UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIRELLE DOGENSKI

Extração do óleo essencial e oleoresina das folhas de *Corymbia citriodora* utilizando CO₂ em condições sub e supercríticas

MIRELLE DOGENSKI

Extração do óleo essencial e oleoresina das folhas de *Corymbia citriodora* utilizando CO₂ em condições sub e supercríticas

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

D654e	<p>Dogenski, Mirelle</p> <p>Extração do óleo essencial e oleoresina das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> utilizando CO₂ em condições sub e supercríticas / Mirelle Dogenski. -- Pirassununga, 2013. 144 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira.</p> <p>1. Óleos essenciais 2. Oleoresina 3. Atividade Antioxidante 4. CO₂ supercrítico 5. <i>Corymbia citriodora</i>. I. Título.</p>
-------	---

*Dedico este trabalho à minha mãe
Néry, à quem devo tudo o que sou.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela benção da vida, pela Sua companhia constante e por colocar em meu caminho amigos tão especiais.

À minha família, minha mãe, pelo seu imenso amor e dedicação, pelos seus ensinamentos e apoio em todas as circunstâncias, me incentivando a seguir sempre em frente.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) - USP pela oportunidade e estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

À Prof^a Dra. Alessandra Lopes de Oliveira pela orientação, incentivo e confiança na execução deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora, pela participação e contribuição apresentadas para redação final do trabalho.

Ao Técnico do LTAPPN, Nilson Ferreira, por toda ajuda e paciência despendida conosco durante os experimentos no laboratório e também à estagiária Ana Carolina Velho.

Aos colegas do LTAPPN pelos momentos compartilhados Samira Melo, Luciana Machado, Débora Nascimento e Santos, Paola de Oliveira, Naila Asbahr, Pedro Grande e, mais recentemente, Heber e aos estagiários Gabriela Marques, Alessandra Barros, Eliane Takahashi, Rafael Almeida e Victor de Rossi.

Aos professores que gentilmente compartilharam o laboratório para que este trabalho pudesse ser realizado: Carmen, Rose, Rogers, Giovana e Christianne. Também ao Prof^o Paulo Sobral pela oportunidade de trabalhar como sua aluna PAE.

À Prof^a Eliana pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados.

Ao Especialista Eduardo Crevelin e Prof^o Luiz Alberto Beraldo de Moraes (Beto) por todo o auxílio nas análises realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais da FFCLRP/USP.

À Prof^a Carmen S. Fávaro-Trindade, pelo seus ensinamentos, imenso apoio e amizade.

Ao Técnico do Laprof Marcelo Thomazini e à Riana Heinnemman, seus ensinamentos foram muito valiosos para mim.

À minha amiga Sarita Cararo pelo enorme apoio, mesmo de longe. Obrigada pela torcida, por se alegrar com as minhas conquistas e se preocupar com as minhas angústias.

À Leanne Wiley por sua amizade, paciência e dedicação no ensino na língua inglesa.

Às companheiras da República Eldorado, Thaís M. Canan, Daniela Akemi, Mariana A. Torres Mariana V. Pierre, Rachel Bonadio, Maíra G. Granero, Jesana Moraes, Nissirlany Cardoso, pela convivência divertida e agradável. Em especial à Roberta Carvalho e Graziela de L. Veiga pelo incentivo e amizade constantes durante esta caminhada.

À todos os amigos da pós-graduação pela amizade e momentos de descontração Paula Okuro, Fernando Eustáquio, Volnei, Mariana, Julio, Adja, Thaysa e Hugo, Vitor Garcia, Josi, Lucas, Tiara, Diane, Rafaela, Renata, Drucila, German, Jaiber, Cristian, Maíra, Julio Guerra, Baiano e às gurias do Sul Taíse Toniazzi, Camila Bitencourt e Keliani Bordin. Agradeço também ao Max e à Ana Paula Chaves, que conheci durante na época do alojamento, por todo apoio e amizade. Em especial à Talitinha Comunian, pela amizade e incentivo constantes.

Aos pós graduandos e estagiários CEBER, Roberta Carvalho, Madeline, Ana Paula, Katiele e Cristian, Letícia, Delaíla, Janaína, Fábio, Dan, Raquel, Claiton, Thaís, Henrique e também à Mayara Palagi, do LABEQUI, pela oportunidade de trabalhar em seus experimentos, amizade e momentos descontração.

Ao pessoal do vôlei pelos momentos de descontração e incentivo ao esporte.

...à todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado, o meu muito obrigada!!

*“Tua caminhada ainda não terminou.
A realidade te acolhe dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.
Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia
e sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento.
É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai,
e não a faceta do raio que destrói.
Se não consegues entender que o céu deve estar dentro de ti,
é inútil buscá-lo acima das nuvens e ao lado das estrelas.
Por mais que tenhas errado e que erres,
para ti haverá sempre esperança,
enquanto te envergonhares de teus erros.
Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo.
Lutar por quem te rejeita é quase chegar à perfeição.
A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.
Não faças do amanhã o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
Mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues,
para poderem seguir-te.”
(Charles Chaplin)*

*“Ein Geist, der sich für eine neue Idee öffnet,
wird niemals zu seiner ursprünglichen Größe zurückkehren.”
(Albert Einstein)*

*“Conservemos a luz da consolação, a bênção do concurso fraterno, a confiança em
nossos Maiores e a certeza na proteção deles; contudo, não olvidemos o dever natural
de seguir para o Alto, utilizando os próprios pés.”
(Emmanuel)*

RESUMO

DOGENSKI, M. **Extração de óleo essencial e oleoresina de folhas de *C. citriodora* utilizando CO₂ em condições sub e supercríticas**. 2013. 137 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Este trabalho teve como objetivo o mapeamento da composição do óleo essencial (OE) de *Corymbia citriodora* produzido no Brasil pelas principais destilarias, Três Barras (FTB) e Meneghetti (FMG), e a extração do OE e oleoresina (OR) a partir das folhas utilizando a tecnologia de fluidos supercríticos. Foram estudados os efeitos das condições do processo, pressão (P) e temperatura (T), sobre a composição química e rendimento dos extratos, além da atividade antioxidante de alguns ensaios. As folhas picotadas apresentaram umidade de $7,33 \pm 1,1$ e $8,66 \pm 0,5\%$ para a FMG e FTB, respectivamente. As extrações, a partir das folhas com CO₂ em condições sub e supercríticas, foram realizadas em duas etapas. Na primeira etapa, obteve-se o OE e, em seguida, as condições foram reajustadas para se fazer a extração da OR. As combinações das variáveis P e T foram determinadas conforme um delineamento composto central rotacional (DCCR), sendo feito um para cada etapa de extração. Para todos os extratos obtidos na primeira etapa, bem como dos OEs obtidos por arraste à vapor (AV) e hidrodestilação (HD), determinou-se o perfil de voláteis por cromatografia gasosa acoplado ao espectrofotômetro de massa (GC/MS). Os ensaios de maior rendimento em OE sem a coextração de pigmentos (100 bar e 60°C, FTB=1,59% e FMG= 1,56%) e OR (220 bar e 70°C, FTB=1,59% e FMG= 1,56%) tiveram sua atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e branqueamento do β -caroteno. A OR também foi avaliada quanto ao seu teor de compostos fenólicos totais, pelos métodos Folin Ciocalteu e Azul da Prússia, e flavonoides totais. Para a amostra FTB, verificou-se a influência positiva da P no rendimento de óleo essencial ($p < 0,05$), enquanto que para a amostra FMG nenhuma variável teve influência significativa ($p > 0,05$). Na resposta rendimento da OR, as variáveis independentes P e T não tiveram influência significativa. A concentração do citronelal (CC) teve influência significativa da P para a amostra FTB e da interação $P \times T$, para a FMG. Para a amostra FTB, na condição supercrítica de 100 bar e 60°C, o rendimento em OE foi semelhante ao obtido por HD (1,59% e $1,6 \pm 0,15\%$, respectivamente), porém o teor de citronelal foi superior (de 87,6%) ao método convencional (79,5%). Nestas mesmas condições para a amostra FMG, os rendimentos foram de 1,53 e $1,16 \pm 0,15\%$ e os teores de citronelal de 71,8% e 57,9% para os OE obtidos por SFE e HD, respectivamente. Os OEs obtidos por AV das amostras FTB e FMG apresentaram teores de citronelal de 79,8 e 76,6%, respectivamente. Nestes OEs foram identificados diversos

compostos com atividade biológica comprovada; verificou-se variações tanto na quantidade quanto na qualidade dos compostos encontrados em cada amostra. As ORs obtidas das folhas FTB e FMG apresentaram alta capacidade antioxidante em ambos os métodos testados, branqueamento do β -caroteno e DPPH, com $81,6 \pm 3,0$ e $81,7 \pm 1,6\%$ de inibição e EC_{50} de $18,04 \pm 0,6$ e $12,6 \pm 0,4$ mg/mL, respectivamente. A capacidade redutora dos compostos da OR foi maior para o método do Azul da Prússia (FTB= $15,7 \pm 1,6$ e FMG= $12,9 \pm 0,5$ mg EAG/100g de folhas) em relação ao reagente Folin-Ciocalteu (FTB= $74,2 \pm 4,0$ e FMG= $84,8 \pm 2,4$, em mg EC/100g de folhas). Os teores de flavonoides (FTB= $26,7 \pm 3,9$ e FMG= $20,4 \pm 0,9$, em mg EC/100g de folhas) foram superiores aos valores dos compostos fenólicos obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu, provavelmente porque o extrato foi testado em sua forma bruta. Os resultados encontrados demonstram que através das condições adequadas de extração com CO_2 supercrítico é possível a obtenção de um OE enriquecido em citronelal e de uma OR com alta atividade biológica. A técnica também permite um melhor aproveitamento da matéria-prima, através da extração sequencial e seletiva de OE e OR, em relação aos métodos convencionais.

Palavras-chave: óleo essencial, oleoresina, atividade antioxidante, CO_2 supercrítico, folhas, *C. citriodora*.

ABSTRACT

DOGENSKI, M. **Extraction of essential oil and oleoresin from *Corymbia citriodora* leaves using near and supercritical CO₂**. 2013. 137 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The aim of this work was to evaluate the *Corymbia citriodora* essential oil (EO) composition produced by the main Brazilian distilleries; Meneghetti and Três Barras moreover evaluate the yield, composition and biological activity of (EO) and oleoresin (OR) obtained from leaves by using supercritical fluids technology. The effects of operational conditions, pressure (P) and temperature (T), on chemical composition and yield were studied. The cut leaves showed moisture content of $7,33 \pm 1,1$ and $8,66 \pm 0,5\%$ to FMG and FTB samples, respectively. The extractions using CO₂ in sub and supercritical conditions were performed in two steps. In the first step the EO was obtained. After, the operational conditions were readjusted to make the OR extraction. The P and T values were determined using a complete factorial experimental design (CFED). It was used two experimental designs, one for each step. The volatile profile of all EO, obtained by steam distillation (AV), hydrodistillation (HD) and SFE were determined using a gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC/MS) equipment. The experiments that provide the higher yields in EO without pigments coextraction (100 bar e 60°C, FTB=1,59% e FMG= 1,56%) and OR (220 bar e 70°C, FTB=1,59% e FMG= 1,56%) had their antioxidant activity determined by DPPH test and β -carotene bleaching assay. The OR was also evaluated for its content of total flavonoids and total phenolics by two different methods, Prussian Blue and Folin-Ciocalteu. In the FTB sample, SFE, to the sample FTB was observed the positive influence of P on essential oil yield ($p < 0,05$), whereas to FMG the variables P and T or its interaction do not have significantly influence in this response. The citronellal concentration (CC) had a positive influence of P to FTB sample and P x T interaction to FMG sample. To FTB, at 100 bar and 60°C, the EO yield was similar from that obtained by HD (1,59% e $1,6 \pm 0,15\%$, respectively). However the citronellal concentration was higher than (87,6%) that obtained by the conventional method (79,5%). At the same conditions, to the FMG sample at the same conditions, the yields were 1,53 e $1,16 \pm 0,15\%$ and the citronellal concentration were 71,8% e 57,9% to the EO obtained by SFE and HD, respectively. OE obtained by AV from FTB and FMG showed citronellal concentrations of 79,8 e 76,6%, respectively. In this EO were identified a variety of compounds with biological activity; it was verified variations in both quantity and the quality of the compounds in each sample. The ORs obtained from FTB and FMG showed a high antioxidant capacity in both, β -carotene bleaching assay and DPPH test, with inhibition of

81,6±3,0 e 81,7±1,6% and EC₅₀ of 18,04±0,6 e 12,6±0,4 mg/mL, respectively. Reducing capacity of OR compounds was higher in Prussian Blue method (FTB= 15,7±1,6 e FMG= 12,9±0,5 mg EAG/100g of leaves) in relation to Folin-Ciocalteu reagent (FTB=74,2±4,0 e FMG= 84,8±2,4, em mg EC/100g de folhas). Total flavonoids (FTB=26,7±3,9 e FMG=20,4±0,9, em mg EC/100g of leaves) were higher than the value of phenolic compounds obtained in Folin-Ciocalteu reagent, probably because the extract was tested crude. The results obtained suggest that by using the SFE it is possible to obtain an EO with a high citronellal concentration. OR also showed a high antioxidant capacity. The SFE technique also improve the raw material utilization by the sequencial and selective extraction of EO and OR, in relation of conventional methods

Key-words: essential oil, oleoresin, antioxidant activity, supercritical CO₂, leaves, *C. citriodora*.

Lista de Figuras

Figura 2.1. Caminhos biosintéticos em plantas. Fonte: Vickery e Vickery, 1986.	27
Figura 2.2. Micrografias de plantas analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando as diferentes estruturas de armazenamento de OE: a) pétala seca de alho com glândulas endógenas de óleo (<i>Syzygium aromaticum</i> , (L.) Merr. & L.M. Perry, Myrtaceae); b) risoma de gengibre (<i>Zingiber officinale Roscoe</i> , Zingiberaceae) com glóbulos de óleo junto com a membrana de suas células secretórias; c) superfície da face superior de camomila romana (<i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All., Asteraceae) com glândulas secretoras sésseis e tricomas não secretórios; d) glândulas secretórias sésseis da parte inferior da folha de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L., Lamiaceae); e) detalhe da superfície inferior da lavanda inglesa (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill., Lamiaceae), mostrando uma glândula secretória séssil rodeada por tricomas não secretórios; f) detalhe da superfície do cálix de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L., Lamiaceae) mostrando as glândulas secretoras sésseis amarelas (redondas) e tricomas não secretórios (pontagudos); g) seção da folha de <i>Corymbia citriodora</i> mostrando as cavidades secretoras de óleo essencial. Recobrimdo a superfície da folha são camadas de cera cristalina (em branco). Fonte: fotos (a) à (f) por American Botanical Council e (g) por Psmicrographs.	29
Figura 2.3. O equipamento Schilcher (a) comparado ao Clevenger (b) para obtenção de OE por HD. O equipamento Schilcher possui um segundo condensador para prevenir que o OE já obtido seja perdido para a atmosfera enquanto que o equipamento Clevenger tem apenas uma torneira de aeração. Assim, o equipamento Schilcher permite períodos mais longos de destilação. Fonte: Bailer et al., 2001.....	43
Figura 2.4. Esquema de um conjunto destilador para OEs. Fonte: Vitti e Brito (2003).	44
Figura 2.5. Extração por AV: normalmente utiliza-se uma tampa para duas dornas de tal modo que o trabalho de destilação ocorra de forma alternada, ou seja, enquanto uma está destilando a outra está sendo descarregada e, na sequência, novamente carregada com folhas. Na foto, está sendo feita a extração de OE de citronela.....	44
Figura 2.6. Diagrama de fase P-V-T para um componente puro e sua projeção no plano PT. Fonte: Brunner, 2005.	46
Figura 2.7. Esquema dos mecanismos de transporte na SFE de matrizes sólidas. Fonte: Mukhopadhyay, 2000.	49
Figura 2.8. Curvas globais de extração do tipo I e tipo II. Adaptado de Cavalcanti, 2013.	51
Figura 2.9. Comportamento típico de processo de extração com fluido supercrítico. Adaptado de Albuquerque, 2008	51

Figura 2.10. Comportamento de solubilidade de um soluto sólido em um solvente supercrítico. Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000.	53
Figura 4.1. Amostras de folhas de <i>C. citriodora</i> utilizadas nos experimentos: (a) amostra fornecida pela Destilaria Meneghetti e (b) a amostra fornecida pela Destilaria Três Barras.	57
Figura 4.2. Preparo das folhas para as análises ou extrações.	58
Figura 4.3. Esquema do equipamento de Extração Supercrítica (SFE).	61
Figura 4.4. Esquema das extrações sequenciais e fracionada do OE e OR. As folhas de <i>C. citriodora</i> foram adicionadas ao extrator. Na primeira etapa (DCCR-SUB) extraiu-se o OE. Em seguida, foram aplicadas no Resíduo 1 as condições da segunda etapa de extração (DCCR-SUP) para a extração da OR. O Resíduo 2 foi então descartado.....	63
Figura 5.1. Extratos obtidos nos testes preliminares nas condições de 175 bar, 66°C e com diferentes TE: a) 0 horas, b) 0,5 horas, c) 1 hora e d) 4 horas e em e) o OE obtido à 65 bar e 45°C.....	75
Figura 5.2. Diagrama de pareto das amostras (a) FTB e (b) FMG.....	79
Figura 5.3. Superfícies de resposta geradas pelos modelos lineares para o rendimento global de OE (%) das amostras (a) FTB e (b) FMG em função de P e T	81
Figura 5.4. Superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático para o rendimento global de OE (%) da amostra FTB em função de P e T.	83
Figura 5.5. Efeito da densidade do CO ₂ sobre o rendimento global de extrato obtido para as amostras FTB e FMG.	85
Figura 5.6. Diagrama de pareto das amostras (a) FTB e (b) FMG.....	88
Figura 5.7. Extratos obtidos no ensaio 15 (220 bar, 70°C, $\rho=696,5\text{kg.m}^{-3}$) do DCCR-SUP das amostras (a) FTB e (b) FMG. Além do rendimento (4,30% e 3,52% para a FTB e FMG, respectivamente), as amostras também diferiram no aspecto e na cor. A amostra FMG possuía uma pigmentação amarela em um tom mais escuro e maior consistência em relação à amostra FTB.	89
Figura 5.8. Comparação das folhas antes de depois das duas etapas de extração: (a) as folhas verdes são antes da extração e as amareladas depois da extração e (b) característica das folhas após a extração.....	89
(b).....	92
Figura 5.9 Diagrama de pareto das amostras (a) FTB e (b) FMG em função das variáveis de processo estudadas (P, T e $P \times T$)......	92
Figura 5.10. Superfície de resposta para a concentração de citronelal (%) das amostras (a) FTB e (b) FMG.....	94

Figura 5.12. Cinética de extração dos ensaios do planejamento DCCR-SUB para os ensaios 2 e 6 da amostra FTB (a) e ensaios 6 e 7 para a amostra FMG (b) plotados massa de solvente versus a massa de extrato.....	99
Figura 5.13: Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos óleos essenciais da amostra FTB obtidos por AV (—), HD (—) e SFE nos ensaios 1 (—), 2 (—), 3 (—), 4 (—), 5 (—) e 6 (—).....	101
Figura 5.14: Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos óleos essenciais da amostra FMG obtidos por AV (—), HD (—) e SFE nos ensaios 1 (—), 2 (—), 3 (—), 4 (—), 5 (—) e 6 (—).....	101
Figura 5.15. Perfil cromatográfico, em diferentes comprimentos de onda (254, 280 e 360 nm), das ORs obtidas por HPLC no ensaio 4 (220 bar e 70°C) das amostras FTB.	111
Figura 5.16. Espectros de massa obtido HPCL-ESI-MS/MS nos modos (a) positivo e (b) negativo da amostra FTB.	112
Figura 5.17. Espectros de massa obtido por HPCL-ESI-MS/MS nos modos (a) positivo e (b) negativo da amostra FTB.....	113
Figura 5.18. Espectro de massa obtido por UPLC/MS da amostra FMG.....	115
Figura 5.19. Atividade Antioxidante Total (%) das amostras FTB e FMG avaliada pelos métodos (a) DPPH e (b) branqueamento do β -caroteno em diferentes concentrações dos extratos de <i>C. citriodora</i> bem como do citronelal purificado e o antioxidante sintético BHT.	119

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Classes de compostos fenólicos em plantas. Fonte: Adaptado de Balasundram <i>et al.</i> , 2006.....	30
Tabela 2.2. Classificação taxonômica e características básicas do <i>C. citriodora</i> . Fonte: IPEF, 2008.	33
Tabela 2.3. Principais constituintes do óleo essencial de <i>C. citriodora</i> e suas propriedades físico-químicas. Fonte: Adaptado de Boland <i>et al.</i> , 1991.....	35
Tabela 2.4. Valores característicos nos estados líquido, gás e supercrítico. Fonte: Brunner, 2005.	47
Tabela 2.5. Propriedades críticas dos fluidos de interesse em processos supercríticos. Fonte: Mukhopadhyay, 2000.	48
Tabela 4.1. Níveis dos dois fatores, pressão (P) e temperatura (T), do DCCR-SUB.....	63
Tabela 4.2. Níveis dos dois fatores, pressão (P) e temperatura (T), do DCCR-SUP.....	63
Tabela 4.3. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis no estudo do efeito da Temperatura (T) e Pressão (P) no rendimento e composição do OE (DCCR-SUP) e da OR (DCCR-SUP).....	64
Tabela 4.4. Gradiente de solvente utilizado nas análises por HPLC, UPLC/MS e HPLC-ESI-MS/MS.....	70
Tabela 5.1. Resultados obtidos nas análises de umidade, densidade aparente e densidade real das amostras FTB e FMG.	72
Tabela 5.2. Especificações para o OE de <i>C. citriodora</i> e caracterização.	73
Tabela 5.3. Rendimento do OE obtido por HD das amostras FTB e FMG.	73
Tabela 5.4. Condições utilizadas nos testes preliminares para obtenção dos extratos da amostra FTB.....	74
Tabela 5.5. Resultados obtidos nos ensaios dos planejamentos experimentais DCCR-SUB e DCCR-SUP para as amostras FTB e FMG para o OE, OR e concentração de citrônella no OE.	77
Tabela 5.6. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente <i>t</i> , significância estatística e estimativas por intervalo para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).	78
Tabela 5.7. Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento global das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).	79
Tabela 5.8. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).	80

Tabela 5.9. Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}) para um modelo de segunda ordem.	82
Tabela 5.10. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para o rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).	82
Tabela 5.11. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t, significância estatística e estimativa por intervalo para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{2FTB}) e FMG (Y_{2FMG}).	86
Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento global de OR das amostras FTB (Y_{2FTB}) e (Y_{2FMG}).	87
Tabela 5.13. Rendimentos parciais, de OE e OR e rendimento total de extratos (OE mais OR). 90	
Tabela 5.14. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t, significância estatística e estimativas por intervalo para cada fator no modelo codificado para a resposta concentração de citrônella das amostras FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}).	91
Tabela 5.15. Coeficiente de regressão com base no MS residual do modelo de primeira ordem para a resposta concentração de citrônella FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}).	92
Tabela 5.16. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para a concentração de citrônella das amostras FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}).	93
Tabela 5.17. Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta concentração de citrônella das amostras FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}) para um modelo de segunda ordem.....	95
Tabela 5.18. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para a concentração de citrônella das amostras FTB (CC_{FTB2}) e FMG (CC_{FMG2}).	96
Tabela 5.19. Composição da fração volátil dos extratos supercríticos das folhas de <i>C. citriodora</i> da amostra FTB obtidos por análise em GC/MS em coluna RTX®-5MS.	102
Tabela 5.20. Composição da fração volátil dos extratos supercríticos das folhas de <i>C. citriodora</i> da amostra FMG obtidos por análise em GC/MS em coluna RTX®-5MS.....	104
Tabela 5.21. Atividade antioxidante das amostras obtidas por AV, HD e SFE, medida pelos métodos DPPH e branqueamento do β -caroteno.	116
Tabela 5.22. Conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes na OR das amostras FTB e FMG obtidas por SFE 220 bar e 70°C.....	120

