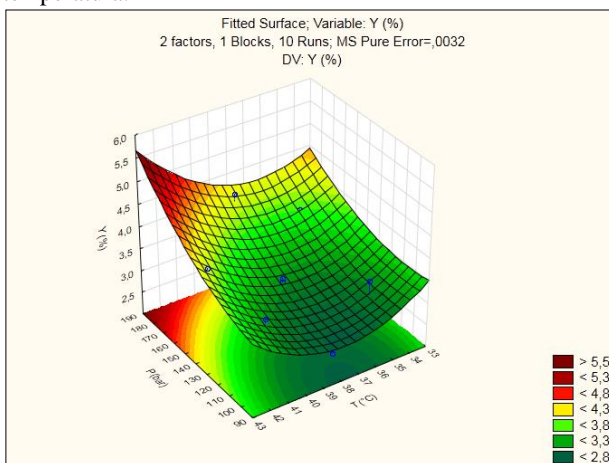
Figura 27 - Gráfico de pareto. Extração com CO₂ supercrítico sem cossolvente.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A descrição gráfica do modelo ajustado, também conhecida como superfície de resposta, bem como a projeção de seus cortes sobre o plano dos fatores gerando as curvas de contorno, são apresentados na Figura 28 e 29, a seguir.

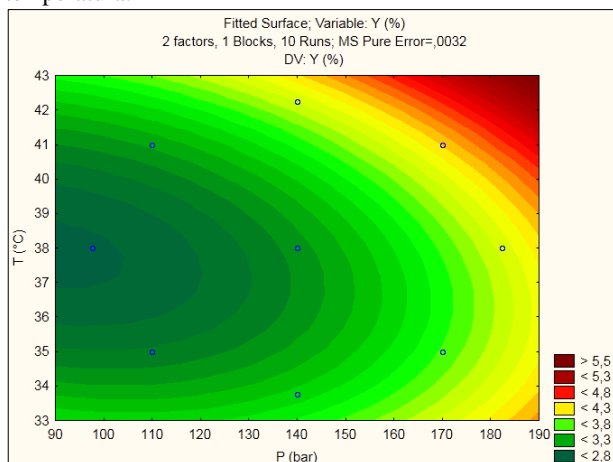
Figura 28: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da extração supercrítica de *B. graveolens* com CO₂ puro, em função da pressão e temperatura.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Na figura 28, observa-se que nos intervalos estudados, os maiores rendimentos ocorreram para níveis altos de pressão, indicando que quanto maior o valor da pressão aplicada no processo, maior o rendimento. Com relação as linhas de contorno (Figura 29), verifica-se que os maiores rendimentos de extração com CO₂ supercrítico puro de *Bursera graveolens* podem ser obtidos ao aplicar pressões acima de 140 bar. Além disso, verifica-se que quanto maior a pressão utilizada, os valores de temperatura necessária para obter rendimentos máximos são menores.

Figura 29 - Gráfico de linhas de contorno para o rendimento global da extração supercrítica de *B. graveolens* com CO₂ puro, em função da pressão e temperatura.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Não foram encontrados trabalhos na literatura com extrações supercríticas do material lenhoso de *B. graveolens*. Consequentemente, não foram utilizadas referências diretas que atestem a influência das variáveis (pressão e temperatura) no rendimento de extração. Nesta perspectiva, para justificar a influência das variáveis no rendimento de extração, resultados de trabalhos realizados com material vegetal da mesma família da *B. graveolens* (Burseraceae) foram analisados e aplicados como referência.

5.3.2.3 Curvas globais de extração

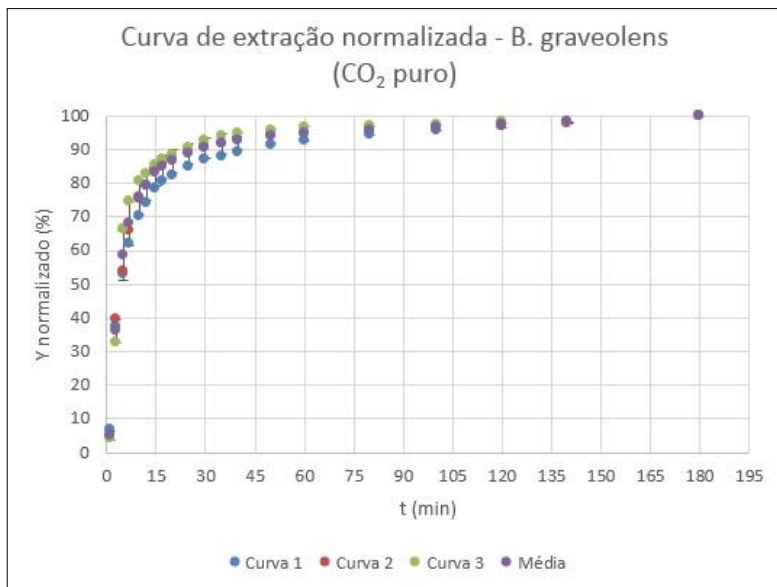
Como já discutido anteriormente, sabe-se que o ensaio que apresentou um melhor rendimento de extrato de *B. graveolens* foi o ensaio 6, onde utilizou-se uma pressão de 200 bar e uma temperatura de 38 °C, onde, para uma futura aplicação industrial, pode apresentar um alto custo. Deste modo, o ensaio 4, apresentando as condições de 170 bar e 41 °C, constatou-se um rendimento alto e uma menor pressão. Então, diante disto, optou-se por estudar o comportamento do rendimento ao longo do tempo deste ensaio.

Uma curva foi plotada para cada extração realizada, assim como, para a média da triplicata. As curvas obtidas mostraram um comportamento típico, onde foi possível observar as três etapas de extração. Na primeira etapa (I), a taxa de extração foi constante, inicialmente linear. Nesta etapa, o solvente entra em contato facilmente com o extrato, já que as células do material vegetal foram abertas pela moagem e a extração pode ser controlada pela relação de equilíbrio entre o extrato e a fase fluida. Na segunda (II) e terceira (III) etapa, a taxa de extração foi decrescente e, praticamente, nula, respectivamente. A etapa III é uma etapa lenta, caracterizada pela diminuição da inclinação da curva, e o seu principal mecanismo de extração corresponde a difusão intrapartícula. Deste modo, para a determinação do rendimento, o tempo de extração deve atestar que esta etapa de extração seja alcançada (BRUNNER, 1994).

Na Figura 30, é possível observar as curvas do processo de extração supercrítica de *B. graveolens* usando a condição de pressão e temperatura estabelecidas para o ensaio 4.

Os experimentos foram realizados através do método dinâmico de extração, caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico na matriz sólida. A Figura 30 apresenta a curva dinâmica de extração obtida para o ensaio 4, realizada nas condições de operação (170 bar, 41 °C) e vazão de 3,0 g/min durante todo o experimento.

Figura 30 - Curva de extração (CO_2 puro) de *B. graveolens*, na condição de 170 bar e 41 °C.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ao analisar a Figura 30, observa-se que a curva de extração obtida apresentou um comportamento típico das curvas de extração com CO_2 supercrítico puro. Nas curvas de extração supercrítica de *B. graveolens*, duas etapas merecem uma maior atenção, I e II. A primeira etapa apresenta um rápido aumento acumulado de massa de extrato em um pequeno intervalo de tempo, o que reflete na rápida solubilização do extrato pelo CO_2 supercrítico, e a segunda etapa (platô da curva) indica que a mobilidade do solvente pelo *B. graveolens* foi reduzindo ao longo do tempo. Os resultados podem ser explicados com base na distribuição de extrato dentro das células do material lenhoso. Na fase I, o extrato é extraído da superfície das partículas e a solubilidade do extrato em CO_2 supercrítico controla a transferência de massa. Na última etapa, o extrato presente nas células intactas vai se difundindo e a transferência de massa é controlada pela difusão do extrato de dentro das partículas. Assim, a taxa de transferência de massa é baixa e incrementos de rendimento de extrato são insignificantes em comparação a fase rápida (DANH et al., 2009).

