

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

MAYRA ARAUCO LIVIA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM
FLUIDO SUPERCRÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MUNHA
[*Minthostachys mollis* (Kunth)]**

Florianópolis, 2010

MAYRA ARAUCO LIVIA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM
FLUIDO SUPERCRÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MUNHA
[*Minthostachys mollis* (Kunth)]**

Dissertação submetida à Universidade
Federal de Santa Catarina como parte
dos requisitos para a obtenção do grau
de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

“Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico do óleo essencial de Munha [*Minthostachys mollis* (Kunth)]”

Por

Mayra Arauco Livia

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológico**, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Orientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lia Krücken Pereira

Dr. Iguatemi Melo Costa

Prof. Dr. Marinho Bastos Quadri

Florianópolis, 2010

*A Daniela, Luciana e Andrés, meus grandes amores.
A Lucrecia, mãe e amiga, que embora longe sempre esteve aqui
comigo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar forças para terminar este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina e os seus professores, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan, meu orientador, pela oportunidade, orientações e paciência na correção do meu “portunhol”. Obrigada por todo o conhecimento transmitido.

À banca examinadora, pela contribuição com este trabalho de dissertação.

Aos amigos, Alessandra Marangoni e André Zibetti, por me receber com tudo carinho e disposição para ajudar em todas as dificuldades que se apresentaram.

À Rafael Dias pela amizade, dicas e sugestões nas análises cromatográficas

Aos colegas do LCP que embora não sejam mencionados um a um, participaram deste processo.

E em especial ao meu querido esposo Andrés, pelo incentivo, amor e paciência nesta etapa de nossas vidas. Às minhas filhas amadas, Daniela e Luciana, pelo amor e carinho incondicional.

À minha querida mãe, Lucrecia, por acreditar em mim, cuidar de minhas filhas com todo o amor e carinho. Ao me querido pai, Luis, que junto à minha avó Estela me ensinaram as muitas propriedades da Munha . Além de ter participado no desenvolvimento deste trabalho, ao conseguir, secar e enviar o material vegetal.

Ao meu irmão Alexis, por fazer suas as minhas conquistas.

A todos os familiares e amigos pelo incentivo e presença.

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*
Chico Xavier.

Sumário

SUMÁRIO

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan	2
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
RESUMO	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>17</i>
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>17</i>
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 <i>Óleos essenciais</i>	<i>18</i>
3.2 <i>MATRIZ VEGETAL: MUNHA (MINTHOSTACHYS MOLLIS)</i>	<i>20</i>
3.2.1 <i>Óleo essencial de Munha</i>	<i>21</i>
3.2.2.1 <i>Pulegona</i>	<i>21</i>
3.2.2.2 <i>Mentona.....</i>	<i>22</i>
3.2.2.3 <i>Usos do Óleo essencial de Munha.....</i>	<i>23</i>
3.3 <i>Fluidos supercríticos.....</i>	<i>24</i>
3.3.1 <i>CO₂ Supercrítico (CO₂-SC).....</i>	<i>24</i>
3.4 <i>Extração supercrítica (ESC)</i>	<i>25</i>
3.5 <i>Extração com CO₂ supercrítico.....</i>	<i>26</i>
3.5.1 <i>Solubilidade e taxa de transferência de massa em extração supercrítica de óleos essenciais</i>	<i>27</i>
3.5.2 <i>Efeito da matriz vegetal.....</i>	<i>28</i>
3.5.3 <i>Efeito de parâmetros operacionais da extração supercrítica.....</i>	<i>29</i>
3.5.3.1 <i>Efeito da Densidade</i>	<i>29</i>

Sumário

3.5.3.2	<i>Efeito da Temperatura</i>	30
3.5.3.3	<i>Efeito da Pressão</i>	30
3.5.3.4	<i>Efeito dos modificadores (co-solventes)</i>	31
3.5.2.6	<i>Efeito da vazão e razão do solvente</i>	33
3.5.3.7	<i>Efeito da secagem</i>	34
3.6	<i>Hidrodestilação</i>	34
3.7	<i>Extração com solvente via soxleth</i>	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	<i>Preparação da matriz Vegetal</i>	37
4.2	<i>Solventes</i>	37
4.3	<i>Extração com CO₂ supercrítico (ESC)</i>	38
4.3.1	<i>Descrição do equipamento de Extração Supercrítica</i>	38
4.3.2	<i>Descrição do processo de extração supercrítica</i>	39
4.4	<i>Extração de óleo essencial de Munha por hidrodestilação</i>	40
4.5	<i>Extração de óleo essencial de Munha com solvente via soxleth</i>	41
4.6	<i>Análises Cromatográficas do óleo essencial de Munha</i>	41
4.7	<i>Procedimentos experimentais complementares</i>	43
4.7.1	<i>Densidade Real da Munha (ρ_r)</i>	43
4.7.2	<i>Densidade aparente da Munha (ρ_a)</i>	43
4.7.3	<i>Porosidade do leito (ϵ)</i>	44
4.7.4	<i>Rendimento da ESC do óleo essencial de Munha (η)</i>	44
4.7.5	<i>Determinação do tamanho médio da partícula</i>	44
4.8	<i>Determinação da densidade do CO₂-SC</i>	44
4.9	<i>Experimentos Realizados</i>	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

Sumário

5.1	<i>Hidrodestilação</i>	47
5.2	<i>Extração com solvente via soxleth</i>	48
5.3	<i>Extração do óleo essencial de Munha com CO₂-SC variando a pressão e a temperatura, sem adição de co-solvente. (ESC)</i>	49
5.3.1	<i>Curvas de extração</i>	49
5.3.2	<i>Avaliação do Rendimento</i>	50
5.3.3	<i>Análise da Composição química do extrato de óleo essencial de Munha obtido por CO₂-SC sem adição de co-solvente</i>	55
5.3.3.1	<i>Influência da pressão e da temperatura na seletividade dos compostos característicos</i>	59
5.4	<i>Extração com CO₂-SC do óleo essencial de munha variando a pressão e a temperatura, com adição de etanol como co-solvente (ESC-CS)</i>	61
5.4.1	<i>Avaliação do Rendimento</i>	61
5.4.1.1	<i>Influência da pressão e temperatura da ESC-CS no rendimento do extrato</i>	63
5.4.2	<i>Análise da composição química do óleo essencial de Munha obtido por CO₂-SC com adição de co-solvente</i> ...	64
5.4.2.1	<i>Influência da pressão e a temperatura na seletividade dos compostos característicos</i>	67
6.	CONCLUSÕES	70
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	ANEXO I- PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO	82

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1-: Caracterização histoquímica das secreções do tricoma glandular (peltado) encontrado nas folhas de P. ornatus. (ASCENÇÃO et al . 1999).....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2-: Planta de Munha. Fonte: Planta de Munha. Fonte: Revista Gener@cción, 2008</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3-: Sopa "Chupe Verde" Fonte: Revista Gener@cción, 2008</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4-: Estrutura química da Pulegona.(ADAMS, 2009)</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5-: Estrutura química da Mentona.(ADAMS, 2009)</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6-: Diagrama de fase do dióxido de carbono. Temperatura - Pressão, (SANDERS,1993).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 7-: Curva típica de extração Fonte: Brunner, 1994.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 8-: Planta de Extração Supercrítica (LCP)</i>	<i>38</i>
<i>Figura 9-: Curva de extração ideal do óleo essencial de Munha .</i>	<i>50</i>
<i>Figura 10-: Rendimento vs. densidade do CO₂-SC em função da pressão (100, 115 e 125 bar) a temperatura constante..</i>	<i>51</i>
<i>Figura 11-: Curvas de extração obtidas a 100 bar nas diferentes condições de temperatura (35, 45 e 55°C)</i>	<i>52</i>
<i>Figura 12-: Curvas de extração obtidas a 115 bar nas diferentes condições de temperatura (35, 45 e 55°C)</i>	<i>53</i>
<i>Figura 13-: Curvas de extração obtidas a 125 bar nas diferentes condições de temperatura (35, 45 e 55°C)</i>	<i>54</i>
<i>Figura 14-: Isotermas da ESC do óleo essencial de Munha</i>	<i>55</i>
<i>Figura 15-: Concentração de pulegona e mentona nas diferentes técnicas e parametros operacionais de extração.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 16-: Influência da pressão e a temperatura na concentração de Pulegona</i>	<i>59</i>

- Figura -17-: Influencia da pressão e a temperatura na concentração de Mentona..... 60*
- Figura 18- Curvas de extração da ESC com utilização de co-solvente do óleo essencial de Munha 62*

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela -1: Experimentos realizados.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela -2: Compostos identificados no extrato de óleo essencial de Munha obtido pela técnica de hidrodestilação</i>	<i>47</i>
<i>Tabela -3: Compostos identificados no extrato de óleo essencial de Munha pela técnica de extração com metanol via soxleth</i>	<i>48</i>
<i>Tabela -4: Densidade (g/mL) do CO₂-SC às diferentes condições operacionais e seus respectivos rendimentos (%)</i>	<i>51</i>
<i>Tabela -5: Compostos identificados na análise de GC-MS nos extratos de producidos na ESC nas diferentes condições de operação.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela -6: Número de compostos obtidos nas diferentes técnicas de extração.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela -7: Resultados de rendimento nas diferentes condições de extração</i>	<i>63</i>
<i>Tabela -8: Resultados da GC-MS dos extratos de óleo essencial de Munha obtidos na ESC-CS</i>	<i>65</i>

Resumo

RESUMO

Mynthostachys mollis (Kunth) é uma planta aromática membro da família botânica Lamiaceae que cresce naturalmente nos Andes da América do Sul, conhecida popularmente com o nome de Munha. Possui ação repelente e propriedades terapêuticas, entre elas carminativa, digestiva, anti-espasmódica, antifúngica, antiparasítica, vermífuga, também é utilizada para curar transtornos respiratórios como bronquite e asma. Na agricultura é amplamente utilizada no armazenamento de tubérculos para o combate de pragas, e na indústria cosmética representa um excelente fixador do aroma. No Peru e Argentina sua extração é feita em grande escala. Dentre os diferentes métodos de extração para óleos essenciais, pode-se destacar a extração supercrítica, um processo de separação a alta pressão, livre de resíduos tóxicos que não provoca degradação térmica e conserva as características organolépticas do produto, além das técnicas tradicionais conhecidas como a hidrodestilação e a extração com solvente via “soxleth”. Assim, sendo que até o momento, não se achou registro de pesquisa de extração de óleo essencial de Munha com fluidos supercríticos o objetivo que norteia esta dissertação foi a avaliação do processo de extração de óleo essencial de Munha com CO₂ supercrítico, comparado com as principais técnicas tradicionais de extração. Os critérios utilizados para atingir o objetivo foram o rendimento mássico e a composição química, buscando a *pulegona* e a *mentona* como os principais compostos do óleo. Na extração supercrítica utilizou-se pressões de 100, 115 e 125 bar, variando com temperaturas de 35, 45 e 55°C. Também trabalhou-se com a adição de etanol como co-solvente, nas mesmas condições de operação. A hidrodestilação foi realizada a uma temperatura de 95°C durante 240 minutos. E na extração via soxleth utilizou-se o metanol como solvente a 70°C de temperatura durante 180 minutos. Os resultados indicaram que a extração supercrítica com adição de co-solvente foi a técnica que apresentou as melhores concentrações de compostos característicos. Sendo que para a *pulegona* a melhor concentração obtida foi de 49,93%, a 115 bar e 35°C. Já para o caso da *mentona* a melhor condição foi a de 125 bar com 55°C, obtendo uma concentração de 36,96%.

*Abstract***ABSTRACT**

Myrthostachys mollis (Kunth) is a scented member of the botanical family Lamiaceae, that grows naturally in the Andes of South America. Has therapeutic properties, including carminative, digestive, anti-spasmodic, antifungal, antiparasitic, anthelmintic, is also used to cure disorders respiratory conditions such as bronchitis and asthma. In agriculture is widely used in the storage of tubers for pest control, and the cosmetics industry is an excellent fixative aroma. In Peru and Argentina its extraction is done on a large scale. Among the different extraction methods for essential oils, you can highlight the supercritical extraction, a separation process at high pressure, free of toxic waste that does not cause thermal degradation and retains the characteristics of the product, in addition to traditional techniques known as steam distillation and solvent extraction via *Soxleth*. And up to date, no record found research about *Munha* essential oil supercritical extraction in order that guides this work, the objective of this dissertation was to evaluate the process of extraction of essential oil with supercritical CO₂ *Munha* compared with the main traditional extraction techniques. The criteria used to reach the goal were the mass yield and chemical composition, searching for pulegone and menthone as the main compounds of the oil. In the supercritical extraction were used pressures of 100, 115 and 125 bar, with temperatures ranging from 35, 45 and 55 ° C. Also worked with the addition of ethanol as co-solvent under the same operating conditions. The hydrodistillation was performed at a temperature of 95 ° C for 240 minutes. And the extraction via *Soxleth* we used methanol as solvent at 70 ° C temperature for 180 minutes. The results indicated that the supercritical extraction with the addition of co-solvent was the technique that produced the best concentrations of characteristic. Since for the best pulegone concentration obtained was 49.93%, which is the condition of 115 bar and 35 ° C. As for the case of menthone was the best condition of the 125 bar 55 ° C obtaining a concentration of 36.96%.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são compostos voláteis provenientes de plantas aromáticas e vêm sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia. Estão constituídos de misturas complexas de monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos oxigenados e compostos relacionados, derivados do metabolismo secundário das plantas (ARAUS *et al.* 2009; REVERCHON, 1997)

A família Lamiaceae representa a um grande número de plantas aromáticas que possuem estruturas celulares especializadas para a produção de óleos essenciais. Entre elas se encontra *Minthostachys mollis* (Kunth) conhecida nos Andes como o nome de Munha, o seu uso no Peru e na Argentina se dá em grande escala (SCHMIDT-LEBUN, 2008).

A Munha é uma das plantas mais importantes na medicina tradicional andina, possui propriedades carminativa, digestiva, anti-espasmódica, antifúngica, antiparasítica, vermífuga, também é utilizada para curar transtornos respiratórios como bronquite e asma (UGARTE, *et al.*, 1984). É muito utilizada também na fumigação de casas por sua ação repelente (ORMAECHEA, 1980) é amplamente utilizada na proteção do armazenamento de tubérculos (GUERRA *et al.*, 2008). Já na indústria cosmética usa-se como um excelente fixador do aroma (LUPACA *et al.*, 2008).

A extração supercrítica é uma técnica de separação que geralmente utiliza como solvente o dióxido de carbono em estado supercrítico ($T_c = 32^\circ\text{C}$. $P_c = 74$ bar). Esse solvente é inerte, não tóxico, não inflamável e de fácil acesso. Esse processo tem sido visto como uma alternativa à extração de compostos naturais devido às vantagens que possui em relação às técnicas tradicionais, dado que é um processo flexível com a possibilidade de uma modulação contínua do poder de seletividade do solvente. Também pode-se citar a vantagem da não utilização de solventes orgânicos que além de serem caros podem contaminar os extratos (REVERCHON, DE MARCO. 2006; GOMEZ e OSSA, 2002).

A maior desvantagem que apresenta o CO_2 supercrítico é a de possuir baixa polaridade, o que é ruim para a extração de compostos com alta polaridade. Para essa limitação, utiliza-se co-solventes, que em pouca quantidade podem melhorar a solubilidade do CO_2 supercrítico

Introdução

(ARAÚJO, 1995; GENENA, 2005). Além disso, a adição do co-solvente promove o aumento na seletividade devido à maior dependência do poder de dissolução com a temperatura e pressão (BRUNNER, 1994).

O objetivo deste trabalho foi a avaliação do processo de extração do óleo essencial de Munha com CO₂ supercrítico (com e sem adição de co-solvente) a diferentes condições de pressão (100, 115 e 125 bar) e temperatura (35°, 45° e 55°C), comparando os resultados em termos de rendimento mássico e composição química com os resultados obtidos nas principais técnicas tradicionais de extração (hidrodestilação e *soxleth*). Com isso, determinou-se a técnica mais eficiente e os seus parâmetros operacionais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o processo da extração do óleo essencial de Munha com CO₂ em estado supercrítico, com e sem adição de co-solvente e compará-lo com as técnicas tradicionais de hidrodestilação e extração com solvente (*soxleth*), visando identificar o processo mais eficiente e os seus parâmetros operacionais.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o rendimento mássico da extração de óleo essencial de Munha com CO₂ em estado supercrítico.
2. Avaliar o rendimento mássico da extração de óleo essencial de Munha com CO₂ em estado supercrítico com adição de co-solvente.
3. Avaliar o rendimento mássico da Hidrodestilação de óleo essencial de Munha.
4. Avaliar o rendimento mássico da extração com solvente via *soxleth* de óleo essencial de Munha.
5. Analisar a composição química do óleo essencial de Munha proveniente dos diferentes tipos de extração utilizadas e comparar o rendimento e condições de operação utilizadas

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nessa revisão serão abordados temas relacionados com os óleos essenciais, principalmente o seu papel fisiológico nas plantas. Será apresentada a Munha e finalmente alguns aspectos do processo de extração com CO₂ supercrítico serão explicados.

3.1 Óleos essenciais

Do ponto de vista biológico os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais, compostos complexos caracterizados por seu cheiro forte, produzidos por plantas aromáticas com metabolitos secundários (BAKKALI *et al.* 2007).