Lista de abreviaturas e siglas

ASR	Análise da Superfície de Resposta
AV	Arraste à vapor
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i> (Butilhidroxianisol)
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> (Hidroxibutiltolueno)
CC	Concentração de Citronelal
CC _{FMG}	Concentração de Citronelal Folhas Meneghetti
CC _{FTB}	Concentração de Citronelal Folhas Três Barras
CE	<i>Catequin Equivalent</i> (Equivalentes de Catequina)
CO ₂ SC	Dióxido de Carbono Supercrítico
DAP	Diâmetro à Altura do Peito
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EC	Equivalentes de Citronelal
EO	<i>Essential Oil</i>
FMG	Folhas Meneghetti
FTB	Folhas Três Barras
GAE	<i>Galic Acid Equivalent</i> (Equivalentes de Ácido Gálico)
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectroscopy</i> (Cromatografia Gasosa/Espectrometria de massa)
HD	Hidrodestilação
HPLC-DAD	<i>High Pressure Liquid Chromatography - Diodo Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de Arranjo Diodo)
LTAPPN	Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais
MS	Metabolismo Secundário
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos Essenciais
OE _{FMG}	Óleo essencial Meneghetti
OE _{FTB}	Óleo essencial Três Barras
OR	Oleoresina
ORs	Oleoresinas
P	Pressão
PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
PET	Polietileno Tereftalato

QE	<i>Quercetin Equivalent</i> (Equivalentes de Quercetina)
SEM	<i>Scanning Eletrosopy Micrography</i> (Microscopia Eletrônica de Varredura)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extração com Fluidos Supercríticos)
T	Temperatura
TBHQ	<i>2-tert-butylhydroquinone</i> (2-terc-butilhidroquinona)
TD	Tempo dinâmico
TE	Tempo estático
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> (Cromatograma de Íons Totais)
UPLC-ESI-MS/MS	<i>Ultra Pressure Liquid Chromatographic/Mass Spectroscopy</i> (Cromatografia Líquida de Alta Pressão)
Y ₁	Rendimento Global de Óleo Essencial
Y ₂	Rendimento Global de Oleoresina
Y _{1FMG}	Rendimento Global de Óleo Essencial Folhas Meneghetti
Y _{1FTB}	Rendimento Global de Óleo Essencial Folhas Três Barras
Y _{2FMG}	Rendimento Global de Oleoresina Folhas Meneghetti
Y _{2FTB}	Rendimento Global de Oleoresina Folhas Três Barras

Sumário

1.	Introdução	22
2.	Revisão Bibliográfica	26
2.1	Metabolismo secundário vegetal	26
2.1.1	Terpenos.....	27
2.1.2	Compostos fenólicos	30
2.2	O eucalipto	31
2.2.1	<i>Corymbia citriodora</i>	32
2.3	Extratos de eucalipto	34
2.3.1	Óleos essenciais	34
2.3.1.1	Óleo essencial de <i>C. citriodora</i>	35
2.3.2	Oleoresinas	37
2.3.3	Ceras.....	38
2.3.4	Kinos.....	39
2.4	Atividade antioxidante.....	40
2.5	Métodos para obtenção de óleos essenciais e oleoresinas de eucalipto	41
2.5.1	Arraste à vapor e hidrodestilação.....	42
2.5.2	Extração com solventes orgânicos.....	45
2.5.3	Extração com fluidos supercríticos	46
2.5.3.1	Mecanismo de extração	49
2.5.3.2	Rendimento Global (Y_0) e cinética de extração	50
3.	Objetivos.....	55
3.1	Objetivo geral	55
3.2	Objetivos específicos	55
4.	Material e Métodos.....	57
4.1	Matéria-prima	57
4.1.1	Folhas de <i>C. citriodora</i>	57
4.1.2	OE de <i>C. citriodora</i>	58
4.2.	Caracterização das folhas.....	59
4.2.1	Umidade	59
4.2.2	Massa específica das folhas, densidade aparente e porosidade do leito na SFE	59
4.3	Caracterização do OE	60
4.3.1	Densidade relativa	60

4.3.2	Índice de refração	60
4.3.3	Solubilidade em etanol.....	61
4.4	Obtenção do extrato das folhas de <i>C. citriodora</i>	61
4.4.1	Hidrodestilação	61
4.4.2	Extração com CO ₂ sub e supercrítico.....	61
4.4.2.1	Planejamento experimental	62
4.4.2.2	Determinação do rendimento global (Y ₀).....	65
4.5	Caracterização dos extratos	65
4.5.1	Atividade antioxidante	65
4.5.1.1	Método DPPH	65
4.5.1.2	Método do branqueamento do β-caroteno	66
4.5.2	Polifenóis Totais.....	67
4.5.2.1	Capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu.....	67
4.5.2.2	Estabilização da cor Azul da Prússia na determinação de fenólicos	67
4.5.3	Flavonóides Totais.....	67
4.5.4	Análise da composição volátil por GC/MS.....	68
4.5.5	Análise dos compostos da OR por HPCL-DAD e UPLC-ESI-MS/MS	69
4.5.6	Análise estatística	70
5.	Resultados e discussão	72
5.1	Caracterização da amostra	72
5.2	Caracterização do OE obtido por AV	72
5.3	Extração do OE e da OR	73
5.3.1	Hidrodestilação	73
5.3.2	Extração com CO ₂ em condições sub e supercríticas.....	73
5.3.3	Rendimento global de OE (Y ₁).....	78
5.3.4	Rendimento global de OR (Y ₂)	86
5.3.5	Concentração de citronelal no OE	90
5.3.6	Curvas de extração global do OE	96
5.4	Caracterização dos extratos	100
5.4.1	Análise da composição volátil por GC/MS.....	100
5.4.2	Análise da composição da OR por HPLC-DAD e UPLC-ESI-MS/MS.....	109
5.4.3	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	116
5.4.4	Polifenóis totais e flavonoides totais da OR	120
6.	Conclusões.....	122

7.	Sugestões para trabalhos futuros	123
8.	Referências Bibliográficas.....	124
9.	Anexos	136
9.1	Outras atividades desenvolvidas	136

1. Introdução

1. Introdução

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais (OEs), ao lado da Índia, China e Indonésia, os quais são considerados os 4 grandes produtores mundiais. Dentre os principais OEs produzidos no mercado mundial encontram-se os provenientes de cítricos, eucalipto (tipos 1,8-cineol e citronelal), hortelã pimenta, cravo-da-índia, cedro, lavanda, *spearmint*, sassafrás, cânfora, coentro, *grapefruit* e *patchouli* (BIZZO *et al.*, 2009). O Brasil é líder mundial na produção de óleo essencial (OE) de laranja, o qual é um produto secundário do processamento do suco, e está na segunda posição na produção de OE de *Corymbia citriodora* (FAO, 2012). Bizzo *et al.*, (2009) citam, a partir de dados do COMTRADE (*United Nations Commodity Trade Statistics Database*) de 2005, que os maiores consumidores de OE são os EUA (40%), a União Europeia (30%), sendo a França o país líder em importações, e o Japão (7%). O mercado mundial gira em torno de US\$ 15 milhões/ano, apresentando crescimento de 11% ao ano.

As principais espécies de eucalipto exploradas para a produção de OE no Brasil são *Eucalyptus globulus*, *E. staigeriana* e *Corymbia citriodora* (MACEDO, 2008). No entanto, esta última espécie tem maior importância na economia brasileira por ser a menos susceptível às variações edafo-climáticas (Revista da Madeira, 2003). Sua madeira é utilizada para produção de carvão, postes, mourões e serraria. Durante o desenvolvimento da planta para estes propósitos, suas folhas são podadas e utilizadas para produzir OE. A extração do OE a partir das folhas é convencionalmente feita por arraste a vapor (AV) sendo que o rendimento varia entre 1,0 e 1,6% e a concentração do seu principal componente, o citronelal, varia entre 65 e 85% (VITTI e BRITO, 2006). No período entre 2005 e 2008, o estado de São Paulo foi responsável por 66% da produção deste OE enquanto que Minas Gerais deteve 33% (BIZZO *et al.*, 2009). A China é o principal fornecedor mundial deste tipo de OE seguida pelo Brasil e Índia (FAO, 2012).

O OE de *C. citriodora* é insumo de grande demanda no mercado entrando na composição de diversos produtos tais como sabonetes, perfumes, desodorantes, detergentes, desinfetantes, inseticidas, repelentes, etc (ANDRADE e GOMES, 2000). Diversos estudos também tem demonstrando as propriedades antimicrobianas e antifúngicas deste óleo contra diferentes tipos de microrganismos (BATISH *et al.*, 2008; ELAISSI *et al.*, 2011; GILLES *et al.*, 2010; RAMEZANI *et al.*, 2002) bem como no controle de pragas e ervas daninhas (MACEDO, 2008).

O AV e a hidrodestilação (HD) são os métodos mais utilizados na extração de OEs. Apesar do baixo custo de operação, estas técnicas possuem diversas desvantagens como baixo

rendimento, utilizam temperaturas elevadas que podem induzir a degradação dos compostos termossensíveis, hidrólise e solubilização na água de alguns compostos de aroma. Além disso, possuem poucos parâmetros ajustáveis para controlar a seletividade do processo (GHASEMI *et al.*, 2007).

A extração com fluidos supercríticos (SFE) tem emergido como uma alternativa aos métodos convencionais de obtenção de OEs (UQUICHE *et al.*, 2012). A SFE pode propiciar alta seletividade e é um método ambientalmente seguro e rápido. O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais utilizado devido às diversas vantagens frente aos outros solventes tais como: não-inflamável, não tóxico, quimicamente inerte, alta disponibilidade e de baixo custo. Além disso, o CO₂ tem um ponto crítico de 31,06°C e 73,8 bar, relativamente baixo comparado aos outros solventes, o qual permite a extração de compostos termossensíveis (GHASEMI *et al.*, 2011; MACCABE *et al.*, 2005; UQUICHE *et al.*, 2012).

Além do OE, a oleoresina (OR) também pode ser obtida na SFE. Em geral, extração sequencial e seletiva para obtenção de OEs e oleoresinas (ORs) é possível através de mudanças nas condições de extração com CO₂ supercrítico após a exaustão de cada fração, utilizando-se a mesma matéria-prima empacotada no leito (DELLA PORTA e REVERCHON, 1999; MUKHOPADHYAY, 2000; VERSCHUERER, 1992). Muitos estudos tem demonstrado que as ORs obtidas de diferentes tipos de plantas, a partir da SFE ou por solventes, possuem potencial bioatividade como antioxidantes, antimicrobianos e atividade anticâncer devido à alta concentração de compostos fenólicos, carotenoides e outras classes de compostos (DUH *et al.*, 2012; HAKKI *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2008; SOVOVÁ *et al.*, 2004). No entanto, pouquíssimos estudos (BHAGAT, *et al.*, 2012; HAKKI *et al.*, 2010; GUO e YANG, 2006; SHEN *et al.*, 2012) têm sido desenvolvidos com extração de OR de *C. citriodora* e avaliação de sua atividade biológica.

Embora o Brasil tenha destaque na produção mundial de óleo OE de *C. citriodora*, o país sofre com a falta de manutenção no seu padrão de qualidade, tem baixa representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor (BIZZO *et al.*, 2009). Há a necessidade urgente do desenvolvimento estratégico de pesquisas que aumentem a capacidade produtiva, aumentando a produtividade de biomassa, o rendimento e a qualidade do óleo para garantir a competitividade e estimular o setor (Revista da Madeira, 2003). Esse fatores aliados às vantagens que a SFE apresenta foram a motivação deste trabalho de pesquisa.

É preciso explorar as vantagens que a SFE pode proporcionar como a obtenção de diferentes extratos, com componentes bioativos, a partir de uma mesma matéria prima. Isso implicará em uma maior competitividade para os produtos naturais de plantas nativas, e

consequente expansão comercial, uma vez que se observa uma tendência generalizada do mercado (indústria de alimentos, fármacos e cosméticos) em relação à busca por produtos que gerem vantagens econômica, social e ambiental (ALBUQUERQUE, 2006).

2. Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Metabolismo secundário vegetal

Os vegetais possuem uma grande diversidade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Estes compostos são conhecidos como metabólitos secundários (MS), produtos secundários ou produtos naturais. Em geral, os MS apresentam papéis não reconhecidos diretamente nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, na diferenciação ou na produção de metabólitos primários - carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Os MS também diferem dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal. Isto significa que certos MS específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal (TAIZ e ZEIGUER, 2013).

Durante muitos anos, a importância da influência dos MS na capacidade adaptativa das plantas era desconhecida. Consideravam-se tais compostos como produtos finais do metabolismo, sem função aparente, ou mesmo resíduos. Os estudos com estes compostos foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, interessados na busca por substâncias com importância como drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais (TAIZ e ZEIGUER, 2013). Atualmente, os MS são conhecidos por desempenharem importantes funções nas plantas, como a defesa contra herbívoros e infecção por microrganismos, proteção contra raios ultravioletas, efeitos alelopáticos, atração de animais polinizadores e dispersores de sementes (GARLET, 2007; VICKERY e VICKERY, 1986).

Apesar dos metabolitos primários e secundários não possuírem uma clara distinção entre si, uma base do processo de produção destes pode ser estabelecida. Excluindo os processos primários de biossíntese de açúcares e proteínas, há três rotas principais para produção da grande quantidade de componentes encontrados nas plantas: os caminhos do acetato-malonato, acetato melavonato e ácido chiquímico, os quais estão inter-relacionados, como pode ser visto na Figura 2.1 (VICKERY e VICKERY, 1986).

Estas vias estão sempre presentes e os primeiros produtos formados em quantidade podem ser considerados metabólitos primários. Os MS são derivados biossinteticamente de intermediários do metabolismo primário, cujas rotas possuem estreita relação. Eles estão distribuídos em grande número de famílias de plantas podendo ser divididos em três grandes grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (DUARTE, 2007; VICKERY e VICKERY, 1986). Dentre os compostos nitrogenados, os alcalóides

são bem conhecidos e estão presentes em plantas como café e guaraná, tendo como composto principal a cafeína. Em nossa discussão sobre extratos de eucalipto, apenas as duas primeiras classes de compostos são de nosso maior interesse e serão abordadas nos próximos itens.

Figura 2.1. Caminhos biosintéticos em plantas. Fonte: Vickery e Vickery, 1986.

2.1.1 Terpenos

Os terpenóides constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água. O termo terpeno é usado para hidrocarbonetos que ocorrem naturalmente. Estes são derivados de unidades isopreno e possuem fórmula molecular de $(C_5H_8)_n$. Podem ser cíclicos ou acíclicos e classificados em dois grupos distintos (MUKHOPADHYAY, 2000; TAIZ e ZEIGER, 2004):

- os hidrocarbonetos, os terpenos com até 10 carbonos são chamados *monoterpenos*; os de 15 carbonos são os *sesquiterpenos*, os terpenos de 20 carbonos são os *diterpenos*, os de 30 carbonos são os *triterpenos* e assim por diante.
- os componentes oxigenados, tais como ésteres, aldeídos, álcoois e fenóis, que contribuem para a característica aromática dos OEs.

Certo terpenos têm função bem caracterizada no crescimento e desenvolvimento vegetal. Por exemplo, as giberelinas, um importante grupo de hormônios vegetais, são diterpenos. Os esteróis são derivados de triterpenos, componentes essenciais das membranas celulares, as quais são estabilizadas pela interação desses compostos com fosfolipídios. Os

carotenóides de cores vermelha, amarela e laranja são tetraterpenos que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Os terpenos também são os constituintes principais dos *óleos essenciais*. Os OEs são substâncias odoríferas encontradas em várias partes das plantas, incluindo sementes, raízes, madeira, folhas, flores e frutos. Os OEs são óleos voláteis, diferente dos óleos fixos, como por exemplo, glicerídeos de ácidos graxos (MUKHOPADHYAY, 2000).

Nas plantas, os OEs apresentam reconhecidas propriedades como repelentes de insetos, sendo frequentemente encontradas em diferentes estruturas de armazenamento (Figura 2.2), que variam conforme a família ou espécie da planta. Os OEs provenientes do eucalipto ocorrem, principalmente, nas folhas, onde são produzidas em pequenas cavidades globulares, chamadas glândulas, que encontram-se distribuídas em todo o parênquima foliar da maioria das espécies de eucalipto (Figura 2.2 (g)). Em algumas espécies, estas glândulas podem ser visualizadas como pequenos pontos translúcidos quando a folha é observada contra a luz (VITTI e BRITO, 2003). Estas substâncias agem como advertência sobre a toxicidade do vegetal, repelindo potenciais herbívoros mesmo antes que ataquem. Um aspecto interessante na sua função protetora é que em milho, algodão, tabaco selvagem e outras espécies, certos mono e sesquiterpenos são produzidos e liberados somente após o inseto ter iniciado a ingestão da planta. Tais substâncias repelem herbívoros ovipositórios e atraem inimigos naturais, incluindo insetos, predadores e parasitas, que matam os insetos herbívoros e, assim minimizam os danos adicionais (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Os OEs podem ser extraídos por diversos métodos como maceração, enfleurage, prensagem e extração com solventes orgânicos, que dependem da natureza e parte da planta que será utilizada. Em geral, as folhas são bastante usadas para extração do OE e, assim, o método mais comumente aplicado é o AV, que será descrito com mais detalhes no *item 2.6.1*. Os OEs tem sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, tais como antifúngica, inseticida, herbicida e antibacteriana nas áreas agrônômica e farmacêutica (BAKKALI *et al.*, 2008). São também amplamente empregados como aromas em perfumaria e produtos alimentícios e têm sido explorados quanto à sua atividade antioxidante. Os OEs podem ser comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO *et al.*, 2009).

Figura 2.2. Micrografias de plantas analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando as diferentes estruturas de armazenamento de OE: a) pétala seca de alho com glândulas endógenas de óleo (*Syzygium aromaticum*, (L.) Merr. & L.M. Perry, Myrtaceae); b) risoma de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) com glóbulos de óleo junto com a membrana de suas células secretórias; c) superfície da face superior de camomila romana (*Chamaemelum nobile* (L.) All., Asteraceae) com glândulas secretoras sésseis e tricomas não secretórios; d) glândulas secretórias sésseis da parte inferior da folha de orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae); e) detalhe da superfície inferior da lavanda inglesa (*Lavandula angustifolia* Mill., Lamiaceae), mostrando uma glândula secretória sésstil rodeada por tricomas não secretórios; f) detalhe da superfície do cálix de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L., Lamiaceae) mostrando as glândulas secretoras sésseis amarelas (redondas) e tricomas não secretórios (pontiaudos); g) seção da folha de *Corymbia citriodora* mostrando as cavidades secretoras de óleo essencial. Recobrando a superfície da folha são camadas de cera cristalina (em branco). Fonte: fotos (a) à (f) por American Botanical Council e (g) por Psmicrographs.

2.1.2 Compostos fenólicos

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários que contém um grupo fenol, ou seja, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Tais substâncias são classificadas como compostos fenólicos. Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, variando de moléculas fenólicas simples até compostos altamente polimerizados, e por isso são divididos em diversas classes (Tabela 2.1) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; TAIZ e ZEIGUER, 2013). Devido à esta diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos. Outros tem a função no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos (características sensoriais como a cor em frutas e vegetais), na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (TAIZ e ZEIGUER, 2013).

Tabela 2.1. Classes de compostos fenólicos em plantas. Fonte: Adaptado de Balasundram *et al.*, 2006.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides (cumarinas, isocumarinas, cromones e cromenes)	C ₆ -C ₃
Antocianidinas	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados (proantocianidinas ou flavolans)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Dentre as classes de fenóis, os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxinâmicos) são os principais compostos fenólicos da dieta humana. Os ácidos fenólicos consistem de dois subgrupos, ou seja, ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, os quais tem uma estrutura comum de C₆-C₁. Os ácidos hidroxibenzóicos, por outro lado, incluem os compostos aromáticos com 3 carbonos laterais

(C₆-C₃), com ácido cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico como sendo os mais comuns. Os flavonoides constituem um grande grupo de fenólicos de plantas, com cerca de metade dos 800 compostos fenólicos de ocorrência natural. Os flavonoides possuem baixo peso molecular, consistindo de 15 carbonos arranjados em uma configuração C₆-C₃-C₆. Essencialmente, a estrutura consiste de dois anéis aromáticos A e B, ligados por uma ponte no terceiro carbono, geralmente na forma de um anel heterocíclico C. Variações nos padrões de substituição do anel C resultam em outras classes de flavonóides como flavonols, flavonas, flavanonas, flavanols (ou catequinas), isoflavonas, flavanonols e antocianidinas, dos quais flavonas e flavonols são os que mais ocorrem e são estruturalmente diversos. Os taninos são componentes de peso molecular relativamente alto, constituindo o terceiro grupo mais importante de compostos fenólicos e podem ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são ésteres de ácido gálico (taninos galo e elágico) enquanto que os últimos (também conhecidos como protoantocianidinas) são polímeros de monômeros de polihidróxiflavan-3-ol (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram desenvolvidas demonstrando o potencial antioxidante desses compostos em sistemas alimentícios e também no organismo humano. Em função disto, a busca por antioxidantes de fontes naturais tem recebido muita atenção, já que os sintéticos Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA) e 2-terc-Butilhidroquinona (TBHQ), por exemplo, têm sido questionados quanto ao seu potencial risco à saúde e toxicidade (RIBEIRO *et al.*, 2001). Além disso, os antioxidantes naturais podem ser formulados como alimentos funcionais ou nutracêuticos, que podem ajudar a combater os radicais livres no nosso organismo (SINGH *et al.*, 2007). As ORs de plantas tem sido amplamente investigadas por apresentarem alta bioatividade em testes *in vitro*, geralmente associados ao alto teor de compostos fenólicos. A abordagem sobre ORs de eucalipto será feita mais adiante, no item 2.5.

2.2 O eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, descrito por L'Herit em 1788, pertence à família Myrtaceae e possui como centro de origem a Austrália e regiões próximas ao Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Java e sul das Filipinas, ou seja, uma faixa compreendida entre as latitudes 9°N e 44°S (ROSSI, 2009). No entanto, o eucalipto é uma espécie arbórea que se destaca devido à extensão de sua área plantada nas regiões de clima tropical, tendo como maiores referências o Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha, e China. Os principais produtores brasileiros concentram-se nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia. Este gênero compreende cerca de 900 espécies, várias das quais são de grande importância

econômica. Atualmente, nosso país possui uma região reflorestada com eucalipto de mais de 3,7 milhões de hectares (BIZZO *et al.*, 2009; ROSSI, 2009).