5.4 EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE

5.4.1 Rendimento global da extração supercrítica

De acordo com os resultados obtidos para as extrações com solvente (Tabela 10), os rendimentos obtidos em soxhlet e ultrassom, utilizando hexano e etanol como solvente, foram superiores aos rendimentos da extração supercrítica com CO₂ puro (Tabela 13). Os rendimentos em soxhlet utilizando o solvente hexano foi de $14,75 \pm 0,74\%$ e o solvente etanol foi de $29,05 \pm 0,51\%$, enquanto que para o ultrassom foi $11,49 \pm 2,45\%$ (hexano) e $22,65 \pm 11,94\%$ (etanol). Já nas extrações com fluido supercrítico sem cossolvente, os melhores rendimentos foram obtidos a 200 bar e 38 °C (4,21 %) e 170 bar e 41 °C (4,14%).

Diante disso, com intuito de aprimorar o rendimento de extração e ampliar a quantidade de compostos solubilizados pela mistura solvente/cossolvente, considerou-se o emprego do etanol como um solvente orgânico e o utilizou como cossolvente na extração supercrítica para obtenção do extrato de *Bursera graveolens*. Sabe-se que, como o CO₂ é um solvente de caráter apolar, ele extrai preferencialmente compostos apolares. Assim, a adição de um cossolvente com característica polar faz com que compostos polares, não extraídos inicialmente pelo CO₂ puro, possam ser solubilizados pela mistura deste com o cossolvente.

O etanol pode ser utilizado como cossolvente ao CO₂ na extração supercrítica devido a sua não-toxicidade e a sua fácil evaporação no extrato, onde a sua utilização na tecnologia supercrítica se encontra amplamente relatada na literatura (CASAS et al., 2007; SALGIN, 2007; MEZZOMO et al., 2010). Assim, buscando aumentar o rendimento e a quantidade de compostos no extrato de *B. graveolens* obtidos pela extração supercrítica, utilizou-se etanol como cossolvente ao CO₂, em concentrações de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % e 25 %.

A Tabela 16 apresenta o resultado do rendimento global (Y) de *Bursera graveolens* com CO₂ supercrítico, as condições de pressão (bar) e temperatura (°C) empregadas, bem como a porcentagem de cossolvente utilizado no processo. Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que corresponde a um delineamento composto central com pontos axiais.

Tabela 16 - Rendimento obtido a partir do planejamento DCCR para extração supercrítica de *B. graveolens* com adição de cossolvente.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	CS (%)	R (%)
1	110	35	10	14,1128
2	170	35	10	15,3016
3	110	41	10	16,3016
4	170	41	10	16,6218
5	110	35	20	20,0745
6	170	35	20	19,9901
7	110	41	20	20,1906
8	170	41	20	20,3850
9	80	38	15	17,3824
10	200	38	15	18,8257
11	140	32	15	17,9030
12	140	44	15	17,4579
13	140	38	5	8,09379
14	140	38	25	20,3742
15	140	38	15	17,9860
16	140	38	15	18,2324

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

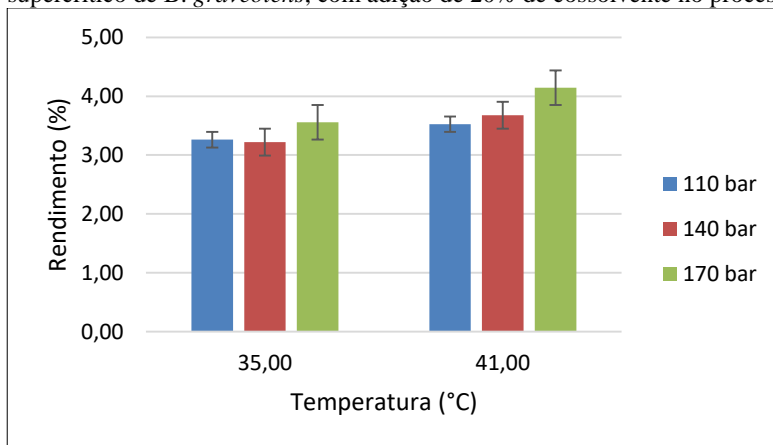
De acordo com a Tabela 16, o maior rendimento para a extração de extrato de *B. graveolens* com cossolvente foi obtido na condição de 170 bar, 41 °C e 20 % de cossolvente. Já o menor rendimento foi obtido em uma condição de 140 bar, 38 °C e 5 % de cossolvente. Além disso, na Tabela 16, é possível verificar que quanto maior a concentração de cossolvente utilizado no processo, maior o rendimento, corroborando com os resultados obtidos por Benelli (2010), que observou em seus estudos com bagaço de laranja, que existiu um aumento no rendimento com um aumento da concentração de etanol testada. Deste modo, este comportamento pode ser consequência da maior solubilização de compostos polares pela mistura etanol/CO₂, não ocorrendo quando se utiliza CO₂ puro. Um alto rendimento também foi obtido quando foi utilizado o etanol nas extrações com solvente, apresentando valores de rendimento de 29,05 ± 0,51% para o soxhlet e 22,65 ± 1,94% para a ultrassom.

Corroborando com Marangoni (2011), onde buscou determinar as melhores condições para a obtenção do composto rotenona, o autor conseguiu observar que a adição de cossolvente contribuiu

significativamente para um maior rendimento e melhor seletividade do composto desejado.

O gráfico a seguir, Figura 31, apresenta o efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de *B. graveolens*. Observa-se que existe uma certa tendência do aumento da pressão apresentar um maior rendimento de extração.

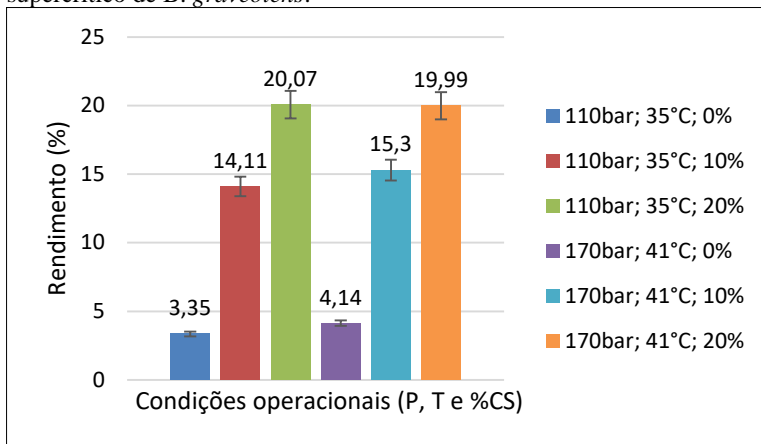
Figura 31 - Efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de *B. graveolens*, com adição de 20% de cossolvente no processo.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A Figura 32 apresenta o efeito da concentração de cossolvente. Observa-se que independente da condição de pressão e temperatura utilizada no processo, o aumento do rendimento foi proporcional ao aumento da concentração de cossolvente utilizada, indicando que a quantidade de cossolvente favorece as interações soluto/solvente, consequentemente, aumenta o rendimento.

Figura 32 - Efeito da concentração do cossolvente no rendimento do extrato supercrítico de *B. graveolens*.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

5.4.2 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o *software Statistica*. Os coeficientes de regressão da equação preditiva do rendimento dos extratos de *B. graveolens* em função das variáveis independentes (P, T e CS) são apresentados na Tabela 17. Verifica-se que apenas os coeficiente linear e quadrático do cossolvente foram estatisticamente significativos, ao nível de significância (5 %). Desta forma, somente o cossolvente apresentou independência em relação as outras variáveis estudadas.