Os óleos essenciais estão contidos em estruturas especializadas que dependendo da família vegetal se encontram distribuídos nos diferentes órgãos da planta. Na família Lamiaceae que representa um grande grupo de plantas aromáticas, a estrutura que contem o óleo essencial chama-se *tricoma glandular*, que pode ser encontrada nas folhas. Estas estruturas dependendo de sua localização e morfologia (*peltados e capitados*) secretam diferentes misturas de compostos que compõem o óleo essencial da planta, como apresentado na Figura 1. (ASCENÇÃO, 1999; LAWRENCET, 2001).

Está claramente demonstrado que os metabolitos secundários possuem uma função adaptativa com seu ambiente, contribuindo significativamente na interação com o ecossistema onde a planta se desenvolve. As principais funções destes metabolitos são descritas como antibióticas, antifúngicas, antivirais, anti-germinativa e tóxica para espécies herbívoras em competição (BOURGAUD *et al.* 2001). Além disso, protegem a planta dos danos ocasionados pelos raios U.V. (LI *et al.* 1993), atraem determinados insetos para favorecer a dispersão do pólen e repelem os que são indesejáveis (BAKKALI *et al.* 2007).

ZYGADLO *et al.* (1996) estudaram a composição dos óleos essenciais de *Minthostachys verticillata* em três diferentes localidades argentinas, e observaram que mesmo sendo a mesma espécie, a composição dos óleos essenciais era significativamente diferente.

Materiais e Métodos

Assim, as plantas possuem uma alta variabilidade genética, dado que suas características estão sob a pressão da mudança contínua do seu entorno, ou seja, a sua síntese é altamente induzível (HARTMANN 2007; BOURGAUD *et al.* 2001).

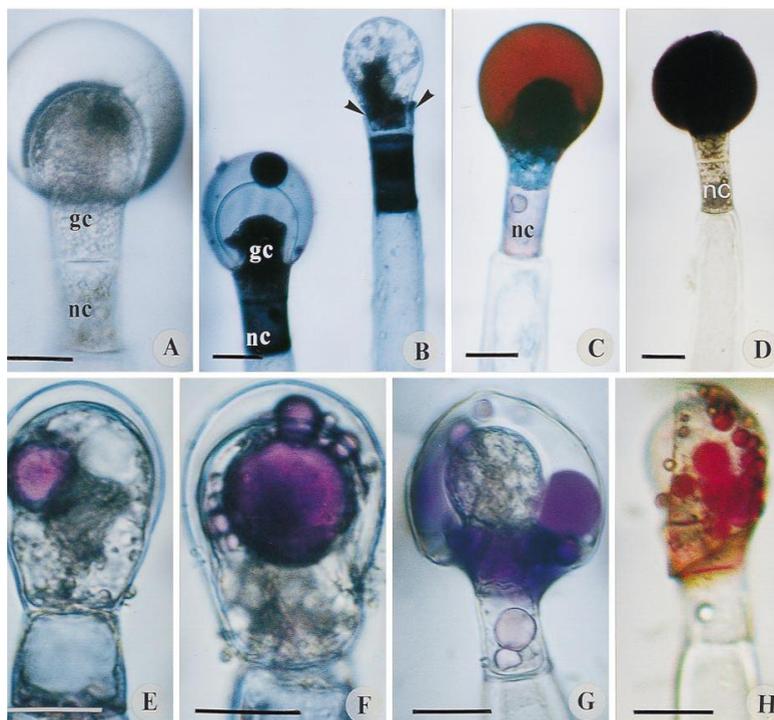


Figura 1-: Caracterização histoquímica das secreções do tricoma glandular (peltado) encontrado nas folhas de *P. ornatus*. [A-D]: gc indica célula glandular; nc indica a célula pescoço. [E-F]: secreções de óleo essencial pelo tricoma glandular. [H]: secreções cuja coloração indica a presença de polissacarídeos. (ASCENÇÃO *et al.* 1999)

Do ponto de vista químico, os óleos essenciais são compostos voláteis de alto valor agregado amplamente utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética e agrícola. Estão constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8), que podem estar associados em monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos oxigenados e compostos relacionados derivados do metabolismo secundário da planta. (REVERCHON, 1997)

Materiais e Métodos

Os óleos podem conter entre 20-60 componentes com diferentes concentrações. Frequentemente contem de dois a três componentes majoritários (20-70%). Geralmente são esses componentes que determinam as propriedades biológicas do óleo (BAKKALI et al. 2007).

3.2 MATRIZ VEGETAL: MUNHA (*MINTHOSTACHYS MOLLIS*)

Munha é uma planta arbustiva oriunda dos Andes e pertence à família das lamiáceas, (SCHMIDT-LEBUNN, 2008). É encontrada entre 2000 e 3800 metros de altitude. Lenhosa, chega a medir entre 0,8 a 1,2m de altura. Frondosa na parte superior, ereta e vilosa. O caule é ramificado desde a base e possui folhas serradas pequenas (Figura 2). As flores são brancas e estão reunidas na forma de racimos curtos. (Ministério de Agricultura do Peru,2009)



Figura 2-: Planta de Munha. Fonte: Planta de Munha. Fonte: Revista Gener@cción, 2008

Seu uso tradicional remonta ao século XVI quando foi descoberta pela população andina. É uma planta carminativa, digestiva, anti-espasmódica, antimicótica, antiparasítica, vermífuga, também é utilizada para curar transtornos respiratórios como bronquite e asma (UGARTE, et al .1984).

Na culinária, é utilizada como condimento para sopas como o tradicional “chupe verde” (Figura 3) (ULLOA, 2006).

Materiais e Métodos



Figura 3-: Sopa "Chupe Verde" Fonte: Revista Gener@cción, 2008

Também é empregada na fumigação de casas com ação inseticida e repelente (ORMACHEA, 1980; GILLIJ, et al 2008).

Na agricultura, tanto as folhas quanto seu óleo, são utilizados na preservação e armazenamento de tubérculos por longos períodos, este procedimento é praticado em grande escala (SCHMIDT-LEBUNN A. 2008)..

3.2.1 Óleo essencial de Munha

O óleo essencial apresenta coloração verde claro, de cheiro adocicado e mentolado.

Entre os componentes mais importantes do óleo essencial de Munha, que são os que lhe conferem as suas propriedades características, estão a *Pulegona* e a *Mentona*, (SCHMIDT-LEBUNN A. 2008)

3.2.2.1 Pulegona

É um monoterpreno e uma cetona, cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{16}O$, com nomenclatura IUPAC (R)-5-Methyl-2-(1-ethylethylideno)

Materiais e Métodos

ciclohexanona (Figura 4). O peso molecular é de 152.2 g/mol. (ADAMS, P., 2009)

Até o momento tem sido achada só em plantas da família Lamiaceae e possui propriedades medicinais, repelente e interfere no desenvolvimento e reprodução de insetos (LEE S. *et al.*, 2003; ASEKUN, O. T *et al.*, 2007; ADAMS, 2009)

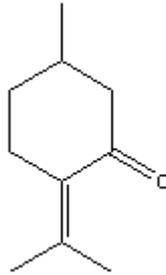


Figura 4-: Estrutura química da Pulegona.(ADAMS, 2009)

3.2.2.2 Mentona

É um monoterpeno e uma cetona, achado geralmente na família Lamiaceae (ASEKUN, O. T *et al.*, 2007)

A sua fórmula molecular é $C_{10}H_{18}O$ (Figura 5), com o número CAS: 89-80-5. A nomenclatura IUPAC o identifica como: ciclohexanona, 5 metil-2-(1-metiletil)-trans-. O peso molecular é de 154.25 g/mol. É utilizada em perfumaria e na indústria de cosméticos por causa do seu cheiro mentolado característico. (ADAMS, 2009)

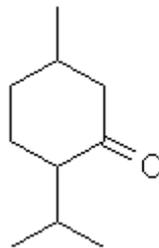


Figura 5-: Estrutura química da Mentona.(ADAMS, 2009)

Materiais e Métodos

3.2.2.3 Usos do Óleo essencial de Munha

Na indústria cosmética, o óleo essencial de Munha utiliza-se como um excelente fixador de aroma. (LUPACA *et al.*,2008)

Uma das utilizações que mais tem sido estudada é a preservação da batata, a qual por ser praticada em grande escala tem sido sistematicamente testada.

Assim, Aliaga and Feldheim (1985) (apud POURMORTAZAVI, 2008) extraíram o óleo essencial de Munha a partir de 1000 kg de planta procedente da localidade de Jauja-Junín (Perú). Analisaram e testaram o potencial de inibição de brotes assim como a preservação do peso do tubérculo tanto quanto a sua qualidade após sua armazenagem. Eles observaram que as batatas armazenadas entre 4-8 meses em uma atmosfera saturada com óleo essencial de Munha perderam muito significativamente menos peso do que o padrão e também não desenvolveram brotes. Um dia após a remoção dos compostos de armazenamento, as batatas tinham perdido o cheiro de hortelã e poderiam ser consumidas como se fossem recém colhidas. No óleo utilizado, as concentrações de pulegona e mentona foram de 33,1% e 48,2%, respectivamente.

Raman *et al.* (1987) trabalharam com pó de folhas secas de Munha e a polvilharam sobre o terreno. Nos resultados observou-se a redução significativa dos danos ocasionados pela traça da batata (*Gnorimoschema operculella* Zeller), assim como também uma redução na ocorrência na podridão das batatas em armazenamento.

Coleman *et al.* (2001) na procura de uma substituição dos pesticidas sintéticos como o Cloroprofan (Isopropil N-(-3-clorofenil) carbonato), testaram o efeito supressor de brotes da mentona provenientes da Munha e outras plantas da família Lamiaceae . Compararam os resultados com os obtidos pela aplicação de S(+)-carvona, (monoterpeno descrito como supressor de brotes mais antigo conhecido pela indústria). Observaram que os testes com mentona tiveram uma supressão entre 5 a 10 vezes maior do que os tratados com S(+)-carvona.

Do mesmo modo, Guerra *et al.* (2007) testaram óleo essencial de Munha em batatas em período de armazenamento e mostrou ter dissuadido significativamente os ovos de traça da batata.

3.3 Fluidos supercríticos

Um componente puro é considerado em um estado supercrítico, se a sua temperatura e sua pressão são mais elevadas do que os valores críticos. (BRUNNER 1994).

Os fluidos supercríticos (FSC) têm sido usados como solventes para uma ampla variedade de aplicações tais como: extração de óleos essenciais, extração de íons metálicos, síntese de polímeros e nucleação de partículas. (ÖZEL *et al.*, 2000; REVERCHON e DE MARCO, 2006)

Um fluido supercrítico apresenta boas propriedades físicas de transporte de massa que realçam sua utilização como solvente para extração. Estas propriedades decorrem da densidade e viscosidade dos FSC. A sua densidade é próxima a do líquido e sua viscosidade é baixa, comparada ao seu gás. A alta densidade do FSC contribui para a grande eficiência no poder de dissolução das partículas do soluto, favorecendo o seu uso como solvente em processos de extração (RIZVI, 1994).

3.3.1 CO₂ Supercrítico (CO₂-SC)

Na prática, mais de 90% das extrações com fluidos supercríticos são levadas a cabo utilizando dióxido de carbono como solvente. Isto ocorre devido ao fato do CO₂ possuir valores críticos relativamente baixos como a temperatura de 32°C e uma pressão de 74 bar (Figura 6), além de ser relativamente atóxico, não inflamável, achado em estado puro a relativo baixo custo. (REVERCHON e DE MARCO. 2006.)

A maior desvantagem que apresenta o CO₂ supercrítico é a de possuir baixa polaridade o que é prejudicial para a extração de compostos com alta polaridade como as proteínas, vitaminas e alguns carboidratos. Por isto, utiliza-se co-solventes que se agregam em pouca quantidade para assim melhorar a solubilidade do CO₂ supercrítico. (ARAÚJO, 2000; GENENA, 2005)

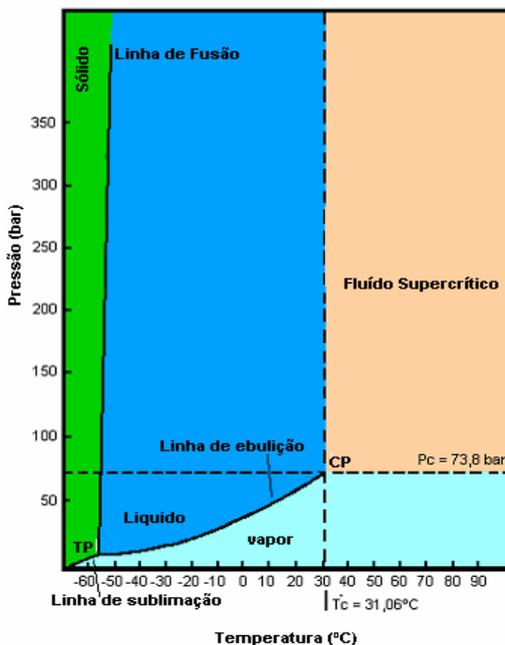


Figura 6-: Diagrama de fase do dióxido de carbono. Temperatura - Pressão, (SANDERS,1993).

3.4 Extração supercrítica (ESC)

A extração supercrítica tem sido vista como uma alternativa ao processo de extração de compostos naturais devido às vantagens que possui em relação às técnicas tradicionais, por ser um processo flexível com a possibilidade de um ajuste contínuo do poder de seletividade do solvente. Também se pode citar a vantagem da não utilização de solventes orgânicos, que além de serem caros, podem contaminar os extratos (GOMEZ e OSSA, 2002; REVERCHON e DE MARCO, 2006)

Esta forma de operação apresenta uma vantagem especial para a extração de óleos essenciais devido à obtenção de extratos sem degradação de componentes termo sensíveis, o que conduz a um produto final com alta pureza. (DANIELSKI *et al.*, 2007)

A única desvantagem do processo vem a ser o alto custo de investimento dos equipamentos. Entretanto, os custos operacionais de extração e separação são relativamente baratos e muito simples de

Materiais e Métodos

calcular o *scale up* para a indústria (GOMEZ e OSSA, 2002; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

3.5 Extração com CO₂ supercrítico

Na prática, mais do que 90% das extrações realizadas com fluido supercrítico são realizadas utilizando como solvente o CO₂. (POURMORTAZAVI, 2008)

O esquema básico do processo inclui um recipiente carregado com o material do qual será feita a extração. Este material deve ter sido pré-tratado, ou seja, deve ter sido seco e moído para favorecer o processo de extração. O FSC e o extrato fluem até outro recipiente onde por despressurização serão separados do meio gasoso e coletados, conforme será detalhado no item 4.3.1.

Os processos de extração com fluido supercrítico apresentam uma curva típica de extração representada na Figura 7, caracterizada por duas etapas:

Na primeira parte da curva (I) tem-se uma taxa de extração constante, e a sua inclinação corresponde à solubilidade. Neste sentido, se a inclinação é pequena significa que resistências à transferência de massa podem governar o processo e o equilíbrio ainda tardará a ser atingido. Esta parte da curva será determinante para estabelecer o tempo de residência necessário para uma adequada extração do soluto durante o processo;

A segunda parte da curva (II) representa a etapa assintótica rumo ao valor limite da quantidade de substâncias extraíveis.

A curva de extração depende de parâmetros operacionais e de todos os fenômenos presentes durante o processo no interior do leito fixo (BRUNNER,1994).



Figura 7-: Curva típica de extração Fonte: Brunner, 1994

3.5.1 Solubilidade e taxa de transferência de massa em extração supercrítica de óleos essenciais

Existem muitas variáveis a ser consideradas em um processo de extração com FSC. Uma delas é a solubilidade do soluto a ser extraído neste processo.

A solubilidade de um soluto em um fluido supercrítico é a quantidade máxima deste que pode ser dissolvida por unidade de massa do fluido supercrítico. Desta forma, pode-se assumir que quanto maior a solubilidade do soluto menor será o tempo de extração, ou seja, menor consumo de solvente e, por conseguinte, maior a eficiência na extração (POURMORTAZAVI, 2008).

O desenvolvimento de processos de extração com FSC depende marcadamente do poder solvente do fluido, da volatilidade do soluto e da variação destas propriedades com as condições de operação. Porém, as condições operacionais têm que ser escolhidas de modo a se obter a extração seletiva de compostos de interesse, reduzindo, a um mínimo, a co-extração de compostos indesejáveis (REVERCHON, 1997).

Materiais e Métodos

O poder solvente dos FSC pode ser relacionado diretamente com a sua densidade, que aumenta à medida que a pressão se incrementa e a temperatura diminui (BRUNNER, 1994; DEL VALLE e AGUILERA, 1999).

GASPAR *et al* (2003) testaram a solubilidade de duas boragináceas e uma lunaria em CO₂ supercrítico. Variaram pressão e temperatura de 60 bar a 300 bar e 10°C a 50°C. Observaram que a solubilidade aumenta com o incremento da pressão, como resultado direto de um aumento na densidade do solvente. A temperatura apresentou comportamento similar. Mas a baixas pressões (60 a 100bar) um aumento de temperatura resultava na diminuição da solubilidade.

BERNA *et al.* (2000) testaram a solubilidade do *limoneno* e *linalool* puros a temperaturas de 45°C e 55°C com pressões de 69 a 111 bar. Mostraram que ao aumentar a pressão aumenta a solubilidade, porém, ao aumentar a temperatura nas mesmas condições o aumento da solubilidade não foi significativa.

Por essa razão que se afirma que as condições de solubilidade dependem da interação do solvente com o soluto.

3.5.2 Efeito da matriz vegetal

Diferentes fatores tais como o tamanho da partícula, forma, superfície, porosidade, umidade, concentração de solutos extraíveis e a natureza da matriz vegetal irão afetar o resultado em uma extração com FSC. A matriz pode exigir condições de extração específica (REVERCHON e DE MARCO, 2006.)