Na classificação informal, amplamente utilizada, Pryor e Johnson (1971) dividiram o gênero *Eucalyptus* em 7 subgêneros: *Corymbia*, *Blakella*, *Eudesmia*, *Ganbaea*, *Indodiogenes*, *Monocalyptus* e *Symphyomyrtus*. Porém, os subgêneros *Corymbia* e *Blakella* foram discriminados dos outros *Eucalyptus* em um novo gênero denominado *Corymbia*. O panorama mais recente sobre a filogenia do *Eucalyptus*, o qual consistiu basicamente de análises de caracteres morfológicos e moleculares, relata duas grandes linhagens: a primeira compreendendo *Angophora* e *Corymbia* e outra incluindo todos os subgêneros de *Eucalyptus* (ROSSI, 2009). Esta reclassificação, feita em 1995, ainda é pouco utilizada e em muitos trabalhos a espécie ainda encontra-se descrita como *Eucalyptus citriodora*. No entanto, neste trabalho utilizaremos a nova denominação, *Corymbia citriodora* (ROSSI, 2009).

O gênero *Corymbia* é composto por aproximadamente 113 espécies arbóreas. No entanto, os estudos relativos às atividades biológicas desse grupo têm sido efetuados, especialmente, envolvendo a espécie *Corymbia citriodora* (DÖLL-BOSCARDIN *et al.*, 2010).

2.2.1 *Corymbia citriodora*

O *C. citriodora*, também conhecido como *Lemon scented gum* ou *Spotted gum*, tem sua distribuição natural na parte oriental do estado de Queensland, na Austrália, entre as latitudes de 17 à 26°S. Existem duas áreas principais de ocorrência: entre Mackay e Maryborough e na região próxima a Atherton. A primeira população encontra-se a uma altitude de 75 à 300 metros, e a segunda de 600 à 800 metros. Esta espécie ocorre também associada com populações de *E. tereticornis*, *E. triantha*, *E. siderophloia*, *E. paniculata*, *E. propinqua*, *E. maculata* e *Araucaria cunninghamii*. Quanto às exigências edafoclimáticas, esta espécie ocorre em regiões tropicais, com precipitação pluviométrica anual de 600 à 1000 mm. Os tipos de solo onde melhor se desenvolve são argilo-arenosos, avermelhados, podzólicos e lateríticos, bem drenados e profundo, podendo também se adaptar em solos pobres. No Brasil, é uma das espécies de maior plasticidade, encontrando-se em plantações desde o estado do Rio Grande do Sul até a região amazônica. Entretanto, devido a sua sensibilidade às geadas e sua elevada tolerância à condições de seca, é recomendado para a região norte e central do Brasil (PINEDO, 1989). As características básicas e a classificação da planta estão apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Classificação taxonômica e características básicas do *C. citriodora*. Fonte: IPEF, 2008.

Classificação	Fruto	Caule	Folha
Divisão: Angiospermae Classe: Dicotyledoneae Subclasse: Archichlamydeae Ordem: Myrtiflorae (Myrtales) Família: Myrtaceae Gênero: <i>Corymbia</i> Subgênero: <i>Ochraria</i> Seção: <i>Ochraria</i> Série: <i>Maculatae</i> Espécie: <i>Corymbia citriodora</i>

O *C. citriodora* é uma planta de porte médio, ocasionalmente podendo atingir 50 m de altura e 1,2 m de DAP (Diâmetro à Altura do Peito) com excelente forma do tronco e folhagem rala (IPEF, 2013). Na fase adulta suas folhas são alternadas, pecioladas, lanceoladas com comprimento de 8-16 cm e 0,5-1,8 cm de largura, possuindo tom de verde claro. A casca é lisa com superfície pulverulenta. Na zona natural de ocorrência, na Austrália, frequentemente é de cor rosada à avermelhada na maior parte do ano. Após a substituição da casca, esta torna-se esbranquiçada (BOLAND *et al.*, 1991).

É uma espécie muito utilizada no Brasil, sobretudo em função das suas satisfatórias características silviculturais e tecnológicas como: madeira, incremento volumétrico, forma e capacidade de brotação. Notadamente é destacada como produtora de OE, encontrado principalmente nas folhas, cujo principal componente é o citrônella (ROSSI, 2009).

A madeira do *C. citriodora* é considerada densa ($0,99 \text{ g/cm}^3$) e pesada, com cerne diferenciado, de alta estabilidade mas de baixa permeabilidade o que confere alta resistência mecânica, durabilidade natural e menor tendência ao rachamento e à deterioração. Assim, é muito utilizada em componentes estruturais para construção civil, caixotaria, postes, mourões, dormentes, lenha e carvão (BERNARDI *et al.*, 2011; ROSSO, 2006).

A coleta das folhas para a produção de OE, que constitui num processo de desrama artificial, é iniciado normalmente aos 18 meses após o plantio, quando as plantas já se encontram com a altura variando entre 2 à 4 m. Devido à sua boa capacidade de brotação, o sistema de manejo tradicionalmente utilizado é o da talhadia, que consiste no corte raso da planta e na condução da brotação das cepas. Na coleta das folhas retira-se, aproximadamente, dois terços da parte inferior da copa das árvores e este processo é aplicado, geralmente, em intervalos de 12 meses (VITTI e BRITO, 2003).

2.3 Extratos de eucalipto

2.3.1 Óleos essenciais

Na produção mundial de OE o Brasil encontra-se entre os 4 principais produtores ao lado da China, Índia e Indonésia. Dentre os principais OEs produzidos encontram-se os provenientes de cítricos, eucalipto (tipos 1,8-cineol e citronelal), hortelã pimenta, cravo-da-índia, cedro, lavanda, *spearmint*, sassafrás, cânfora, coentro, *grapefruit* e *patchouli*. O Brasil é o principal fornecedor de OE de laranja e é o segundo maior produtor mundial de OE de *C. citriodora*, sendo que em primeiro lugar está a China e em terceiro está a Índia (BIZZO *et al.*, 2009; FAO, 2012).

Os OEs de folhas de eucalipto são formados por uma complexa mistura de componentes, envolvendo de 50 a 100 ou até mais compostos orgânicos voláteis, dentre os quais destacam-se hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Entre as aproximadamente 900 espécies de eucalipto descritas, pouco mais de 200 foram examinadas com relação à produção e ao teor de OE, e menos de 20 têm sido citadas como usadas na exploração comercial (VITTI e BRITO, 2003).

Os OEs de folhas de eucalipto possuem uma ampla faixa de aplicações. Eles são normalmente classificados em 3 grupos de acordo com sua aplicação. É considerado OE para uso medicinal aqueles que apresentam teores de 1,8-cineol acima de 70% e baixos teores de felandreno, constituinte indesejável pela ação cardíaca, com um teor máximo de 5% estabelecido pelas farmacopeias. Esse tipo de óleo é encontrado nos *E. globulus*, *E. tereticornis*, *E. smithi*, *E. camaldulensis* entre outros. Os OEs de eucalipto utilizados em perfumaria possuem o citronelal como constituinte majoritário, sendo o *C. citriodora* a fonte mais rica e econômica conhecida desse composto. Esses óleos fazem parte da composição de perfumes para diversos fins. Já os óleos com finalidades industriais, os constituintes majoritários são o felandreno, matéria-prima para desinfetantes e desodorantes, o mentol que é um flavorizante de produtos medicinais, e a piperona, uma fonte de fabricação do timol, utilizado como preservativo para colas, pastas e gomas (CASTRO, 2006).

No Brasil, a principal espécie que produz óleo medicinal é a *E. globulus*, enquanto que a espécie para a perfumaria é *C. citriodora*, ao lado de *E. staigeriana*, rica em citral (BIZZO *et al.*, 2009). A espécie *C. citriodora* tem maior importância na economia brasileira por ser uma espécie menos susceptível às variações edafo-climáticas (Revista da Madeira, 2003). No entanto, os fatores ambientais são capazes de afetar a produtividade, a composição e a quantidade dos constituintes dos OEs. Dentre esses, as condições de solo, a umidade relativa, a radiação solar, a temperatura e o estresse hídrico são bem relevantes. Além também, da

parte utilizada da planta, a sua idade, o tipo de manejo florestal, os métodos para amostragem das folhas, os processos para extração e de análise de óleo e variabilidade genética. O monitoramento desses constituintes químicos e o estudo dos fatores envolvidos na sua variação são fundamentais nas recomendações de manejo do ambiente, otimizando a produção e a conservação desses compostos químicos (CASTRO *et al.*, 2008).

As exportações brasileiras do OE, no período de 2005-2008, somaram US\$ 9,6 milhões relativos a 1.237 t, sendo 66% do estado de São Paulo e 33% de Minas Gerais. O principal importador foi a UE (45%), especificamente a Espanha (24%), Reino Unido (13%) e Suíça (10%), seguido dos EUA (33%) (BIZZO *et al.*, 2009). Atualmente, as principais destilarias produtoras do OE de *C. citriodora* no Brasil são a Três Barras e a Meneghetti, localizadas nas cidades de Torrinha/SP e São João do Paraíso/MG, respectivamente (Revista da Madeira, 2012; Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2008).

2.3.1.1 Óleo essencial de *C. citriodora*

O OE de *C. citriodora* tem como principais constituintes os terpenos oxigenados citronelal e, em menor quantidade, o citronelol e isopulegol. As características físico-químicas destes componentes estão apresentadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Principais constituintes do óleo essencial de *C. citriodora* e suas propriedades físico-químicas. Fonte: Adaptado de Boland *et al.*, 1991.

	Citronelal	Citronelol	Isopulegol
Estrutura
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₀ H ₂₀ O	C ₁₀ H ₁₈ O
Massa Molecular	154,25	156,27	154,25
Ponto de Ebulição	206,5°C	221,5°C	220°C
Ponto de fulgor	78°C	79°C	78°C
Densidade	0,856	0,857	0,911
Concentrações típicas	65-80%	4,0-5,0%	2,5%-3,5%
Sinônimos	3,7-dimetil-6-octenal; (R)-(+)-citronelal; Rodinal	3,7-dimetil-6-octen-1-ol; Levo-citronelol; 3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1-metil-4-isopropenil ciclohexan-3-ol; pment-8-em-3-ol

O OE de *C. citriodora* é conhecido pelo agradável odor de limão, característica do seu constituinte principal, e por isso é uma importante *commoditie* amplamente empregada na indústria de fragrâncias. O OE comercializado na forma bruta é utilizado principalmente como

aromatizante em produtos como sabonetes, perfumes e como fixante de outras fragrâncias, cosméticos, sachês, desodorizantes, detergentes, desinfetantes e cêras (ANDRADE e GOMES, 2000; VITTI e BRITO, 2003).

Além do seu emprego como fragrância e aroma, o OE de *C. citriodora* tem sido estudado devido ao seu amplo espectro de atividade biológica. Este pode ser utilizado como herbicida contra ervas daninhas como a *Parthenium hysterophorus* (KOHLI *et al.*, 1998), *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Raphanus sativus*, *Cassia occidentalis*, *Amaranthus viridis* e *Echinochloa crus-galli* (BATISH *et al.*, 2004), *Hippeastrum hybridum* (EL-ROKIEK e EID, 2009) e *Amaranthus viridis* (SETIA *et al.*, 2007), no controle de carrapatos pelo seu efeito repelente e acaricida (CLEMENTE *et al.*, 2010; ELMHALLI *et al.*, 2009; OLIVO *et al.*, 2013), como antimicrobiano contra diversos microorganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* (VAGHASIYA *et al.*, 2008), *Salmonella typhimurium* (BATISH *et al.*, 2008) entre outros microrganismos (CIMANGA *et al.*, 2001; ELAISSI *et al.*, 2011; GILLES *et al.*, 2010; RAMEZANI *et al.*, 2002). Combrinck *et al.* (2011) relataram que o OE de *C. citriodora*, na concentração de 2000 µL/L, foi 100% efetivo contra *Penicillium digitatum* FB001 e Q370 e *Botrytis cinerea*, causadores de deterioração em frutas.

Este OE também tem sido investigado quanto ao seu potencial efeito antioxidante (BATISH *et al.*, 2008; SHAHWAR *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012). Há uma patente que inclui o extrato aquoso das folhas na composição de cápsulas para o tratamento de alergias e infecções provenientes de alergias e que utilizam o OE produzido no Brasil (CCI KK, 2004). Gbenou *et al.*, (2013) verificaram efeitos anti-inflamatório, analgésico e antipirético quando o OE foi administrado oralmente em ratos com indução de edema gastrointestinal. Siddique *et al.* (2013), estudaram a redução do stress oxidativo utilizando *Drosophila* transgênica como modelo e os resultados obtidos sugeriram que o extrato das folhas de *C. citriodora*, enriquecido com polifenóis e triterpenos, pode ser particularmente útil no tratamento de doenças como o Mal de Parkinson. O extrato aquoso das folhas de *C. citriodora* reduziram significativamente o nível de glucose no sangue em ratos tratados durante 21 dias com concentrações variando entre 250 e 500 mg/kg (PATRA *et al.*, 2009 citado por PATEL *et al.*, 2012). O composto mirtalina, isolado das folhas de *C. citriodora* produziram uma rápida hipoglicemia após administração oral em coelhos (REVORERO, 1958 citado por PEREZ *et al.*, 1998).

O OE têm sido aplicado nas mais diversas áreas. Como exemplo, a pesquisa de Willians *et al.* (2013), que obtiveram bons resultados com os OEs de eucaliptos, inclusive de *C. citriodora*, na substituição do potássio amilo xantato. Este último composto é amplamente empregado na etapa de flotação de minerais preciosos, como o ouro, mas oferece riscos à

saúde e ao meio ambiente por ser altamente inflamável e pela possibilidade de se decompor em CS₂, um gás extremamente tóxico.

O OE purificado em seu componente principal, o citronelal, devido à sua grande versatilidade, é amplamente empregado pela indústria química em reações de síntese orgânica, para inserir e/ou induzir quiralidade em moléculas complexas (LENARDÃO *et al.*, 2008). Além disso, outros compostos podem ser obtidos a partir do citronelal, tais como o citronelol, que possui odor de rosas e por isso é utilizado em perfumaria, e o mentol, o qual é empregado como flavorizante em balas, chiclés, cigarros e cremes dentais (LEFFINGWELL, 2009).

Apesar de o Brasil ocupar a segunda posição na produção mundial, os produtores brasileiros deste tipo de OE sofrem na competitividade com outros países da Europa que, em contrapartida, conseguem comercializar um óleo de maior qualidade. Além disso, grande parte do óleo produzido no Brasil é importado por aqueles países que fazem sua purificação. Em seguida, o óleo purificado é re-exportado para diversos países, inclusive para o Brasil (FAO, 2012).

A partir disto, fica clara a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que aumentem a qualidade e o rendimento do OE para estimular o setor e aumentar a competitividade no mercado mundial. Apesar da grande importância econômica, poucos estudos tem sido feitos com o *C. citriodora* com o intuito de melhorar o rendimento de extração e a concentração do componente principal, o citronelal (BRAGA, 2002).

2.3.2 Oleoresinas

As ORs podem ser extraídas, utilizando-se solventes orgânicos, a partir de material vegetal fresco ou seco. Elas são praticamente sólidas à temperatura ambiente após a remoção do solvente e contém todos os componentes lipofílicos que constituem o material vegetal. Outros componentes tais como OEs, ácidos graxos, metil ésteres de ácidos graxos, pigmentos (carotenóides), cumarinas, psolarenos, esteróis e flavonas também podem ser extraídos e estarem presentes na OR (REVERCHON, 1997).

Este tipo de extrato tem despertado o interesse de diversas áreas por vários motivos. Para a indústria de cosméticos a OR é interessante porque possui o aroma de forma mais concentrada (KANAKDANDE *et al.*, 2007). Muitos estudos também tem demonstrado a alta bioatividade de tais extratos devido à presença de diversos componentes com propriedades antioxidantes e antimicrobianas (SINGH *et al.*, 2008) o que é atrativo para as indústrias de alimentos, que tem cada vez mais buscado a substituição dos aditivos sintéticos pelos naturais.

Além disso, tem-se observado que os extratos brutos, como é a OR, possuem uma alta atividade antioxidante em relação aos compostos purificados, provavelmente devido ao efeito sinérgico entre componentes (MOURE, 2001).

Hakki *et al.* (2010), identificaram o componente cipelocarpina C, um glicosídeo esterificado com ácido oleuropêico, na OR obtida de folhas de *Eucalyptus cypellocarpa*. Este componente apresentou atividade contra o vírus *Epstein-Barr*, causador de tumor no trato respiratório de humanos. Guo e Yang (2006) em suas pesquisas também confirmaram a presença deste composto em frutos de *E. globulus*. Muito recentemente, o estudo de SHEN *et al.* (2012), com a OR comercial obtida das folhas de *C. citriodora*, demonstrou que esta teve efeito antiproliferativo contra células humanas HepG2 de hepatoma, causadoras de tumor no fígado, provavelmente devido à alta concentração de compostos fenólicos e flavonóides. Bhagat *et al.* (2012), também verificaram que os extratos aquoso e de etil acetato das folhas de *C. citriodora* suprimiram o crescimento das células de tumor ascítico de Erlisch em 18,48% e 29,79%, respectivamente. O efeito também foi associado à presença de flavonoides, taninos e saponinas nos extratos. Estas pesquisas são de grande importância no campo da medicina e áreas farmacêuticas, pois tais extratos apresentaram potencial para a cura e/ou maior eficácia no tratamento de doenças como o câncer.

As ORs de plantas eucalipto e diversas outras tem sido amplamente investigadas e aplicadas em alimentos, cosméticos e fármacos devido às suas potenciais propriedades de atividade biológica. No entanto, poucas pesquisas tem sido realizadas com OR de *C. citriodora* e, ao melhor de nosso conhecimento, ainda não há estudos com a OR obtida com CO₂ supercrítico.

2.3.3 Ceras

Cutículas de plantas representam a interface entre a planta e o meio externo. Estas são formadas por cutinas de polímeros insolúveis e, em algumas espécies, por cutana. Além disso, as cutículas contêm polissacarídeos tais como celulose e vários lipídeos solúveis os quais também se depositam na superfície cuticular (epicuticular). Estes lipídeos são frequentemente chamados de *ceras*. A composição química das ceras apresenta grande variabilidade entre as espécies de plantas sendo complexas misturas de componentes alifáticos e cíclicos. As duas principais funções da cutícula são controlar a perda de água pela transpiração e reduzir a lixiviação de substâncias orgânicas e inorgânicas do interior da planta (KOCH *et al.*, 2006).

A composição química das ceras de eucalipto varia entre as espécies. Alguns autores citam a presença incomum de compostos não parafínicos nas ceras como a eucaliptina (4, 7-

dimetoxi-6, 8-dimetil-5-hidroxi-flavona), 8-desmetileucaliptina, ácido ursólico, sideroxilina (4, 5-dihidroxi-6, 8-dimetil, 7-metoxi-flavona) e 8-desmetilsideroxilina (COURTNEY *et al.*, 1983). Isto chama a atenção pois alguns destes compostos foram relatados por sua atividade biológica, como a eucaliptina que apresentou atividade antimicrobiana (TAKAHASHI, 2004).

Osawa e Namiki (1981), partindo do pressuposto de que estas podem promover a proteção química dos OE endógenos da degradação oxidativa bem como a proteção física, realizaram testes *in vitro* e comprovaram o potencial antioxidante das ceras presentes nas folhas de diferentes espécies de eucalipto (*E. dives*, *E. cosmophylla*, *E. parvifolia*, *E. perriniana*, *E. rubida*, *E. viminalis*). Em 1985, os autores identificaram os compostos, derivados de β -dicetona, 4-hidróxi-tritriacontano-16, 18-diona e n-tritriacontano 16, 18-diona, os quais demonstraram possuir excelente capacidade antioxidante, inclusive em sistemas alimentícios como a maionese.

Apesar do potencial que este tipo de extrato demonstrou ter, poucos estudos tem sido realizados com relação à identificação da sua composição química e atividade biológica (LAMBERTON, 1964; STEINBAUER *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 2010; WIRTHENSON *et al.*, 2000).

2.3.4 Kinos

Semelhante às gomas e resinas, o kino é uma classe de exsudado da casca que se distingue por seu alto conteúdo de taninos e característica de adstringência ocorrendo em diversas famílias de plantas em todas as partes do mundo. Este pode se formar em bolsões, veias ou reservatórios fechados por toda casca após lesão causada por insetos, invasão de fungos, fogo ou injúria mecânica. Estudos tem demonstrado que a formação do kino não é, ordinariamente, um processo metabólico e que este somente acumula quando a casca, da planta viva, é danificada. Embora o propósito particular do kino ainda não tenha sido completamente investigado, verifica-se que a planta demanda de uma grande quantidade de energia na produção dos taninos indicando que o kino pode ter um papel crucial no seu mecanismo de defesa (MARTIUS *et al.*, 2012).

Na Austrália, as principais fontes de obtenção de kino é partir de espécies de eucalipto. Durante muitas centenas de anos este exsudado foi amplamente utilizado pelas comunidades indígenas para tratar diarreia, disenteria, resfriado, tosses, feridas e úlceras. O extrato aquoso ou o kino esmagado puro, preparado por eles, era aplicado diretamente em queimaduras, para aliviar dores musculares, infecção nos olhos e dor de dente bem como no tratamento de micoses e feridas venéreas (LOCHER e CURRIE, 2010; VON MARTIUS *et al.*, 2012).

Algumas pesquisas sobre a química destes exudados foram realizadas, entre 1950 e 1960 por Hillis e Carle, com 2 tipos de kinos utilizando técnicas cromatográficas. No entanto, os resultados não foram divulgados (LOCHER e CURRIE, 2010). Ainda há poucas pesquisas que foram realizadas recentemente (FREITAS *et al.*, 2007).

Os artigos de Martius *et al.*, (2010) e Locher e Currie (2012), apresentam a história, origem, botânica, aplicações e identificação preliminar dos compostos presentes no kino. Estes autores vem ressaltar a importância de conduzir mais pesquisas não só para contribuir com o conhecimento da química dos taninos mas também investigar sobre a atividade farmacológica do kino.

2.4 Atividade antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres, cujo excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios da membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, que protegem o sistema biológico contra os efeitos nocivos de processos ou reações que possam causar oxidação excessiva. O *stress* oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, e está envolvido no processo de envelhecimento (TONON, 2009).

Os polifenóis possuem estrutura química ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E em base molar. Além disso, estes compostos podem agir independentemente ou em combinação como agentes anticâncer ou cardioprotetivos através de diversos mecanismos (RICE-EVANS *et al.*, 1997). Os flavonoides, que compõem a maior classe de compostos fenólicos, tem função como agentes antioxidantes através da captura de espécies reativas de oxigênio (ROS), de nitrogênio (RNS) e, em alguns casos, como quelantes de íons metálicos. Os flavonoides também são excelentes na captura de radicais peroxila devido ao seu favorável poder de redução dos radicais alquil peroxil e, assim, efetivos inibidores da peroxidação lipídica (RICE-EVANS, 2001).

A atividade antioxidante dos flavonoides é interessante desde o ponto de vista tecnológico até o nutricional, uma vez que estes compostos intervêm como antioxidantes naturais dos alimentos e desta forma, a preparação de alimentos com um alto conteúdo de flavonoides supõe uma redução na utilização de antioxidantes sintéticos, resultando em

alimentos mais saudáveis, que podem ser incluídos dentro da classe dos alimentos funcionais (TONON, 2009).