Tabela 17 - Estimativa dos efeitos significativos que influenciaram no rendimento de extração supercrítica com adição de cossolvente.

Fatores ⁽¹⁾	Efeitos estimados	Erro padrão	t (I)	P	-95%	+95%
Média	17,9411	0,1171	153,158	0,0042	16,4526	19,430
(1) P (L)	0,7870	0,0899	8,7523	0,0724	-0,3555	1,9295
P (Q)	0,5135	0,1092	4,7036	0,1334	-0,8737	1,9007
(2) T (L)	0,5397	0,0899	6,0017	0,1051	-0,6029	1,6822
T (Q)	0,3374	0,1092	300903	0,1992	-1,0498	1,7246
(3) CS (L)	5,8562	0,0899	65,0164	0,0098	4,7037	6,9888
CS (Q)	2,0265	0,1092	18,5618	0,0343	-3,4137	-0,6393
1L x 2L	0,0482	0,1175	0,4106	0,7519	-1,4445	1,5410
1L x 3L	-0,1569	0,1175	-1,3356	0,4091	-1,6497	1,3359
2L x 3L	-0,6713	0,1175	-5,7137	0,1103	-2,1641	0,8215

⁽¹⁾ P – Pressão (bar); T – Temperatura (°C); CS – Cossolvente (%)

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A análise de variância (ANOVA) indicou uma porcentagem de variação explicada de 90,62% e Fcal superior ao Ftabelado, Tabela 18. O coeficiente de determinação ou de explicação, R^2 , corresponde a uma medida da qualidade do ajustamento da reta de regressão à nuvem de pontos. Assim, fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

Tabela 18 - ANOVA - Análise de Variância para os dados obtidos na extração supercrítica com adição de cossolvente.

Fatores	SQ	GL	MS	Fcal	p	R_2
(1) P (bar) (L)	2,1146	1	2,1146	76,6020	0,0724	0,9062
P (bar) (Q)	0,6107	1	0,6107	22,1240	0,1334	
(2) T (°C) (L)	0,9943	1	0,9943	36,0200	0,1051	
T (°C) (Q)	0,2636	1	0,2636	9,5500	0,1992	
(3) CS (%) (L)	116,6923	1	116,6923	4227,1	0,0098	
(CS) (%) (Q)	9,5112	1	9,5112	344,54	0,0343	
1L x 2L	1,0047	1	0,0047	0,1690	0,7520	
1L x 3L	0,9012	1	0,0492	1,7840	0,4091	
2L x 3L	0,9012	1	0,9012	32,646	0,1103	
Falta de ajuste	14,2001	5	2,8400	102,878	0,0747	
Erro puro	0,0276	1	0,0276			
Total SQ	151,6574	15				

⁽¹⁾ SQ – Soma dos Quadrados

⁽²⁾ GL – Graus de Liberdade

⁽³⁾ QM – Quadrado Médio

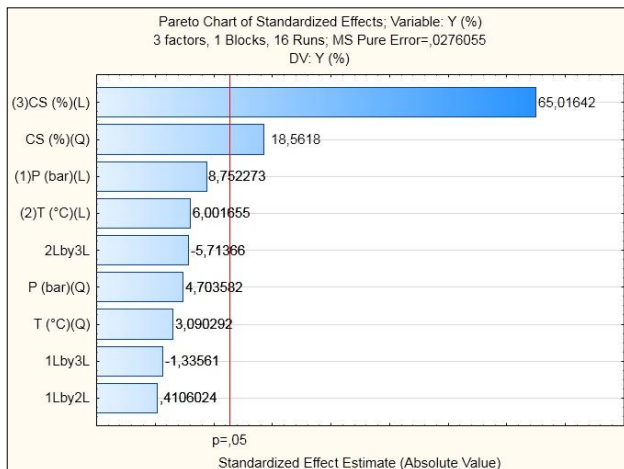
⁽⁴⁾ R^2 – Coeficiente de determinação = SQr/SQT

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O efeito das variáveis sobre o rendimento de extração supercrítica com cossolvente podem ser analisados na Figura 33 (Diagrama de pareto).

Analisando a Figura 33, observa-se que, em um nível de significância de 95 %, a variável que interferiu significativamente no processo de extração de *B. graveolens*, quando se utilizou a extração com CO₂ e adição de cossolvente, foi a variável cossolvente.

Figura 33 - Gráfico de pareto. Extração com CO₂ supercrítico com adição de cossolvente.

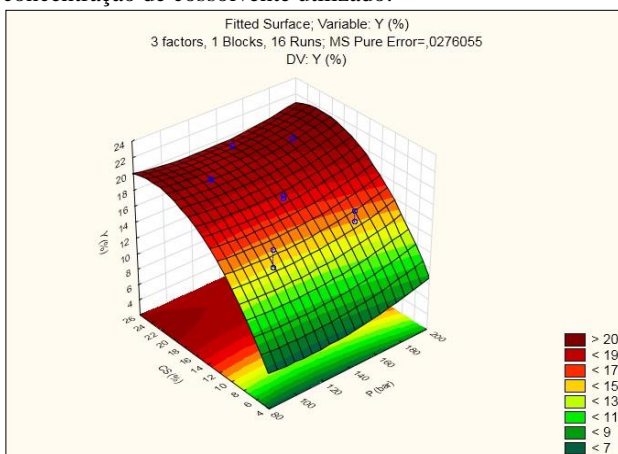


Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No diagrama de pareto, quanto mais à direita da linha pontilhada vermelha os efeitos estiverem, tanto mais significativos serão para o experimento supercrítico, considerando um nível de probabilidade de confiança de 95 % (significância de 5 %).

A figura 34 apresenta a superfície de resposta. Observa-se que, independente da pressão utilizada, o rendimento da extração aumentou com o aumento da concentração de cossolvente.

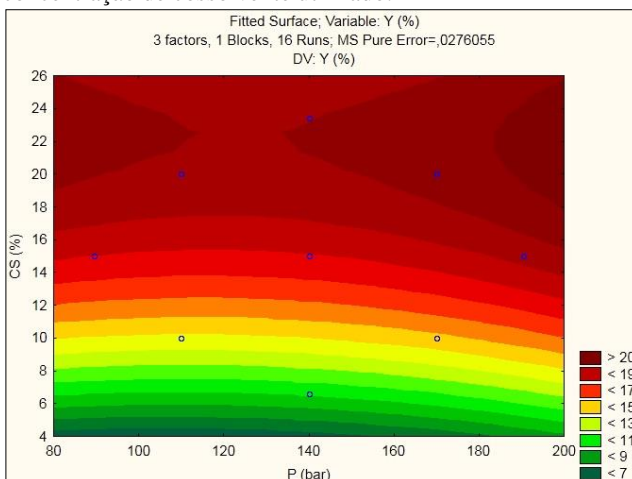
Figura 34: Gráfico de superfície de reposta para o rendimento global de extração supercrítica com CO₂ e adição de cossolvente em função da pressão e concentração de cossolvente utilizado.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Já na Figura 35, verifica-se que ao utilizar uma concentração de cossolvente acima de 10%, o rendimento da extração de *B. graveolens* encontra-se nos seus melhores rendimentos.

Figura 35: Gráfico das linhas de contorno para o rendimento global de extração supercrítica com CO₂ e adição de cossolvente em função da pressão e concentração de cossolvente utilizado.