O sucesso de uma ESC não depende apenas dos parâmetros escolhidos, mas também da boa escolha da matriz vegetal. Por conseguinte a ESC deve ser considerada como um estágio de 4 passos: i) dessorção do composto na matriz; ii) Difusão subsequente através da matriz, iii) solubilização do composto pelo FSC e iv) retirada do óleo para fora da célula pelo FSC. Cada parte deste processo deve ser cuidadosamente otimizado para obter resultados reproduzíveis em grande escala (BRUNNER, 1994).

A estrutura física da matriz é um ponto importante, sendo que a eficiência da extração está relacionada com a habilidade do FSC em difundir-se dentro desta. Por essa razão as condições de extração de um mesmo composto diferem de uma matriz a outra (SALGIM, 2007).

Como regra geral tem-se que: diminuindo o tamanho da partícula da matriz se dá uma maior área de contato, tornando assim mais

Materiais e Métodos

eficiente a extração. No entanto, moagem excessiva pode prejudicar a ESC devido à reabsorção dos compostos de interesse dentro da superfície interna da matriz, e pode acontecer uma queda de pressão dentro do extrator, devido a formação de caminhos preferenciais no interior do leito. Como consequência, parte do solvente flui pelos canais formados sem ter contato com o resto do soluto. Geralmente, partículas com diâmetros médios de aproximadamente entre 0,25 e 2,0 mm são utilizadas. A dimensão ótima deve ser escolhida caso a caso, considerando o conteúdo de água na matriz vegetal e a quantidade de compostos líquidos extraíveis que podem produzir fenômenos de coalescência entre as partículas, favorecendo assim a extração irregular ao longo do extrator. Adicionalmente, a produção de partículas muito pequenas pela moagem poderia favorecer a perda de compostos voláteis (ESMELINDRO et al., 2004; REVERCHON. e DE MARCO, 2006; SALGIM, 2007).

3.5.3 Efeito de parâmetros operacionais da extração supercrítica

A seleção das condições de operação depende de compostos ou famílias de compostos específicos a serem extraídos. Peso molecular e polaridade devem ser levados em consideração, com algumas regras gerais a serem seguidas (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Por esse motivo, devem ser considerados os efeitos dos outros parâmetros observados numa extração com FSC.

3.5.3.1 Efeito da Densidade

Como regra, um aumento da densidade do fluido supercrítico implica em um aumento na solubilidade do soluto (BRUNNER,1994). E conforme o observado no item 3.5.1 desta dissertação, um aumento na solubilidade implica em maior eficiência da extração.

A solubilidade do soluto no fluido supercrítico é função da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto (FERREIRA, 1991), além da natureza química dos compostos. Nas vizinhanças do ponto crítico, grandes mudanças de densidade podem ser produzidas por pequenas mudanças na pressão e temperatura de operação. Esta

Materiais e Métodos

propriedade é mais sensível a temperaturas próximas ao ponto crítico do que em pressões elevadas (BRUNNER,1994).

Em uma isoterma, o aumento da pressão aumenta a densidade do solvente, diminuindo a distância intermolecular, aumentando assim a interação entre as moléculas de soluto e solvente. Já em uma isóbara, o aumento da temperatura acarreta uma diminuição da densidade do solvente e um aumento da pressão de vapor do soluto (FERREIRA,1991). Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação ou condensação retrógrada, resultado da competição entre esses efeitos (densidade do solvente e pressão de vapor do soluto) e da predominância de um dos dois. Assim, abaixo da pressão de inversão das isotermas o efeito da densidade do solvente é dominante, logo a solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Acima da pressão de inversão, o efeito da pressão de vapor do soluto é dominante e a solubilidade aumenta com a temperatura. (GÜÇLÜ-ÜSTUNDAG & TEMELLI; MICHELLIN *et al*; 2004, 2005).

3.5.3.2 Efeito da Temperatura

O aumento da temperatura acarreta dois efeitos contrários em relação a solubilidade. Em um primeiro momento, o aumento da temperatura reduz a densidade do CO₂-SC a uma pressão constante, reduzindo, assim, o poder solvente do fluido. Em um segundo momento, o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos, aumentando a solubilidade.

Quando se tem padrões de pressão elevados, o efeito que predomina é o aumento da solubilidade, e em pressões pouco acima do ponto crítico predomina a redução da solubilidade (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006; ARAUS *et al.*,2009)

3.5.3.3 Efeito da Pressão

A pressão representa outro fator importante no processo de extração supercrítica tanto quanto a temperatura, dado que pode ser utilizada para ajustar a seletividade do FSC. Um aumento na pressão resulta em um aumento na densidade do FSC. Tem-se como regra:

Materiais e Métodos

quanto mais elevada é a pressão, maior é o poder do solvente e menor a seletividade da extração.

A densidade no caso do CO₂-SC pode variar aproximadamente entre 0,15 a 1,00 g/cm³ e está relacionada diretamente com a temperatura e a pressão (ROOP *et al.*, 1989; BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006)

3.5.3.4 Efeito dos modificadores (co-solventes)

O uso de co-solvente ou modificador foi proposto como um método para melhorar a solubilidade da extração, permitindo operações com pressões não tão elevadas. Estes atuam aumentando o rendimento e alterando a solubilidade do processo, por meio de mudanças das características de polaridade do solvente, promovendo interações específicas com o soluto, como são, por exemplo, as pontes de hidrogênio (TEBERIKLER *et al.*, 2001; DAUKSAS *et al.*, 2002, VASAPOLLO *et al.*, 2004; GRIGONIS *et al.*, 2005; NAWAZ *et al.*, 2006; SALGIM, 2006). É por esta razão que a natureza do co-solvente vai depender da natureza do soluto a ser extraído (SOVOVÁ *et al.*, 1999)

Em uma extração com fluido supercrítico de óleos essenciais geralmente é utilizado como solvente o CO₂ que, entretanto, extrai outros compostos lipofílicos, além dos compostos voláteis (SIMÕES e SPITZER, 2001).

Para substâncias de baixa volatilidade, sua solubilidade em gases supercríticos apolares diminui com o aumento da massa molecular e com o aumento da polaridade e número de grupos funcionais polares (BRUNNER, 1994). Nesse caso, a solubilidade dessas substâncias pode ser aumentada mediante a adição de um co-solvente modificador, substância com volatilidade intermediária entre o soluto e o solvente, normalmente orgânico líquido.

O co-solvente é adicionado ao fluido supercrítico com a intenção de se obter propriedades que os componentes puros não têm sozinhos, e permitir ao solvente alcançar um aumento no poder de solvatação, tanto como um aumento na dependência do poder de solvatação do solvente com a temperatura e pressão (BRUNNER, 1994).

Além do aumento no poder de dissolução do solvente supercrítico, a adição de um co-solvente promove um aumento na seletividade. Esse fenômeno ocorre devido a uma maior dependência do poder de dissolução do solvente com a pressão e a temperatura

Materiais e Métodos

(BRUNNER, 1994). Esta seletividade está relacionada também à polaridade do solvente empregado e do soluto. O conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja extrair indica o solvente ou mistura de solvente mais adequado para determinada extração (PRATES, 2006).

Segundo Morrison & Boyd (1990), a polaridade de um composto está intimamente ligada às propriedades físicas e químicas das moléculas, exercendo influência sobre o ponto de fusão, o ponto de ebulição e a solubilidade das mesmas em determinado solvente, o que inclui a soma de todas as interações soluto-solvente, como as pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals.

Na escolha de um solvente deve-se levar em conta, além dos fatores referentes à eficiência do processo de extração, a toxicidade, riscos que seu manuseio representa a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade, o custo do solvente e suas propriedades físico-químicas (SAUCEAU *et al.*, 2004).

A curva crítica de uma mistura de solventes, com respeito à composição, depende da proporção entre a pressão e a temperatura críticas dos componentes puros. Com o aumento da diferença no tamanho das moléculas, a pressão crítica da mistura aumenta e pode alcançar valores superiores às pressões críticas dos componentes puros. As temperaturas críticas de uma mistura binária frequentemente são intermediárias às temperaturas críticas dos componentes puros (BRUNNER, 1994). A adição de um co-solvente aumenta as propriedades críticas da mistura (TONTHUBTHIMTHONG *et al.*, 2004)

POURMORTAZAVI *et al.* (2003) estudaram a extração com CO₂-SC e a adição de diferentes modificadores como o Metanol, Etanol, Diclorometano e Hexano em concentrações de 1 e 5% a uma pressão constante (100 atm) e temperatura (35 ° C) para medir seu efeito na composição do extrato de óleo essencial das partes aéreas de *Perovskia atriplicifolia* Benth. Os resultados desses estudos mostraram que a mudança do tipo de modificador poderia afetar significativamente a seletividade do processo de extração uma vez que as concentrações dos compostos presentes nos extratos variaram de acordo com o tipo de modificador utilizado.

Materiais e Métodos

3.5.2.5 Efeito do tempo de extração

Para realizar uma otimização econômica do processo de extração supercrítica, deve-se considerar além dos parâmetros anteriormente descritos, o tempo de extração. Este tempo será ótimo economicamente em função da taxa de extração

ARAUJO (2008) comparou diferentes tempos de extração, tendo em vista o rendimento obtido na extração de óleo essencial de patchouli. As extrações tiveram diferentes períodos estáticos e coleta de amostra, onde o limite para o término das mesmas era a completa exaustão da matriz vegetal. Foram testados seis períodos estáticos diferentes: 10; 20; 30; 40; 50 e 60 minutos. A vazão utilizada foi de 1,2 L/min. Os resultados mostraram que o processo mais eficiente foi a extração com 20 minutos de período estático, sendo que, nestas condições, gastou-se a menor quantidade solvente. No entanto, a extrações de 30 e 50 minutos de período estático, também apresentaram uma eficiência satisfatória até os 160 minutos aproximadamente, podendo ser tempos aplicados se os parâmetros forem otimizados.

3.5.2.6 Efeito da vazão e razão do solvente

Além disso, um fator importante que afeta diretamente a eficiência da extração é também a vazão do solvente. Este é relevante se uma resistência à transferência de massa controla o processo (BRUNNER,1994).

BRUNNER (1994) cita que a razão de solvente, definida como a razão entre a vazão mássica de solvente e a massa de sólidos (kg FSC/h/kg de matriz vegetal), é um dos fatores mais relevantes para o processo de extração. O aumento da vazão mássica de solvente para uma quantidade fixa de sólidos pode resultar em uma redução da carga do solvente, devido a um menor tempo de residência. No entanto, devido à maior vazão, a velocidade de extração tende a aumentar até um valor máximo a partir do qual pode sofrer um declínio.

A razão do solvente pode influenciar os custos de produção de duas maneiras: i) se o solvente leva consigo pouco óleo essencial após ter passado pelo leito, utilizando altas razões, mesmo diminuindo o tempo do processo de extração, significaria um alto custo operacional por unidade produzida. Por outro lado, pode-se dar também que ii) uma

Materiais e Métodos

alta razão de solvente, aumenta a quantidade de extrato, diminuindo assim o custo de produção por unidade produzida (BRUNNER,1994; REVERCHON e DE MARCO,2006).

Por esse motivo, a boa seleção destes parâmetros para promover a completa extração dos compostos desejados no menor intervalo de tempo deve ser feita após se identificar o mecanismo que controla o processo (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

3.5.3.7 Efeito da secagem

Dados da literatura indicam que as mudanças nas concentrações de compostos aromáticos durante a secagem dependem do método empregado, uma vez que os compostos voláteis são termos-sensíveis.

ASEKUN *et al.* (2007) testaram diferentes tipos de secagem em plantas de *Mentha longifolia* L. e determinaram que as concentrações dos extratos de óleo essencial resultante variaram dependendo do método empregado na secagem. Assim, determinaram que em alguns casos os compostos se degradaram.

VENSKUTONIS (1996) testou temperaturas de 30° e 60°C na secagem prévia da matriz vegetal na extração supercrítica *Thymus vulgaris* L e *Salvia officinalis* L. e concluiu que as concentrações de compostos voláteis foram dependentes da temperatura de secagem. Observou também que temperaturas elevadas (60°C) afetaram fortemente as estruturas biológicas chamadas de tricomas glandulares onde são depositados os óleos essenciais.

WONGPORNCHAI *et al.*(2004), testaram o efeito das diferentes temperaturas de secagem e armazenamento no aroma e na qualidade em arroz (*Oryza sativa* L.) e determinaram que temperaturas de secagem médias (30 a 40°C) e tempos curtos de armazenamento produziram melhores resultados para a preservação do aroma e qualidade dos componentes. Também concluíram que temperaturas muito elevadas (70°C) devem ser descartadas, pois degradaram o produto.

3.6 Hidrodestilação

O processo de hidrodestilação é o processo mais empregado para a obtenção dos óleos essenciais a partir de plantas aromáticas (MUKHOPADHYAY, 2000; POVH, 2000; SANTOS, 2002).

Materiais e Métodos

É um processo de separação baseado nas diferenças de pressão de vapor de soluto (matriz vegetal), e do solvente (água) (HEATH, 1981). Embora os óleos essenciais possuam ponto de ebulição normalmente entre 200 e 300°C, superior à água cujo ponto de ebulição é de 100°C, eles são vaporizados facilmente com o vapor da água. Para isto, da mesma maneira que na ESC a matriz vegetal precisa de um pré-tratamento para facilitar a saída do óleo que consiste na secagem e moagem da planta (SANTOS, 2004).

Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação muitas vezes não possuem integralmente o aroma da planta ou das partes submetidas à destilação. Esta diferença na característica do aroma obtido pode ser devido à degradação térmica que os componentes dos óleos essenciais não são extraídos totalmente. Outros podem ser degradados gerando produtos diferentes e com odor desagradável. Também podem acontecer alguns desses produtos permaneçam na água após a condensação sendo assim descartados junto com água condensada (HEATH,1981; MUKHOPADHYAY,2000).

3.7 Extração com solvente via *soxleth*

É um tipo de extração relativamente barata que apresenta certas desvantagens como a alta concentração de solvente orgânico, que na maioria das vezes é tóxico, razão pela qual tem que ter um cuidado especial.

Outra desvantagem é o pós-tratamento necessário para recuperar o solvente, que pode resultar na perda de compostos importantes dado que são compostos termo sensíveis (ZOUAGH *et al.* 2004).

Nesta modalidade, utiliza-se um aparelho no qual é introduzida a matriz vegetal em contato com o solvente orgânico contido em um recipiente. O solvente é aquecido até chegar ao ponto de ebulição. Uma vez que se atingiu a temperatura desejada, se deixa recircular o solvente até completar-se a extração. Terminado o processo tem-se que recuperar o solvente mediante evaporação (POKRYWIECKI, 2006).

Materiais e Métodos

Neste capítulo procurou-se apresentar as principais características dos óleos essenciais, do óleo essencial de Munha, suas aplicações e principais componentes. Assim como uma revisão especializada dos principais características dos processos de extração.

A seguir estão apresentados os materiais e os métodos utilizados na parte experimental desta dissertação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, apresentam-se a descrição do material, equipamentos, procedimentos de extração, análise da composição química e cálculos complementares utilizados para a avaliação do óleo essencial de Munha.

4.1 Preparação da matriz Vegetal

O material vegetal foi colhido em Setembro do 2008 na localidade de Tarma (Junín) a 2800 m.s.n.m no Peru.

Foi secado em estufa a 30 °C por três dias nos laboratórios de química da Universidade Nacional Agrária La Molina. Após isso foi embalado em sacos de plástico preto e enviado à Florianópolis.

Uma vez chegada a Munha no LCP-UFSC, a moagem foi conduzida em moinho de facas (MA580, Marconi, Brasil) obtendo-se um pó verde escuro fino cujas partículas tem tamanho inferior a 0,545 mm (medida da abertura da peneira do moinho).

4.2 Solventes

Na extração via soxleth foi utilizado Metanol ($d = 0.7918 \text{ g/cm}^3$).

Para o processo de extração supercrítica foi utilizado dióxido de carbono (CO_2) com 99,95% de pureza fornecida pela empresa AGA do Brasil S/A em cilindros de 25 Kg. Além disso, na segunda parte utilizou-se como co-solvente o Etanol 70° GL ($d = 0,92$ a 40°C).