A capacidade antioxidante dos extratos de plantas depende não somente da composição do extrato mas também do mecanismo de ação do método que avalia o poder antioxidante. Assim, a capacidade antioxidante é influenciada por diversos fatores os quais não podem ser descritos através de um único método (GUPTA *et al.*, 2010). Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH) ou quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Dentre estes, os métodos ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais usados atualmente (RUFINO *et al.*, 2007).

O método do DPPH é relativamente simples e amplamente empregado para avaliar a capacidade antioxidante de diversos compostos. Este método espectrofotométrico utiliza o radical livre e estável 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH) como reagente. O modelo da captura do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante em um tempo relativamente curto, de cerca de 30 minutos ou até que a absorbância estabilize. As amostras tem a capacidade de reduzir o radical livre DPPH para 1-1-difenil-2-picrilhidrazil que possui cor amarela. A capacidade de doação de hidrogênio ou elétron das amostras é medida através da diminuição da absorbância, à 515 nm, que resulta da mudança de cor de púrpura para amarela (BASER e BUCHBAUER, 2009). O método do radical livre DPPH tem a desvantagem de não apresentar afinidade aos radicais envolvidos na peroxidação lipídica. Assim, muitos antioxidantes que reagem rapidamente com radicais peroxil podem reagir lentamente ou podem mesmo ser inertes ao DPPH (HUANG *et al.*, 2005).

A atividade inibitória da peroxidação lipídica dos OEs é, geralmente, avaliada pelo teste de branqueamento do β -caroteno. Neste método, a capacidade de minimizar a oxidação do β -caroteno acoplada ao ácido linoleico é medida com um espectrofotômetro. A reação com radicais mostra uma mudança na cor laranja. De modo geral, o teste de branqueamento do β -caroteno para OEs mostra melhores resultados do que teste com DPPH devido a sua maior afinidade aos compostos lipofílicos (BASER e BUCHBAUER, 2009).

2.5 Métodos para obtenção de óleos essenciais e oleoresinas de eucalipto

A recuperação de OE e OR a partir de plantas tem sido realizada através de uma grande variedade de novos e antigos processos de extração, tais como o AV, hidrodifusão,

enfleuragem, maceração mecânica, extração com solventes e, mais eficientemente, com fluidos supercríticos. Os OEs e ORs extraídos por qualquer um destes métodos pode requerer a purificação ou posterior processamento, seja por uma combinação desejável dos processos acima citados ou por redestilação, fracionamento por cromatografia, cristalização, tratamento químico, etc, que irão depender da natureza da matéria-prima e da qualidade e especificações desejadas no produto final (MUKHOPADHYAY, 2000).

A seguir, será dada uma descrição detalhada dos métodos de extração a serem abordados neste trabalho de pesquisa, sendo estes o AV (principal método utilizado no Brasil para extração de OE de *Corymbia citriodora*), a HD e a extração com fluidos supercríticos (método a ser empregado nesta pesquisa). As ORs são comumente obtidas através da extração com solventes orgânicos e uma breve descrição será dada, embora este método não seja utilizado nesta pesquisa.

2.5.1 Arraste à vapor e hidrodestilação

A HD e o AV são os métodos mais comuns para obtenção de OEs a partir de diversas partes das plantas. Na HD, o material botânico é submerso em água em um equipamento tipo Clevenger ou Schilcher (Figura 2.3) e submetido ao aquecimento. O vapor, o qual contém compostos voláteis, passa através do condensador e chega em um compartimento onde o OE e a água são separados por diferença de densidade. Já no AV, o vapor de água passa através do material botânico carregando os compostos voláteis (CAZES, 2005).

No Brasil, a produção do OE de *C. citriodora* também é feita por este último método. Assim, uma descrição mais detalhada do processo é dada a seguir. Para o preparo da matéria-prima, as folhas após cortadas são deixadas no local por algumas horas para que ocorra seu murchamento, reduzindo assim a umidade, ou então transportadas para a destilaria onde também podem ser deixadas no pátio, protegidas do sol, com a mesma finalidade. O período de murchamento é feito em horários não muito quentes do dia. Algumas empresas cortam as folhas e deixam para fazer seu transporte e destilação no final do dia ou então no dia seguinte, logo pela manhã. Os montes de folhas também não devem ser muito grandes pois potencializam o processo de fermentação (VITTI e BRITO, 2003).

Figura 2.3. O equipamento Schilcher (a) comparado ao Clevenger (b) para obtenção de OE por HD. O equipamento Schilcher possui um segundo condensador para prevenir que o OE já obtido seja perdido para a atmosfera enquanto que o equipamento Clevenger tem apenas uma torneira de aeração. Assim, o equipamento Schilcher permite períodos mais longos de destilação. Fonte: Bailer et al., 2001.

A Figura 2.4 apresenta um esquema do processo de AV. Inicialmente, o vapor é gerado em uma caldeira e injetado na parte inferior da dorna, onde ocorrerá a extração do OE. A dorna é o recipiente onde as folhas serão acondicionadas para receber o vapor de água. A parte inferior da dorna apresenta formato cônico, sobre o qual existe um grelha, que tem a função de separar a massa de folhas da entrada de vapor, bem como proporcionar a drenagem da água condensada durante a destilação. Para evitar a perda de OE, na parte superior da dorna é utilizado um fecho hidráulico, que consiste numa canaleta cheia de água, na qual a tampa é colocada (VITTI e BRITO, 2003).

O enchimento da dorna é feito de forma manual (mais comum) ou mecanizada. Durante o enchimento da dorna, as folhas são compactadas através de pisoteio, para melhor aproveitamento do espaço interno do equipamento. Depois do carregamento das folhas, faz-se a colocação da tampa, que fará a conexão com o condensador. Normalmente utiliza-se uma tampa para duas dornas, de tal modo que o trabalho de destilação ocorra de forma alternada, ou seja, enquanto uma está destilando a outra está sendo descarregada e, na sequência, novamente carregada com folhas (Figura 2.5). O vapor, atingindo a base da dorna, percorre a massa de folhas aquecendo e arrastando o OE na direção do condensador. Para um sistema tradicional com uma dorna com capacidade de 1 tonelada de folhas, o tempo médio de destilação é de 60 minutos. Os rendimentos da extração do OE de *C. citriodora* são entre 1 e 1,6% e a concentração de citronelal é entre 65 e 85% que variam conforme a época de colheita, condições ambientais como clima e solo, variabilidade genética, idade da folha, manejo da cultura e método de extração (VITTI e BRITO, 2003).

Figura 2.4. Esquema de um conjunto destilador para OEs. Fonte: Vitti e Brito (2003).

Figura 2.5. Extração por AV: normalmente utiliza-se uma tampa para duas dornas de tal modo que o trabalho de destilação ocorra de forma alternada, ou seja, enquanto uma está destilando a outra está sendo descarregada e, na sequência, novamente carregada com folhas. Na foto, está sendo feita a extração de OE de citronela.

O condensador é uma estrutura cilíndrica, que possui admissão de água fria na parte inferior e saída de água quente na parte superior. Em seu interior existem diversos tubos imersos em água, dentro dos quais a mistura de vapor de água e OE é admitida e, em contato com as paredes resfriadas dos tubos, essa mistura é condensada. A mistura segue para o separador e deste para o coletor, onde é feita sua pesagem. Ao término do processo, as folhas

são retiradas e utilizadas como alimento para a caldeira (1/3 deste resíduo) ou como adubo orgânico (VITTI e BRITO, 2003).

A recuperação do OE ocorre através da destilação de dois líquidos imiscíveis, nomeados água e OE, baseado no princípio básico de que, à temperatura de ebulição, as pressões de vapor combinadas tornam-se iguais à pressão ambiente. Assim, o OE que normalmente possui um ponto de ebulição entre 200 e 300°C, entra em ebulição a uma temperatura próxima a da água. Em seguida, os vapores de OE e água são condensados e separados. Os OEs que não são suficientemente voláteis no vapor, por exemplo, 2-fenil etanol, presente no óleo de rosas, permanece no material botânico enquanto que os componentes altamente voláteis são perdidos durante o processo de destilação (MUKHOPADHYAY, 2000).

Apesar do baixo custo de operação, esta técnica possui diversas desvantagens como baixo rendimento, usa temperaturas elevadas que podem induzir a degradação dos compostos termossensíveis, hidrólise e solubilização na água de alguns compostos de aroma. Além disso, possui poucos parâmetros ajustáveis para controlar a seletividade do processo (GHASEMI *et al.*, 2007). Portanto, os OEs recuperados por destilação à vapor são frequentemente diferentes do OE presente originalmente na planta (MUKHOPADHYAY, 2000).

2.5.2 Extração com solventes orgânicos

Este processo é comumente empregado para obtenção da OR a partir das flores, folhas, sementes raízes e outras partes de plantas. O extrato obtido é purificado utilizando-se solventes orgânicos tais como hexano, éter de petróleo, benzeno, tolueno, etanol, isopropanol, acetato de etil, acetona, diclorometano, etc. A transferência por difusão, da fragrância do sólido para o solvente, no processo de extração líquido-sólido é feita de duas maneiras: estacionária ou sistema rotatório. De forma a melhorar a extração em grande escala, algumas indústrias de perfumaria tem desenvolvido sistemas de extração contracorrente contínuos, requerendo mecanização e automação (MUKHOPADHYAY, 2000).

A temperatura e o tempo de extração são específicos à natureza do material botânico e o equipamento de extração. Basicamente, após dissolver o extrato, o solvente saturado é transferido para um concentrador onde o volume da solução é drasticamente reduzido e o solvente liberado é reciclado. A solução concentrada é destilada à vácuo e o resíduo, ou OR, é uma substância cerosa com cor escura. Para transformar a OR em extrato purificado, a primeira é dissolvido em etanol à 30 ou 40°C e assim refrigerada entre 5 e 10°C, onde as ceras são precipitadas. O filtrado é concentrado à vácuo para eliminar o etanol. O resíduo é geralmente líquido, formando o extrato purificado. As etapas do processo, bem como os

solventes utilizados, podem variar conforme a qualidade e a quantidade do produto final desejado. A extração com solventes é um método que pode causar a degradação de compostos termolábeis, hidrólise, alcoólise, etc (MUKHOPADHYAY, 2000).

Devido à possibilidade de resíduos do solvente orgânico no extrato, este método é pouco empregado para extração de compostos que serão utilizados em indústrias de cosméticos ou alimentos (CAZES, 2010).

2.5.3 Extração com fluidos supercríticos

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que apresenta propriedades P-V-T (pressão-volume-temperatura) acima dos seus valores críticos. Enquanto abaixo do ponto crítico, uma substância pode existir como sólido, líquido ou vapor, acima deste as fases gasosa e líquida se tornam indistinguíveis, e a nova fase formada é referenciada com “fase supercrítica” (Figura 2.6) (BRUNNER, 2005; McCABE *et al.*, 2005).

Figura 2.6. Diagrama de fase P-V-T para um componente puro e sua projeção no plano PT.
Fonte: Brunner, 2005.

A partir disto, o fluido passa a exibir propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um gás e de um líquido, aumentando sua função como solvente. Sua densidade relativamente alta, semelhante a dos líquidos, lhe confere um grande poder de solvatação, enquanto que sua viscosidade e tensão de superfície relativamente baixas e sua alta difusividade, característicos dos gases, promovem um apreciável poder de penetração na matriz do soluto (BRUNNER, 2005; McCABE *et al.*, 2005; SANDLER, 1989; TZIA e LIADAKIS, 2003). Quando o fluido encontra-se em um estado próximo ao da região crítica, este apresenta características semelhantes às do fluido supercrítico. Sendo assim, ele pode ser

denominado um fluido subcrítico. A Tabela 2.4 mostra as características de densidade, difusividade e viscosidade dos fluidos em diferentes estados.

Tabela 2.4. Valores característicos nos estados líquido, gás e supercrítico. Fonte: Brunner, 2005.

Estado do fluido	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g.s.cm ⁻¹)
<i>Gás</i>			
P=1 atm, T=15-30°C	(0,6-2,0) x10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0)x10 ⁻⁴
<i>Líquido</i>			
P=1 atm, T=15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0)x10 ⁻⁵	(0,2-3,0)x10 ⁻²
<i>Fluido supercrítico</i>			
P≈P _c , T≈T _c	0,2-0,5	0,7x10 ⁻³	(1-3)x10 ⁻⁴
P≈4P _c , T≈T _c	0,4-0,9	0,2x10 ⁻³	(3-9)x10 ⁻⁴

A forte dependência da solubilidade na pressão (P) e temperatura (T) é o fenômeno mais crucial e explorado na extração com fluidos supercríticos. Mudanças suaves nos seus valores promovem grandes variações nas propriedades físico-químicas do solvente (densidade, condutividade térmica, polaridade, etc) e por isso estas variáveis são diretamente relacionadas com a composição química dos extratos. Demais variáveis tais como a geometria do leito, o número de vasos extratores e a vazão de escoamento do solvente também interferem no desempenho do processo. Geralmente, a escolha da P e da T baseia-se na solubilidade desejada ao soluto (ou mistura de solutos) no solvente supercrítico (CARVALHO *et al.*, 2005; MUKHOPADHYAY, 2000). Essas características promovem condições ideais para extração de solutos com um alto grau de recuperação em um curto período de tempo. A extração com fluidos supercríticos pode seletivamente extrair componentes de uma complexa mistura. O composto a ser extraído pode ser um ingrediente ativo de interesse como também um componente indesejável que precisa ser removido do produto final (MUKHOPADHYAY, 2000).

Diversos fluidos tem sido explorados como solventes para SFE. Alguns deles estão apresentados na Tabela 2.5, bem como seus respectivos dados de temperatura, pressão e volume críticos. Contudo, o dióxido de carbono é o solvente mais utilizado na SFE devido às suas inúmeras vantagens frente aos outros fluidos. Seu ponto crítico, 31,06°C e 73,8 bar, o faz ideal para a extração de compostos termossensíveis. O CO₂ é um solvente inerte, barato, facilmente disponível, não causa danos ao meio ambiente, considerado GRAS (*Generally Reconized As Safe*) e não deixa resíduos no extrato uma vez que ele é um gás em condições

ambientais (MUKHOPADHYAY, 2000). Além disso, a energia requerida para alcançar o estado supercrítico com o CO₂ é menor do que a necessária para alcançar este estado comparado à outros solventes. Em geral, a extração dos componentes com CO₂ supercrítico depende da ocorrência de grupos funcionais individuais nesses componentes, seus pesos moleculares e polaridades (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Tabela 2.5. Propriedades críticas dos fluidos de interesse em processos supercríticos. Fonte: Mukhopadhyay, 2000.

Fluido	Temperatura crítica (T _c /K)	Pressão crítica (P _c /bar)	Volume crítico (V _c /cm ³ .mol ⁻¹)
CO ₂	304,12	73,7	94,07
Etanol	305,3	48,7	145,5
Propanol	369,8	42,5	200
Água	647,1	220,6	55,95
Amonia	405,4	113,5	72,47
n-hexano	507,5	30,2	368
Metanol	512,6	80,9	118

A SFE utilizando o CO₂ é atualmente uma tecnologia de extração rápida e livre de contaminação por solvente amplamente aplicada nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A SFE é empregada em escala comercial desde 1970 para descafeinação de café e chá, refinamento de óleos, recuperação de *flavors* e pungentes de especiarias e de lúpulo (MUKHOPADHYAY, 2000). Os extratos de plantas obtidos por SFE tem sido intensivamente investigados como potenciais fontes de compostos bioativos devido aos seus favoráveis efeitos em diversas doenças humanas com consequente aplicação na produção de novos produtos funcionais, nutraceuticos e fármacos. Em geral, a SFE fornece extratos com qualidade superior (ou seja, melhor atividade biológica e/ou maior concentração dos compostos de aroma) em comparação com os extratos produzidos por AV ou que utilizam solventes orgânicos (FORNARI *et al.*, 2012).

No Brasil, a tecnologia de fluido supercrítico ainda é explorada apenas na área acadêmica. No entanto, em diversos outros países esta é largamente utilizada em escala comercial. São alguns exemplos de empresas que obtêm extratos para aplicações na área de alimentos: descafeinação de café – General Foods (Estados Unidos), SKW Trostberg (Alemanha), Kaffee HAG (Alemanha), Hermsen (Hermsen); processamento de lúpulo – HVG Barth (Alemanha), John Haas (Estados Unidos), Yakima Chief (Estados Unidos), Carlton United Breweries (Reino Unido), Steiner Hops (Alemanha, Reino Unido, Estados Unidos), English Hops;

aromas/especiarias – Cultor (França), Quest (Holanda), Flavex (Alemanha), Fuji Flavor (Japão), Mori Oil Mills (Japão), Takeda (Japão) (TZIA e LIADAKIS, 2003).

2.5.3.1 Mecanismo de extração

Para a extração dinâmica de um leito fixo de partículas sólidas, o solvente passa continuamente através do extrator a uma taxa fixa de escoamento. A P e T do extrator são mantidas constantes e estes parâmetros devem ser ajustados de modo que o solvente tenha o maior poder de solvatação possível no soluto de interesse. Além da P e T, a natureza da planta, uso de cosolvente e outras variáveis do processo tais como taxa de escoamento do fluido, modo de escoamento, tamanho da partícula, porosidade, diâmetro e comprimento do extrator também definem a eficiência de extração (MUKHOPADHYAY, 2000).

Um dos fatores cruciais na extração do soluto está relacionado à distribuição deste na matriz. Um esquema das etapas do processo de extração pode ser visualizado na Figura 2.7. A descrição das etapas é dada a seguir:

Figura 2.7. Esquema dos mecanismos de transporte na SFE de matrizes sólidas. Fonte: Mukhopadhyay, 2000.

1. Difusão do CO_2 nos poros e adsorção deste na superfície do sólido;
 2. Transporte do óleo para a camada externa e formação de uma fina camada de líquido ao redor das partículas sólidas;
 3. Dissolução do OE no scCO_2 ;
 4. Transporte convectivo do soluto para o fluido;
- Subsequentemente, no modo instável de extração, o processo de SFE implica:
5. Desorção do soluto do sólido ou da superfície do sólido seguida por
 6. Dissolução do soluto no scCO_2 ;
 7. Dissolução do soluto nos poros;

8. Estado instável de transporte convectivo do soluto para a fase fluida.

Contudo, em um processo industrial, além do poder de solvatação do solvente, o tempo de processo é geralmente uma das questões chave para a escolha de um processo específico. Em vista disto, o conhecimento das melhores condições envolve o estudo do rendimento global e/ou solubilidade e parâmetros cinéticos (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

2.5.3.2 Rendimento Global (Y_0) e cinética de extração

O Rendimento Global (Y_0) representa a máxima quantidade de extrato que pode ser recuperada de uma matéria prima a uma dada T e P de extração, expressa como a relação entre a massa de material solúvel pela massa de substrato sólido. No cálculo do rendimento global (Equação 2.1) a quantidade de material extraído é calculada como a relação entre a massa total de extrato ($M_{extrato}$) e a massa inicial da amostra em base seca ($M_{amostra}$) (ALBUQUERQUE, 2008).

$$X_0 = \left(\frac{M_{extrato}}{M_{amostra}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

As isotermas de rendimento global promovem informações para analisar os efeitos da T e P no comportamento do processo de extração. Esta análise pode ser feita em termos de rendimento global de extração como um todo ou para o rendimento global de um componente específico. O rendimento global está intimamente relacionado com a solubilidade do soluto (ou mistura de solutos) no fluido supercrítico (ou na mistura de solventes) (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

O rendimento global é um parâmetro importante na modelagem matemática da Curva de Extração Global (OEC, *Overall Extraction Curve*) que representa o acúmulo de extrato versus o tempo ou o consumo de solvente. Na maioria dos modelos, o rendimento global é um parâmetro de ajuste ou é estimado por extrapolação das curvas globais de extração (QUISPE-CONDORI, 2005). A Figura 2.8 representa dois tipos de OEC na SFE:

Figura 2.8. Curvas globais de extração do tipo I e tipo II. Adaptado de Cavalcanti, 2013.

Na OEC tipo I observa-se, inicialmente, uma taxa de extração constante com o decorrer da extração, seguida por um decréscimo apenas no final do processo. Curvas deste tipo representam cinéticas de extração a partir de matrizes vegetais com alto teor de material extraível e/ou de fácil acesso ao solvente. Na OEC tipo II, observa-se que desde o início da extração ocorre a diminuição progressiva da taxa de extração. Este tipo de curva representa a extração de substratos com baixo teor de material extraível e/ou de difícil acesso ao solvente (CAVALCANTI, 2013).

A quantidade de extrato acumulada durante o curso da extração será tipicamente da forma da curva apresentada na Figura 2.9, e esta pode ser, basicamente, dividida em três regiões distintas (BRUNNER, 2005; NASCIMENTO E SANTOS, 2012).

Figura 2.9. Comportamento típico de processo de extração com fluido supercrítico. Adaptado de Albuquerque, 2008

- 1) A curva inicia-se com o período de taxa de extração constante (CER, *Constant Extraction Rate*), na qual a superfície externa das partículas é coberta com o

solute, de fácil acesso, e a convecção é o mecanismo de transferência de massa dominante;

- 2) No segundo período ocorre a taxa de extração decrescente (FER, *Falling Extraction Rate*), na qual as falhas do soluto na camada externa da superfície da matriz aparecem e então inicia-se o mecanismo de difusão, fenômeno que atua combinado com a convecção;
- 3) Finalmente, ocorre o período de difusão controlada (DC, *Difusion controlled*), onde a camada de soluto na superfície externa praticamente desapareceu e a transferência de massa ocorre principalmente por difusão do interior das partículas;

Embora a inclinação da primeira parte do gráfico possa ser dada pela solubilidade de equilíbrio uma linha reta pode ser causada também por uma resistencia constante à transferencia de massa e não prova que as condições de equilíbrio são atingidas durante a extração. Assim, a primeira parte da curva de extração contém informações no tipo de equilíbrio entre as fases fluida e sólida enquanto que segunda parte a taxa de extração decresce e o rendimento diminui, o qual é dado pela quantidade de substâncias extraíveis no substrato (BRUNNER, 2005). Quando a concentração inicial do soluto na planta é baixa, o qual é típica para OEs, o equilíbrio é geralmente controlado pela interação soluto-matriz e a concentração na fase fluida é muito menor do que a solubilidade (SOVOVÁ, 2005).

As melhores condições operacionais serão aquelas nas quais grandes quantidade de solutos são extraídas em um tempo relativamente curto, que é no período CER (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

O rendimento global apresenta dois comportamentos: a pressões baixas é observado um fenômeno denominado de retrogradação, que consiste na diminuição da solubilidade com o aumento da T a uma dada P. À elevadas P, o efeito do aumento da pressão de vapor do extrato é mais importante do que o efeito da densidade do solvente. Assim, duas propriedades fisico-químicas afetam o rendimento global do extrato na SFE: a densidade do fluido supercrítico e a pressão de vapor e/ou sublimação do extrato (Figura 2.10). Entretanto, devido à complexidade química dos extratos, comportamentos diferentes podem ser esperados (QUISPE-CONDORI, 2005).

Figura 2.10. Comportamento de solubilidade de um soluto sólido em um solvente supercrítico. Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000.