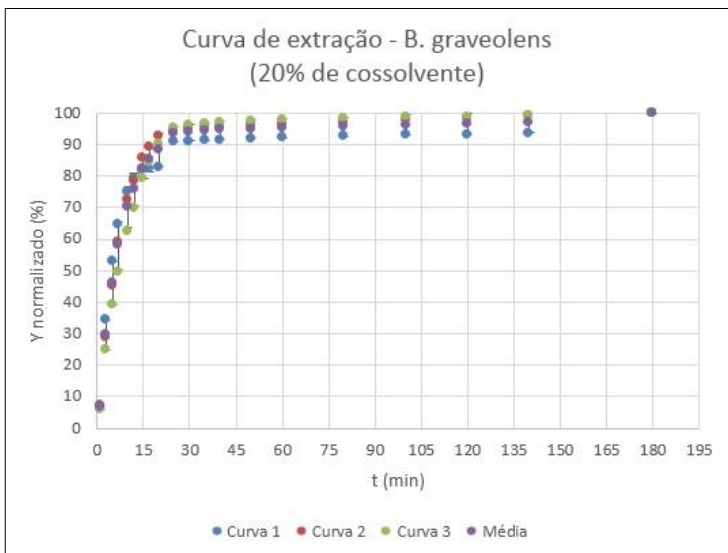
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Vale salientar que em todas as extrações, das diferentes técnicas empregadas, as extrações utilizando etanol como solvente apresentaram os maiores valores de rendimento em massa. Isto pode ser justificado pela possível presença de grupos hidroxilas na estrutura molecular dos compostos presentes no extrato da *B. graveolens* e, também, pela possível formação de ligações de hidrogênio entre estas hidroxilas e o etanol.

5.4.3 Curvas globais de extração

As curvas de extração supercrítica da *B. graveolens*, Figura 36, se apresenta de forma característica, do mesmo modo que a dinâmica de extração supercrítica sem adição de cossolvente. O ensaio escolhido foi o ensaio que apresentou o maior rendimento, ensaio 8, com as condições de 170 bar, 41 °C e 20 % de cossolvente.

Figura 36 - Curvas de extração da *B. graveolens* na condição de 170 bar, 41 °C e 20 % de cossolvente.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

5.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS POR MEIO DA EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO PURO E COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE

No Apêndice é possível observar duas tabelas, Apêndice A e Apêndice B, os componentes identificados no extrato de *B. graveolens* obtido por extração com CO₂ supercrítico puro e com adição de cossolvente no processo.

Ao observar as tabelas, verifica-se que em todos os ensaios experimentais, o componente que se apresentou em maior quantidade foi o mint-furanone, seguido do alfa-terpineol. A concentração destes compostos foi maior na extração em que utilizou a adição de cossolvente, quando comparada à extração com o CO₂ puro.

Com relação ao mint-furanone, Humbert et al. (2012), inovando no processo de extração da *Euodia suaveolens* Scheff, planta da família Rutaceae, a partir da utilização de um solvente orgânico ou hidroalcoólico, o autor observou que o mint-furanone corresponde a um dos componentes majoritários do extrato obtido por esta espécie e, juntamente com outros compostos, proporciona atividade repelente.

Bougherra et al. (2015), ao avaliarem a atividade repelente do óleo essencial de *Pistacia lentiscus* contra as espécies *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus zeamais* e *Tribolium confusum*, observaram que os compostos alfa-pineno (15.9 %), cariofileno (7.0 %), alfa-terpineol (6.9 %) e mirceno (6.4 %) apresentaram uma ótima atividade repelente para as três espécies avaliadas. Estes compostos também estão presentes no extrato supercrítico de *B. graveolens*, indicando uma possível atividade repelente no extrato obtido do Palo santo.

Segundo a Embrapa (2016), o óleo essencial do louro (*Laurus nobilis*) apresentou atividades repelente e tóxica sobre *Rhyzopertha dominica* e *Tribolium castaneum*. O óleo essencial apresentou em sua composição química o alfa-terpineol entre os compostos majoritários, também observado no presente trabalho.

Enan et al. (2001) avaliaram a composição química do óleo essencial e a sua atuação como defensivo agrícola natural. Os autores verificaram que os três compostos majoritários do óleo essencial foram eugenol, alfa-terpineol e álcool cinâmico. Ao aplicar sobre três espécies diferentes, *Periplaneta americana*, *Camponotus pensilvanicus* e *Blatella germânica*, o óleo apresentou fortíssima atividade inseticida, onde o alfa-terpineol foi o composto que apresentou uma maior resposta para essa atividade.

Alciolo (2009), estudou a composição e a atividade inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* em condições laboratoriais do óleo obtido de *Cordia curassavica*. O autor identificou vinte e seis compostos voláteis presentes no óleo essencial desta espécie, onde os principais componentes foram: beta-elemene, alfa-gurjuneno, (E)-Cariofileno, beta-gurjuneno, alloaromadendrene, gama-Muurolene, germacrene D, trans-calamenene, delta-Cadinene, alpha-Calacorene, epi-Longipinano, beta-Calacorene, óxido cariofileno. Ainda segundo este autor, os resultados do óleo de *C. curassavica* apresentou uma forte potencialidade de atividade inseticida.

De acordo com Cole (2010), o óleo essencial da Aroeira apresentou entre os seus componentes principais o limonene e o-cimeno. Além disso, em seus estudos, o autor verificou que o óleo apresentou um bom resultado para atividade larvicida, inseticida e repelente contra o *Aedes aegypti*.

De forma similar, Assunção (2013) realizou a extração e estudou a composição analítica das cascas frescas da *Citrus sinensis*. O autor observou que o constituinte majoritário do óleo essencial desta espécie foi o D-limoneno e apresentou efeito larvicida contra o *Aedes aegypti*. Já Furtado (2005), estudou o óleo essencial de *C. limon*, conhecido popularmente como limão, cujo constituinte principal foi o limoneno. Os óleos essenciais apresentaram atividade larvicida contra o *A. aegypti*.

Niculau et al. (2013), estudaram a atividade inseticida do óleo essencial de *Pelargonium graveolens*. Eles verificaram que o-geraniol, linalool, carvone e citral causaram uma mortalidade significativa de 30, 90, 84 e 64 %, respectivamente, comparada ao controle negativo.

Moura (2015), em seus estudos, verificou que os óleos essenciais de manjerição e candeeiro apresentaram o alfa-bisabolol como componente majoritário, possuíram efeito inseticida fumigante sobre adultos de *C. maculatus* e se representaram como uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos.

Deste modo, os extratos obtidos pela técnica com fluido supercrítico apresentam uma alta seletividade na extração e possibilitam a obtenção de compostos puros que podem ser aplicados para a elaboração de novos produtos alternativos aos inseticidas sintéticos.

5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE *BURSELA GRAVEOLENS*

Os resultados da Tabela 19 indicam que os maiores rendimentos foram obtidos para as extrações em soxhlet com etanol, ultrassom com

etanol e extração supercrítica com cossolvente, alcançando valores de 29,05 %, 22,65 % e 18,59 %, respectivamente.

Tabela 19: Valores de rendimento global de extração de *B. graveolens* obtido por diferentes métodos.

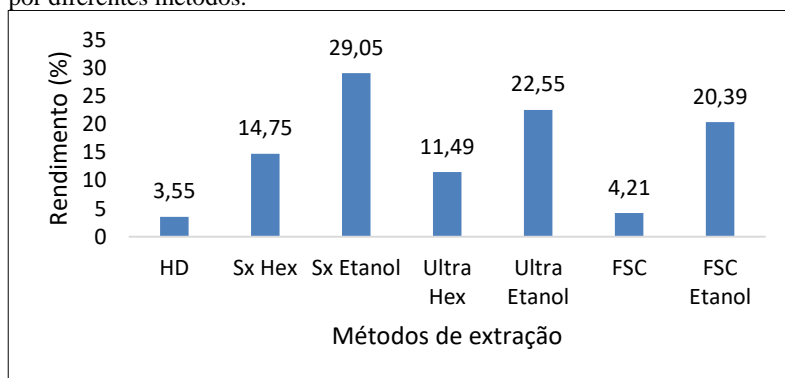
Métodos	Rendimento (%) ⁽¹⁾
HD	3,56 ^e ± 0,20
Sx Hex	14,75 ^d ± 0,74
Sx Etanol	29,05 ^a ± 0,51
Ultra Hex	11,49 ^d ± 2,45
Ultra Etanol	22,65 ^b ± 1,94
FSC	4,76 ^e ± 0,72
FSC Etanol	18,59 ^c ± 0,85

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Com intuito de uma melhor visualização dos dados apresentados na Tabela 19, os resultados podem ser visualizados na figura a seguir.