4.3 Extração com CO₂ supercrítico (ESC)

4.3.1 Descrição do equipamento de Extração Supercrítica

As extrações de óleo essencial de Munha com CO₂ supercrítico foram realizadas na unidade de extração supercrítica do Laboratório de Controle de Processos do departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

Os equipamentos utilizados para a extração estão esquematizados na Figura 8 e listados a seguir:

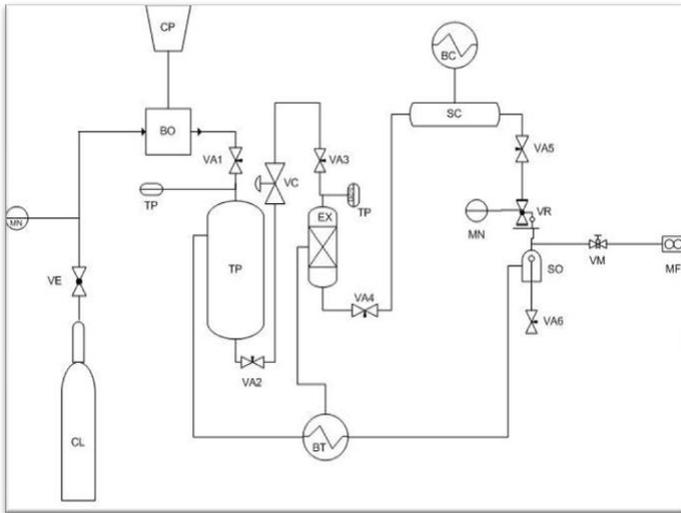


Figura 8:- Planta de Extração Supercrítica (LCP)

- a) **Compressor de ar (CP)** (CSL 20 BR, Schulz, Brasil);
- b) **CO₂ (CL)** (99,9% de pureza, AGA, Brasil);
- c) **Bomba ou booster (BO)** (DLE-15, Maxpro Technologies, Alemanha);
- d) **Tanque pulmão (TP)**: construído em aço inox 316L, encamisado, com aproximadamente 0,60 m de

Materiais e Métodos

- comprimento e 0,10 m de diâmetro interno, volume interno de 4,7 L;
- e) **Extrator (EX)**: construído em aço inox 316L, encamisado, com aproximadamente 0,50 m de comprimento e 0,021 m de diâmetro interno, volume interno de 0,175 L;
 - f) **Separador de óleos (SO)**: construído em aço inox 316L, encamisado, com aproximadamente 0,15 m de comprimento e 0,075 m de diâmetro interno, volume interno de 0,660 L;
 - g) **Válvula de controle com acionamento pneumático (VC)** (807, Badger Meter, EUA);
 - h) **Válvula redutora de pressão (VR)** (SR-AL, Victor, EUA);
 - i) **Válvulas de agulha (VA)**: construídas em aço inox 316L, 344 bar de pressão e 38°C de temperatura (SS-1VS4, Swagelok, EUA);
 - j) **Válvulas de esfera (VE)**: construídas em aço inox 316L, 344 bar de pressão e 38°C de temperatura (SS-43S4, Swagelok, EUA);
 - k) **Válvula micrométrica (VM)**: construídas em aço inox 316L; usada para regular a vazão de solvente supercrítico (SS-21RS4, Swagelok, EUA);
 - l) **Medidor de fluxo (MF)** (PV500LPM0CC, Key Instruments, EUA);
 - m) **Banho termostático (BT)**: construído em alumínio com controle de temperatura (InControl, Brasil);
 - n) **Banho termocriostático (BC)** (MQBTC, Microquímica, Brasil);
 - o) **Transdutores de pressão (TP)** (RTP12/BE53R, AEP, Itália);
 - p) **Manômetros (MN)** (MTR, Brasil).

4.3.2 Descrição do processo de extração supercrítica

Abaixo estão listadas as operações seqüenciais que são executadas na extração:

Materiais e Métodos

- i. Primeiramente se liga o compressor e o cilindro de CO₂ quem alimenta o *booster*;
- ii. Abrindo a válvula AV1 o tanque pulmão (previamente aquecido pelo banho termostático BT na temperatura desejada) é alimentado pelo CO₂ do cilindro até ajustar a pressão na qual será realizado o experimento.
- iii. Uma vez que se atingiram os níveis de pressão e temperatura predeterminados, a válvula esfera é aberta, seguida da válvula AV2, controlando o fluxo para o extrator previamente carregado como a matriz vegetal (Munha). Ao abrir a válvula AV3, inicia-se o processo de carregamento do extrator e, portanto, a extração propriamente dita;
- iv. Após permanecer em contato por certo tempo com a matriz vegetal, a solução supercrítica (óleo essencial + CO₂) é direcionada para o coletor;
- v. Abrindo a válvula AV4 e AV5 se chega à válvula VR, onde acontece a redução da pressão;
- vi. No separador de óleo ocorre a precipitação do óleo essencial por meio da descompressão realizada pela válvula VR;
- vii. Ao se abrir a válvula VA6, o óleo essencial de Munha é coletado em tubos de ensaio, em tempos pré-determinados;
- viii. Por meio da abertura da válvula micrométrica (VM) pode-se medir o fluxo de CO₂ à temperatura ambiente;
- ix. Após coletadas, as amostras de óleo essencial são pesadas em balança digital (KN500, Digimed, Brasil) e logo depois armazenados na geladeira para sua posterior análise.

4.4 Extração de óleo essencial de Munha por hidrodestilação

Para determinar a quantidade de óleo essencial na matriz vegetal foram realizados alguns experimentos analíticos de hidrodestilação utilizando o aparelho Clevenger.

O procedimento adotado foi colocar 70 g da matriz vegetal seca no balão de destilação de 500 ml boca esmerilhada. Adicionou-se água quente de modo a ocupar pouco mais da metade do volume do balão. Acoplou-se o aparelho de Clevenger que foi preenchido com água fria na parte do tubo graduado e tubo de retorno. Promoveu-se o aquecimento do balão utilizando-se uma manta de aquecimento até a temperatura de 95°C a fim controlar a ebulição da água e manter a

Materiais e Métodos

destilação por 04 horas. Utilizou-se água corrente para resfriar o condensador proporcionando a condensação dos vapores formados.

Após este tempo se realizou a medição da quantidade de óleo obtida no tubo graduado. Logo depois se calculou a porcentagem de óleo em relação à matriz vegetal adicionada.

4.5 Extração de óleo essencial de Munha com solvente via *soxleth*

Outro tipo de experimento analítico para determinar a quantidade de óleo essencial na matriz vegetal é a extração com solvente via *soxleth*.

A matriz vegetal é acondicionada no interior do papel filtro, sendo utilizada uma massa de 20 gramas. No balão volumétrico de fundo chato é adicionado o solvente. Usou-se 500 ml de metanol para um processo de extração de 03 horas após atingir a temperatura de 70°C.

4.6 Análises Cromatográficas do óleo essencial de Munha

Para fazer as comparações e quantificar os componentes principais do óleo essencial de Munha foram feitas análises de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GCFID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas nos laboratórios do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB – FURB – Blumenau-SC).

Foi utilizado um cromatógrafo a gás (CP-3800, Variant) acoplado a um espectrômetro de massas (2000, Saturn) para a identificação e fracionamento dos compostos presentes no óleo essencial de Munha. Foi utilizada a coluna CP-Sil 8-CB Low Bleed/MS (30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro x 0,25µm de espessura do filme). O gás de arraste utilizado foi hélio (He) a fluxo constante de 1ml/min. A temperatura do injetor manteve-se em 250°C e a temperatura do forno foi mantida a 50°C por um minuto e, em seguida, aumentada até 240°C a uma taxa de 3°C/min. No espectrômetro de massas (MS) foram utilizadas as seguintes temperaturas: temperatura de *ion trap* (220°C), temperatura do *manifold* (80°C) e temperatura do *transferline* (190°C). O *software* de gerenciamento utilizado no MS foi o *Workstation 5.51* (Saturn).

Materiais e Métodos

Análises de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GCFID) também foram realizadas. No cromatógrafo a gás, a coluna e os patamares de temperatura utilizados foram os mesmos usados na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O detector de ionização de chama foi mantido a 280°C e o gás de arraste, He, a fluxo constante de 1,2ml/min. Foi utilizado o mesmo *software* de gerenciamento.

A amostra foi submetida a um processo de “clean up” antes da análise por CG-DIC e EM, o qual consistiu em passar a amostra em uma película com sílica flash, eluindo com Pentano e Éter Etílico (1:1).

A identificação dos compostos obtidos por GC-MS foi por comparação aos espectros de massas contidos na espectroteca NIST e na *web*.

Materiais e Métodos

4.7 Procedimentos experimentais complementares

Parâmetros como pressão e temperatura de extração são essenciais, como citados anteriormente. Porém, dados da geometria do leito fixo utilizado, propriedades físicas da matriz vegetal e cálculos de eficiência do processo são necessários para melhor avaliar o processo.

4.7.1 Densidade Real da Munha (ρ_r)

A densidade real da Munha foi determinada no Laboratório de Engenharia de materiais da Universidade Federal de Santa Catarina mediante a técnica de Picnometria de gás Helio.

O resultado obtido foi:

$$\rho_r = 0,5343 \text{ g / cm}^3$$

4.7.2 Densidade aparente da Munha (ρ_a)

Para calcular a densidade aparente da Munha utilizada nos experimentos, o extrator (EX) foi preenchido com a matriz vegetal pré-tratada. Este procedimento foi feito manualmente, de maneira simples. Na medida em que era preenchido, o leito era agitado de modo a acomodar perfeitamente as partículas de Munha. Com o valor do volume do extrator, dado em cm^3 (175 cm^3) e com a massa utilizada para preencher completamente o extrator (dada em g), foi possível calcular a densidade aparente da Munha.

$$\rho_a = m_m / V_{leito} \quad (1)$$

onde:

m_m = Massa da Munha no extrator (g)

V_{leito} = volume ocupado pelo extrator de sólidos (cm^3)

ρ_a = densidade aparente da Munha (g / cm^3)

O resultado foi de $0,4053 \text{ g / cm}^3$

Materiais e Métodos

4.7.3 Porosidade do leito (ϵ)

A porosidade do leito foi determinada usando-se a equação que relaciona a densidade aparente à densidade real.

$$\epsilon = 1 - \rho_a / \rho_r \quad (2)$$

$$\epsilon = 0,242$$

4.7.4 Rendimento da ESC do óleo essencial de Munha (η)

O rendimento de uma extração supercrítica é um indicativo importante para a viabilidade econômica do processo. A equação (3) a seguir representa o cálculo para obter o rendimento do processo.

$$\eta = m_{\text{óleo}} / m \times 100 \quad (3)$$

onde:

$m_{\text{óleo}}$ = massa de óleo extraída (g)

m = massa de Munha carregada no extrator

4.7.5 Determinação do tamanho médio da partícula

Para determinar o tamanho médio das partículas do material vegetal se utilizou o conjunto de peneiras da série *mesh* Tyler. O material foi peneirado e foi feita uma media ponderada obtendo-se o tamanho médio inferior a 0,555mm. De acordo com a abertura da peneira.

4.8 Determinação da densidade do CO₂-SC

A densidade do solvente supercrítico (CO₂-SC) foi determinada utilizando-se a equação de ANGUS *et al.*, 1976, baseada em dados experimentais.

4.9 Experimentos Realizados

Os experimentos realizados nesta dissertação foram conduzidos com o objetivo geral de determinar os parâmetros operacionais da extração supercrítica de óleo essencial de Munha.

Todos os experimentos de extração supercrítica foram feitos em batelada, o período de tempo de amostragem do óleo foi de 15 minutos. Utilizou-se um período estático de 60 minutos. Nos experimentos foram utilizados o mesmo tamanho de partícula calculado segundo o item 4.7.5.

A seguir, a Tabela 1 apresenta os experimentos realizados, cujos resultados foram obtidos a partir dos cálculos de rendimento e análise cromatográfica.

*Materiais e Métodos***Tabela 1-: Experimentos realizados**

Experimento	P (bar)	T (°C)	Massa de Munha (g)	Tempo (min)
Hidrodestilação		95	70	240
Extração com solvente via soxhleth		70	20	180
Extração com CO ₂ -SC do óleo essencial de Munha variando pressão e temperatura sem adição de co-solvente	100	35	70	105
		45		
		55		
	115	35		
		45		
		55		
	125	35		
		45		
		55		
Extração com CO ₂ -SC do óleo essencial de Munha variando Pressão e temperatura com adição de co-solvente (30 ml.)	100	35	50	60
		45		
		55		
	115	35		
		45		
		55		
	125	35		
		45		
		55		

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo terão cinco abordagens segundo descrito na Tabela -1 desta dissertação.

Esse procedimento foi definido para se obter os parâmetros operacionais de pressão e temperatura que apresentem um bom rendimento mássico para o extrato bem como uma boa concentração de compostos característicos, comparando com as técnicas tradicionais de extração de óleos essenciais.

5.1 Hidrodestilação

Foi realizada a hidrodestilação do essencial de Munha segundo o procedimento descrito no item 4.4.

Os tempo de extração foi de 240 minutos e se obteve um rendimento ($[\text{g óleo} \cdot 100 / \text{g matriz vegetal seca}]$) de 1,2% em base aos 70g de matriz vegetal seca .

Mediante o uso da cromatografia gasosa acoplada a massas (CG-MS) foram identificados treze compostos químicos e suas respectivas concentrações como apresenta a Tabela 2 a seguir:

Tabela 2-: Compostos identificados no extrato de óleo essencial de Munha obtido pela técnica de hidrodestilação

Nº	Composto	(%)
1	Pulegona	10,92
2	Mentona	19,21
3	Carvona-mentona	4,21
4	Iso-pulegona	3,86
5	Linalool	1,73
6	β -cariofileno	1,48
7	Piperitona	1,11
8	Iso-mentona	0,94
9	β -phellandreno	0,79
10	Eugenol	0,56
11	α -humuleno	13,35
12	Timol	0,28
13	Terpineol	0,26
Total		93,79

Resultados e Discussão

Os compostos presentes em maior quantidade no óleo essencial de Munha foram a *pulegona* (49,76%) e a *mentona* (30,26%).

Verificou-se que a qualidade do óleo obtido apresentava um cheiro ligeiramente diferente ao da planta no estado natural, fato que pode ser explicado devido à exposição prolongada ao calor, que ocasiona uma degradação dos compostos termos-sensíveis. Outro motivo pode ser o fato que alguns destes compostos permaneceram na água após a condensação e assim foram descartados junto com a água condensada (HEATH, 1981; MUKHOPADHYAY, 2000).

5.2 Extração com solvente via *soxleth*

Realizou-se a extração de óleo essencial de Munha com solvente via *soxleth*. Utilizou-se metanol com o objetivo de avaliar o comportamento deste solvente frente aos compostos e assim verificar se é possível utilizá-lo como co-solvente na ESC de óleo essencial de Munha.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos pela cromatografia gasosa acoplada a massa. Nela se encontrou que o total de compostos extraídos foi de 58,16% muito diferente do resultado da hidrodestilação que obteve 93,79%. Além disso, os resultados de concentração de compostos característicos foram de 10,92% para a *pulegona* e 19,21% para a *mentona*, muito baixos quando comparados com a hidrodestilação, que obteve para *pulegona* um 49,76% e para a *mentona* de 30,26%.

Tabela 3: Compostos identificados no extrato de óleo essencial de Munha pela técnica de extração com metanol via *soxleth*

Nº	Composto	(%)
1	Pulegona	10,92
2	Mentona	19,21
3	iso-Mentona	4,21
4	Copaeno	3,86
5	Cariofileno oxido	1,73
6	Pulegona oxido	1,48
7	Mentol	1,11
8	Espatuleno	0,94
9	Cariofileno	0,79
10	Cadinene	0,56
11	Veratril	13,35
Total		58,16

Resultados e Discussão

Tudo parece indicar que, mesmo sendo um composto polar, não houve uma solvatação adequada do soluto, motivo pelo qual o metanol foi descartado para atuar como co-solvente na ESC de óleo essencial de Munha.

5.3 Extração do óleo essencial de Munha com CO₂-SC variando a pressão e a temperatura, sem adição de co-solvente. (ESC)

Foram realizadas nove extrações de óleo essencial de Munha com CO₂-SC variando a pressão e a temperatura nas faixas de 100, 115, 125 bar e 35, 45, e 55°C, respectivamente. Esses experimentos foram realizados com a finalidade de determinar qual condição de extração apresentava a melhor qualidade de óleo e a maior eficiência de extração. Buscou-se o maior rendimento mássico e menor gasto de solvente.

Todas as extrações tiveram um período estático de 60 minutos, após o qual se realizou uma amostragem a cada 15 minutos até a completa exaustão da matriz vegetal, que em todos os casos se deu aos 105 minutos do processo.

A vazão do CO₂-SC, medida no estado gasoso, foi de 3,0 L/min para todos os experimentos.

5.3.1 Curvas de extração

As curvas de extração de óleo essencial de Munha seguem um comportamento semelhante ao descrito pelo pesquisador Brunner (1994).

Na Figura 9 está representada a extração realizada a 35°C de temperatura e 125 bar de pressão, que foi a que obteve o maior rendimento mássico. Nela podem-se apreciar as etapas descritas por Brunner (1994) para o processo de extração supercrítica. A primeira etapa, ou etapa de taxa constante, é inicialmente linear, devido à solubilidade de equilíbrio e indica a velocidade com que o óleo mais disponível é extraído. Nesta etapa, a extração é controlada pela relação de equilíbrio entre o extrato e a fase fluida. Na segunda etapa ocorre um período de transição, durante o qual a taxa de extração cai rapidamente e a extração continua a uma taxa muito mais lenta, nesse caso, controlada pela difusão mássica na matriz sólida.

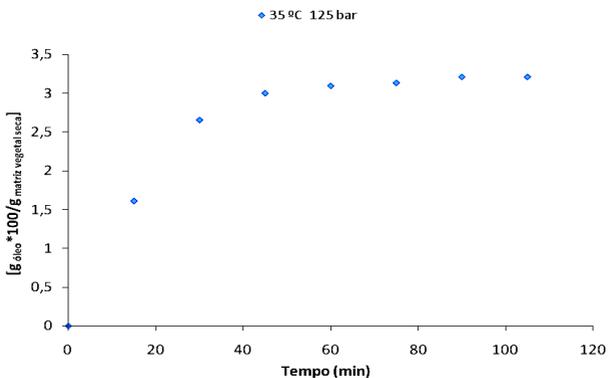


Figura 9-: Curva de extração ideal do óleo essencial de Munha

5.3.2 Avaliação do Rendimento

O rendimento da extração, determinado conforme o descrito no item 4.7.4 desta dissertação, indica o teor de óleo possível de ser extraído pelo $\text{CO}_2\text{-SC}$, presente na matriz sólida. A avaliação dos resultados de rendimento para as diferentes condições de pressão e temperatura indica o efeito do poder de solubilização do solvente sobre o rendimento do processo.