A região marcada entre P_L e P_U (chamadas pressão inferior e pressão superior, respectivamente) é onde se vê que as isoterma convergem demonstrando o fenômeno de retrogradação (MUKHOPADHYAY, 2000).

A cinética de extração na SFE pode ser representada pela OEC. Esta é determinada levando-se em consideração a massa do soluto extraída e é uma função do tempo de processo ou solvente consumido, de acordo com a seguinte Equação (2.2) (PEREIRA e MEIRELES, 2010):

$$m_{total} = Q \int_0^t Y(H, t) dt \quad (2.2)$$

onde m_{total} é a massa do extrato, Q é a taxa de escoamento do fluido supercrítico e $Y(H, t)$ é a taxa de massa de soluto pela massa de solvente a um dado tempo (t) no extrator ou saída do leito.

O *scale-up* de unidades de SFE requer o conhecimento dos parâmetros de processo relevantes tais como a cinética de transferência de massa e o equilíbrio e também as condições ótimas de operação. Estes parâmetros podem ser obtidos através da descrição matemática acurada do processo de extração e dos dados experimentais obtidos em escala laboratorial. O estudo da OEC ajuda a definir os parâmetros cinéticos do processo que fornecem informações importantes relativas ao dimensionamento industrial de uma unidade de extração com fluidos supercríticos (ALBUQUERQUE, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Mapear a composição do OE produzido pelas principais destilarias no Brasil (Meneghetti e Três Barras). Estudar a influência dos parâmetros operacionais de P e T no rendimento global e qualidade dos extratos obtidos das folhas de *C. citriodora* utilizando-se CO₂ como solvente em condições sub e supercríticas.

3.2 Objetivos específicos

- Mapeamento da composição do OE de *C. citriodora* produzido nas duas principais regiões produtoras Brasil (SP e MG) através de GC/MS;
- Caracterização físico-química da matéria-prima (folhas e OE de *C. citriodora*) fornecida pelas destilarias Três Barras e Meneghetti;
- Extração com CO₂ em condições sub e supercríticas do OE e OR das folhas de *C. citriodora*, utilizando-se a metodologia de análise de superfície de respostas;
- Estudo da cinética de extração do OE na SFE;
- Caracterização dos extratos quanto à sua composição química e atividade biológica dos OEs obtidos por HD, AV e SFE e da OR obtida por SFE.

4. Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada para este estudo consistiu de folhas de *C. citriodora* e seu OE. As amostras foram gentilmente cedidas pelas indústrias Três Barras (Torrinha, SP) e Meneghetti (São João do Paraíso, MG). As folhas foram coletadas pelos produtores no mês de abril de 2011 e no mesmo dia processadas para obtenção do OE. Em seguida, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP).

4.1.1 Folhas de *C. citriodora*

As amostras de folhas de *C. citriodora* chegaram no LTAPPN acondicionadas em sacos plásticos de rafia e consistiam de 25 kg de folhas de cada produtor. As folhas fornecidas pela Destilaria Meneghetti possuíam um tom de verde oliva e, ao toque manual, notava-se que a maior parte destas estava coberta por uma fina camada de fuligem preta. As folhas fornecidas pela Destilaria Três Barras tinham uma cor verde mais intensa e não apresentavam a mesma camada de fuligem (Figura 4.1).

Figura 4.1. Amostras de folhas de *C. citriodora* utilizadas nos experimentos: (a) amostra fornecida pela Destilaria Meneghetti e (b) a amostra fornecida pela Destilaria Três Barras.

Para facilitar o armazenamento, as folhas passaram por um processo de seleção onde os galhos maiores foram retirados manualmente e descartados. Em seguida, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD). As amostras foram identificadas como FTB (Folhas Três Barras) e FMG (Folhas Meneghetti). Em função da

grande quantidade de amostras (50 kg ao total), estas foram armazenadas em diferentes freezers: a amostra FTB foi armazenada em freezer vertical (Frost Free, Brastemp, BR) enquanto que a amostra FMG foi armazenada em freezer horizontal (HF40S, Metalfrio, BR), ambos à temperatura de -18°C.

Para a realização dos experimentos, as folhas foram preparadas picotando-as manualmente com uma tesoura em um tamanho de aproximadamente 3 cm (Figura 4.2). As folhas não foram trituradas de forma a evitar a perda de voláteis. Alguns autores relatam que o rendimento em OE é menor quando as folhas são trituradas do que quando são utilizadas íntegras para a extração (BOCEVSKA e SOVOVÁ, 2007; MUKHOPADHYAY, 2000; ROZZI *et al.*, 2002), isto se deve à perda de voláteis durante a trituração. Não foi realizado nenhum outro tipo de tratamento de forma a manter as características originais das folhas utilizadas pelos produtores para o processamento do OE.

Figura 4.2. Preparo das folhas para as análises ou extrações.

4.1.2 OE de *C. citriodora*

O OE foi obtido por AV pelas destilarias e encaminhado ao LTAPPN. A amostra de OE fornecida pela Destilaria Três Barras chegou ao LTAPPN acondicionada em dois frascos PET (Politereftalato de Etileno), consistindo de 280 mL de OE cada. Já a amostra fornecida pela Destilaria Meneghetti estava acondicionada em um frasco PEAD contendo 1000 mL de OE. Respectivamente, as amostras foram identificadas como OEFTB (Óleo Essencial Três Barras) e OEFMG (Óleo Essencial Meneghetti) e armazenadas em geladeira à 4°C para análises posteriores.

4.2. Caracterização das folhas

4.2.1 Umidade

A análise de umidade das folhas foi realizada baseada na metodologia de Pimentel *et al.* (2008). Para isto, 10 g de folhas picotadas foram adicionadas de 25 ml de diclorometano grau cromatográfico (J.T. Baker, USA) em um balão de fundo redondo. Este foi acoplado em um equipamento tipo Schilcher, com circulação de água à 3°C, para evitar a perda do solvente para o ambiente, e a destilação ocorreu durante 3 horas. As análises foram feitas em triplicata para ambas amostras FTB e FMG. A umidade (%) foi calculada de acordo com a Equação (4.1):

$$Umidade (\%) = \frac{V (ml)}{m (g)} \times 100 \quad (4.1)$$

onde V é o volume de água (mL) e m é a quantidade de amostra (g).

4.2.2 Massa específica das folhas, densidade aparente e porosidade do leito na SFE

A densidade aparente das folhas foi determinada empiricamente através da razão entre a massa de folhas acondicionadas e o volume do extrator de leito fixo (300 cm³) (Equação 4.2). As folhas foram empacotadas no extrator e, em seguida, estas foram removidas e pesadas. Este procedimento foi repetido 10 vezes e o valor médio das pesagens foi a quantidade de matéria-prima utilizada em todas as extrações.

$$\rho_{ap} = \frac{m}{V} \quad (4.2)$$

onde m é a massa de folhas (g) e V o volume interno do extrator (cm³).

A massa específica das folhas foi medida em equipamento picnômetro de gás hélio (Quantachrome Ultrapyc 1200e, FL, USA) pela Central Analítica- IQ/UNICAMP.

A porosidade do leito foi determinada pela relação entre a densidade aparente e a massa específica das folhas conforme a Equação (4.3).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_r} \quad (4.3)$$

onde, ε é a porosidade do leito, ρ_{ap} é a densidade aparente e ρ_r é a densidade real.

4.3 Caracterização do OE

Segundo Vitti e Brito (2003), a qualidade do OE é considerada um fator básico a ser vinculado à sua obtenção, fazendo com que a realização de análises constantes sejam de grande importância para a avaliação de suas características e, deste modo, serem prevenidos problemas na sua comercialização e uso. As principais análises recomendadas para OEs de eucalipto são: densidade relativa, índice de refração, solubilidade em álcool etílico e teor do componente principal.

A caracterização físico-química descrita dos itens 4.3.1 ao 4.3.5 foi realizada apenas para o OE fornecido pelos produtores em função da quantidade de amostra necessária. Portanto, os OEs obtidos por HD e SFE, nos quais os rendimentos obtidos foram menores que 1 mL, não foram submetidos à estas análises.

4.3.1 Densidade relativa

A densidade relativa foi determinada por picnometria conforme a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (2010). A água foi transferida para um picnômetro de 5 mL, limpo e seco e previamente pesado, e sua temperatura ajustada para 20°C. O excesso de água foi removido com auxílio de papel e acetona, e o picnômetro foi pesado em seguida. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata. A densidade relativa foi determinada através da razão entre a massa da amostra e a massa da água (obtidas pela diferença entre o picnômetro cheio e vazio) (Equação 4.4).

$$\rho_r = \frac{m_{amostra}}{m_{água}} \quad (4.4)$$

onde, $m_{amostra}$ é a massa da amostra e $m_{água}$ é a massa de água e ρ_r é a densidade relativa.

4.3.2 Índice de refração

O índice de refração foi determinado, conforme sugerido pela Farmacopeia Brasileira (2010), em um refratômetro tipo Abbé (ATTO Instruments Co., LAMBDA 2WAJ, Hong Kong, CH). Água destilada foi utilizada para calibrar o equipamento. As leituras foram realizadas à 20°C, sendo que a temperatura foi mantida constante com auxílio de um banho termostaticado (Van Den, Rio de Janeiro, BRA).

4.3.3 Solubilidade em etanol

A solubilidade do OE em etanol foi determinada através da metodologia descrita na *European Pharmacopoeia* (2005). Assim, 1 mL de OE foi adicionado em um tubo de ensaio e a solução de etanol (J.T. Baker, Xalostoc, MEX) à 80% foi adicionada aos poucos, com incrementos de 0,1 mL, agitando-se frequente e vigorosamente. Anotou-se o volume de etanol à 80% necessário para se obter uma solução limpa e clara. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Obtenção do extrato das folhas de *C. citriodora*

4.4.1 Hidrodestilação

A HD das folhas para obtenção do OE foi baseada na metodologia de Rozzi *et al.* (2002). Em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionou-se 40 g de folhas picotadas e 500 mL de água destilada. Um balão foi acoplado em um equipamento tipo Schilcher e a extração ocorreu durante 1 h. O experimento foi realizado em triplicata. O OE foi recuperado em frascos de vidro e armazenado em geladeira à 4°C para posterior análise.

4.4.2 Extração com CO₂ sub e supercrítico

A extração com CO₂ consistiu-se em proporcionar o contato das folhas secas e picotadas de eucalipto no extrator de leito fixo para as diferentes condições de P e T estudadas. Um esquema do equipamento utilizado nas extrações está demonstrado na Figura 4.3.

Figura 4.3. Esquema do equipamento de Extração Supercrítica (SFE).

A temperatura foi controlada pelo banho termostatzado no qual o extrator encontrava-se imerso. A pressão do sistema foi controlada pelo acionamento da bomba de líquido (Eldex, modelo AA-100-S, Napa, USA) que transporta o fluido para o sistema e pelo acionamento manual da válvula micrométrica (Autoclave Engineers, 10VRMM2812, Erie, USA) na saída do sistema. O equipamento é basicamente constituído de cilindro que armazena o CO₂ líquido que segue pela tubulação encamisada na qual circula etileno glicol (-5°C) a fim de se garantir que o CO₂ chegue líquido até a bomba de líquido (bomba de HPLC) evitando a cavitação. O equipamento contém um reservatório de CO₂ (tanque pulmão) que armazena o CO₂ pressurizado e tem a função de manter a T de equilíbrio e equalizar a P no extrator de leito fixo. O fluido segue do tanque pulmão para o extrator por meio de tubulações com válvulas de controle, até que se alcance a pressão de operação desejada. No extrator, o CO₂ entra em contato com a matéria-prima nas condições de P e T estabelecidas. O fluxo de CO₂, após o contato de equilíbrio estático, flui com o soluto para o frasco coletor, onde é recolhido o extrato. O frasco coletor é mantido em um banho de gelo para evitar a degradação de compostos sensíveis e o CO₂ em estado gasoso, que sai do frasco coletor tem sua vazão medida em um medidor de vazão de gás (Lao-G1, 4493, Osasco, BR). As condições ambientes de coleta (25°C e 0,94 bar) possibilitam a gaseificação do CO₂ que libera o soluto para o frasco coletor livre de qualquer resíduo de solvente.

4.4.2.1 Planejamento experimental

Na investigação do comportamento de extratos de matrizes vegetais obtidos a partir do emprego de novas metodologias, um planejamento experimental que demande relativamente poucos ensaios para uma faixa ampla de condições operacionais e suas respectivas respostas deve ser empregado. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma ferramenta ideal para otimização do processo e suas características de rotação permitem identificar respostas ótimas em torno do seu ponto central sem alterar a variância da predição (KASSAMA *et al.*, 2008).

Um dos objetivos deste estudo consistiu em alcançar as condições de P e T que proporcionariam os maiores rendimentos globais e concentração de citrônella nos extratos. Para as variáveis P e T, o planejamento experimental utilizado foi um DCCR de 2², com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais. Constatado nos testes preliminares a possibilidade de se extrair dois produtos diferentes a partir de uma mesma matéria-prima e, como as faixas de P e T para a extração de OE e OR demonstraram-se bem distintas, optou-se por empregar dois planejamentos experimentais abrangendo faixas de P e T que foram específicas para obtenção

de OE e OR. Estes foram denominados DCCR-SUB (o qual contém ensaios em condições sub e supercríticas do CO₂) para extrair o OE, e DCCR-SUP, para extrair a OR (Tabelas 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1. Níveis dos dois fatores, pressão (P) e temperatura (T), do DCCR-SUB.

		DCCR-SUB				
		-1,41	-1	0	1	1,41
P (bar)	X ₁	51,8	60	80	100	108,2
T (°C)	X ₂	35,9	40	50	60	64,1

Tabela 4.2. Níveis dos dois fatores, pressão (P) e temperatura (T), do DCCR-SUP.

		DCCR-SUB				
		-1,41	-1	0	1	1,41
P (bar)	X ₁	119,5	140	180	220	236,4
T (°C)	X ₂	45,9	50	60	70	74,1

Segundo Vitti e Brito (2003), após a extração do OE pelo método convencional, as folhas são utilizadas ou para alimentar a caldeira ou como adubo. Objetivando-se um melhor aproveitamento da matéria-prima bem como das possibilidades que a tecnologia de SFE pode proporcionar, optou-se por fazer extrações sequenciais e seletivas de OE e OR utilizando-se o mesmo material empacotado no extrator. Um esquema das etapas de extração está demonstrado na Figura 4.4.

Figura 4.4. Esquema das extrações sequenciais e fracionada do OE e OR. As folhas de *C. citriodora* foram adicionadas ao extrator. Na primeira etapa (DCCR-SUB) extraiu-se o OE. Em seguida, foram aplicadas no Resíduo 1 as condições da segunda etapa de extração (DCCR-SUP) para a extração da OR. O Resíduo 2 foi então descartado.

Assim, as extrações foram feitas da seguinte forma: um ensaio do DCCR-SUB foi escolhido, de forma aleatória, e aplicado para a extração do OE. A primeira etapa a extração consistiu de 30 min de TE e 4 horas de TD. Houve a troca de frascos a cada 30 minutos

totalizando 8 frascos. Para garantir que o CO₂ saísse do frasco, estes foram deixados abertos na bancada durante 30 minutos. Em seguida, os frascos foram fechados e armazenados à -18°C.

Ao término da primeira extração, um ensaio do DCCR-SUP foi escolhido, também de forma aleatória, e as condições de P e T reajustadas para se extrair a OR. Na segunda etapa do processo não houve TE e o TD foi de 4 horas. O TE utilizado em cada etapa foi determinado em testes preliminares.

A matriz do DCCR-SUB e DCCR-SUP com as variáveis codificadas e reais (P e T) está demonstrada na Tabela 4.3. A densidade do CO₂ em cada condição foi calculada a partir da equação de Huang *et al.* (1985) utilizando-se o programa “PCO₂ V. 01-97.for”, desenvolvido por Silva (1999).

Tabela 4.3. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis no estudo do efeito da Temperatura (T) e Pressão (P) no rendimento e composição do OE (DCCR-SUP) e da OR (DCCR-SUB).

Variáveis codificadas		DCCR-SUB				DCCR-SUP			
		Ensaio	Variáveis		ρCO_2 (kg.m ⁻³)	Ensaio	Variáveis		ρCO_2 (kg.m ⁻³)
P	T		P (bar)	T (°C)			P (bar)	T (°C)	
-1	-1	1	60	40	149,4	12	140	50	675,0
1	-1	2	100	40	632,3	13	240	50	807,9
-1	1	3	60	60	124,9	14	140	70	460,9
1	1	4	100	60	291,5	15	240	70	696,5
-1,41	0	5	51,8	50	104,9	16	119,5	60	439,3
1,41	0	6	108,2	50	390,9	17	260,5	60	765,9
0	-1,41	7	80	35,9	443,3	18	190	45,9	791,1
0	1,41	8	80	64,1	183,6	19	190	74,1	585,0
0	0	9*	80	50	219,7	20*	190	60	689,3
0	0	10*	80	50	219,7	21*	190	60	689,3
0	0	11*	80	50	219,7	22*	190	60	689,3

*pontos centrais

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar o efeito das variáveis P e T nas respostas, as quais compreenderam no rendimento do OE e da OR e na concentração de citronelal nos OEs. Na análise de superfície de respostas (ASR) o comportamento das respostas frente às variáveis estudadas pode ser descrito como um modelo linear ou quadrático como demonstra a equação generalizada (Equação 4.5).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + e \quad (4.5)$$

onde Y é a resposta preditiva, β_0 é o coeficiente de intercessão, β_1 e β_2 são os termos lineares e x_1 e x_2 são os níveis codificados das variáveis independentes.

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa Statistica v. 7 (STATSOFT, 2004), com nível de confiança de 95%. Assim, somente os parâmetros estatisticamente significativos foram utilizados nos modelos para analisar o comportamento do sistema e para gerar a superfície de resposta.

4.4.2.2 Determinação do rendimento global (Y_0)

A massa de folhas utilizada nos experimentos foi de 53,12 g para ambas amostras, FTB e FMG. As folhas picotadas foram acondicionadas no extrator com auxílio de um bastão de vidro de modo a garantir uniformidade ao longo de todo o leito. Os rendimentos globais de OE (Y_1) e OR (Y_2) foram calculados considerando a relação entre a massa das folhas secas através da Equação (4.6):

$$Y_0 = \left(\frac{M_{\text{extrato}}}{M_{\text{amostra}}} \right) \times 100 \quad (4.6)$$

onde M_{extrato} é a massa de extrato e M_{amostra} é a massa de folhas. Para o OE, somou-se a massa obtida nos 8 frascos de coleta. Os resultados obtidos nos 11 ensaios para ambas amostras foram apresentados em gráficos relacionando-se a massa de extrato acumulada (g) versus o consumo de CO_2 (g) ou o tempo (min) de extração dinâmica.

4.5 Caracterização dos extratos

4.5.1 Atividade antioxidante

4.5.1.1 Método DPPH

A determinação da capacidade sequestrante do radical livre estável DPPH (2,2 difenil, 1-picril-hidrazil) (Sigma Aldrich, Steinheim, GE) foi baseada na metodologia de Brandi-Willians *et al.* (1995). Preparou-se uma solução metanólica (Carlo Erba, Val de Reuil, FRA) de DPPH à 60 μMol com absorvância entre 0,6 e 0,7 à 515 nm. As amostras foram diluídas no metanol em concentrações variando entre 50 e 500.000 ppm. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição do extrato, ou metanol para o controle, foram adicionados em tubos contendo 3,9 mL da solução de DPPH. As análises foram realizadas em triplicata. A leitura das absorvâncias foi feita após 1 h de reação, em espectrofotômetro (Biospectro SP 22, BR). O mesmo procedimento foi realizado para o antioxidante sintético BHT (Labcenter, SP, BRA). Os resultados foram expressos em EC_{50} (mg/mL) que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em

50% a concentração inicial de DPPH (ANTOLOVICH *et al.*, 2001). Assim, quanto menor o valor de EC₅₀ maior a capacidade de sequestrar o radical livre DPPH.

4.5.1.2 Método do branqueamento do β -caroteno

A determinação da atividade antioxidante total no sistema β -caroteno/ácido linoleico foi adaptada da metodologia de Mattos *et al.*, (2009). Para o preparo da emulsão de β -caroteno/ácido linoleico (A), adicionou-se em um balão de fundo redondo protegido da luz com papel alumínio, 20 mg de ácido linoleico (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, BR), 200 mg de Tween 20 (Sigma Aldrich, São Paulo, BRA) e 1 mL de solução clorofórmica (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) de β -caroteno (Sigma aldrich, São Paulo, BRA) (3mg/5mL). A mistura foi rotaevaporada durante 10 minutos à 50°C. Após, 100 mL de água destilada foram adicionados, aos poucos e com vigorosa agitação, para formação da emulsão. Uma segunda emulsão (B) foi preparada da mesma forma com exceção da adição da solução do β -caroteno. A absorbância da emulsão foi lida em espectrofotômetro à 470 nm e manteve-se entre 0,7 e 0,8 nm. A solução (B) foi utilizada como branco.

Os ensaios foram feitos adicionando-se alíquotas de 5 mL da emulsão (A) em tubos contendo 0,5 mL de extratos ou BHT (Neon, São Paulo, BR) diluídos em etanol (J.T. Baker, Xalostoc, BRA) em concentrações variando entre 0,005 e 5 mg/mL (50 e 5.000 ppm). Para cada diluição da amostra, foi preparado um branco contendo 0,5 mL do extrato diluído e 5 mL da emulsão (B). Para o controle, preparou-se um tubo contendo 0,5 mL de etanol adicionados de 5 mL da emulsão (A). A homogeneização foi feita manualmente e a absorbância lida imediatamente em espectrofotômetro (Biospectro 22, Curitiba, BR) à 470 nm. Após a primeira leitura, os tubos foram incubados em banho-maria à 50°C para que a reação de oxidação ocorresse. A absorbância foi monitorada em intervalos de 30 minutos até completar 120 minutos. As análises foram feitas em triplicata.

Os resultados foram expressos em percentagem de atividade antioxidante (%AA) que foi determinada através da Equação (4.7).

$$\%AA = \left[1 - \frac{(Absc_{inicial} - Absc_{final})}{(Absam_{inicial} - Absam_{final})} \right] \times 100 \quad (4.7)$$

onde Absc_{inicial} é a absorbância inicial do controle, Abs_{final} é a absorbância final do controle, Absam_{inicial} é a absorbância inicial da amostra e Absam_{final} é a absorbância final da amostra.

4.5.2 Polifenóis Totais

4.5.2.1 Capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia de Singleton e Rossi (1965). Aliquotas de 2 mL contendo de 10 à 60 µg de ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro, BRA), para a construção da curva padrão, ou 5 mg/mL do extrato diluídos em metanol (Carlo Erba, Val de Reuil, FRA) foram adicionados de 10 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Haloquímica, Tatuapé, BRA) diluído em água destilada na proporção de 1/10 (v/v). A mistura foi agitada e deixada em repouso por 8 minutos à temperatura ambiente antes da adição de 8 mL da solução saturada de Na₂CO₃ (Exôdo Científica, Hortolândia, BRA), que foi diluído em água destilada na concentração de 7,5% (m:v). A mistura foi agitada, mantida em repouso em ambiente escuro, e a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-visível (Biospectro SP 22, Curitiba, BRA) à 765 nm após 2 horas de reação. O metanol foi utilizado como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em Equivalentes de Ácido Gálico (GAE= *Galic Ácid Equivalent*,) por 100 g de folhas secas.