Figura 37 - Valores de rendimento global de extração de *B. graveolens* obtido por diferentes métodos.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A partir da Figura 37, observa-se que dentre os métodos estudados, a hidrodestilação apresentou o menor rendimento. Isto pode ser justificado pelo fato do extrato de *Bursera graveolens* conter

terpenos e terpenóides, compostos caracterizados por sua instabilidade térmica devido a dupla ligação carbono-carbono. Portanto, as moléculas apresentam diferentes reorganizações (isomerização) que fazem com que a solubilidade seja reduzida. Além disso, somado a proximidade dos pontos de ebulição, torna-se difícil o isolamento dos compostos presentes nos extratos obtidos por esta técnica. Assim, este resultado corrobora com Fornari et al, (2012), onde verificou que a hidrodestilação apresenta um baixo rendimento e uma baixa seletividade dos compostos de interesse.

Na técnica de hidrodestilação, a ebulição da água provoca a formação de vapor e, conseqüentemente, o arraste dos compostos voláteis presentes na amostra. O extrato obtido nestas condições é caracterizado como óleo essencial, enquanto que nos demais processos de extração são obtidas misturas de compostos de diferentes classes (MICHIELIN, 2009). Assim, neste trabalho, a fração designada como óleo essencial, obtida por hidrodestilação, foi igual a 3,56 %.

Ao comparar os métodos de extração aqui empregados para um mesmo solvente, nota-se que a extração soxhlet com o solvente etanol (29,05 %, m/m) apresentou um rendimento maior e estatisticamente diferente ao rendimento obtido por ultrassom utilizando o mesmo solvente (22,65 %, m/m). Este resultado corrobora com Benelli (2010), onde, em seus estudos com extração de óleo essencial de bagaço de laranja, observou que a técnica em soxhlet apresentou um maior rendimento quando comparada com a técnica de ultrassom.

Sabe-se que a polaridade de um composto é definida em função da habilidade da molécula em participar de interações com outras moléculas polares presentes no sistema. Neste caso, a temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações solvente-componente de *B. graveolens* podem ter contribuído para a maior dissolução e rendimento. Na extração em soxhlet, realizada na temperatura de ebulição do solvente, a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas quando comparadas a extrações em temperatura inferior, como é o caso da técnica por ultrassom. Assim, com uma maior temperatura no processo, o solvente pode alcançar os espaços da matriz que contém solutos com maior facilidade, solubilizando uma maior quantidade e diferentes tipos de solutos (BARWICK, 1997; MARKON et al., 2007).

Avaliando a polaridade dos solventes, o extrato de *B. graveolens* apresentou rendimentos mais elevados com o solvente etanol, sugerindo que os compostos presentes no material lenhoso do Palo santo apresenta polaridade de intermediária a alta. Em contrapartida, as extrações com

solventes de baixa polaridade, hexano e CO₂, apresentaram os menores rendimentos, sugerindo uma menor concentração de compostos apolares presentes na matriz vegetal de *B. graveolens*.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que os maiores rendimentos foram encontrados nas técnicas onde o solvente etanol foi utilizado no processo, tanto para técnicas de baixa pressão, como para de alta pressão. Assim, para a obtenção do extrato de *B. graveolens*, o etanol mostrou-se ser um solvente/cossolvente adequado para ser utilizado e proporcionar um maior rendimento entre as técnicas de extração.

A extração em soxhlet com etanol apresentou um rendimento médio significativamente superior aos outros métodos utilizados. Além disso, verifica-se, na Tabela 21, que não houve diferença significativa entre as técnicas de ultrassom e soxhlet, quando ambos utilizaram como solvente o hexano. Já a hidrodestilação e a extração com CO₂ supercrítico puro não diferiram significativamente entre si.

Este resultado corrobora com Freitas (2007), que submeteu o caule *Spiranthera odoratissima* a extração com solvente orgânico e fluido supercrítico. O autor observou que os rendimentos obtidos por meio das extrações com fluido supercrítico foram inferiores àqueles obtidos por maceração com solvente. Porém, o método de extração supercrítica e as condições de extração utilizadas apresentaram uma maior seletividade.

Ao utilizar as técnicas de soxhlet e hidrodestilação, Nascimento (2015) analisou exemplares de variedades de pimentas secas e *in natura*. O autor observou que a técnica de soxhlet apresentou um rendimento superior ao rendimento da hidrodestilação, estando de acordo com os resultados do presente trabalho.

Da mesma forma, Barros (2014), trabalhando com a extração do óleo de manjerição por meio de métodos convencionais e com CO₂ supercrítico, observou que a hidrodestilação apresentou o menor rendimento (0,26 %). Usando a técnica em soxhlet e extração supercrítica, o rendimento foi de 2,39 % e 0,43 %, respectivamente. Assim, estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, onde a hidrodestilação e a extração com CO₂ supercrítico apresentaram rendimentos inferiores a extração em soxhlet. No entanto, não foi observado diferença significativa entre as técnicas de hidrodestilação e extração supercrítica sem adição de cossolvente.

Usando técnicas de hidrodestilação assistida por ultrassom de micro-ondas, Leyva et al. (2007) obtiveram um rendimento de 0,14 % de extrato de *B. graveolens* e uma composição com os seguintes

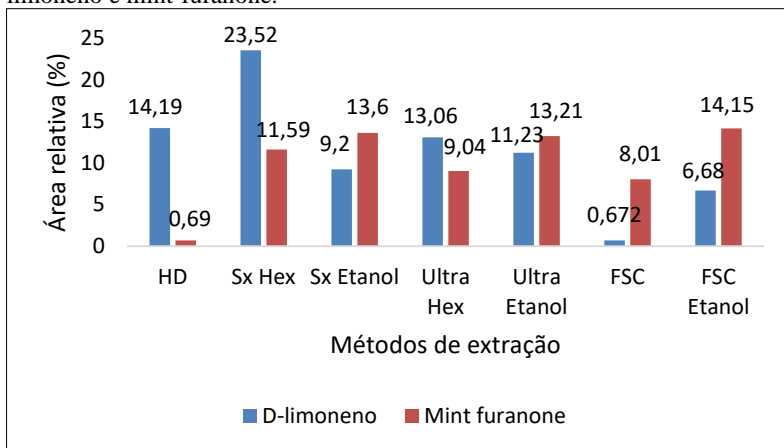
componentes majoritários: limoneno (42,1 %), mirceno (19,8 %) e de mint-furanone (14,7 %), corroborando com a composição do óleo essencial obtido no presente estudo.

Com relação a adição de cossolvente na extração supercrítica, os resultados corroboraram com os dados obtidos por Marangoni (2011), onde observou que a adição de cossolvente aumentou significativamente o rendimento e a seletividade dos compostos.

Os compostos que se apresentaram em maior quantidade nas extrações de baixas e altas pressões, com ou sem a utilização de um solvente, foram o D-limoneno e o mint-furanone. Na Figura 38, é possível observar a quantidade destes compostos em relação a cada método de extração estudado.

Em relação ao D-limoneno, verifica-se que apresentou maiores concentrações nas técnicas em que o solvente hexano foi utilizado, indicando que este composto apresenta uma maior afinidade aos solventes mais apolares. Já o mint-furanone, apresentou um comportamento contrário, onde sua concentração foi maior nas técnicas em que o solvente etanol foi usado, indicando sua maior solubilidade nesse solvente devido à similaridade das suas estruturas químicas.