O poder de solubilização do $\text{CO}_2\text{-SC}$ depende basicamente da sua densidade. Como regra, um aumento na densidade do fluido supercrítico implica em um aumento na solubilidade do soluto. Sabe-se que a densidade aumenta à medida que a pressão se incrementa e a temperatura diminui (DEL VALLE e AGUILERA, 1999)

Os resultados apresentados na Tabela 4 comprovam o dito por diversos pesquisadores em relação à solubilização do solvente e sua relação com a densidade, ou seja, o aumento isotérmico da pressão aumenta a densidade do solvente, aumentando conseqüentemente a solubilidade do soluto o que resulta em um maior rendimento da extração (BRUNNER, 1994; DEL VALLE e AGUILERA, 1999; LOULI *et al.* 2004), conforme apresentado na Figura 10.

Resultados e Discussão

Tabela 4: Densidade (g/mL) do CO₂-SC às diferentes condições operacionais e seus respectivos rendimentos (%)

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (g/mL)	Rendimento(%) [g óleo *100/g matriz vegetal seca]
100	35	0,71364	1,239
100	45	0,49967	1,089
100	55	0,2659	0,967
115	35	0,75713	2,217
115	45	0,63539	1,634
115	55	0,35113	1,59
125	35	0,77771	3,029
125	45	0,6786	1,71
125	55	0,41626	1,624

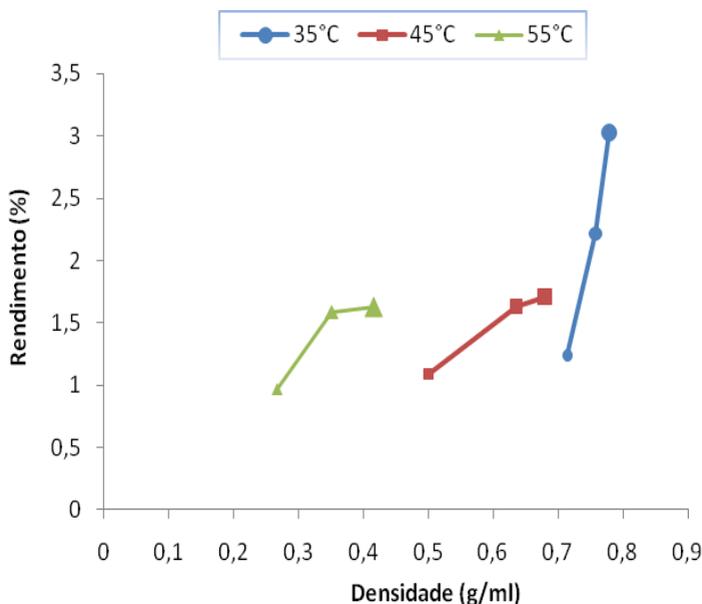


Figura 10-: Rendimento vs. densidade do CO₂-SC em função da pressão (100, 115 e 125 bar) a temperatura constante

As Figuras 11, 12 e 13, representam as curvas de extração para as condições de 100, 115 e 125 bar que foram testadas nas diferentes temperaturas (35, 45 e 55°C).

Resultados e Discussão

A Figura 11 que representa a condição de 100 bar, apresentou os menores resultados de rendimento (g óleo*100/g massa vegetal seca) de todas as extrações realizadas.

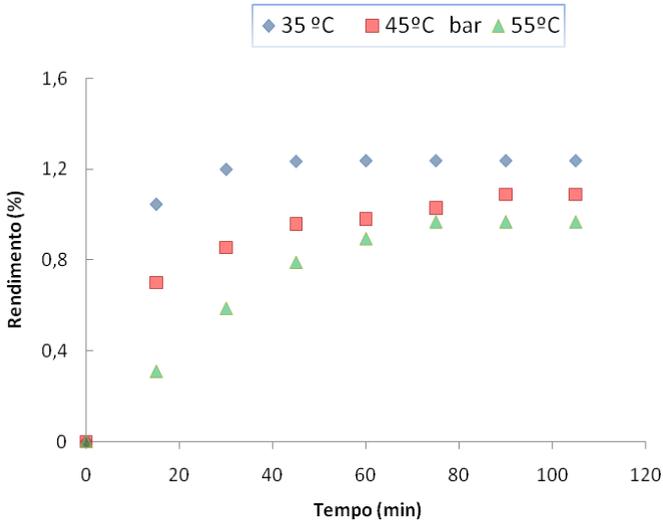


Figura 11:- Curvas de extração obtidas a 100 bar nas diferentes condições de temperatura (35, 45 e 55°C)

A Figura 11 que representa a condição de 100 bar, apresentou os menores resultados de rendimento (g óleo*100/g massa vegetal seca) de todas as extrações realizadas.

Nas condições de 55°C e 45°C foram obtidos rendimentos de 0,967% e 1,089% respectivamente, ambos menores que o obtido pelo método tradicional de hidrodestilação, que foi de 1,2%. Já na temperatura de 35°C, se obteve um resultado de 1,239%, parecido como o método tradicional, mas aparentemente com uma qualidade organoléptica maior devido ao seu cheiro parecido com o da planta de Munha. Este fato pode ser devido a que o método tradicional de hidrodestilação utiliza altas temperaturas, que com um tempo de extração prolongado pode degradar alguns dos compostos voláteis, interferindo, assim, com a qualidade do aroma (DIAZ-MAROTO *et al.*, 2002).

Resultados e Discussão

Analisando a Figura 12, que representa as curvas obtidas da ESC de óleo de Munha a uma pressão de 115 bar nas três temperaturas testadas, observou-se rendimentos superiores nas três condições de operação, quando comparados com a extração feita a 100 bar e com o método de hidrodestilação. O melhor rendimento foi obtido na temperatura 35°C que atingiu um 2,217%.

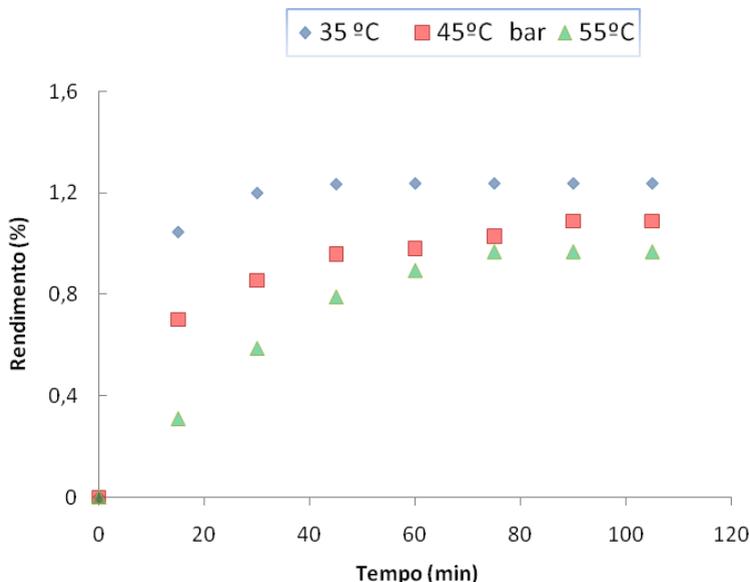


Figura 12-: Curvas de extração obtidas a 115 bar nas diferentes condições de temperatura (35, 45 e 55°C)

Analisando as curvas de extração, apresentados na Figura -13-, pode-se observar que o melhor rendimento das extrações realizadas com CO₂-SC foi na pressão de 125 bar com 35°C. nessas condições obteve-se um resultado de 3,029% de óleo essencial de Munha, muito superior às demais condições e ao método tradicional de hidrodestilação.

Resultados e Discussão

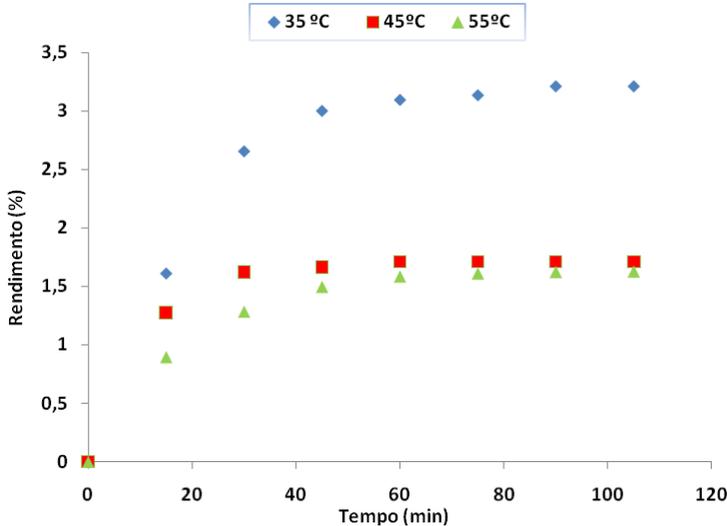


Figura 13:- Curvas de extração obtidas a 125 bar nas diferentes condições de temperatura (35, 45 e 55°C)

Pode-se observar que, as curvas de extração citadas anteriormente mostram o efeito da pressão no rendimento do extrato. A uma pressão maior, o rendimento aumentou em todas as condições de extração.

O efeito da temperatura de extração no rendimento do processo é mais complexo. O aumento isobárico da temperatura diminuiu a densidade do solvente ao mesmo tempo em que aumenta a pressão de vapor do soluto. Próximo ao ponto crítico, qualquer pequena mudança na temperatura é mais moderada, e a pressão de vapor do soluto passa a ser o fator dominante (BRUNNER, 1994). A competição entre esses dois fatores leva ao fenômeno de retrogradação, ou seja, a pressão na qual ocorre a inversão das isotermas. Nesse caso, abaixo do ponto de inversão das isotermas, o efeito da densidade é maior e o aumento da temperatura diminuiu a densidade e o rendimento da extração, enquanto que acima da pressão de inversão, o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor do soluto e o rendimento da extração (LEE *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2003; MICHELIN *et al.*, 2005). O fenômeno de retrogradação do óleo essencial de *Munha* não foi atingido nas condições experimentais em que foram feitas as extrações, tal como apresenta a Figura 14. Isso ocorreu, pelo fato de ter utilizado pressões muito baixas,

Resultados e Discussão

dato que até o momento não se achou registro de pesquisa em extração supercrítica de óleo de Munha que pudesse orientar inicialmente a escolha das condições experimentais.

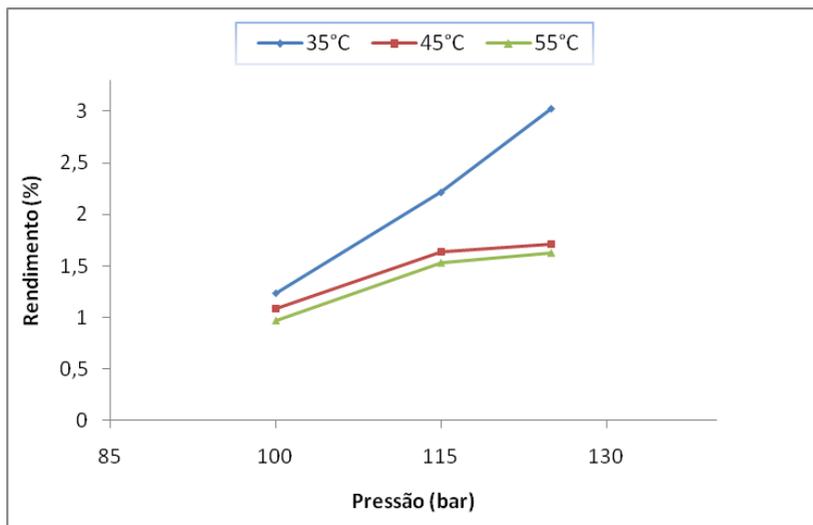


Figura 14-: Isotermas da ESC do óleo essencial de Munha

Ainda analisando a Figura 14 pode-se verificar o citado anteriormente, dado que as condições de operação se encontram abaixo do ponto de inversão das isotermas, o rendimento diminuiu com o aumento da temperatura

5.3.3 Análise da Composição química do extrato de óleo essencial de Munha obtido por CO₂-SC sem adição de co-solvente

A determinação da composição do óleo de Munha é uma importante informação para a definição das características do sistema estudado.

Com a análise das diferentes amostras obtidas do rendimento global do óleo foram realizadas análises cromatográficas de nove amostras de óleo essencial de Munha obtidos com CO₂-SC em diferentes condições de processo. As análises mostram o perfil da composição dos extratos obtidos e com isto foi possível avaliar a

Resultados e Discussão

influência da temperatura e da pressão do solvente na seletividade do soluto.

A Tabela 5 contém a composição química (%) dos compostos identificados por GC-MS, para cada condição de extração. As porcentagens representam uma proporção relativa à área obtida nos picos dos cromatogramas.

Tabela -5: Compostos identificados na análise de GC-MS nos extratos de produzidos na ESC nas diferentes condições de operação

N°	Composto	100 bar			115 bar			125 bar		
		35°C	45°C	55°C	35°C	45°C	55°C	35°C	45°C	55°C
1	Pulegona	41,60	42,62	32,08	40,65	41,18	40,75	39,64	39,18	41,80
2	Mentona	27,50	28,74	25,15	26,81	24,80	24,32	28,56	25,57	27,37
3	Iso-Mentona	5,76	6,28	6,96	6,44	6,62	5,95	6,64	3,84	6,30
4	Carvona	3,43	3,72	4,29	3,35	3,03	2,74	3,70	3,36	3,25
5	Copaeno	2,85	1,38	1,06	0,06	0,06	0,72	1,35	1,23	0,94
6	Limoneno	2,29	0,36	2,03	0,25	2,08	0,51	0,21	0,28	0,31
7	Mentol	1,56	1,45	2,14	1,56	1,44	1,29	1,45	1,84	1,51
8	Durenol	1,40	1,05	0,12	0,22	0,26	0,25	0,62	0,90	0,26
9	Timol	1,13	1,05	2,14	0,22	0,20	0,19	0,18	0,25	0,27
10	Carvacrol	0,99	0,81	1,11	0,65	0,56	0,39	0,61	1,16	0,91
11	Germacrene	0,74	2,43	0,18	0,24	1,24	0,24	0,28	2,27	0,28
12	2-hidroxy-3-isopropyl-6-methyl-2-cyclohexen-1-one	0,63	0,21	0,08	0,97	0,08	0,05	0,28	0,30	0,08
13	Cariofileno oxido	0,60	0,11	2,98	0,30	0,08	0,12	1,09	0,25	0,08
14	Cadineno	0,54	0,20	0,02	1,70	0,05	0,12	0,15	0,33	2,29
15	Cariofileno	0,54	0,26	1,42	0,98	0,96	0,17	0,27	0,24	0,07
16	Isopulegol	0,51	0,50	0,46	0,58	0,20	0,39	0,60	1,42	0,62

Resultados e Discussão

17	Veratril	0,44	0,16	0,04	0,12	0,19	0,28	0,19	0,48	0,10
18	Espatuleno	0,37	0,26	0,94	0,06	0,42	2,50	0,35	0,62	0,34
19	Cariofileno (9-epi-E)	0,37	0,12	0,29	1,18	0,15	1,00	1,59	0,12	1,26
20	Pulegona Oxi	0,35	0,28	0,74	0,39	0,38	0,23	0,44	0,29	0,33
21	Eremofileno	0,34	0,47	0,06	0,07	0,25	0,05	0,19	0,12	0,12
22	Estrutura proposta (- CO)	0,28	0,12	0,07	0,93	1,40	0,83	0,33	0,19	0,95
23	Linalool	0,24	2,07	0,15	2,23	0,04	1,96	2,30	1,90	2,19
	TOTAL	94,43	94,66	84,50	89,97	85,65	85,02	91,00	86,13	91,60

Analisando a Tabela 5 pode-se observar que foram identificados 23 compostos do óleo essencial de Munha, resultado superior quando comparado aos obtidos pelos métodos tradicionais, na Tabela -6. Este fato pode ser devido aos monoterpenos serem sensíveis a mudanças térmicas sob as condições de operação das técnicas tradicionais; isto acontece pela e desorção e lenta difusão do soluto no solvente. Além disso, durante a separação posterior do solvente no extrato se produz uma maior perda de compostos voláteis (DIAZ-MAROTO *et al*, 2002; OZCAN e OZCAN, 2004).

Tabela -6: Número de compostos obtidos nas diferentes técnicas de extração

<i>Técnica de extração utilizada</i>	<i>N° de compostos identificados</i>
Extração com CO ₂ -SC	23
Hidrodestilação	13
Extração com solvente via soxleth	11

Na Figura 15, observa-se que os resultados da concentração de compostos característicos na extração com CO₂-SC em geral, apresentaram concentrações menores de *pulegona* e *mentona* em comparação com a hidrodestilação, o que pode ser explicado pela polaridade maior da água, fato que proporciona uma maior afinidade pelo soluto. No entanto, os resultados da ESC foram superiores quando

Resultados e Discussão

comparados à extração com solvente via *soxhlet*. Devido a este último fato o metanol não foi utilizado como co-solvente posteriormente.

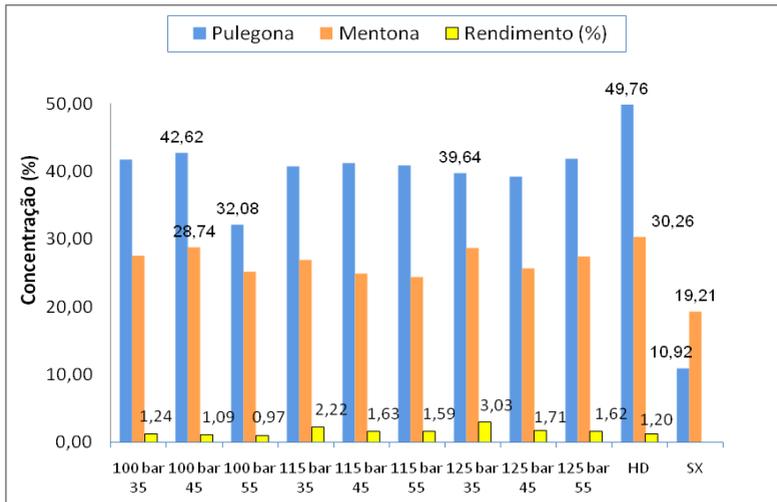


Figura 15:- Concentração de pulegona e mentona nas diferentes técnicas e parâmetros operacionais de extração.