4.5.2.2 Estabilização da cor Azul da Prússia na determinação de fenólicos

A análise de fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Graham *et al.*, (1992). Aliquotas de 3 mL contendo 2 à 15 µg de pirocatequina (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA), para a construção da curva padrão, ou 0,3 mg/mL do extrato diluídos em etanol (J.T. Baker, Xalostoc, MEX) foram adicionadas, em triplicata, em tubos. 1 mL de K₃Fe(CN)₆ (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) à 0,016 M foram adicionados seguidos, imediatamente, por 1 mL de FeCl₃ (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) à 0,02 M diluído em HCl (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) 0,1 N. O conteúdo foi misturado e deixado reagir, em temperatura ambiente, por 15 minutos. Assim, 3 mL de H₃PO₄ (Êxodo, BR) à 6,03 M foram adicionados e misturados. Após 2 minutos, 2 mL de goma arábica (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) diluída em água destilada à 1% foram adicionados. O conteúdo foi misturado e a absorbância lida à 700 nm utilizando como branco a solução contendo todos os reagentes exceto os polifenóis. Os resultados foram expressos em Equivalentes de Catequina (CE, *Catequin Equivalent*) por 100 g de folhas.

4.5.3 Flavonóides Totais

A análise de flavonoides totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Hatami *et al.*, (2013). Uma alíquota de 1 mL contendo de 5 à 125 µg/mL de quercetina (Sigma-

Aldrich, São Paulo, BR) para a construção da curva padrão, ou 5 mg/mL extrato em etanol (J.T. Baker, Xalostoc, MEX) foi adicionado à um frasco volumétrico contendo 4 mL de água destilada. No tempo zero, 0,3 mL de uma solução de NaNO_2 (5%) (Ecibra, Santo Amaro, BRA) foi adicionada ao frasco. Após 5 minutos, 0,3 mL de AlCl_3 (10%) (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) foi adicionado. Após 1 minuto, 2 mL de uma solução de NaOH (1 M) (Êxodo Científica, Hortolândia, BRA) foi adicionado. Água destilada (2,4 mL) foi imediatamente adicionada ao frasco seguida por vigorosa agitação. A absorbância da mistura foi determinada à 510 nm em um espectrofotômetro UV-visível (Biospectro SP 22, Curitiba, BR). Os resultados foram expressos em Equivalentes de Quercetina (QE, *Quercetin Equivalent*) por 100 g de folhas secas.

4.5.4 Análise da composição volátil por GC/MS

A composição volátil dos OEs obtidos por HD, AV e por SFE foi analisada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) utilizando um equipamento QP 2010 Plus (Shimadzu, Tokyo, JP) com injetor automático (AOC-5000, Bellefonte, USA). Utilizou-se coluna capilar RtxR-5MS (30m × 0,25mm id × 0,25µm df, 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) (Restek, Bellefonte, USA) e gás Hélio como gás de arraste, a uma pressão interna de 60psi. Injetou-se 1 µL do extrato diluído em diclorometano (Merk, Darmstadt, GER) na concentração de 1% (10.000 ppm) para uma razão de *split* de 1:10. A temperatura do injetor foi de 220°C e a da interface entre a coluna e a fonte de íons foi de 250°C. A temperatura do forno foi regulada de forma a se obter uma rampa linear de 60 a 246°C em um gradiente de 3°C por minuto (Adams, 1995). A energia de ionização foi de 70 eV na fonte, e a faixa de varredura de massas foi de 50 a 500 m/z. O tratamento dos espectros foi feito através do software GCMS Solutions V. 2.5 que possui como base de dados, bibliotecas NIST 08 e NIST 08s. Injetou-se nas mesmas condições das amostras, uma mistura de hidrocarbonetos (C_8H_{18} – $\text{C}_{40}\text{H}_{82}$) (Fluka, Saint Louis, USA). Como ferramenta de auxílio na identificação dos componentes presentes nos extratos, calculou-se o índice de Van der Dool e Kratz (AI) (Equação.4.8) (ADAMS, 2009),

$$AI(x) = 100P_z + 100 \left[\frac{RT(x) - RT(P_z)}{RT(P_{z+1}) - RT(P_z)} \right] \quad (4.8)$$

onde, $RT(x)$ é o tempo de retenção do analito, $RT(P_z)$ é o tempo de retenção do alcano imediatamente anterior ao do analito, $RT(P_{z+1})$ é o tempo de retenção do alcano imediatamente posterior ao do analito e P_z é o numero de carbonos do analito anterior ao do analito.

4.5.5 Análise dos compostos da OR por HPCL-DAD e UPLC-ESI-MS/MS

A análise preliminar dos compostos presentes na OR foi realizada através de diferentes métodos. Para isto, aplicaram-se os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e por cromatografia líquida de ultra-alta pressão e espectrometria de massas (UPLC-ESI-MS/MS).

A OR foi analisada em equipamento HPLC Proeminence, (Shimadzu, Tokyo, JP) consistindo de uma bomba LC-20AD, um autoinjeter SIL-10AF (Shimadzu, Tokyo, JP) com uma interface SPD-M20A (Shimadzu, Tokyo, JP). Como fase estacionária foi usada a coluna LiChrospher 100 RP-18 (100x4.6mm x 5µm) (Agilent Technologies, USA). A fase móvel consistiu de metanol grau cromatográfico (Panreac, Barcelona, ES) e água ultra pura destilada com um sistema Milipore Direct Q (Milipore, Billerica, USA) acidificado com ácido fórmico (Merk, Darmstadt, GE) (0,01%). O fluxo (1,0 mL.min⁻¹) e a T (40°C) foram constantes e as concentrações dos solventes variaram durante a análise cromatográfica de acordo com o gradiente aplicado para cada análise específica como apresentado na Tabela 4.4. A detecção do UV foi feita à 254, 280 e 360 nm com uma faixa DAD entre 200 e 600nm. Os extratos foram injetados na concentração de 10 mg/mL diluídos em acetonitrila (Merk, Darmstadt, GE) e o volume injetado foi de 10 µL.

Para a análise em UPLC, como fase estacionária utilizou-se a Coluna UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm x 50 mm x 1.7 mm). O espectrômetro de massas (MS) teve voltagem do capilar da fonte de ionização do ESI ajustada para 3,2 kV e voltagem do cone 40 V e a fonte Offset em 60 V. A temperatura da fonte foi de 150°C, a temperatura de dessolvatação do gás N₂ foi de 350°C. As análises foram realizadas em modo positivo e negativo utilizando uma fonte de ionização Z-Spray. A faixa de massas utilizada foi de *m/z* 150-1000. Nas análises de íons produtos (MS/MS) foi utilizado Ar na célula de colisão (ScanWave) como gás de colisão. As energias de colisão variaram de 10-40 eV. Os extratos foram injetados na concentração de 20 µg/mL preparados a partir da solução contendo 75% de acetonitrila e 25% de metanol.

Tabela 4.4. Gradiente de solvente utilizado nas análises por HPLC, UPLC/MS e HPLC-ESI-MS/MS.

Tempo (min)	Taxa de Fluxo (mL/min)	% H ₂ O	% Acetonitrila + (0.1% Ácido Fórmico)
0	0,5	85	15
2	0,5	50	50
5	0,5	30	70
7	0,5	30	70
7,01	0,5	10	90
10	0,5	10	90
10,01	0,5	85	15
13	0,5	85	15

4.5.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de médias de Tukey para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando-se o software SAS v. 9.0 (SAS, 2004). A análise de variância, efeitos estimados, coeficientes de regressão, diagrama de pareto e superfície de resposta foram gerados utilizando-se o programa Statistica v. 7.0 (STATSOFT, 2004).

5. Resultados e Discussão

5. Resultados e discussão

5.1 Caracterização da amostra

A Tabela 5.1 mostra os resultados obtidos nas análises de umidade e massa específica das folhas secas de *C. citriodora*, bem como a densidade aparente e porosidade do leito na SFE, para amostras FTB e FMG.

Tabela 5.1. Resultados obtidos nas análises de umidade, densidade aparente e densidade real das amostras FTB e FMG.

Amostra	Umidade (%)	Massa específica das folhas (g.cm^{-3})	Densidade aparente do leito (gcm^{-3})	Porosidade do leito
FTB	8,66±0,5	1,38±0,001	0,177±0,008	0,871
FMG	7,33±1,1	1,38±0,001	0,175±0,005	0,873

Os valores de umidade encontrados para as folhas FTB e FMG foram inferiores a 10%, indicando a não necessidade de um processo adicional de secagem previamente às extrações.

O teor de umidade nas folhas é um fator que pode influenciar de diferentes formas no rendimento da extração com CO_2 supercrítico e que depende das características da matriz, dos componentes presentes e do soluto de interesse na extração. Em alguns casos a água pode facilitar a solubilidade dos solutos, agindo com um mecanismo semelhante ao de cosolvente e aumentando o rendimento da extração. Em outras situações, a água pode interferir na atuação do solvente na solubilização de compostos específicos (BRUNNER, 1994; IVANOVIC *et al.*, 2011; REVERCHON, 1997).

Com relação à massa específica das folhas, densidade aparente e porosidade do leito, os valores obtidos para as amostras foram semelhantes entre si, embora as folhas tenham sido picotadas manualmente e sejam de procedências diferentes.

5.2 Caracterização do OE obtido por AV

A Tabela 5.2 apresenta as especificações recomendadas pela ISO-3044-1974 (ISO 2013, VITTI e BRITO, 2003) para OE de *C. citriodora* bem como os resultados obtidos na caracterização das amostras OEFTB e OEFMG.

Tabela 5.2. Especificações para o OE de *C. citriodora* e caracterização.

Análises	ISO 3044-1974	OEFTB	OEFMG
Densidade relativa (20°C) (g/cm ³)	0,858-0,877	0,85907±0,0022	0,85092±0,0021
Índice de refração (20°C)	1,4500-1,4590	1,450±0,001	1,451±0,001
Solubilidade em etanol 80% v:v (20°C)	1:2, v:v	1:1,9, v:v	1:2, v:v
Total de aldeído (citronelal)	mínimo de 70%	79,86%	76,65%

Os resultados demonstraram que, para todas as análises, os valores encontram-se dentro dos limites especificados indicando a conformidade com a ISO 3044-1974. A qualidade do OE é considerada um fator básico a ser vinculado à sua obtenção, fazendo com que a realização de análises constantes sejam de grande importância para a avaliação de suas características e, deste modo, serem prevenidos problemas na sua comercialização (VITTI e BRITO, 2003).

5.3 Extração do OE e da OR

5.3.1 Hidrodestilação

Os resultados obtidos na extração por HD utilizando um equipamento Schilcher estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Rendimento do OE obtido por HD das amostras FTB e FMG.

	Amostra	
	FTB	FMG
Rendimento (%)	1,60±0,15	1,16±0,25

O rendimento em OE obtido para a amostra FTB (1,6±0,15%) foi ligeiramente superior do que para a amostra FMG (1,16±0,25%). Os valores obtidos para a espécie *C. citriodora* normalmente variam entre 1 e 2% (CASTRO *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2012). O rendimento pode variar em função de diversos fatores inerentes ao cultivo, tais como clima, solo, manejo florestal, época de colheita, idade da planta entre outros (VITTI e BRITO, 1999).

5.3.2 Extração com CO₂ em condições sub e supercríticas

5.3.2.1 Testes preliminares

Os testes preliminares tiveram por objetivo a familiarização com o processo de extração e com a matéria-prima a ser estudada. Baseando-se em dados da literatura, os valores de P e T foram escolhidos de forma que proporcionassem densidades distintas entre si

para verificar o tipo de extrato que seria obtido bem como o seu rendimento. A amostra FTB foi utilizada nos testes.

A exposição das folhas ao fluido supercrítico durante o tempo de equilíbrio estático (TE) leva à dissolução parcial dos solutos presentes na matriz (por alterar a estrutura da folha e causar mudanças nas propriedades do tecido, facilitando a saída do soluto) e permite que a mistura soluto-solvente entre em equilíbrio termodinâmico na T e P aplicadas no processo (DZINGELEVICIUS *et al.*, 2011; LIZA *et al.*, 2010). Assim, além das variáveis P e T, o TE também foi avaliado em relação ao rendimento de extrato nos testes preliminares. O tempo de extração dinâmica (TD) foi fixado em 4 horas para todos os experimentos, tempo considerado operacionalmente viável.

Na condição de 65 bar e 45°C o maior rendimento foi obtido com 30 minutos de TE (0,94%) (Tabela 5.4). O OE obtido nesta condição era de aspecto transparente e claro à temperatura ambiente (Figura 5.1e). No estudo do rendimento em função do TE, o efeito na recuperação do OE não foi linear, assim um TE de até 30 minutos foi positivo sobre o rendimento, no entanto, este decaiu com o aumento do TE. Isto provavelmente ocorre porque o teor de OE presente na folha é baixo, logo, não há necessidade de um TE elevado para saturar a fase subcrítica; assim, a maior parte do soluto passa da matriz para a fase subcrítica em um curto período. Outro fato a ser considerado relaciona-se na dificuldade de manipulação do procedimento de coleta, pois nesta etapa ocorre a despressurização e boa parte do OE extraído, por ser muito volátil, é arrastado para o ambiente juntamente com o CO₂.

Tabela 5.4. Condições utilizadas nos testes preliminares para obtenção dos extratos da amostra FTB.

P (bar)	T(°C)	Densidade (kg.m ⁻³)	Ensaio	Tempo estático (horas)	Y (%)
65	45	141,68	1	0	0,63
			2	0,5	0,94
			3	1	0,57
			4	2	0,46
175	65	626,47	5	0	4,79
			6	0,5	5,056
			7	1	5,054
			8	4	5,25

Na condição supercrítica (175 bar e 65°C), o TE de 30 minutos foi suficiente para obter um rendimento expressivo, indicando mais uma vez que não há necessidade de um período

maior para a solubilização do soluto, que especificadamente agora se caracteriza com a OR com aparência mais viscosa, com forte pigmentação amarela e semi-sólida à temperatura ambiente (Tabela 5.4).

Apesar da diferença no TE, as ORs obtidas foram visualmente semelhantes entre si em relação à cor e aparência (Figura 5.1 a, b e c). De modo geral, o rendimento aumentou com o TE e variou entre 4,79 e 5,25%, sendo igual para os ensaios com 0,5 h e 1 h de TE (Figura 5.1 a, b e c). Diferente do que ocorreu para o OE (Figura 5.1 e), neste caso o rendimento aumentou com o TE, mas não em proporções que compensem o emprego de 4h frente aos 30 minutos. Na extração da OR, por ser composto de material menos volátil e de alto peso molecular, a precipitação do material no frasco coletor ocorre mais facilmente durante a despressurização e por isso aponta maior coerência na relação direta do aumento do rendimento em função de maiores períodos de TE.

Figura 5.1. Extratos obtidos nos testes preliminares nas condições de 175 bar, 66°C e com diferentes TE: a) 0 horas, b) 0,5 horas, c) 1 hora e d) 4 horas e em e) o OE obtido à 65 bar e 45°C.

Quanto à pigmentação da OR, vale ainda ressaltar que pode ser um indicativo da presença de compostos fenólicos neste extrato. A partir desta constatação preliminar, optou-se por incluir no decorrer da pesquisa o estudo da influência das condições operacionais no

rendimento e na composição da OR e do OE, o que ressalta a importância de testes preliminares em qualquer proposta de desenvolvimento científico.

Para os testes definitivos, optou-se por fixar o TE para a extração do OE em 30 minutos e 0 para a extração subsequente da OR. Outro procedimento experimental adotado após os testes preliminares consistiu-se na necessidade de trocar os frascos de coleta durante o período de extração do OE, para evitar a volatilização do mesmo. Assim, os frascos foram trocados de 30 em 30 min. quando da extração do OE (totalizando 8 frascos em 4 h de extração) e, para a extração da OR, apenas 1 frasco foi utilizado.

Conforme descrito no *item 4.4.3* a extração do OE e da OR das amostras FTB e FMG foi realizada de acordo com um DCCR 2² completo, com 4 pontos fatoriais, 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios para obtenção de cada tipo de extrato (OE ou OR). O planejamento teve como objetivo avaliar a influência das variáveis P e T nas respostas de rendimento global de OE (Y_1), rendimento global de OR (Y_2) e concentração de citrônella no OE (CC). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.5. A discussão destes será feita separadamente, nos *itens 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3* para o OE, OR e concentração de citrônella, respectivamente.

Na análise estatística, foram calculados os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas estudadas, bem como o erro, o coeficiente t , a significância estatística (p) e os limites superiores e inferiores à 95% de confiança.

Os valores dos efeitos estimados indicam quanto cada fator influencia na resposta estudada. Quanto maior é o seu valor, maior é a sua influência, e um efeito positivo indica que ao passar de um valor mínimo a um valor máximo da variável, a resposta aumenta. Um efeito negativo indica o contrário, ou seja, ao passar de um valor mínimo para o valor máximo, a resposta diminui. O valor de t indica o quão grande é a variável em relação ao seu desvio. Assim, quanto maior o valor de t , maior a probabilidade de a variável ser estatisticamente significativa. O valor do coeficiente p está relacionado ao nível de significância da variável independente sobre a resposta em estudo. Normalmente, é escolhido como intervalo de confiança o valor de 95%. Sendo assim, pode-se afirmar que para valores de p inferiores a 5%, a variável é considerada estatisticamente significativa. Caso contrário, é considerada não significativa (TONON, 2009).

A análise de variância (ANOVA) é utilizada para avaliar a significância dos coeficientes de regressão; quanto menor o valor de p maior a influência da respectiva variável na resposta (WANG *et al.*, 2012).

Tabela 5.5. Resultados obtidos nos ensaios dos planejamentos experimentais DCCR-SUB e DCCR-SUP para as amostras FTB e FMG para o OE, OR e concentração de citrônella no OE.

DCCR-SUB								DCCR-SUP						
Ensaio	P (bar)	T (°C)	Densidade CO ₂ (kg/m ³)	Rendimento global de OE (%)		Citrônella (%)		Ensaio anterior	Ensaio	P (bar)	T (°C)	Densidade CO ₂ (kg/m ³)	Rendimento global de OR (%)	
				FTB	FMG	FTB	FMG						FTB	FMG
1	60	40	149,4	0,54	0,56	82,1	79,2	9*	12	140	50	675,0	2,54	2,47
2	100	40	623,6	2,66	1,93	90,4	57,8	6	13	220	50	808,0	1,47	2,09
3	60	60	124,9	0,39	0,61	68,6	58,6	1	14	140	70	460,9	2,56	1,79
4	100	60	291,5	1,59	1,53	89,0	71,8	11*	15	220	70	696,5	4,30	3,52
5	51,8	50	104,9	0,46	0,57	62,0	61,1	5	16	119,5	60	439,4	1,99	1,37
6	108,2	50	390,9	3,78	2,48	92,4	47,5	3	17	236,4	60	765,9	3,34	3,16
7	80	35,9	443,3	3,09	3,46	88,1	49,9	7	18	180	45,9	791,1	1,51	1,80
8	80	64,1	183,6	0,57	0,63	73,9	53,2	8	19	180	74,1	585,1	3,78	2,98
9*	80	50	219,7	1,02	0,89	85,1	67,9	4	20*	180	60	689,3	2,99	1,35
10*	80	50	219,7	1,17	1,41	89,3	66,1	2	21*	180	60	689,3	1,33	2,38
11*	80	50	219,7	0,92	0,92	83,7	69,4	10*	22*	180	60	689,3	3,04	2,45

*Pontos centrais

Média OEFTB = 1,03±0,1%; Média OEMG = 1,07±0,29%; Média ORFTB = 2,45±0,97%; Média ORFMG = 2,06±0,61%

5.3.3 Rendimento global de OE (Y_1)

Os resultados da análise estatística, aplicado aos dados experimentais do rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}) estão apresentados na Tabela 5.6. Os fatores lineares em negrito são significativos à 95% de confiança ($p \leq 0,05$); ainda apresenta-se os resultados obtidos para o efeito estimado, erro padrão, coeficiente t , significância estatística e estimativas por intervalo.

Os efeitos estimados analisados em um modelo de primeira ordem mostram que apenas a variável P teve influência sobre a resposta rendimento global de OE. Os valores positivos indicam que, com o aumento da P, o rendimento aumentou. A variável T e a interação P $\times$ T não tiveram influência significativa. Isto foi verificado para ambas as amostras (FTB e FMG) (Tabela 5.6.).

Tabela 5.6. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t , significância estatística e estimativas por intervalo para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).

Amostra	Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	$t(3)$	p	-95 %	95 %
FTB	Média	1,1843	0,0834	14,1998	0,0008	0,9189	1,4497
	Pressão (L)	1,6600	0,2207	7,5229	0,0049	0,9578	2,3622
	Temperatura (L)	-0,6100	0,2207	-2,7644	0,0699	-1,3122	0,0922
	P $\times$ T	-0,4600	0,2207	-2,0847	0,1284	-1,1622	0,2422
FMG	Média	1,1214	0,0933	12,0259	0,0012	0,8247	1,4182
	Pressão (L)	1,1450	0,2467	4,6409	0,0189	0,3598	1,9302
	Temperatura (L)	-0,1750	0,2467	-0,7093	0,5293	-0,9602	0,6102
	P $\times$ T	-0,2250	0,2467	-0,9120	0,4290	-1,0102	0,5602

O diagrama de pareto, outra ferramenta que mostra a influência das variáveis P e T e sua interação P $\times$ T na resposta rendimento global de OE está apresentado nas Figuras 5.2 (a) e (b) para a FTB e FMG, respectivamente. A Figura 5.2 possibilita a visualização dos efeitos principais, onde pode-se constatar a influência positiva de P é um pouco maior para a amostras FTB.

Os resultados obtidos para o coeficiente de regressão do modelo linear ou de primeira ordem para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB e FMG estão apresentados na Tabela 5.7.

Figura 5.2. Diagrama de pareto das amostras (a) FTB e (b) FMG.

Tabela 5.7. Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento global das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).

Amostra	Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(3)	p	Estimativas por Intervalo	
						-95%	95%
FTB	Média	1,1843	0,0834	14,1998	0,0008	0,9189	1,4497
	Pressão (L)	0,8300	0,1103	7,5229	0,0049	0,4789	1,1811
	Temperatura (L)	-0,3050	0,1103	-2,7644	0,0699	-0,6561	0,0461
	P x T	-0,2300	0,1103	-2,0847	0,1284	-0,5811	0,1211
FMG	Média	1,1214	0,0933	12,0259	0,0012	0,8247	1,4182
	Pressão (L)	0,5725	0,1234	4,6409	0,0189	0,1799	0,9651
	Temperatura (L)	-0,0875	0,1234	-0,7093	0,5293	-0,4801	0,3051
	P x T	-0,1125	0,1234	-0,9120	0,4290	-0,5051	0,2801

A partir destes coeficientes de regressão pode-se gerar o modelo linear codificado proposto para descrever o comportamento das variáveis P e T em relação ao rendimento de extratos para as amostras FTB e FMG nas Equações 5.1 e 5.2, respectivamente, apresentadas no modelo de primeira ordem.

$$Y_{1FTB} = 1,1843 + 0,8300P \quad (5.1)$$

$$Y_{1FMG} = 1,1214 + 0,5725P \quad (5.2)$$

onde P é a pressão, Y_{1FTB} e Y_{1FMG} são os rendimentos globais de OE para as amostras FTB e FMG, respectivamente.