Figura 38 - Comparação entre os métodos em relação ao percentual de D-limoneno e mint-furanone.



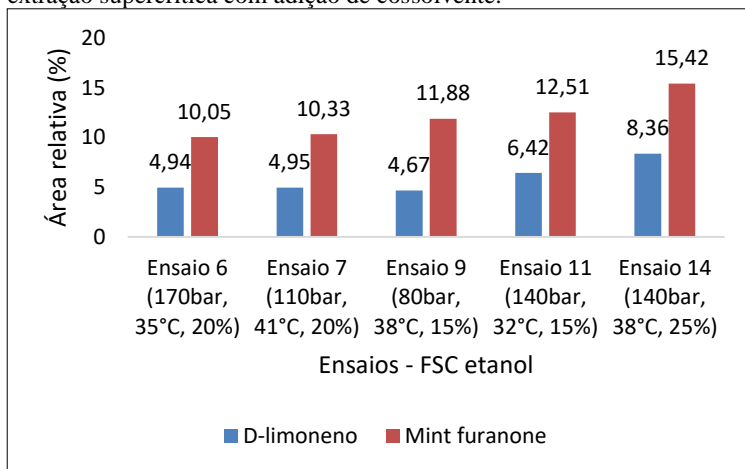
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Como a extração supercrítica apresentou uma maior seletividade, esta técnica foi considerada a técnica para a melhor extração dos extratos presentes na *B. graveolens*. Além disso, escolheu-se as

melhores condições de acordo com as extrações em que o cossolvente foi empregado.

A Figura 39 apresenta a composição do extrato supercrítico obtido com adição de cossolvente. Observa-se que o composto presente em maior quantidade foi o mint-furanone. E que, em relação as condições estudadas, o ensaio 7 foi considerado o melhor ensaio, já que este se encontra entre os ensaios com maior rendimento e maior quantidade dos compostos de interesse. Além disso, este ensaio utilizou uma menor pressão no processo, o que torna mais fácil uma futura aplicação industrial.

Figura 39 - Composição do extrato supercrítico obtido de alguns ensaios da extração supercrítica com adição de cossolvente.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Apesar do ensaio 14 apresentar um maior rendimento para os compostos de interesse, o ensaio 9 também apresentou um rendimento alto. Como este ensaio utilizou uma menor pressão no processo, estas condições foram escolhidas como as melhores condições para a obtenção de mint-furanone e D-limoneno por meio da extração com CO₂ supercrítico com adição de cossolvente utilizando como matéria prima a *Bursera graveolens*.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, confirmou-se que diferentes métodos de extração apresentam diferenças no rendimento e na composição dos extratos, e que isto está relacionado aos compostos presentes na matriz vegetal.

Foi verificado a composição do óleo essencial de Palo santo (*Bursera graveolens*) e identificados como componentes majoritários, os compostos D-limoneno e alfa-terpineol.

Ao utilizar as técnicas com solventes (soxhlet e ultrassom), observou-se que os solventes orgânicos utilizados para a obtenção dos extratos do Palo santo forneceram, para cada técnica, rendimentos e constituintes majoritários diferentes, onde o solvente etanol foi o que apresentou os melhores resultados.

Em relação a técnica em soxhlet, os componentes majoritários foram o D-limoneno e beta-gurjunene, com o solvente hexano, e mint-furanone e D-limoneno, com o solvente etanol. Já a técnica de ultrassom apresentou como componentes majoritários o D-limoneno e alfa-terpeneol, com o hexano, e mint-furanone e D-limoneno, com o etanol.

As técnicas em soxhlet e ultrassom, utilizando o etanol como solvente, apresentaram um rendimento que não existiu diferença significativa. Além disso, foram os maiores rendimentos, indicando que o solvente é eficiente para melhorar o processo de extração.

Com relação a técnica de alta pressão, verificou-se que os rendimentos foram maiores com o uso do etanol como cossolvente, confirmando que este pode beneficiar de forma significativa o rendimento do processo. Além disso, verificou-se que a técnica de extração supercrítica apresentou uma maior seletividade na extração de compostos, quando comparada com as outras técnicas. O componente majoritário foi o mint-furanone, para ambos os tipos de extração utilizada.

Também foi possível observar que a dinâmica de extração do Palo santo se apresentou de forma semelhante as típicas curvas de extração com CO₂ supercrítico, indicando uma futura aplicação em trabalhos com modelagem matemática, com intuito de aperfeiçoar esta técnica.

Assim, a partir deste trabalho, verificou-se que os compostos de interesse aqui estabelecidos, o mint-furanone e o D-limoneno, podem ser obtidos com maior qualidade e eficiência por meio do uso da técnica de extração supercrítica com cossolvente, fornecendo um extrato com possibilidade de ação inseticida, seguro e ambientalmente correto.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos durante a execução deste trabalho, algumas sugestões são dadas para trabalhos futuros.

- Realizar a atividade inseticida e repelente do óleo essencial e do extrato obtido pela técnica de extração supercrítica com adição de cossolvente;
- Determinar um modelo matemático a partir dos dados das curvas de extrações com CO₂ supercrítico puro e com adição de cossolvente;
- Encapsular o óleo essencial e o extrato obtido pela tecnologia supercrítica;
- Avaliar a atividade inseticida e repelente do óleo essencial e do extrato supercrítico encapsulado e observar se existiu um aumento nestas atividades.

REFERÊNCIAS

- ALCIOLE, S. D. G. Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertação (mestrado). Universidade de Lisboa, 2009.
- ARAUCO, M. Obtenção e separação de compostos bioativos de *Schinus terebinthifolius raddi* em meio supercrítico e avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Florianópolis – SC, 2013.
- ASSUNÇÃO, G. V. DE. Caracterização química e avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (Laranja doce). Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-graduação em Química. 2013.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFCOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 426-436, 2013.
- BAJPAI, V.K., BAEK, K.H., KANG, S.C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. *Food Res. Int.* 45, 722–734, 2012.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* n. 46, 446–475, 2008.
- BARROS, N. A. DE; ASSIS, A. V. R. DE; MENDES, M. F. Extração do óleo de manjerição usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.8, p.1499-1505, ago, 2014.
- BARWICK, V.J. Strategies for solvent selection: a literature review. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 16(6), p. 293–309, 1997.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2010.

BISCAIA, D. Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas. Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BOUGHERRA, H. H.; BEDINI, S.; FLAMINI, G.; COSCI, F.; BELTHAMEL, K.; CONTI, B. Pistacia lentiscus essential oil has repellent effect against three major insect pests of pasta. *Industrial crops and products*. n. 63, 249-255, 2015.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. New York: Springer, 1994.

CARRIÓN-PALADINES, V; FRIES, A.; GÓMEZ-MUÑOZ, B.; GARCÍA-RUIZ, R. Agrochemical characterization of vermicomposts produced from residues of Palo Santo (*Bursera graveolens*). essential oil extraction. *Waste Management*, 2016.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; DE LA OSSA, E. M. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 41, p. 43-49, 2007.

COLE, R. E. Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da areira (*Schinus terebinthifolius raddi*) e sua eficácia no combate ao dengue. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Química. 2010.

CHEMMÉS, C. S.; SILVA, F. C. DA; SOUZA, L. S.; AZEVEDO JR, R. A. DE; CAMPOS, L. M. A. Estudo de métodos físico-químicos no

pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. UNIFACS, 2013.

DANH, L. T. et al. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. *Chemical Engineering Journal*. Lausanne, v. 155, p. 617-626, 2009.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 92, p. 115-176, 2014.

DONELIAN, A. et al. Comparison of extraction of parghoul (Pogostemon cablin) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *J. Supercrit. Fluids*, v. 48, p. 15- 20, 2009.