Observa-se também na Figura 15 que a pressão de 100 bar e 45°C obteve a maior concentração de *pulegona* (28,74%) e *mentona* (42,617%).

Observe-se que o maior rendimento de extração (3,03%), foi dado na condição de 125 bar e 35°C, mas, nesta condição se obteve a menor concentração de *pulegona* (36,64 %). No entanto a concentração de *mentona* (28,56 %) se manteve parecida com a condição de 100 bar e 45°C.

A condição de 100 bar e 55°C foi a que apresentou uma menor concentração de compostos característicos, coincidindo com o fato de ter sido essa condição a que menor rendimento de óleo obteve (0,967%).

Resultados e Discussão

5.3.3.1 Influência da pressão e da temperatura na seletividade dos compostos característicos

Inicialmente, analisando os dados da composição química, é possível afirmar que a influência da temperatura e da pressão na ESC não foi significativa na seletividade dos compostos característicos (*pulegona* e *mentona*), visto que os resultados foram muito semelhantes em todas as condições de extração. Este fato pode ter acontecido devido à estreita faixa de pressão e temperatura estudadas, dado que não se dipunha até o momento de nenhum registro de pesquisa em extração supercrítica de óleo essencial de Munha.

Entretanto, as Figuras 16 e 17 revelam um padrão de comportamento na quantidade de *pulegona* e *mentona* extraídas.

No caso da *pulegona*, a Figura 16 mostra que, com o aumento isobárico da temperatura nas pressões de 100 e 115 bar a quantidade do composto aumentou da temperatura de 35°C para 45°C, e logo depois na temperatura de 55°C diminuiu.

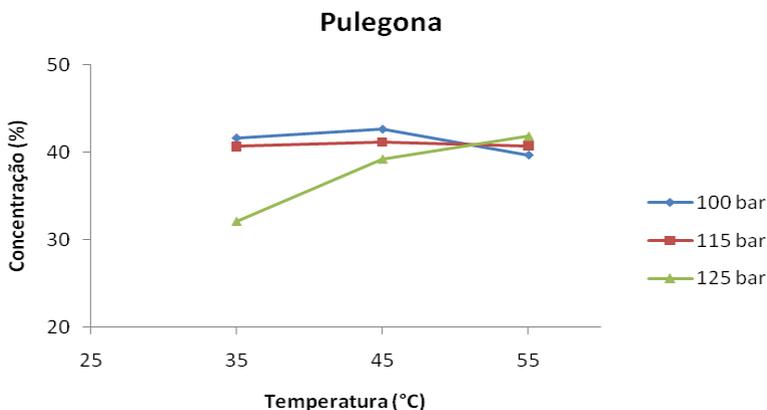


Figura 16-: Influência da pressão e a temperatura na concentração de Pulegona

No caso da *mentona*, observa-se, na Figura 17, que não apresenta um padrão de comportamento tão definido quanto a *pulegona*.

A pressão de 100 bar mostra um incremento na concentração da *mentona* em quanto aumenta a temperatura de 35 a 45°C, após isso, na temperatura de 55°C, a concentração da *mentona* diminui.

Resultados e Discussão

Já o comportamento da curva na pressão de 115 bar, mostra que a concentração diminui com o aumento da temperatura.

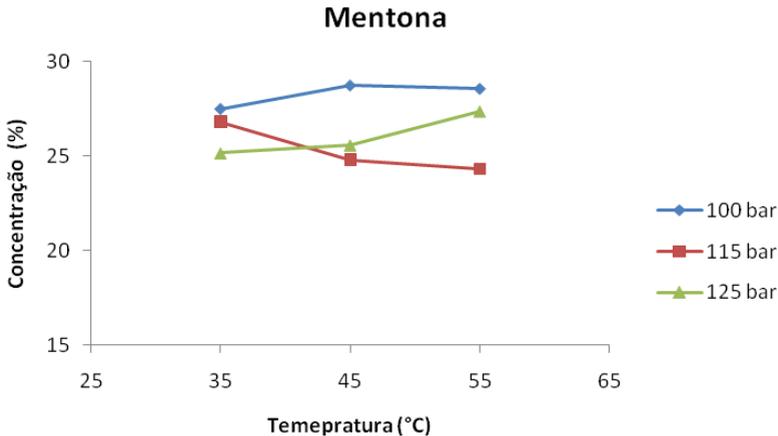


Figura 17-: Influencia da pressão e a temperatura na concentração de Mentona

Já na pressão de 125 bar se observou que a concentração de *pulegona* extraída aumenta com a temperatura. Este comportamento provavelmente se deve ao valor da pressão ser maior, o que ocasiona um aumento da polaridade do CO₂-SC (BRUNNER, 1994), tendo como resultado um incremento progressivo na afinidade pelo composto.

Na pressão de 125 bar observou-se comportamento semelhante ao caso da *pulegona*. A mentona aumenta proporcionalmente sua concentração com a elevação progressiva da temperatura de extração, más esse comportamento não se dá de maneira tão definida. Este fato, além de ser explicado pelo incremento da polaridade do CO₂-SC com o aumento da pressão (BRUNNER, 1994), também poderia ser explicado pela possibilidade de mudanças na estrutura da matriz vegetal em altas pressões, o que daria como resultado uma maior afinidade do CO₂-SC pelos compostos. Para comprovar esse fenômeno se necessitaria de um estudo aprofundado de solubilidade do extrato no CO₂-SC (LUCCHESI *et al.*,2004).

Resultados e Discussão

5.4 Extração com CO₂-SC do óleo essencial de munha variando a pressão e a temperatura, com adição de etanol como co-solvente (ESC-CS).

Foi utilizado o etanol como co-solvente na extração com CO₂-SC de óleo essencial de Munha em uma quantidade de 30 ml. O baixo peso molecular dos alcoóis faz com que sejam os compostos mais importantes nos processos de separação. (SECUIANU *et al.*, 2008).

O etanol foi escolhido como co-solvente por ser um composto orgânico, polar, incolor, volátil e de olor característico permitido nas indústrias alimentícias, além de ser separado facilmente do extrato, (MORRISON e BOYD, 1990).

As condições de extração supercrítica com adição do co-solvente (ESC-CS) foram as mesmas do item 5.3, com isso foi possível comparar os resultados e determinar qual a melhor metodologia de extração no caso do óleo essencial de Munha. O critério de comparação utilizado foi o rendimento e maior concentração de compostos característicos (*pulegona* e *mentona*).

5.4.1 Avaliação do Rendimento

A Figura 18 os resultados de rendimento obtidos na ESC-CS.

Notou-se que o comportamento das curvas se ajusta ao descrito por Brunner (1994). Porém, a primeira etapa possui uma inclinação muito mais pronunciada quando comparada a ESC se adição de co-solvente, indicando uma maior velocidade na solubilização do soluto, por consequência obtendo maiores rendimentos.

Observou-se ainda que o tempo de extração se reduz quase pela metade: de 105 minutos na ESC sem co-solvente para 60 minutos na ESC-CS. Esse é um indicador da efetividade do uso do co-solvente pois aumenta a produtividade e representa uma economia na utilização do CO₂-SC como solvente.

Resultados e Discussão

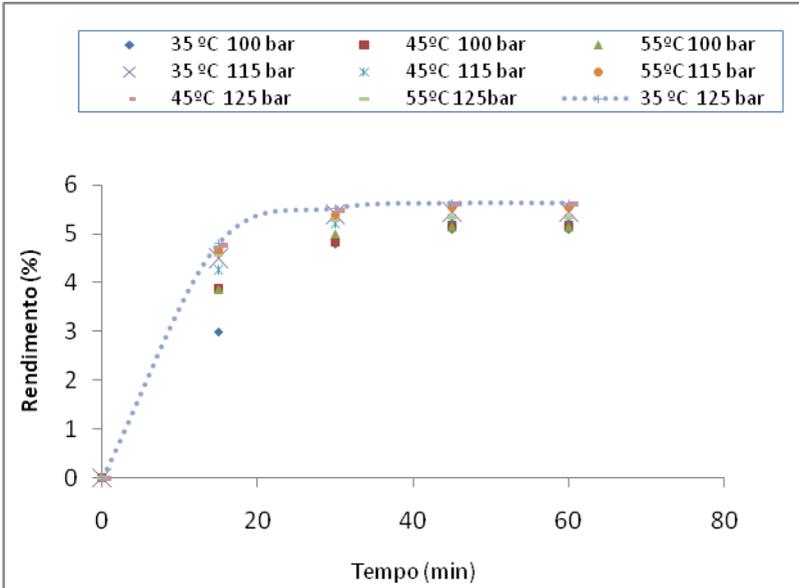


Figura 188- Curvas de extração da ESC com utilização de co-solvente do óleo essencial de Munha

O maior rendimento obtido na ESC-CS deve-se ao comportamento do soluto na fase supercrítica, que pode ser modificado pela adição de pequenas quantidades de co-solventes.

A ação do co-solvente produz um aumento da solubilidade resultante do aumento na densidade do solvente e/ou às interações moleculares entre o co-solvente e o soluto. Por exemplo, pode ocorrer uma quebra nas interações soluto-matriz sólida e a substituição pelo co-solvente nos sítios ativos da matriz sólida (LIU *et al* 2003; HOLLENDER. *et al.*,1997; GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG *et al.*, 2005).

Em geral, se um co-solvente possuir uma temperatura crítica menor que a do fluido supercrítico (FSC) utilizado como solvente ocorrerá uma diminuição da solubilidade de compostos extraíveis. Entretanto, quando o co-solvente possui uma temperatura crítica maior que a do FSC, se dá um aumento da solubilidade dos compostos extraíveis (BRUNNER, 1994). Assim, devido ao etanol possuir uma temperatura crítica de 240,7°C, muito maior quando comparada à temperatura crítica do dióxido de carbono que é de 31,1°C ocorre o referido aumento na solubilidade dos compostos extraíveis no CO₂-SC. Por isso, melhora o rendimento da extração.

Resultados e Discussão

A Tabela 7 apresenta os resultados de rendimento em cada condição de extração com co-solvente. Analisando de forma geral os resultados, observou-se que a melhor condição de rendimento de 5,62% é obtida à 125 bar com 35 °C, que apresentou um rendimento de 5,62%, similar à condição de 125 bar com 45°C que obteve 5,6%, seguido de perto da condição de 115 bar e 55°C que obteve 5,54%.

Tabela 7- Resultados de rendimento nas diferentes condições de extração

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
		[g óleo*100/g matriz vegetal seca]
100	35	5,08
100	45	5,16
100	55	5,13
115	35	5,45
115	45	5,31
115	55	5,54
125	35	5,62
125	45	5,6
125	55	5,33

5.4.1.1 Influência da pressão e temperatura da ESC-CS no rendimento do extrato

Analisando a Figura 19, observou-se que nas extrações feitas a 35°C e 45°C de temperatura, acontece um aumento do rendimento ([g óleo*100/g matriz vegetal seca]) na medida em que a pressão aumenta. Porém, na temperatura de 55°C, acontece uma diminuição do rendimento ao chegar à pressão de 125 bar. Este comportamento coincide com os dados da literatura que apontam que o etanol em estado líquido diminui a sua polaridade com um aumento da temperatura, a partir dos 55°C, o que faz com que a solubilidade oferecida ao processo diminua com o aumento da temperatura (LU, J. *et al.*, 2002)

Resultados e Discussão

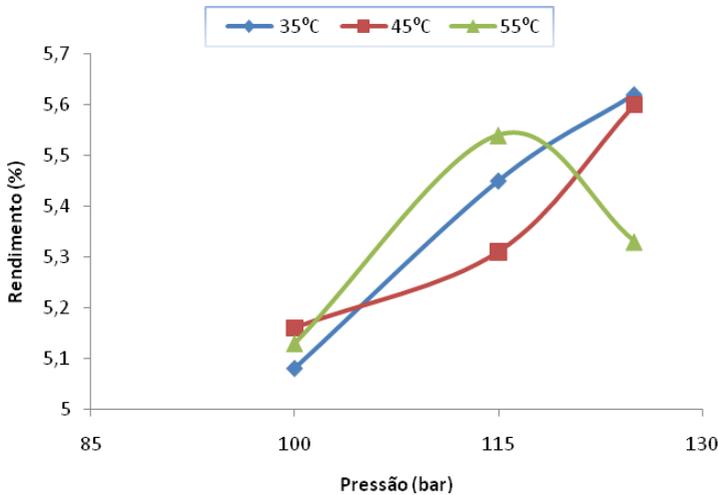


Figura 19- Influência da temperatura e pressão na ESC com adição de co-solvente

Já, para o etanol em estado gasoso e no estado supercrítico acima de 250 °C, a sua polaridade é quase nula, tanto quanto um líquido não polar (LU, J. *et al.*, 2002).

5.4.2 Análise da composição química do óleo essencial de Munha obtido por CO₂-SC com adição de co-solvente

Nesta dissertação buscou-se determinar a melhor condição operacional em termos de eficiência da extração, com esse intuito utilizou-se a adição do etanol como co-solvente.

A utilização de um co-solvente pode produzir um aumento na solubilidade dos solutos como visto no item anterior, como também pode apresentar um incremento na seletividade de alguns compostos. Quando estas duas características se apresentam juntas se obtém o denominado efeito *entrainer* (GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG *et al.*, 2005)

Para a identificação e quantificação dos compostos presentes no óleo essencial de Munha obtido por ESC-CS, foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), conforme o descrito no item 2.6 desta dissertação.

Resultados e Discussão

A seguir a Tabela 8 apresenta os resultados da cromatografia gasosa para determinação da composição dos extratos de óleo essencial de Munha pela técnica de ESC-CS.

Tabela -8: Resultados da GC-MS dos extratos de óleo essencial de Munha obtidos na ESC-CS

Nº	Composto	100 Bar			115 bar			125 bar		
		35°C	45°C	55°C	35°C	45°C	55°C	35°C	45°C	55°C
1	Pulegona	40,02	45,21	45,16	49,93	46,25	41,78	41,43	38,38	26,17
2	Mentona	21,87	23,08	25,79	24,77	24,85	24,17	34,19	33,95	38,96
3	Espatulenol	16,18	12,22	8,71	5	8,71	9,39	3,1	3,82	4,23
4	Cariofileno	3,06	3,07	3,6	3,29	3,31	2,93	3,1	2,96	2,17
5	iso-Mentona	4,01	4,25	4,81	4,57	4,48	4,15	4,75	6,33	6,19
6	Copaeno	0,8	0,76	0,65	0,58	0,82	0,87	4,5	-	-
7	Mentol	1,24	1,35	1,47	1,48	1,6	1,38	1,95	1,98	2,38
8	Eremofileno	0,84	1,95	1,81	0,96	-	1,92	-	-	-
9	Cariofileno oxido	0,58	0,54	0,53	0,78	0,87	1,47	2,4	-	-
10	Cariofileno (9-epi-E)	0,56	0,89	0,58	0,93	0,93	-	-	-	-
11	Germacrene D	-	-	-	-	-	-	-	5,39	-
12	Pulegona oxido	-	-	-	-	1,66	-	-	-	-
	Total	89,16	93,32	93,11	92,29	93,48	88,06	95,42	92,81	80,01

Analisando-se os dados da Tabela 8, identificou-se 12 compostos de óleo essencial de Munha. Este resultado é inferior em número ao obtido pela ESC sem adição de co-solvente. Este fato acontece devido a seletividade oferecida ao CO₂-SC pelo co-solvente, neste caso o etanol, que dada a sua polaridade atua nas interações entre as moléculas do soluto e o solvente, revelando mais afinidade por determinados compostos. Assim, na dissolução do soluto, as suas unidades estruturais,

Resultados e Discussão

como íons e moléculas, separam-se umas das outras, e o espaço entre elas passa a ser ocupado pelas moléculas do solvente. Essa energia para vencer as forças eletrostáticas que sustentam a rede iônica provém de um solvente polar, que neste caso é o etanol (MORRISON e BOYD, 1990).

No que se refere à concentração de compostos característicos, mostrou-se que os compostos majoritários continuavam sendo a *pulegona* e a *mentona*, mas se encontrou um aumento da concentração de espatulenol em comparação com as demais técnicas de extração utilizadas nesta dissertação.

O *espatulenol* é um sesquiterpeno com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (LIMBERGUER *et al.*, 2004). Este composto apresentou sua maior concentração na condição de 100 bar a 35°C com um 16,18%, significativamente maior que o obtido com as demais técnicas extrativas utilizadas, onde a sua concentração não passava do 1%.

A Figura 20 apresenta um gráfico comparativo das concentrações dos compostos característicos (*pulegona* e *mentona*) do óleo essencial de Munha proveniente das diferentes técnicas de extração.

Analisando de todas as técnicas de extração utilizadas nesta dissertação se observou que, no referente ao composto *pulegona*, as maiores concentrações foram obtidas com a técnica da ESC-CS, para a maioria das condições de pressão e temperatura testadas. A maior concentração deste composto se obteve na condição de 115 bar com 35°C, com um resultado de 49,93%, similar ao resultado obtido pelo método tradicional de hidrodestilação com 49,76%, que até o momento representava o melhor resultado.