Os dados da análise de variância (ANOVA) dos modelos de primeira ordem para as amostras FTB e FMG estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).

Amostra	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}	$*F_{tab}$	R^2
FTB	Regressão (r)	3,3393	3	1,1131	22,8607	9,28	0,95
	Resíduo (R)	0,1460	3	0,0486			
	Total (T)	3,4853	6				
FMG	Regressão (r)	1,3922	3	0,4640	7,6242	9,28	0,88
	Resíduo (R)	0,1826	3	0,0608			
	Total (T)	1,5748	6				

Coeficiente de determinação (R^2) = SQ_R/SQ_T ; $F_{calc} = QM_R/QM_r$; Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$

Por meio do teste F, verifica-se que o modelo de primeira ordem para o rendimento global de OE obtido para a amostra FTB foi significativo e, portanto preditivo, já que o valor de F_{calc} foi maior que o de F_{tab} . Desta forma, o modelo linear gerado tem a capacidade de explicar 95% da variação dos dados (Tabela 5.8). No entanto, para a amostra FMG o modelo não foi significativo ($F_{calc} < F_{tab}$), embora tenha apresentado um bom coeficiente de determinação ($R^2=0,88$).

A superfície de resposta, gerada a partir do modelo de primeira ordem para a amostra FTB, é observada na Figura 5.3 (a). Embora o modelo não tenha sido significativo para a amostra FMG, a superfície de resposta (Figura 5.3 (b)) foi gerada para tentar identificar regiões semelhantes com aquela obtida para o rendimento da extração da FTB cujo modelo foi significativo. Como esperado, o comportamento das duas superfícies foi o mesmo, os

melhores rendimentos para o OE, independentemente da procedência das folhas de *C. citriodora*, foram superiores na região em que altas pressões foram empregadas, para valores de temperatura superiores a 50°C.

Figura 5.3. Superfícies de resposta geradas pelos modelos lineares para o rendimento global de OE (%) das amostras (a) FTB e (b) FMG em função de P e T.

Na análise estatística para o modelo de segunda ordem, verifica-se que os coeficientes de regressão quadráticos ou de segunda ordem não foram significativos (Tabela 5.9), apenas as variáveis lineares apresentaram efeito significativo para a amostra FTB, enquanto que para a amostra FMG nenhuma variável foi significativa.

Tabela 5.9. Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}) para um modelo de segunda ordem.

Amostra	Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	t(5)	p	-95%	95%
FTB	Média	1,03667	0,35398	2,92859	0,03269	0,12673	1,94661
	Pressão (L)	1,00190	0,21677	4,62197	0,00573	0,44468	1,55912
	Pressão (Q)	0,37167	0,25801	1,44053	0,20927	-0,29156	1,03489
	Temperatura (L)	-0,59798	0,21677	-2,75860	0,03990	-1,15520	-0,04076
	Temperatura (Q)	0,22667	0,25801	0,87853	0,41986	-0,43656	0,88989
	P x T	-0,23000	0,30656	-0,75027	0,48688	-1,01803	0,55803
FMG	Média	1,07333	0,42004	2,55534	0,05093	-0,00640	2,15307
	Pressão (L)	0,62389	0,25722	2,42554	0,05971	-0,03731	1,28509
	Pressão (Q)	0,06896	0,30615	0,22524	0,83071	-0,71803	0,85594
	Temperatura (L)	-0,54403	0,25722	-2,11504	0,08806	-1,20523	0,11717
	Temperatura (Q)	0,32896	0,30615	1,07450	0,33169	-0,45803	1,11594
	P x T	-0,11250	0,36376	-0,30927	0,76959	-1,04758	0,82258

O modelo de segunda ordem que descreve o comportamento do rendimento global do OE de FTB em função das variáveis do processo de extração supercrítica (P e T) apresenta-se na Equação (5.3):

$$Y_{1FTB} = 1,03667 + 1,00190P - 0,59798T \quad (5.3)$$

Na análise de variância para o modelo de segunda ordem (Tabela 5.10), comprova-se que somente o modelo que descreve o comportamento do rendimento global do OE de FTB em função de P e T foi significativo ($F_{calc} > F_{tab}$), no entanto, vale ressaltar que esta significância é referente aos fatores lineares do modelo.

Tabela 5.10. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para o rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{1FTB}) e FMG (Y_{1FMG}).

Amostra	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}	$*F_{tab}$	R^2
FTB	Regressão (r)	12,17282	5	2,43456	6,47647	5,05	0,86
	Resíduo (R)	1,87955	5	0,37591			
	Total (T)	13,84736	10				
FMG	Regressão (r)	6,17024	5	1,23405	2,33152	5,05	0,69
	Resíduo (R)	2,64645	5	0,52929			
	Total (T)	8,79462	10				

Coeficiente de determinação (R^2) = SQ_R/SQ_T ; $F_{calc} = QM_R/QM_r$; Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$

A superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático (Figura 5.4) que descreve o rendimento do OE da FTB em função de P e T, na faixa de valores estudados no processo de SFE, indica o mesmo comportamento da superfície de resposta gerada pelo modelo linear (Figura 5.3).

Na Análise da Superfície de Resposta (ASR) (Figuras 5.3 e 5.4), pode-se constatar a influência pronunciada da P, sendo que um aumento no valor desta variável (o que implica um aumento na densidade do solvente) proporcionou um aumento significativo no rendimento de extrato. Nas condições de P e T que proporcionaram altas densidades do CO₂, independentemente da procedência das folhas, houve a coextração de compostos de alto peso molecular que conferiram pigmentação amarela ao extrato (no caso, os ensaios 2, 6 e 7). Em altas densidades do CO₂SC, os terpenos oxigenados são altamente solúveis, porém, as interações moleculares entre o solvente e os solutos são reforçadas e componentes de alto peso molecular são também solubilizados, diminuindo a seletividade do fluido (MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON, 1997).

Figura 5.4. Superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático para o rendimento global de OE (%) da amostra FTB em função de P e T.

Segundo Reverchon (1997), as condições ideais para a SFE de OE a partir de plantas é em temperaturas entre 40-50°C e à pressões menores de 100 bar. Dentro da faixa de P e T aplicada nos experimentos deste trabalho, visando a obtenção de extratos a partir das folhas de *C. citriodora*, verificou-se que ensaio 4 (100 bar, 60°C, ρ_{CO_2} =291,5 kg/m³) foi o que proporcionou os maiores rendimentos globais em OE (sem a coextração de pigmentos). Nesta condição, os rendimentos foram 1,59% e 1,53% e os teores de citronelal foram 89,0 e 71,8%

para as amostras FTB e FMG, respectivamente. Os rendimentos foram próximos aos obtidos pelos métodos convencionais de AV e HD, entre 1 e 1,6%. Della Porta *et al.* (1999) extraíram o OE de *E. globulus* à 90 bar e 50°C ($\rho=287,3 \text{ kg.m}^{-3}$). O rendimento obtido foi de 2,4% e a concentração do componente principal, 1,8-cineole, foi de 62,6%. Na HD, eles encontraram um rendimento de 2,0% com concentração de 1,8-cineole de 48,2%, valores inferiores ao obtido na SFE.

A coextração de uma pequena quantidade de ceras, uma substância sólida de cor branca, foi observada em alguns ensaios. As ceras, por estarem localizadas na superfície das folhas, são facilmente extraídas pelo solvente, além de serem altamente solúveis nas condições aplicadas nos ensaios, sendo insolúveis apenas em temperaturas próximas à 0°C (REVERCHON, 1997). O frasco era mantido em um banho de gelo, para evitar a perda dos voláteis, e a condição de T (próxima de zero) favorável à precipitação das ceras. Uma possibilidade de se obter um OE relativamente puro, ou seja, sem a coextração de ceras, é utilizar um processo de separação em dois estágios, onde as substâncias de baixa volatilidade precipitam no primeiro coletor, à uma baixa T, e o OE é recuperado no segundo coletor, à uma T maior (BOCEVSKA e SOVOVÁ, 2007; REIS-VASCO *et al.*, 2000). Mesmo ocorrendo a coextração de ceras, a concentração de citronelal foi significativamente elevada nestes extratos, com concentração máxima de 89,0 e 71,8% para as amostras FTB e FMG, respectivamente.

Na faixa de P e T estudada, a análise estatística demonstrou que a T não teve influência significativa. No entanto, plotando-se a densidade do CO₂ versus o rendimento global de extratos (Y_1) para cada condição (Figura 5.5), verifica-se que o aumento no valor da densidade, por si só não é suficiente para proporcionar os maiores rendimentos. A solubilidade dos solutos no fluido supercrítico é influenciada pela T e pela P e, geralmente, é uma função da densidade do solvente. No entanto, o efeito da T na solubilidade pode ser complexo devido aos efeitos opostos da pressão de vapor do soluto e a densidade do solvente. A pressão de vapor do soluto aumenta com o aumento da T, resultando em um aumento na solubilidade enquanto que a densidade diminui resultando em uma diminuição na solubilidade (MOURA *et al.*, 2012). O efeito da T no rendimento do processo é complexo devido ao efeito combinado da densidade do solvente e a pressão de vapor do soluto sendo, portanto, mais difícil de prever na SFE (CAMPOS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012).

Como exemplo, podemos citar os ensaios 2 e 6, de ambas as amostras, nas respectivas condições de 100 bar e 40°C ($\rho=623,6 \text{ kg/m}^3$) e 108,5 bar e 50°C ($\rho=390,9 \text{ kg/m}^3$). Apesar da

maior densidade do ensaio 2 (com rendimento de 2,66%), no ensaio 6 o rendimento foi maior (rendimento de 3,78%), o que é um indicativo da influencia da T na volatilidade dos solutos.

Figura 5.5. Efeito da densidade do CO₂ sobre o rendimento global de extrato obtido para as amostras FTB e FMG.

Esta região, onde o efeito da volatilidade se torna mais pronunciado do que o efeito da densidade sobre o rendimento, é conhecida como solubilidade retrógrada ou fenômeno *crossover* e, geralmente, é observado em condições próximas à da região supercrítica do fluido (MUKHOPADHYAY, 2000). O conhecimento da solubilidade, bem como o da região onde o fenômeno ocorre são cruciais para o *design* do processo na SFE. Assim, é possível obter o maior rendimento e/ou qualidade de extrato desejado e evitar custos adicionais desnecessários para operação.

A escolha da melhor condição de extração depende da aplicação a ser dada ao extrato obtido. Para as indústrias de cosméticos, por exemplo, a coextração de pigmentos e outros componentes de elevada massa molecular pode representar uma vantagem. As ORs são mais concentradas em aroma e podem agir como matriz fixante para os compostos voláteis, prolongando o seu *shelf-life*. A OR também possui melhor capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana devido ao alto teor de compostos fenólicos (KANAKDANDE *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2008, VISENTÍN *et al.*, 2011). No entanto, a indústria química tem interesse em um OE que seja o mais concentrado possível em citronelal, que seja livre de ceras ou OR. Esta característica é importante quando o objetivo é a aplicação em reações químicas, nas quais os componentes a serem utilizados devem ser de alta pureza para garantir a estabilidade nas reações e evitar a formação de compostos que são indesejados (LENARDÃO *et al.*, 2007). No

entanto, os estudos de Osawa e Namiki (1985), demonstraram que as ceras das folhas de *E. globulus*, obtidas através da extração com solventes, apresentaram efeito antioxidante em sistemas alimentícios, como a maionese. Assim, a qualidade do extrato será equivalente à finalidade da aplicação.

5.3.4 Rendimento global de OR (Y_2)

Os resultados da análise estatística, aplicado aos dados experimentais do rendimento global de OR (Y_2) de ambas as amostras, FTB e FMG, estão apresentados a seguir. Os fatores lineares em negrito (efeito estimado, erro padrão, coeficiente t , significância estatística e estimativas por intervalo de confiança) são significativos à 95% de confiança ($p \leq 0,05$) (Tabela 5.11).

Tabela 5.11. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t , significância estatística e estimativa por intervalo para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento global de OE das amostras FTB (Y_{2FTB}) e FMG (Y_{2FMG}).

Amostra	Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	$t(3)$	p	-95%	95%
FTB	Média	2,6043	0,3097	8,4101	0,0035	1,6188	3,5898
	Pressão (L)	0,3350	0,8193	0,4089	0,7101	-2,2723	2,9423
	Temperatura (L)	1,4250	0,8193	1,7393	0,1804	-1,1823	4,0323
	$P \times T$	1,4050	0,8193	1,7149	0,1849	-1,2023	4,0123
FMG	Média	2,2929	0,2229	10,2870	0,0020	1,5835	3,0022
	Pressão (L)	0,6750	0,5897	1,1446	0,3354	-1,2017	2,5517
	Temperatura (L)	0,3750	0,5897	0,6359	0,5700	-1,5017	2,2517
	$P \times T$	1,0550	0,5897	1,7890	0,1716	-0,8217	2,9317

Os efeitos estimados analisados em um modelo de primeira ordem mostram que os fatores P , T ou a interação $P \times T$ não tiveram influência significativa sobre o rendimento global de OR (Y_2) para ambas as amostras, FTB e FMG.

Os dados da análise de variância (ANOVA) para as amostras FTB e FMG (Tabela 5.12) indicam que os modelos lineares testados não apresentaram significância estatística ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$) e isso era esperado já que não houve efeito significativo das variáveis estudadas para esta resposta. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram baixos, explicando apenas 67 e 62% da variação dos dados para as amostras FTB e FMG, respectivamente. Portanto, o modelo de primeira ordem testado não foi significativo e nem preditivo para descrever o comportamento do rendimento global de OR (Y_2) de ambas as amostras.

Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento global de OR das amostras FTB (Y_{2FTB}) e (Y_{2FMG}).

Amostra	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}	$*F_{tab}$	R^2
FTB	Regressão (r)	4,1168	3	1,3722	2,0444	9,28	0,67
	Resíduo (R)	2,0136	3	0,6712			
	Total (T)	6,1305	6				
FMG	Regressão (r)	1,7092	3	0,5697	1,6383	9,28	0,62
	Resíduo (R)	1,0432	3	0,3477			
	Total (T)	2,7525	6				

Coeficiente de determinação (R^2)= SQ_R/SQ_T ; $F_{calc}=QM_R/QM_r$; Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$

O diagrama de pareto, que mostra a influência das variáveis P e T e sua interação $P \times T$ na resposta rendimento global de OR, está apresentado nas Figuras 5.6 (a) e (b) para a FTB e FMG, respectivamente, no qual também se visualiza a não influência dos fatores e de suas interações no rendimento.

Embora não tenha sido possível gerar modelos que predigam a influência da P e T no rendimento da OR para a faixa de valores estudada, pela análise dos dados experimentais (Tabela 5.5) é possível identificar que o rendimento de OR aumentou com o aumento da P e T. Um aumento na P de extração resulta em um aumento na densidade e, conseqüentemente, no poder de solvatação do CO_2SC , bem como uma maior interação entre o fluido e a matriz sólida. Pressões entre 80 e 150 bar são adequadas para a extração de OE, onde pressões entre 150 e 400 bar tem sido empregadas nos processos de extração de compostos fenólicos e terpenóides. Na extração de compostos antioxidantes, um aumento na P pode resultar na diminuição da seletividade como um resultado da coextração de compostos que reduzem a pureza e podem conferir cor, bem como a ação pró-oxidante dos extratos supercríticos. O efeito de uma maior T para uma dada P, leva à uma baixa densidade e poder de solubilização do CO_2SC , e também à uma maior pressão de vapor do soluto (MEIRELES, 2009).

Observando-se os rendimentos globais dos ensaios 1, 4 e 11 do DCCR-SUP ($\rho = 675,0$, 696,5 e 689,3 $kg.m^{-3}$, respectivamente) (Tabela 5.5) obtidos sequencialmente aos pontos centrais da primeira etapa (Y_1) (ensaios 9, 10 e 11 do DCCR-SUB), nota-se que, apesar dos valores de densidade estarem próximos entre si, os rendimentos aumentaram com a P e T (maior rendimento obtido no ensaio 4 do DCCR-SUP, à 220 bar e 70°C, com 4,30 e 3,52% de OR para as amostras FTB e FMG, respectivamente).

Figura 5.6. Diagrama de pareto das amostras (a) FTB e (b) FMG.

Com relação aos outros ensaios, apesar das condições de P e T aplicadas terem sido as mesmas para ambas as amostras, percebe-se que os valores de rendimento não foram semelhantes entre si. As características de cor e consistência dos extratos também foram visualmente diferentes entre as amostras FTB e FMG, como pode ser visto no exemplo da Figura 5.7, para o ensaio 15 (220 bar, 70°C, $\rho=696,5\text{kg.m}^{-3}$).

As diferenças nos valores de rendimento global (Y_2) e característica do extrato entre as amostras FTB e FMG podem ter duas explicações principais: (a) as condições édafo-climáticas de cultivo das árvores, bem como o manejo e a idade da planta em que as folhas foram coletadas (as amostras são provenientes de diferentes produtores e coletadas em regiões com características bem distintas entre si o que, conseqüentemente, influencia na produção e composição de metabólitos secundários presentes nas folhas) e (b) a extração dos compostos

principais da OR podem afetar tanto a solubilidade dos compostos do OE como a sua afinidade com a matriz (SOVOVÁ *et al.*, 2004). Assim, o rendimento global da OR (Y_2), que correspondeu à segunda etapa de extração, irá ter como terceira variável independente o rendimento global de OE (Y_1), ou seja, dependerá da quantidade de OE extraída no ensaio da primeira etapa do processo, principalmente nas condições em que houve a pigmentação do extrato. Isto também explica a falta de significância e predição dos modelos lineares testados.

Figura 5.7. Extratos obtidos no ensaio 15 (220 bar, 70°C, $\rho=696,5\text{kg.m}^{-3}$) do DCCR-SUP das amostras (a) FTB e (b) FMG. Além do rendimento (4,30% e 3,52% para a FTB e FMG, respectivamente), as amostras também diferiram no aspecto e na cor. A amostra FMG possuía uma pigmentação amarela em um tom mais escuro e maior consistência em relação à amostra FTB.

As folhas, após as duas etapas de extração, apresentavam-se amareladas e quebradiças indicando uma extração eficaz, como pode ser observado na Figura 5.8.

Figura 5.8. Comparação das folhas antes e depois das duas etapas de extração: (a) as folhas verdes são antes da extração e as amareladas depois da extração e (b) característica das folhas após a extração.

A Tabela 5.13 apresenta os rendimentos parciais, obtidos em cada extração, e os rendimentos totais, sendo a soma das duas etapas de extração.

Tabela 5.13. Rendimentos parciais, de OE e OR e rendimento total de extratos (OE mais OR).

OE		OR		Rendimento Total de Extratos (%)					
P (bar)	T (°C)	P (bar)	T (°C)	FTB			FMG		
				OE	OR	Total	OE	OR	Total
60	40	140	70	0,54	2,56	3,1	0,56	1,79	2,35
100	40	*180	*60	2,66	1,33	3,99	1,93	2,38	4,31
60	60	236,4	60	0,39	3,34	3,73	0,61	3,16	3,77
100	60	*180	*60	1,59	2,99	4,58	1,53	1,35	2,88
51,8	50	119,5	60	0,46	1,99	2,45	0,57	1,37	1,94
108,2	50	220	50	3,78	1,47	5,25	2,48	2,09	4,57
80	35,9	180	45,9	3,09	1,51	4,6	3,46	1,80	5,26
80	64,1	180	74,1	0,57	3,78	4,35	0,63	2,98	3,61
*80	*50	140	50	1,02	2,54	3,56	0,89	2,47	3,36
*80	*50	*180	*60	1,17	3,04	4,21	1,41	2,45	3,86
*80	*50	220	70	0,92	4,30	5,22	0,92	3,52	4,44

*pontos centrais

Um teste foi realizado com as folhas da amostra FTB para verificar a influência que a extração seletiva e sequencial pode ter no rendimento global de extratos. Após a realização de todos os ensaios do planejamento experimental, escolheu-se a condição que proporcionou os maiores rendimentos em OR (ensaio 15, à 220 bar e 70°C e rendimento de 4,30%). A extração foi feita em apenas uma etapa e teve 30 minutos de TE e 4 h de TD. O rendimento global desta extração foi de 2,45%, ou seja, 2,06% a menos de rendimento em comparação com a extração sequencial em duas etapas. Portanto, aqui verifica-se a importância da extração sequencial e fracionada não só para a obtenção de diferentes extratos e com maior pureza, como é para o objetivo da extração do OE, mas com o maior rendimento possível.

5.3.5 Concentração de citronelal no OE

No planejamento experimental DCCR-SUB, além do rendimento global (Y_1) ter sido considerado como resposta, considerou-se também a concentração do citronelal (CC), principal componente do OE de eucalipto. A CC nos extratos das folhas FTB variou entre 42,6% à 92,4%, enquanto que na amostra FMG a concentração variou de 47,5% à 79,2% (Tabela 5.5).

Os resultados da análise estatística, aplicado aos dados experimentais da concentração de citronelal (% de área dos picos) nos OEs extraídos de ambas as amostras, FTB e FMG, são apresentados a seguir. Somente o modelo linear apresentou significância estatística. Os fatores lineares em negrito (efeito estimado, erro padrão, coeficiente t, significância estatística e estimativas por intervalo) foram significativos à 95% de confiança ($p \leq 0,05$) (Tabela 5.12).

Para a amostra FTB, a P influenciou significativamente a CC nos OEs e, nesta mesma análise de efeitos principais, para a amostra FMG nota-se que houve influência significativa e positiva da interação entre as variáveis $P \times T$ no intervalo de 95% de confiança (Tabela 5.14).

Tabela 5.14. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t , significância estatística e estimativas por intervalo para cada fator no modelo codificado para a resposta concentração de citrôn timeral das amostras FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}).

Amostra	Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	$t(3)$	p	-95%	95%
FTB	Média	84,0286	1,3467	62,3950	0,0000	79,7427	88,3144
	Pressão (L)	14,3500	3,5631	4,0274	0,0275	3,0107	25,6893
	Temperatura (L)	-7,4500	3,5631	-2,0909	0,1277	-18,7893	3,8893
	$P \times T$	6,0500	3,5631	1,6980	0,1881	-5,2893	17,3893
FMG	Média	67,2571	0,5776	116,4334	0,0000	65,4188	69,0955
	Pressão (L)	-4,1000	1,5283	-2,6827	0,0749	-8,9637	0,7637
	Temperatura (L)	-3,3000	1,5283	-2,1593	0,1197	-8,1637	1,5637
	$P \times T$	17,3000	1,5283	11,3197	0,0015	12,4363	22,1637

No diagrama de Pareto (Figura 5.9) visualiza-se a influência dos efeitos no rendimento (Y_2) do citrôn timeral para os óleos essenciais obtidos das duas amostras (FTB e FMG). Nota-se que a influência da interação entre as variáveis ($P \times T$) para a FMG foi significativamente superior à influência de P na amostra FTB. Considerando que, na extração supercrítica deve-se ponderar a T na extração de OEs, visto que influi na pressão de vapor e consequentemente na volatilização dos componentes, infere-se que esta influência seja aquela que melhor representa o comportamento do enriquecimento dos OEs em citrôn timeral quando diferentes condições de P e T foram empregadas no delineamento proposto para as condições sub e supercríticas do CO_2 .