DUBA, K. S.; FIORI, L. Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*. 98, 33-43, 2015.

EMBRAPA. Plantas com atividade inseticida. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. 2016.

ESFANDIARI, N. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 100, p. 129-141, 2015.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* n.130, 325–337, 2001.

FOURNARI, T.; VICENT, G.; VASQUEZ, E. GARCIA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid review. *Journal of Chromatography A*, v. 1250, p. 34-48, 2012.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de Procedimentos de Extração do Óleo de Semente de Uva e Caracterização Química dos Compostos Extraídos. 2007. Tese (Doutorado em química) Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

FUNASA. Ministério da saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.-3.ed., rev.-Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 2001.

GUINDANI, C. Emprego da Tecnologia Supercrítica para a Valorização do Resíduo de Semente de Chia (salvia hispanica). Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC; 2014

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

HOLLINGSWORTH, R. G.; Limonene, a Citrus Extract for control of Mealybugs and scale insects. *Journal of Economic Entomology*, v. 98, n° 3, p. 772-779, 2005.

HUMBERT, M.; LAVOINE-HANNE-GUELLE. Extract of euodia suaveolens scheff, repellent compositions and use thereof. Patente (n° US20120015054 A1), 2012.

KNEZ, Z.; MARKOCIC, E.; LEITGEB, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ HRNCIC, M.; SKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, v. 77, p. 235-243, 2014.

LEAL, P. A. Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais do óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste de vapor. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

LEYVA MA, MARTÍNEZ JR, STASHENKO EE. 2007. Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de *Bursera graveolens* (Burseraceae) de Colombia. *Sci et Techn* 33: 201 - 202.

LIMA, S. R. DE.; OLIVEIRA, G. S. DE; MORAIS, S. A. L. DE; NASCIMENTO, E. A. DO; CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira

de candeia – *Moquinia polymorpha* (less.) DC. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 145-155, abr-jun, 2007.

LOZIONE, K.; VENSKUTONIS, P. R. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 517–525, 2005.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MARANGONI, A. Extração de rotenone com fluido em estado supercrítico em escala semi-industrial. Teses (doutorado), Programa da Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2011

MARCHETTO, F.; AZIZ, A. A. A review of Supercritical Fluids Extraction Technology and Application. *Jurnal Teknologi*, v. 69, p. 27-31, 2014.

MARKON, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, v. 52, p. 487-96, 2007.

MARQUES, D. D.; SARTORI, R. A.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N. DE; MONTE, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazonica*. vol. 40(1), 227 – 230, 2010.

MELECCHI, M. I. S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, v.101(14), p. 5622-32, 2010.

MICHELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6615-23, 2009.

Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Boletim epidemiológico. n. 6, v. 48. Disponível em <http://combateaesde.saude.gov.br/images/informes/2017_informe_epidemiologico_SE02.pdf> Acesso em: 28/02/2017.

MOHAMMADHOSSEINIA, M. SARKERB, S. D.;AKBARZADEHC, A. Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. n. 199, 257–315, 2017.

MONZOTE, L.; HILL, G. M.; CUELLAR, A.; SCULL, R.; SETZER, W. N. Chemical Composition and Anti-proliferative Properties of *Bursera graveolens* Essential Oil. *Natural Product Communications*. n. 11, v.7, 2012.

MORGAN, M.; JOSE, S. Increasing Seed Germination of *Bursera graveolens*, a Promising Tree for the Restoration of Tropical Dry Forests. *Tree Planters' Notes*. Vol. 56, n. 1, 2013.

MOURA, E. DE S. Atividade inseticida dos óleos essenciais de manjeriço e candeeiro e seus componentes sobre *callosobruchus maculatus* (coleoptera: bruchidae). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, 2015.

MUNOZ-ACEVEDO, A., SERRANO-URIBE, A., PARRA-NAVAS, X.J., OLIVARES-ESCOBAR, L.A., NINO-PORRAS, M.E., 2013. Análisis multivariable y variabilidad química de los metabolitos volátiles presentes em las partes aéreas e la resina de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. De Soledad (Atlántico, Colombia). *Bol. Latinoam. Caribe* 12, 322–337.

NAJAFIAN, S. Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated Balm Mint Herb (Lamiaceae) in Iran. *Industrial Crops and Products*, 52, 575–581, 2014.

NASCIMENTO, G. M. DA L. Extração e avaliação farmacológica de óleos essenciais de pimenta para fins tecnológicos. Dissertação (mestrado profissional em Gestão Tecnológica). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, 2015.

NICULAU, E. DOS S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. D. DE L.; MORAES, V. R. DE. S. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit E. *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Química Nova*, v. 36, n. 9, 1391-1394, 2013.

NOGE, K.; BECERRA, J. X. Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules*. 14, 5289-5297, 2009.

OLIVEIRA, F. F. DE. Caracterização físico-química de amostras de óleo de pinho e estudo da ação de sistemas tensoativos na atividade antimicrobiana de tensoativos fenólicos. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Química, 2008.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. n.76,174–187, 2015.

PEREIRA, C. G.; MEIRELLES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess technol*, v. 3, p. 340-372, 2010.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis: Review. *Journal of Chromatography A*, v.1163, n.1-2, p.2-24, 2007.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C., ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Ann. Rev. Entomol*, n, 57, 405–424, 2012.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter: Review. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.38, n.2, p.146-166, 2006.

ROBLES, T.R., GRAY, A., PIÑEROS, C., ORTIZ, L., SIERRA, M. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. Rev. Brasileña Farmacogn. n .15, v.4, 283-6, 2005.

ROMERO, L.A. F. Extração de óleo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2007.

SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. Journal of Supercritical Fluids, v. 39, p. 330-377, 2007.

SANTANA, P. M.; MIRANDA, M.; GUTIÉRREZ, Y.; GARCÍA, G.; ORELLANA, T.; ORELLANA, A. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de Ecuador Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2009; 14(3):45-53

SANTOS, A. B.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - EMBRAPA. Comunicado Técnico, n. 99, ISSN 1517- 2244, Belém, 2004.

SANTOS, D. N. E. Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Dissertação (mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2012.

SANTOS, PHILIPPE; AGUIAR, ANA C.; BARBERO, GERARDO F.; REZENDE, CAMILA A.; MARTINEZ-JULIAN. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. Ultrasonics Sonochemistry, 2015.

SGANZERLA; M. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante do butiá (Dissertação de mestrado em Química de Alimentos) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas RS, fevereiro de 2010.

SILVA, E. R. DA; OLIVEIRA, D. R. DE; MELO, M. DE F. F.; BIZZO, H. R.; LEITÃO, S. G. Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu? *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26, 647–656, 2016.

SILVA, L. P. S. Modelagem matemática da transferência de massa no processo de extração supercrítica de pimenta vermelha. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas-SP, 2013.

SUN J. D-Limonene: Safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12, 259-264, 2007.

TANDON, S. Distillation technology for essential oils. In: HANDA, S. S., et al. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Trieste: International Centre of Science and High Technology, 2008. Cap. 7, p. 115-128.

TEOR, W. H.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N. R. Solubility of organometallic complexes in supercritical carbon dioxide: A review. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 724, p. 102-116, 2013.

UQUICHEA, E.; CIRANO, N.; MILLAO, S. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂. *Industrial Crops and Products*, n. 77, 307–314, 2015.

VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ, R.; TORRES-VALENCIA, J. M.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. D.; ROMÁN-MARÍN, L. U.; MANRÍQUEZ-TORRES, J. J.; GÓMEZ-HURTADO, M. A.; VALDEZ-CALDERÓN, A.; MOTILVA, V.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; TALERO, E.; ÁVILA, J.; JOSEPH-NATHAN, P. Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*, n.72, 2237–2243. 2011.