No caso da *mentona*, a ESC-CS apresentou também os melhores resultados de concentração do composto em comparação às demais técnicas, porém, somente para a condição de 125 bar nas três temperaturas testadas. As concentrações obtidas foram de 39,19%, 33,95% e 38,96%, para as temperaturas de 35, 45 e 55°C, respectivamente.

Observou-se também que os menores resultados de concentração tanto de *pulegona* como de *mentona*, se deram na técnica de extração com solvente via *soxleth*.

Resultados e Discussão

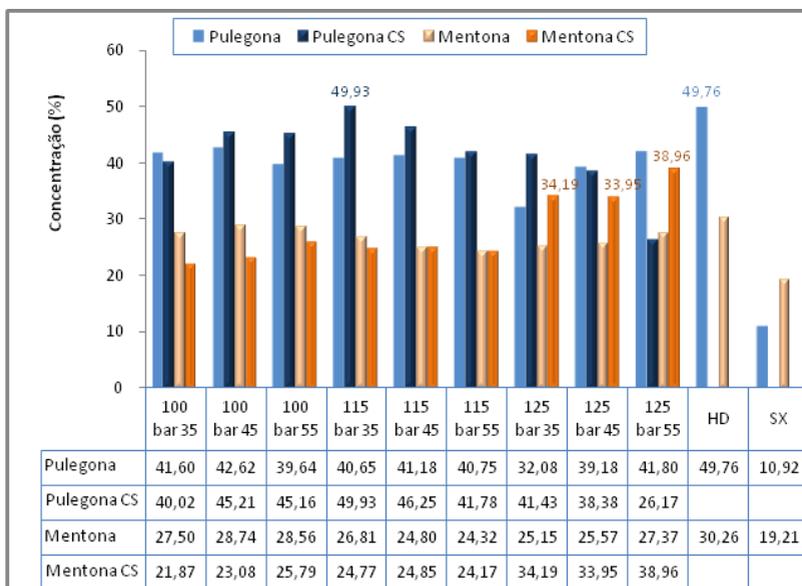


Figura 20:- Concentração de Pulegona e Mentona provenientes das diferentes técnicas de extração utilizadas. HD (Hidrodestilação);SX (Soxhlet); CS (indica que provêm da ESC-CS).

5.4.2.1 Influência da pressão e a temperatura na seletividade dos compostos característicos

Como o etanol possui em sua molécula o grupo OH, tal fato permite a formação de pontes hidrogênio entre as moléculas de etanol e dos compostos polares presentes nos extratos orgânicos (LEE *et al.*, 2000). Verificou-se que este fato característico pode ter sido afetada pelas diferentes condições de pressão e temperatura testadas nesta dissertação.

Assim, analisando primeiramente o composto pulegona como segue na Figura 21, observou-se que, sob condição isotérmica, a medida que se incrementa a pressão, a concentração aumenta até se chegar a 115 bar. Em seguida ocorre uma diminuição da concentração na pressão de 125 bar para as três temperaturas testadas. Quando se incrementa a temperatura, observa-se uma redução na concentração do composto, encontrando-se a menor delas na temperatura de 55°C.

Resultados e Discussão

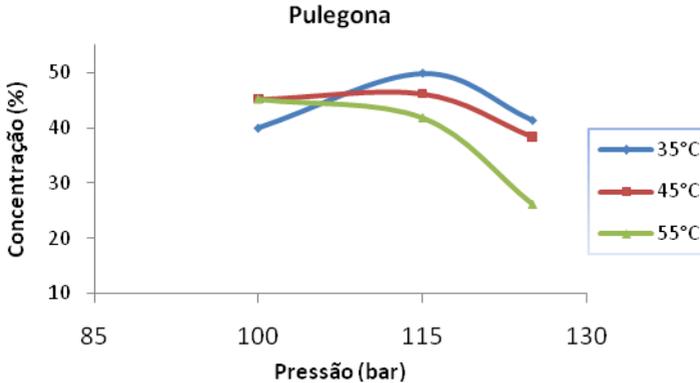


Figura 21-: Influência da Pressão e a Temperatura na concentração de Pulegona na ESC-CS

Este fato é compatível com a literatura referente ao etanol, que diz que com o aumento da temperatura há uma diminuição da polaridade que pode ser a razão para a seletividade observada no caso da *pulegona*, (LU, J. *et al.*, 2002)

No caso da seletividade da *mentona*, como se apresenta na Figura 22 notou-se um comportamento oposto ao da *pulegona*. A concentração da *mentona* aumenta à medida que a pressão e a temperatura aumentavam, encontrando-se a melhor condição a 125 bar com 55°C.

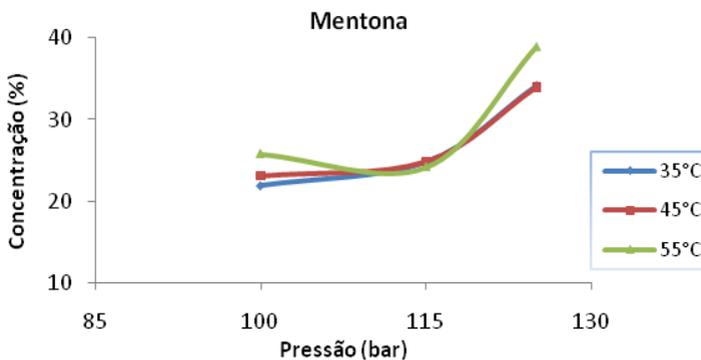


Figura 22-: Influência da Pressão e a Temperatura na concentração de Mentona na ESC-CS

Resultados e Discussão

Comportamento similar pode ser encontrado na literatura disponível, onde os pesquisadores Zougagh M. *et al.* (2009) que testaram a extração de mentona a diferentes temperaturas a partir de 50°C até 80°C. Eles encontraram que a melhor temperatura de extração foi de 70°C, sem utilização de co-solvente. Então especula-se que no presente estudo, mesmo não utilizando temperaturas maiores de extração, o etanol ajudou a incrementar a concentração de mentona à medida que se elevava a temperatura. Este fato não se observou tão claramente na ESC sem o co-solvente, provavelmente devido ao fato de se testar temperaturas somente até 55°C.

Neste capítulo apresentaram-se os resultados de todos os experimentos realizados nesta dissertação. Estão também apontados e comentados os motivos para os comportamentos observados.

A seguir, apresentam-se as conclusões que, fundamentadas nos resultados obtidos, podem ser compiladas e resumidas

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho para a extração de óleo essencial de Munha (*Minthostachys mollis*) por diferentes técnicas de extração permitiram concluir que:

- i. A extração com CO₂-SC do óleo essencial de Munha proporciona um extrato rico em compostos com valor econômico agregado comprovado, porém em uma concentração relativamente menor do que a obtida pela técnica tradicional de hidrodestilação. Mesmo assim a qualidade do extrato obtido com CO₂-SC mostrou uma qualidade organoléptica superior à da técnica tradicional.
- ii. Na extração com CO₂-SC se trabalhou abaixo do ponto de inversão das isotermas, o que permitiu avaliar quantitativa e qualitativamente o processo, sendo que o efeito dominante foi a densidade, a qual diminui à medida que aumenta a temperatura, o que influencia no rendimento do extrato.
- iii. A influência da pressão e a temperatura na seletividade dos compostos *pulegona* e *mentona* mostraram que com o aumento na temperatura na curva isobárica a 125 bar a concentração destes se incrementa, evidenciando um padrão de comportamento.
- iv. A maior concentração do composto *pulegona* se observou na condição de 125 bar e 55°C, com 41,796%. Mesmo assim o resultado foi menor ao ser comparado com a técnica tradicional de hidrodestilação.
- v. A *mentona* apresentou seu melhor resultado em 100 bar e 45°C (28,741%), No entanto, foi menor que o da técnica de hidrodestilação que resultou em 30,229%.
- vi. O emprego do etanol líquido como co-solvente na extração com CO₂-SC permitiu um aumento progressivo no rendimento nas extrações realizadas nas temperaturas de 35°C e 45°C a medida que a pressão aumentava. Já na temperatura de 55°C, o rendimento chegou a seu ponto máximo em 115 bar para logo depois diminuir drasticamente na pressão de 125 bar, fato que indica a diminuição da solubilidade da mistura a partir dessas condições.

Conclusões

- vii. A vantagem da utilização do etanol como co-solvente na extração com CO₂-SC está relacionado como o incremento da solubilidade de alguns compostos devido ao aumento da polaridade da mistura.
- viii. A seletividade que ofereceu o etanol como co-solvente na extração com CO₂-SC se viu refletida na aparição de uma maior concentração do composto *espatulenol* de comprovado valor econômico com uma quantidade significativa de 16,18% na condição de 100 bar e 35°C, sendo que nas outras técnicas de extração se apresentava apenas na forma de traços.
- ix. Por sua vez, a utilização do co-solvente diminuiu a quantidade de compostos extraídos o que facilitaria o posterior processamento para a obtenção dos compostos de interesse.
- x. A seletividade dos compostos característicos (*pulegona e mentona*) foi influenciada pelas condições de pressão e temperatura. No caso da *pulegona* o aumento isotérmico da pressão resultou em uma diminuição na sua concentração. Já no caso da *mentona* apresentou um comportamento inverso ao da *pulegona*; ou seja, o aumento isotérmico da pressão aumenta a concentração do composto.
- xi. A adição do etanol como co-solvente na extração com CO₂-SC apresentou os melhores resultados de concentração de compostos característicos do óleo essencial de Munha (*pulegona e mentona*) comparado às demais técnicas utilizadas nesta dissertação, sendo que para o caso da *pulegona* a melhor condição foi a de 115 bar com 35°C (49,93%) e na *mentona* foi a de 125 bar com 55°C (38,96%).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros se recomenda:

- i. Trabalhar com uma faixa de pressões maior a fim de identificar o ponto de inversão das isotermas e poder analisar assim o efeito dominante tanto na seletividade de compostos quanto no rendimento da extração.
- ii. Estudar a variação dos demais parâmetros da extração supercrítica (vazão, tempo de extração, tamanho de partícula, adição de outros co-solventes) mediante um planejamento experimental.
- iii. Caracterizar a solubilidade do óleo de Munha no solvente supercrítico
- iv. Estudar a atividade antimicrobiana dos extratos de Munha
- v. Fazer uma verificação sazonal dos compostos extraídos no óleo de Munha.
- vi. Quantificação absoluta de um dos compostos para ser usado como marcador, com isso verificar a presença de compostos “fixos” (óleos e ceras) que conferem massa, mas não cheiro e não são identificados por cromatografia gasosa (CG).
- vii. Avaliação de custos de processos e análise tecnológica.

Referências bibliográficas

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R. P., Identification essential oil components by gas chromatography/mass epectrometry. 4ta ed. Angela C Kozlowski ISBN: 978-1-932633-21-4, 2009

ALIAGA T.J., FELDHEIM,W., 1985.Hemmungder Keimbildung bei gelagerten Kartoffeln durch das ätherische Öl der südamerikanischen Munhapflanze (*Minthostachys* spp.). Ernährung/Nutrition 9, 254–256., 1985

ARAÚJO, M.E.; MEIRELES, M.A.A. Improving phase equilibrium calculation with Peng-Robinson EOS for fats and oils related compounds-supercritical CO₂ –systems. Fluid Phase Equilibria, v. 169, p. 49-64, 2000

ARAUJO, A.C.; Fracionamento do Óleo essencial de Patchouli [(*Pogostemom cabim* (blanco) Benth) obtido por extração supercrítica. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química e Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2008

ARAUS, K., E. UQUICHE, AND J.M. DEL VALLE, Matrix effects in supercritical CO₂ extraction of essential oils from plant material. Journal of Food Engineering,. **92**(4): p. 438-447, 2009

ASCENSÃO L., L. MOTA ;. CASTRO M. Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*:Morphology, Distribution and Histochemistry . Annals of Botany 84: 437±447, 1999

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J., Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis. Food Chemistry 101 (3), 995-998, 2007

BAKKALI F. S.; AVERBECK D.; M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46 : 446–475, 2008

Referências bibliográficas

BERNA, A.; TÁRREGA, A.; BLASCO, M.; SUBIRATS, S., Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. *The Journal of Supercritical Fluids*. 18 (3), 227-237, 2000

BOURGAUD F.; GRAVOT A.; MILESI S.; GONTIER E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839–851, 2001

BRUNNER, G. Gas Extraction: Na Introduction to Fundamentals of supercritical Fluids and the Application to separation processes. 1a. ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994. v. 4

GIRAUD, D.; VENTURA, A.; CAMEL, V.; BERMOND, A.; ARPINO, P., Determination of traces of pesticides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1997**, 777 (1), 115-125, 1997

COLEMAN W.K.; LONERGAN, G; SILK, P. Potato sprout growth suppression by Menthone and Neomenthol, volatile oil components of *Minthostachys*, *Satureja*, *Bystropogon* and *Mentha* species. *American Journal of Potato Research* 78:345-354, 2001

DANIELSKI L.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. *Journal of Food Engineering* 78 : 1054–1059, 2007.

DAUKSAS, E.; VENSKUTONIS, P. R.; SIVIK, B., Supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) seeds with pure CO₂ and its mixture with caprylic acid methyl ester. *The Journal of Supercritical Fluids*. 22 (3), 211-219, 2002

DEL VALLE J.M. ; AGUILERA J.M.; Rewiew: High pressure co₂ Extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International* 5(1): 1-24, 1999

DIAZ-MAROTO, M. C.; PEREZ-COELLO, M.S; CABEZUDO, M. D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simustaneous distillation-extraction. *Journal of Chromatography A*, 947: 23-29, 2002

Referências bibliográficas

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; LOPES, D.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C., Effects of processing conditions on the chemical distribution of mate tea leaves extracts obtained from CO₂ extraction at high pressures. *Journal of Food Engineering*. 70 (4), 588-592, 2005

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Journal of Supercritical Fluids* 14: 235-245, 1999

GASPAR, F; LU, T; MARRIOT, R; MELLOR, S; WATKINSON, C; AL DOURI, B; SANTOS, R; SEVILLE, J. Solubility of Echium , Borage and Lunaria seeds oils in compressed co₂. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48 (1), 107-109

GENENA, A. K. Estudo da extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) quanto a sua ação antioxidante. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos . Departamento de Engenharia Química e Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2005

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A., Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99 (7), 2507-2515, 2008

GÓMEZ, A. M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E., Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 88 (1-3), 103-109, 2002

GRIGONIS, D.; VENSKUTONIS, P. R.; SIVIK, B.; SANDAHL, M.; ESKILSSON, C. S., Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3), 223-233, 2005

GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG, Ö.; TEMELLI, F Solubility behavior of ternary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects. Güçlü- Üstündag, Ö.; Temelli, F. *Journal of supercritical fluids* 36 :1-15, 2005

Referências bibliográficas

GUERRA, P.C. ; MOLINA, I.Y; YÁBAR E. ; GIANOLI, E. Oviposition deterrence of shoots and essential oils of *Minthostachys* spp. (Lamiaceae) against the potato tuber moth, *Journal of Applied Entomology* 131 pp. 134–138, 2007

HARTMANN, T.; From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846, 2007

HEAT, H. B. *Source cook of flavors*. USA: Van Nostrand Reinhold, v. 2, 1981.

HOLLENDER, J; HNEINE, J. ; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W; GOTZ,G.K.E. Extraction of policyclic aromatic hidrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. *Journal of chromatography A*, 776.233-243, 1997

LAWRENCET, B. M. .Essential oils: From Agriculture to chemistry. *International Journal of Aromatherapy* 10:(3-4), 82-98, 2001

LEAL, P.F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 2520-2525, 2003

LEE, S.; PETERSON, C.; COATS, J., Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 39 (1), 77-85, 2003

LEE, W. Y.; CHO, Y. J.; OH, S. L.; PARK, J. H.; CHA, W. S.; JUNG, J. Y.; CHOI, Y. H. Extraction of grape seed oil by supercritical co2 and ethanol modifier. *Food Science Biotechnology*. 9: 3, 174-178, 2000

LI, J. OU-LEE, S,' RABA, R.; AMUNDSON, R.G.; LASTATBII, R.L Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-6 Irradiation *The Plant Cell*, 5, 171-179, 1993

LIMBERGUER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Óleos atéis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio grande do Sul. *Química Nova*, (27) 6, 916-919, 2004

Referências bibliográficas

LIU. Solubility of solid solutes in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents. Li Q.; Zhang Z.; Zhong C.; Liu Y.; Zhou Q. *Fluid Phase Equilibria* 207(2003) 183-192.

LOULI, V.; FOLAS, G.; VOUSAS, E.; MAGOULAS, K. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids* 30: 163-174, 2004

LU, J. Near critical and supercritical ethanol as benign solvent: polarity and hydrogen bonding. Lu, J.; Boughner E.C.; Liotta, C. L.; Eckert, C.A. *Fluid Phase Equilibria* 198(2002) 47-49.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J.; Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043 :323-327, 2004

LUPACA, D. M, ROMERO S. M, DAVID COTACALLAPA D. V., TELLO M. T., Influencia del distanciamiento de siembra y abonamiento Nitrogenado y el rendimiento de aceite esencial de la Munha (*minthostachys mollis* grisebach). *Investig. Valdiviana* 2 (2) 2008

MICHELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A; FERREIRA, S.R.S Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. *Journal of Supercritical Fluids* 33, 131-138, 2005

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA DEL PERÚ. Ficha técnica de Munha disponível em http://www.minag.gob.pe/download/pdf/sectoragrario/agricola/lineasd_cultivoemergentes/MUNA.pdf> Acesso em 13/11/2009

MORRISON, R.; BOYD, R. *Química Orgânica* 9. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1639p., 1990

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Washington, D. D, 2000

NAWAZ, H.; SHI, J.; MITTAL, G. S.; KAKUDA, Y., Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48 (2), 176-181, 2006

Referências bibliográficas

ORMACHEA, A.E.C.,. Usos tradicionales de la "Munha" (*Minthostachys* spp., Labiatae) en aspectos fito-sanitarios de Cusco y Puno. Revista Peruana de Entomología 22, 67-70. 1980.