VINATORU, M.; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P. I.; LAZURCA, D.; MASON, T. J. The ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.4, p. 135-9, 1997.

YUKAWA C, IWABUCHI H. Terpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*. *J Oleo Sci* 52: 483 – 489, 2003.

YUKAWA, Chiyoki; IWABUCHI, Hisakatsu; et al. Terpenoids of the Volatile Oil of *Bursera graveolens*, *Flavour fragr. j.* 19(6), pp. 565-570, 2004.

YUKAWA CH, IMAYOSHI Y, Iwabuchi H, Komemushi S, Sawabw A. Chemical composition of three extracts of *Bursera graveolens*. *Flavour Fragrance J.* 21(2):234-8, 2006.

WU, H. et al. Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. *LWT – Food Science and Technology.* v. 44, p. 2032e2039, 2011.

ZUNIGA B, GUEVARA-FEFER P, HERRERA J, CONTRERAS JL, VELASCO L, PÉREZ FJ, ESQUIVEL B. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight mexican *Bursera* species. *Planta Medica* 71: 825 – 828, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela compostos (Extração com CO2 puro)

Compostos (Extração com CO ₂ puro)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9
	110 bar 35°C	110 bar 41°C	170 bar 35°C	170 bar 41°C	80 bar 38°C	200 bar 38°C	140 bar 32°C	140 bar 44°C	140 bar 38°C
Mint-furanone	5,1065	5,1850	6,8052	6,5067	3,8054	8,0069	6,1825	5,2397	4,9000
Alpha.-terpineol	2,9219	1,2826	2,2052	2,5349	1,3856	2,5166	1,4796	1,5716	2,1078
Beta-bisabolone	0,6809	1,3205	1,2407	0,8261	1,3744	1,1608	0,7965	1,3479	1,5514
Alpha.-bisabolol	2,0662								
D-limonene	1,1390								
Epizonarene	3,1333								
D-carvone	2,9009	3,5958	2,4906	2,5274	2,4305	1,7394	3,2709	3,0141	3,6555
Cis-carveol	2,0620	3,1889	2,9937		2,7634	2,7076	2,3114	2,857	2,7696
Carveol	1,5669	1,2942						1,1653	
Bicyclosesquiphellandrene	1,3932								
l-Selinene	2,9989								
Cosmene	1,0192								
Alloaromadendrene	0,417								
Alloaromadendrene oxide-(1)	1,8186								
A-Amorphene	0,8881								
Spathulenol	0,807								
Cyclosativene	0,7159								
B-Elemene	1,1603	0,9531		1,003	1,1563		1,0203	0,7053	0,7079
1,3,8-p-Menthatriene	0,7710	0,4376		0,6827			0,5561		0,5020
A- h achalene	0,4298								
Aristoflene	2,9004	2,8669	2,1936	2,3284	2,6752	2,5207	2,4522	2,7464	
Isoaromadendrene epoxide	1,6868								

Gama-muurolene	1,5434	1,3276	1,8651	1,2475	1,5898	1,3265	1,9285
Alfa-muurolene	0,6859	0,5663		0,5772		0,6509	
6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-ol				0,637			
3,4,4-Trimethyl-3-(3-oxo-but-1-enyl)-bicyclo[4.1.0]heptan-2-one				0,5306			
Exo-2-Hiroycineole				0,3763			
1-Ermyl -2,2-dimethyl-3-trans-(3-methyl-but-2-enyl)-6-methylidene-cyclohexane			1,2202				
1-Ermyl -2,2,6-trimethyl-3-(3-methyl-but-2-enyl)-6-cyclohexene			0,9599				
4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane			1,0598				
Eremophilene			0,4866				
B-Gurjunene			0,1605		0,623		
Isolongifolene, 9,10-dehydro-					1,1838		
(E)-2-Hiroy -4'-cyano-stilbene					1,0996		
2-carene					2,8193		
Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-		0,5200	0,6288		0,7614		0,0905
Trans-Sesquisabinene hydrate						0,1936	
Isolongifolene, 9,10-dehydro-			0,9301				1,1121
9-Isopropyl-1-methyl-2-methylene-5-oxatricyclo[5.4.0.0(3,8)]undecane		0,7752					

1-Methylene-2b-hydroxymethyl-3,3-dimethyl-4b-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexane	0.6593
Caryophyllene oxide	0.4298
Terpin	0.6969
Pyrethrin (ßmolin i)	0.5711
Aromadendrene oxide-(2)	0.4703

APÊNDICE B – Tabela compostos (Extração com CO2 e etanol)

Compostos (Extração com CO ₂ e etanol)	PC ⁽¹⁾	1 ⁽²⁾	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Mint- furanone	13,34	12,7 5	12,1 6	12,0 1	12,8 3	8,14 5	10,0 6,27	10,3 6,28	14,1 8,75	11,8 7,84	11,8 9,26	12,5 8,74	11,2 7,77	13,1 7,91	15,4 8,90
Alpha- terpineol	9,32	8,53	8,25	8,54	8,04	4,51	6,27	4,16	4,86	6,01	5,57	6,02	4,94	3,34	4,64
Bicyclo[4,4,0] dec-1-ene, 2- isopropyl-5- methyl-9- methylfene- Alpha-	5,71	5,42	5,34	5,96	3,45	2,97	4,16	4,86	6,01	5,57	6,02	4,94	3,34	4,64	6,38
bergamotene	4,12	4,21	2,78	4,16	4,61	4,37	4,94	4,95	6,68	4,67	8,27	6,42	8,06	4,55	8,36
D-Limonene		7,53	8,06	7,79	3,95		5,17			7,02		7,56		5,95	
ditol															
D-Carvone	4,10	3,60	3,43	3,60	3,47	2,05	2,66	2,67	3,77	3,36	3,72	3,67	3,26	3,09	3,65
Beta- bisabolene	3,82	3,55	3,45	3,50					3,44				3,11	3,28	
Carveol		1,05		1,07			0,76	0,76	0,55	1,03	1,12	1,14	0,93	1,03	0,97
Cis-carveol	2,46	3,98	2,76	3,94	2,77	1,83	2,56	1,85	2,60	2,69	2,74	2,81	2,29	2,65	2,40
(-)-Anisotolene	2,45												1,71		2,04
Caryophyllen e oxide	1,89						1,02								
Alpha- caryophyllene							0,53	0,55							
alcohol															
Alpha- bisabolol	4,48	4,53	5,08	4,61	2,56	3,17	2,99	4,35	4,16	4,28	4,13	4,13	3,80	4,11	4,62

β-Selinene	0,80	1,07	1,92	1,83									
γ-Cadinene	0,63												
Cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	0,58	0,57	0,58	0,55	0,31	0,41	0,40	0,60	0,54	0,59	0,59	0,51	0,54
Carvon	0,47	0,48	0,49	0,49	0,33	0,33	0,45	0,45	0,49	0,49			0,45
Hydrate													
Patchulane	0,42						0,27						
Alloaromadendrene													
Alloaromadendrene oxide (1)	0,40						0,20		0,37				
4-tert-Butyl-o-cresol	0,19												
Caryophyllene oxide	1,70	1,34	0,80	1,03	1,03	1,03	1,64	1,43					0,32
Alpha-aminophene	1,00	0,93	0,61	0,63	0,77	0,63	0,77	0,61	1,70	0,46	0,92		
Cadalene	0,86												0,82
p-tert-Butylbenzyl alcohol	0,23												
o-Cymene						0,30	0,30	0,51	0,38	0,48			
p-Cymene			0,26	0,28									0,32
Cyclohexanol acetate	0,63												2,73
Ledol	0,55												
Aristolone			0,85										1,93
4,5-di-epi-aristolochene										1,94			
Spathulenol													0,43

(¹) PC – Ponto central; (²) Ensaios: 1 – 14.