OZCAN, A.; OZCAN, A.S. Comparison of supercritical fluid and soxleth extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macrolada*. Talanta 64: 491–495, 2004

ÖZEL, M. Z.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A.; BURFORD, M. D., Extraction, solubility and stability of metal complexes using stainless steel supercritical fluid extraction system. Analytica Chimica Acta 417 (2), 177-184., 2000

POKRYWIECKI, J. C.Fracionamento do óleo essencial de manjeriço de cheiro (*ocimum basilicum*) com membranas em meio supercrítico para concentração do linalol com recirculação do solvente no processo de extração. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química e Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006

POURMORTAZAVI S.M.; SEFIDKON F. ;GHORBAN S. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from *perovskia atriplicifolia* benth.; Journal of Agricultural and Food chemical, 51:5414-5419, 2003

POURMORTAZAVI S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S.; Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis Rewiew Journal of Chromatography A, 1163 :2–24, 2008

POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). Journal of Supercritical Fluids 21: 245-256, 2001

PRATES, P D. , Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química e Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006

Referências bibliográficas

Raman, K.V., Booth, R.H., Palacios, M., 1987. Control of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller in rustic potato stores. *Tropical Science* 27, 568–569.

REVERCHON E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of supercritical Fluids*, v. 10, 1997.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids* 38: 146-166, 2006

ROOP R., AKGERMAN A., DEXTER B. ; IRVIN T. Extraction of phenol from water with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* (2), 2-3, 51-56 , 1989

SALGIN, U., Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. *The Journal of Supercritical Fluids* 2007, 39 (3), 330-337, 2007

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C; NETO, O. G. R. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. ISSN 1517-2244, novembro 2004.

SAUCEAU, M.; LETOURNEAU, J. J.; FREISS, B.; RICHON, D.; FAGES, J., Solubility of eflucimibe in supercritical carbon dioxide with or without a co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 31 (2), 133-140. 2004

SECUIANU, C.; FEROIU, V.; GEANA, D., Phase behavior for carbon dioxide + ethanol system: Experimental measurements and modeling with a cubic equation of state. *The Journal of Supercritical Fluids* 47 (2), 109-116., 2008

SCHMIDT-LEBUHN, A. N., Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 118 (3), 343-353. 2008

Referências bibliográficas

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª Ed. Ver. – Porto alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, cap. 19, 2001

SOSOVÁ, H; RAT, V.;KHACHATURYAN,M.;VLCEK, D. Solubility of squalene and dinolyl phthalate in CO₂ with entrainers. Journal of Supercritical Fluids 14: 145-149, 1999

TEBERIKLER, L.; KOSEOGLU, S.; AKGERMAN, A., Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78 (2), 115-120, 2001

ULLOA, C., "Aromas y sabores andinos," Moraes, M., b. Ollgard, LP Kvist, F. borchsenius & h. balslev (eds.). botánica económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, p. 319, 2006.

VASAPOLLO, G.; LONGO, L.; RESCIO, L.; CIURLIA, L., Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. Journal of Supercritical Fluids. 29 (1-2), 87-96, 2004

TONTHUBTHIMTHONG, P.; DOUGLAS, P. L.; DOUGLAS, S.; LUEWISUTTHICHAT, W.; TEPPAITOON, W.; PENG SOPA, L. Extraction of nimbin from neem seeds using supercritical CO₂ –methanol mixture. Journal of Supercritical Fluids 30: 287-301, 2004

UGARTE OCHOA, M.A., ALENCASTRE MEDRANO, L., SICOS HUAMÁN, A., 1984. La Muña en el conocimiento popular Andino. In: Caballero Osorio, A.A., Ugarte, M.A.(Eds.), Muña: investigación y proyección social. Instituto de Investigaciones UNSAAC—NUFFIC, Cuzco, pp. 5–16.

VENSKUTONIS, P. R., Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). Food Chemistry, 59 (2), 219-227. 1997

WONGPORNCHAI, S.; DUMRI, K.; JONGKAEWWATTANA, S.; SIRI, B., Effects of drying methods and storage time on the aroma

Referências bibliográficas

and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. *Food Chemistry* 87 (3), 407-414, 2004

ZOUGAGH, M.; ARANDA, P.; CASTAÑEDA, G.; RIOS, A. Supercritical fluid extraction Achiral liquid chromatography with circular dichroism detection for the determination of menthone enantiomers in natural peppermint oil samples. *Talanta* 79 : 284–288, 2009

ZYGADLO, J. A.; MAESTRI, D. M.; LAMARQUE, A. L.; GUZMAN, C. A.; VELAZCO-NEGUERELA, A.; PEREZ ALONSO, M. J; GARCIA-GALLEGOS, M.C; GROSSO, M.R. Essential Oil Variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24:4.319-323, 1996

ANEXO I- PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO

Artigo completo submetido

Arauco, M.*; Marangoni, A. & Bolzan, A. SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF *Minthostachys mollis* (Kunth). 9th International Symposium On Supercritical Fluids Arcachon 18-20 May 2009

SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF *Minthostachys mollis* (Kunth)

Arauco, M.*; Marangoni, A. & Bolzan, A.
Federal University of Santa Catarina,
Florianópolis, (Brazil) (NP)
mayarau0@hotmail.com

Minthostachys mollis (Kunth) Griseb is of great ethnobotanical, pharmacological and commercial interest because of the essential oils found in the leaves. It does not only find use, as a condiment or tea, in the traditional cuisine of the Andes, but is one of the most important plants in the folk medicine of the area. On the basis of this observation, it receives growing attention from modern pharmacology and medicine, as plant decoctions and extracted essential oils are tested for pharmacological effects. In Argentina and Peru, essential oil is extracted on a commercial scale.

The dependence of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb essential oil composition, obtained by supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), with the following parameters: pressure, temperature, extraction time (dynamic), and modifier (ethanol) was studied. The results were also compared with those obtained by extraction solvent method in laboratory conditions. Regarding the percentages of menthone (19,21%) and pulegone (52.0%), the optimum SC-CO₂ results were obtained at the following experimental conditions: pressure = 115 bar, T = 35 °C, static time = 10 min, and Vmodifier = 30ml. The results of extraction solvent that the major components of *M. pulegium* L. were

Anexo

pulegone (10,92%), menthone (19,21%). The evaluation of the composition of each extract was performed by gas chromatography–mass spectrometry.

INTRODUCTION

The Labiatae family has several members with a significant content of essential oils, some of them being utilized in perfumery, or as spices in foods. *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb that grow naturally now restricted to Andean South America[1] is one of the most important plants in the folk medicine of the area. In Argentina and Peru, essential oil is extracted on a commercial scale. *Minthostachys* from southern Peru for seasoning, tea, medicine against colds and stomach ache, and especially for the preservation of stored potatoes lists uses of *Minthostachys* like condiment for soups, stew, and even modern Pizza, medicinal infusions, and commercial production of aromatic oil. She also presents two culinary receipts containing *Minthostachys* (for “chupe verde” and “lagua de maíz”). Also one of traditional uses of *Minthostachys* in the vicinity of Cuzco and Puno: the protection of stored potato and oca tubers from pests, the application of water boiled while containing *Minthostachys* leaves or even of fresh plant parts against aphids on crop plants, and use in the house against flea infestations.[1-4]

Previous studies on the isolation of *M. mollis*(Kunth) Griseb essential oils with hydro/or steam distillations, resulted in the identification of the main constituents of the oils.[1-2]

Supercritical fluid extraction (SC-CO₂) is receiving great attention in the agrochemical fields, can be considered one of the most potentially useful new methods of sample preparation and will eventually compete successfully with conventional methods, e.g. hydrodistillation, steam distillation, and solvent extraction, in the isolation of volatile compounds from natural matrices.[6]

The solvent strength of the supercritical fluids directly related to its density and thus can be controlled by changing the extraction pressure (or to a lesser extent, the temperature).

The low viscosities and high solute diffusible characteristic of supercritical fluids facilitate mass transfer during extraction. [5,6]

When volatile, reactive, and heat-sensitive terpene compounds are isolated, low critical temperature and non-polar character of the fluids are preferable. The most commonly used supercritical fluid is carbon dioxide, possesses these features and in addition provides a

Anexo

chemically inert, low cost, non-flammable and non-toxic environment for the extraction.[5,6]

The objective of this work was to compare the SC-CO₂ with solvent extraction process. Also the influence of parameters such as temperature, pressure, modifier and yield the SC-CO₂ of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb essential oil was studied. This study was undertaken to address the following goals: (i) Finding suitable extraction parameters to isolate volatile oil and extraction and (ii) determination of composition of the essential oil.

MATERIAL AND METHODS

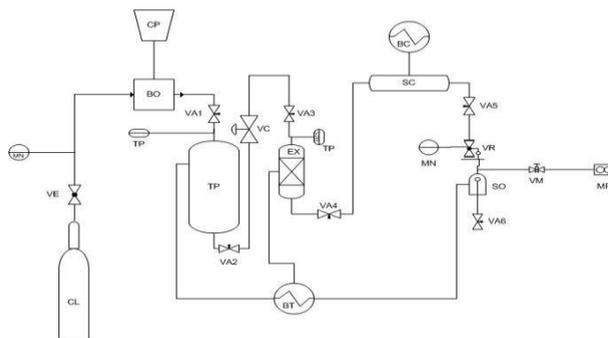
Plant Material

The plant material was collected in the town of Tarma, Junin-Peru. The drying temperature was 35 ° C, was then sent by air dried, and protected from direct light. It was sent by air to the Federal University of Santa Catarina, Florianopolis-Brazil.

Sohxlet extraction

The plant (were charged with a particle size about 0,2 um) was submits a extraction by sohxlet method for 2h using methanol as solvent. The volatile extract was collected and refrigerated till time of analysis.

Supercritical Fluids apparatus



**Figure 1 – Pilot plant, schematic drawing. CL- CO₂ tank; CP-pump; BO- booster; TP- CO₂ tank; EX- extractor; SO- oil separator; SC- wax separator; VC- control valve; VR- back pressure valve; VA- needle valves; VE- ball valve; VM- regulation valve; MF- flow meter; BT- heat exchanger (hot water); BC- heat exchanger (cold water); TP- flow rate measurement; MN- manometer.
GC and GC/MS analysis**

The oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and flame ionization detector. The compounds were identified by comparison of retention time by Kovatz indexes with authentic compounds, as well as comparison of mass spectra with authentic or published data.

Supercritical fluid extraction (SC-CO₂) procedure

Nine extractions were made to temperatures 35, 45, and 55 °C, and pressures of 100, 115 and 125 bar according to Table 1. shows. Carbon dioxide was used as supercritical solvent with flow rate of 1,2 L/min and 30 ml of ethanol as modifier. The static time was 60 minutes for all extractions. In each extraction was used 70g of powdered plant material.

Table 1.

Conditions extractions of SC-CO₂: each extraction has 60 minutes of static time and 30 ml of ethanol as modifier.

<i>Nº</i>	<i>Pressure (bar)</i>	<i>Temperature (°C)</i>
1	100	35
2	100	45
3	100	55
4	115	35
5	115	45
6	115	55
7	125	35
8	125	45
9	125	55

Results and discussion

The soxleth extraction is one of traditionally methods for essential oils in laboratory. In this study, we intend to compare the efficiency of this process with the relationship to the volatile compounds of the extracts of *Minthostachys mollis* obtained by SC-CO₂

As show the table 2 than 22 compounds consisting over than 58,16% of the total solvent extraction of essential oil were The major components were pulegone (20,3%), menthone (19,21%), Veratril (13,35%), iso-Menthone (4,21%), Copaene (3,86%).

Table 2.
Composition of solvent extraction essential oil *M. mollis*

Nº	Composto	(%)
1	1 Pulegona	10,92
2	2 Mentona	19,21
3	3 iso-Mentona	4,21
4	4 Copaeno	3,86
5	5 Cariofileno oxido	1,73
6	6 Pulegona oxido	1,48
7	7 Mentol	1,11
8	8 Espatulenol	0,94
9	9 Cariofileno	0,79
10	10 Cadinene	0,56
11	11 Veratril	13,35
	∑	58,16
	Total	

Results of GC/MS analyses of the nine SC-CO₂ extractions are shown in Table 3. These results revealed great differences between each set of SFE conditions. We can conclude according to Table 3 that the

Anexos

best extraction conditions in terms of the number of Menthona and Pulegone was extraction No 4 (T = 35 °C, pressure = 115 bar, dynamic time = 60 min, and modifier volume = 30 ml) because we have an attractive rate of Pulegone which is active in major. We can also say that the extraction No 9 (T = 55 °C, pressure = 125 bar) with 95% extracted of components showed high values of Menthone, however if the percentage of low Pulegone 26.17%. The best yield was presented in extraction No 7 (T = 55 °C, pressure = 125 bar), showing that it has a good proportion of Menthone (34,19%) and Pulegone (41,43 %).

Table 3.
The results of GC/MS analysis and each yield of the nine SC-CO₂ extractions of *M. mollis*

N°	Compound	Ext 1	Ext 2	Ext 3	Ext 4	Ext 5	Ext 6	Ext 7	Ext 8	Ext 9
1	Pulegona	41,60	42,62	32,08	40,65	41,18	40,75	39,64	39,18	41,80
2	Mentona	27,50	28,74	25,15	26,81	24,80	24,32	28,56	25,57	27,37
3	Iso-Mentona	5,76	6,28	6,96	6,44	6,62	5,95	6,64	3,84	6,30
4	Carvona	3,43	3,72	4,29	3,35	3,03	2,74	3,70	3,36	3,25
5	Copaeno	2,85	1,38	1,06	0,06	0,06	0,72	1,35	1,23	0,94
6	Limoneno	2,29	0,36	2,03	0,25	2,08	0,51	0,21	0,28	0,31
7	Mentol	1,56	1,45	2,14	1,56	1,44	1,29	1,45	1,84	1,51
8	Durenol	1,40	1,05	0,12	0,22	0,26	0,25	0,62	0,90	0,26
9	Timol	1,13	1,05	2,14	0,22	0,20	0,19	0,18	0,25	0,27
10	Carvacrol	0,99	0,81	1,11	0,65	0,56	0,39	0,61	1,16	0,91
11	Germacrene 2-hidroxy-3-isopropyl-6-methyl-2-cyclohexen-1-one	0,74	2,43	0,18	0,24	1,24	0,24	0,28	2,27	0,28
12	Cariofileno oxido	0,63	0,21	0,08	0,97	0,08	0,05	0,28	0,30	0,08
13	Cadineno	0,54	0,20	0,02	1,70	0,05	0,12	0,15	0,33	2,29
14	Cariofileno	0,54	0,26	1,42	0,98	0,96	0,17	0,27	0,24	0,07
15	Isopulegol	0,51	0,50	0,46	0,58	0,20	0,39	0,60	1,42	0,62
16	Veratril	0,44	0,16	0,04	0,12	0,19	0,28	0,19	0,48	0,10
17	Espatuleno	0,37	0,26	0,94	0,06	0,42	2,50	0,35	0,62	0,34
18	Cariofileno (9-epi-E)	0,37	0,12	0,29	1,18	0,15	1,00	1,59	0,12	1,26

Anexos

	Pulegona									
20	Oxi	0,35	0,28	0,74	0,39	0,38	0,23	0,44	0,29	0,33
21	Eremofileno	0,34	0,47	0,06	0,07	0,25	0,05	0,19	0,12	0,12
	Estrutura proposta (- CO)									
22		0,28	0,12	0,07	0,93	1,40	0,83	0,33	0,19	0,95
23	Linalool	0,24	2,07	0,15	2,23	0,04	1,96	2,30	1,90	2,19
	TOTAL	94,43	94,66	84,50	89,97	85,65	85,02	91,00	86,13	91,60

In a comparison between the solvent extraction method, and the nine extractions of SC-CO₂, there was less percentage of constituents in the supercritical extractions. Probably the reason is the low affinity of methanol as the solvent polarity of the Pulegone.

Conclusions

The flexibility in the management of the variables involved in the SCF process allows one to optimize the experimental conditions considering the selectivity of a substance or classes of substances of interest. The selectivity of SC-CO₂ allowed one to maximize the concentration of the selected compounds, with this process being more advantageous than the solvent extraction, demonstrated for the low yield 0,6% of extraction and lows percentages of compounds menthone and pulegone.

The best percentage of pulegone and menthone was given by the condition of T = 35 °C, pressure = 115 bar.

References

[1] A.N. Schmidt-Lebuhn. Review, Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae) *Journal of Ethnopharmacology* 118 (2008) 343–353

[2] Erika Banchio, Graciela Valladares, Julio Zygadlo, Pablo C. Bogino, Luciana V. Rinaudi, Walter Giordano. Changes in composition of essential oils and volatile emissions of *Minthostachys mollis*, induced by leaf punctures of *Liriomyza huidobrensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 35 (2007) 68e74

Anexos

[3] A. Fournet , A. Rojas de Arias , B. Charles , J. Bruneton. Chemical constituents of essential oils of Mufia, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology* 52 (1996) 145-149

[4] Y.G. Gillij , R.M. Gleiser , J.A. Zygadlo. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99 (2008) 2507–2515

[5] Ernesto Reverchon , Iolanda De Marco. Review. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. of Supercritical Fluids* 38 (2006) 146–166

[6] Seied Mahdi Pourmortazavi , Seiedeh Somayyeh Hajimirsadeghi. Review: Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163 (2007) 2–24