Os coeficientes de regressão que irão compor o modelo que descreve o comportamento da resposta CC (% em área dos picos) em função das variáveis estudadas (P e T) no processo de extração que emprega CO_2 em estado sub e supercrítico são apresentados na Tabela 5.15 para os extratos obtidos das folhas FTB e FMG.

Figura 5.9 Diagrama de pareto das amostras (a) FTB e (b) FMG em função das variáveis de processo estudadas (P, T e P x T).

Tabela 5.15. Coeficiente de regressão com base no MS residual do modelo de primeira ordem para a resposta concentração de citrônella FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}).

Amostra	Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	$t(3)$	p	Estimativas por Intervalo	
						-95%	95%
FTB	Média	84,0286	1,3467	62,3950	0,0000	79,7427	88,3144
	Pressão (L)	7,1750	1,7815	4,0274	0,0275	1,5053	12,8447
	Temperatura (L)	-3,7250	1,7815	-2,0909	0,1277	-9,3947	1,9447
	PxT	3,0250	1,7815	1,6980	0,1881	-2,6447	8,6947
FMG	Média	67,2571	0,5776	116,4334	0,0000	65,4188	69,0955
	Pressão (L)	-2,0500	0,7642	-2,6827	0,0749	-4,4819	0,3819
	Temperatura (L)	-1,6500	0,7642	-2,1593	0,1197	-4,0819	0,7819
	PxT	8,6500	0,7642	11,3197	0,0015	6,2181	11,0819

Na ANOVA, quando F_{calc} é superior ao F_{tab} no intervalo de 95% de confiança, o modelo linear gerado é significativo e pode ser preditivo. A análise de variância (ANOVA) para a resposta concentração de citronelal (% em área dos picos) da amostra FTB (Tabela 5.16) mostra que o modelo não foi significativo ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$). No entanto, para a amostra FMG, o modelo foi significativo. Observa-se, que um modelo linear, no qual somente a variável P mostra significância, foi utilizado para descrever o comportamento da variação da concentração de citronelal em função de P e T para a FTB (Equação 5.4), salienta-se que este modelo não é preditivo (Tabela 5.16).

$$Y = 86,0333 + 12,3910P \quad (5.4)$$

Para a amostra FMG, o modelo linear significativo que prediz a variação de citronelal em função de P e T é apresentado na equação 5.5. Neste modelo, a interação entre P×T foi significativa.

$$Y = 67,2571 + 8,65PT \quad (5.5)$$

Tabela 5.16. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para a concentração de citronelal das amostras FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}).

Amostra	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}	$*F_{\text{tab}}$	R^2
FTB	Regressão (r)	298,0275	3	99,3425	7,8249	9,28	0,88
	Resíduo (R)	38,08679	3	12,6956			
	Total (T)	336,1143	6				
FMG	Regressão (r)	326,99	3	108,9967	46,6652	9,28	0,97
	Resíduo (R)	7,007143	3	2,335714			
	Total (T)	333,9971	6				

Coeficiente de determinação (R^2) = SQ_R/SQ_T ; $F_{\text{calc}} = QM_R/QM_r$; Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$

Embora o modelo linear (Equação 5.4) não tenha sido significativo para prever a influência de P e T na concentração de citronelal (% em área dos picos) para a amostra FTB, optou por gerar a superfície de resposta (Figura 5.10a). Para esta amostra, as maiores concentrações de citronelal no OE obtido por extração com CO_2 em estado sub e supercrítico das folhas FTB foi alcançada para toda a faixa de temperatura estudada, mas para valores elevados de pressão (acima do ponto central, 80 bar). No entanto, ao ser considerado o

modelo significativo da amostra FMG (Equação 5.5) observa-se duas regiões onde condições otimizadas poderão ser alcançadas. Na região de baixa pressão e temperatura e alta pressão e temperatura (Figura 5.10b) indicando que a interação $P \times T$ realmente influi e com relação a isso vale ressaltar que, dependendo da pressão a temperatura de vapor do componente volátil pode predominar no processo. O fato de empregar baixas temperaturas e pressões, interfere em economia de energia e a otimização nesta região merece maiores estudos em trabalhos futuros.

(a)

(b)

Figura 5.10. Superfície de resposta para a concentração de citronelal (%) das amostras (a) FTB e (b) FMG.

A falta de significância estatística na análise da influência da P e T na resposta CC para a amostra FTB pode estar associada à solubilidade do citrôn timer nas condições estudadas bem como aos mecanismos de resistência de transferência de massa dos solutos para o solvente.

Na análise estatística para o modelo de segunda ordem, verifica-se que os coeficientes de regressão quadráticos ou de segunda ordem não foram significativos (Tabela 5.17), apenas as variáveis lineares apresentaram efeito significativo para a amostra FTB, enquanto que para a amostra FMG nenhuma variável foi significativa.

Tabela 5.17. Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta concentração de citrôn timer das amostras FTB (CC_{FTB}) e FMG (CC_{FMG}) para um modelo de segunda ordem.

Amostra	Fatores	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p	-95%	95%
FTB	Média	86,0333	4,9996	17,2079	0,0000	73,1813	98,8853
	Pressão (L)	12,3909	3,0616	4,0471	0,0098	4,5207	20,2611
	Pressão (Q)	-7,1979	3,6440	-1,9752	0,1052	-16,5653	2,1694
	Temperatura (L)	-4,3727	3,0616	-1,4282	0,2125	-12,2429	3,4974
	Temperatura (Q)	-0,4479	3,6440	-0,1229	0,9069	-9,8153	8,9194
	P x T	3,0250	4,3298	0,6986	0,5159	-8,1051	14,1551
FMG	Média	67,8000	5,3188	12,7470	0,0000	54,1274	81,4725
	Pressão (L)	-3,4291	3,2571	-1,0528	0,3406	-11,8018	4,9435
	Pressão (Q)	-3,2687	3,8767	-0,8431	0,4376	-13,2342	6,6967
	Temperatura (L)	-0,2416	3,2571	-0,0741	0,9437	-8,6143	8,1310
	Temperatura (Q)	-4,6437	3,8767	-1,1978	0,2846	-14,6092	5,3217
	P x T	8,6500	4,6062	1,8778	0,1192	-3,1908	20,4908

O modelo de segunda ordem que descreve o comportamento da concentração de citrôn timer de FTB em função das variáveis do processo de extração supercrítica (P e T) apresenta-se na Equação (5.6).

$$CC_{FTB} = 86,033333 + 12,39098P \quad (5.6)$$

Na análise de variância para o modelo de segunda ordem (Tabela 5.18), comprova-se que o modelo que descreve o comportamento da concentração de citrôn timer de FTB (CC_{FTB}) em função de P e T não foi significativo já que $F_{calc} < F_{tab}$.

Tabela 5.18. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para a concentração de citrônella das amostras FTB (CC_{FTB2}) e FMG (CC_{FMG2}).

Amostra	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	*F _{tab}	R ²
FTB	Regressão (r)	1711,567	5	342,3133	4,564837	5,05	0,82
	Resíduo (R)	374,9459	5	74,98917			
	Total (T)	2102,602	10				
FMG	Regressão (r)	575,9432	5	115,1886	1,357217	5,05	0,55
	Resíduo (R)	424,3559	5	84,87117			
	Total (T)	962,3473	10				

Coeficiente de determinação (R^2) = SQ_R/SQ_T ; $F_{calc} = QM_R/QM_r$; Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$.

5.3.6 Curvas de extração global do OE

Embora neste trabalho não tenha sido possível concluir o estudo de cinéticas de extração para fim específico de modelagem termodinâmica, visto à considerável quantidade de experimentos realizados na otimização do processo de extração para se obter um óleo essencial rico em citrônella proveniente de folhas de *C. citriodora* de regiões diferentes do país, o comportamento das curvas de extração global, especificamente para o OE foi observado.

As curvas de extração global obtidas em diferentes condições de P e T estão apresentadas nas Figuras 5.11 (a), (b), (c) e (d), que mostram a massa de extrato (g) versus o consumo de solvente (g) ou o tempo de extração (min), respectivamente. Algumas destas curvas (Figura 5.12) demonstram o comportamento típico para a SFE de OE em função das variáveis de processo aplicadas.

Em geral, uma curva de extração global na SFE pode ser dividida em três regiões: (i) taxa de extração constante, onde a convecção na fase fluida é o principal mecanismo de transferência de massa; (ii) taxa de extração decrescente (FER), onde ambos, difusão interna da partícula e convecção na fase fluida são importantes na transferência de massa; e (iii) taxa de difusão controlada (DCR), onde a transferência de massa é limitada pela difusão dentro das partículas. Geralmente, de 50 à 90% dos compostos extraíveis são obtidos na etapa FER, assim, de forma a reduzir os custos do processo, a otimização da operação deve focar nesta região (MOURA *et al.*, 2012).

Para ambas as amostras, em condições de altas densidades do CO₂, verifica-se que a taxa de recuperação do extrato foi maior em um período de tempo menor. Isto pode ser observado claramente nos ensaios à 100 bar e 40°C ($\rho = 623,6 \text{ kg.m}^{-3}$) (Figura 5.11 e 5.12), onde os três períodos típicos da curva de extração na SFE foram alcançados. Este comportamento é

devido às altas densidades, já que nestas condições, a capacidade de solubilização do solvente é maior e mais solutos podem ser extraídos da matriz.

Nos ensaios onde as densidades foram menores, pode-se observar que as 4 horas de extração não foram suficientes para causar a exaustão dos solutos presentes na matriz (Figura 5.11). Fornari *et al.* (2012), realizaram a extração das folhas de sálvia, orégano, alecrim e tomilho nas condições de 300 bar e 40°C. Para as duas primeiras plantas foi observada, nas curvas de extração globais, a completa exaustão dos solutos nas 4,5 horas de extração, o que não foi o caso para as duas últimas. Uma variedade de parâmetros pode ser relevante nos mecanismos de transferência de massa, entre estes está a distribuição inicial das substâncias do extrato no substrato sólido. As substâncias podem estar adsorvidas na superfície externa, na superfície dos poros ou mesmo distribuídas dentro da matriz ou nas células da planta. Cada uma destas diferentes distribuições tem alguma influencia no curso da extração (BRUNNER, 1994).

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 5.11. Cinética de extração dos ensaios do planejamento DCCR-SUB plotadas (a) e (c) massa de solvente versus a massa de extrato e (b) e (d) tempo versus massa de extrato para as amostras FTB e FMG, respectivamente.

Figura 5.12. Cinética de extração dos ensaios do planejamento DCCR-SUB para os ensaios 2 e 6 da amostra FTB (a) e ensaios 6 e 7 para a amostra FMG (b) plotados massa de solvente versus a massa de extrato.

5.4 Caracterização dos extratos

5.4.1 Análise da composição volátil por GC/MS

A análise de GC/MS dos extratos obtidos por AV, HD e SFE teve por objetivo verificar a qualidade do OE produzido nas principais destilarias de OE de *C. citriodora* do Brasil, Três Barras e Meneghetti, e verificar a influência do método de extração na composição do OE.

Na análise da intensidade dos picos cromatográficos (% em área) no cromatograma de íons totais (TIC), a amostra FMG quando comparado ao TIC das folhas FTB (Figura 5.13), apresentou concentração de citronelal inferior, mas isto é consequência da maior quantidade de componentes extraídos destas folhas (Figura 5.14).

As Figuras 5.13 e 5.14 apresentam os Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos OEs obtidos por AV, HD e SFE para alguns ensaios. De um modo geral, podem-se notar que os TICs dos Oes obtidos por AV e HD apresentaram uma maior quantidade de picos em relação aos obtidos por SFE para ambas amostras, FTB e FMG. Os OEs obtidos por métodos convencionais de extração (AV e a HD) normalmente possuem componentes derivados da degradação pelo emprego de altas temperaturas (acima de 100°C). Temperaturas elevadas decompõem compostos termosensíveis e mesmo hidrólise de outros. No entanto, os Oes são misturas complexas de compostos terpênicos sendo difícil a identificação de quais são produtos provenientes da degradação. Comparando-se os TICs entre as amostras, nota-se que a FMG apresentou maior quantidade de picos em relação à FTB. Uma vez que as amostras foram obtidas de diferentes regiões do Brasil (SP e MG), diferenças na composição são esperadas.

A composição química dos extratos das folhas de *C. citriodora* obtidos por AV, HD e na primeira etapa da extração está apresentada nas Tabelas 5.19 e 5.20 para as amostras FTB e FMG, respectivamente. Nas tabelas está relatada a composição dos extratos em termos de percentual da área do pico de cada uma das substâncias identificadas.

Figura 5.13: Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos óleos essenciais da amostra FTB obtidos por AV (—), HD (—) e SFE nos ensaios 1 (—), 2 (—), 3 (—), 4 (—), 5 (—) e 6 (—).

Figura 5.14: Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos óleos essenciais da amostra FMG obtidos por AV (—), HD (—) e SFE nos ensaios 1 (—), 2 (—), 3 (—), 4 (—), 5 (—) e 6 (—).

Tabela 5.19. Composição da fração volátil dos extratos supercríticos das folhas de *C. citriodora* da amostra FTB obtidos por análise em GC/MS em coluna RTx®-5MS.

Pico	Componente	T.C.	RT	AI	AI*	Áreas dos picos (%)												
						AV	HD	Condição (°C/bar)										
								40/60	40/100	60/60	60/100	50/51,8	50/108,2	35,9/80	64,1/80	50/80	50/80	50/80
1	N.I.		4,471			0,04	0,04											
2	N.I.		4,968			0,34	0,43		0,08		0,14		0,15	0,11	0,02	0,03	0,09	0,03
3	N.I.		4,945			0,19	0,26				0,03			0,03				
4	N.I.		6,047			0,62	0,61		0,1		0,17		0,16	0,15	0,03	0,05	0,14	0,05
5	Mirceno	MT	6,372	988	997	0,18	0,28				0,08		0,03	0,07		0,02	0,06	0,03
6	Limoneno	MT	7,558	1024	1013	0,35	0,85				0,1			0,09	0,03	0,05	0,07	0,05
7	Eucaliptol	MTO	7,633	1026	1014	0,92	5,82		0,11	0,04	0,36		0,33	0,3	0,11	0,28	0,16	0,19
8	(E)-β-ocimeno	MT	7,822	1044	1017	0,1	0,09	0,01	0,05		0,17		0,07	0,08		0,12	0,09	0,04
9	(Z)-β-ocimeno	MT	8,172	1032	1021	0,05												
10	Melonal	MTO	8,376	1051	1024	0,09	0,17				0,06			0,03	0,04	0,03	0,05	0,04
11	γ-terpineno	MT	8,549	1054	1027	0,13	0,17		0,04		0,08		0,06	0,06	0,06	0,06	0,1	0,07
12	N.I.		8,968				0,06											
13	N.I.		9,611			0,06	0,06											
14	Linalol	MTO	9,990	1095	1046	0,41	0,55	0,17	0,07	0,4	0,32	0,31	0,08	0,24	0,63	0,45	0,34	0,75
15	Fenil etil alcool		10,559	1106	1054	0,04		0,02		0,09					0,09	0,03		
16	Isopulegol	MT	11,802	1145	1071	2,9	6,24	4,78	2,28	6,99	3,86	19,04	1,56	2,75	9,25	5,88	3,71	4,77
17	Citronelal	MT	12,112	1148	1075	79,86	79,58	82,19	90,4	68,68	87,68	62,08	92,49	88,22	73,95	85,17	89,35	83,78
18	N.I.		12,339			0,21	0,37	0,15	1,3	0,35	0,16	1,08	0,03	0,16	0,46	0,27	0,17	0,22
19	N.I.		12,641			0,09			0,05	0,03	0,03	0,14		0,04	0,09	0,06	0,04	0,04
20	Alfa-terpineol	MTO	13,605	1186	1096	0,13	0,3			0,22	0,06	0,15	0,05	0,04	0,2	0,15	0,05	0,16
21	Citronelol	MTO	15,165	1223	1215	8,15	2,81	5,53	3,3	15,66	3,41	8,82	2,93	3,85	9,17	4,33	2,22	5,28
22	Neral	MTO	15,708	1235	1222	0,04									0,08	0,04		
23	Nerol	MTO	16,240	1249	1228	0,17	0,04	0,1		0,25	0,09			0,04	0,49	0,17	0,08	0,16

Continuação da Tabela 5.19

24	Geranial	MTO	16,909	1264	1236	0,04				0,04	0,03	0,12		0,1	0,05		0,05	
25	<i>p</i> -mentano-3,8-diol	MTO	19,472		1267		0,26	0,6	0,66	1,94	0,49	1,61	0,5	0,19	1,37	0,42	0,3	0,44
26	N.I.		19,909									0,74		0,24				
27	N.I.		19,513			0,96	0,1	0,25	0,26	1,08	0,29		0,21		0,61	0,16	0,16	0,27
28	Citronelil propionato		20,383	1444	1278	0,98												
29	Eugenol	CF	20,523	1356	1280	0,14		0,27	0,07	0,78	0,14	0,3	0,1	0,08	0,6	0,24	0,07	0,45
30	N.I.		22,538			0,32	0,05											0,03
31	N.I.		22,080									0,12						
32	Metil eugenol éter	CF	22,518	1403	1404			0,18	0,9	0,84	0,18	0,91	0,13	0,41	0,7	0,36	0,2	0,23
33	(<i>Z</i>)-β-cariofileno	ST	23,005	1417	1410	1,11	0,15	2,19	0,04	1,81	0,97	3,4	0,82	1,34	1,08	1,1	1,51	1,91
34	α-humuleno	ST	23,872	1452	1421	0,06		0,06				0,17				0,04	0,06	0,09
35	γ-muroleno		24,983									0,17						
36	Germacreno D	ST	25,500	1484	1442	0,11		0,19	0,01	0,16	0,15		0,08	0,2	0,13	0,15	0,07	0,24
37	Germacreno B	ST	26,131	1559	1450	0,11					0,04					0,05		0,11
38	Gama- elemeno	ST	25,610	1434	1443							0,12		0,07			0,06	
39	N.I.		41,717			0,32												
40	Fitol	DTO	47,242	1242	2058								0,08	0,06			0,37	
41	Nonacosane	CP	55,227	2900	2300			3,09			0,32							
42	N.I.		61,199			0,08								0,67		0,06	0,1	
Total Identificado						96,13	97,43	99,38	97,93	97,9	98,59	97,2	99,31	98,12	98,08	99,19	98,92	98,84

N.I.= Não Identificado

T.C.= Tipo de Componente

AI*= Índice de van Deen Dolls e Kratz calculado

MT= Monoterpeno; MTO= Monoterpeno Oxigenado; HCO= Hidrocarboneto Oxigenado; CF= Composto fenólico; ST= Sesquiterpeno; STO= Sesquiterpeno Oxigenado; DTO= Diterpeno Oxigenado; HC= Hidrocarboneto; CP= Composto Parafínico

Tabela 5.20. Composição da fração volátil dos extratos supercríticos das folhas de *C. citriodora* da amostra FMG obtidos por análise em GC/MS em coluna RTx®-5MS.

Pico	Componente	T. C.	RT	AI	AI*	Áreas dos picos (%)												
						AV	HD	Condição (°C/bar)										
								40/60	40/100	60/60	60/100	50/51,8	50/108,2	35,9/80	64,1/80	50/80	50/80	50/80
1	N.I.		4,458			0,23	0,11									0,03	0,03	
2	N.I.		4,964			0,43	0,13			0,04	0,13	0,04	0,05	0,1	0,03	0,07	0,09	
3	N.I.		5,946			0,14		0,03					0,03	0,07		0,05		
4	N.I.		6,051			1,13	0,66		0,22	0,14	0,36	0,14	0,25	0,42	0,1	0,33	0,27	0,06
5	Mirceno	MT	6,372	988	997	0,24	0,12		0,04	0,03		0,03		0,08		0,08	0,09	
6	<i>o</i> -cimeno	MT	7,342	1022	1010	0,03				0,05							0,03	
7	<i>p</i> -cimeno	MT	7,356	1020	1010							0,1				0,1		
8	Limoneno	MT	7,558	1024	1013	0,33	0,12		0,04	0,1	0,09	0,07	0,05	0,1	0,06	0,13	0,13	
9	Eucaliptol	MTO	7,633	1026	1014	1,46	0,31	0,06	0,08	0,37	0,13	0,19	0,09	0,33	0,13	0,32	0,36	0,08
10	(E)- β -ocimeno	MT	7,822	1044	1017	0,26	0,18	0,11	0,09	0,15	0,43	0,27	0,08	0,18	0,28	0,33	0,37	0,1
11	(Z)- β -ocimeno	MT	8,099	1032	1020	0,09			0,04	0,1		0,32	0,02	0,18	0,02	0,3	0,02	
12	Melonal	MTO	8,376	1051	1024	0,08	0,08			0,05		0,04			0,03	0,05		
13	γ -terpineno	MT	8,549	1054	1027	0,22	0,06	0,04	0,08	0,19	0,12	0,54	0,05	0,32	0,07	0,5	0,18	
14	<i>p</i> -menta-3, 8-dieno	MT	8,955	1068	1032	0,12	0,1					0,03						
15	N.I.		9,611			0,16	0,07			0,03						0,07		
16	Linalol	MTO	9,990	1095	1046	0,57	0,4	0,05	0,18	0,74		0,62	0,19	0,13	0,47	0,69	0,19	0,16
17	Rose oxide	MTO	10,347	1122	1051	0,05	0,15			0,13					0,14	0,05	0,09	0,06
18	Feniletil álcool	HCO	10,481	1106	1053							0,07			0,12		0,14	0,04
19	Isopulegol	MTO	11,802	1145	1071	6,02	10,94	5,99	4,84	18,61	5,25	10,67	5,32	5,51	11,43	10,17	12,48	9,83
20	Citronelal	MTO	12,112	1148	1075	76,65	57,99	71,29	57,88	58,66	71,86	61,11	47,59	49,92	53,24	67,98	66,11	69,42
21	N.I.		12,665			0,42	0,8	0,24		1,28		0,63	0,44	0,4	0,8	0,47	0,51	0,42
22	N.I.		12,956			0,14	0,26		0,49	0,36	0,36		0,11	0,14	0,16	0,15	0,09	
23	(Z)- β -terpineol	MTO	12,972	1140	1087					0,06		0,25						

Continuação Tabela 5.20

24	α -terpineol	MTO	13,605	1186	1096	0,07	0,07		0,08			0,17	0,05	0,11	0,06	0,1	0,09	
25	Citronelol	MTO	15,165	1223	1215	7,36	23,68	5,87	13,98	7,63	11,00	11,72	12,89	11,69	17,07	8,52	9,61	11,74
26	N.I.		15,938						0,16			0,21		0,31		0,1		
27	Nerol	MTO	16,240	1227	1228	0,06	0,05		0,13	0,18		0,13	0,14	0,13	0,06		0,09	
28	N.I.		16,261						0,13		0,10		0,15					
29	Ácido citronelico	MTO	19,028	1312	1262				0,22				0,98	0,37		0,1		
30	<i>p</i> -mentano-3,8-diol	MTO	19,508		1267	0,82	0,34	0,16	3,96	1,44	0,70	0,97	5,82	5,41	0,78	0,33	1,31	0,49
31	(-)-mentil chloride	N.I.	19,918						3,21				0,08					
32	Citronelil propionato	MTO	20,383	1444	1278	0,91		0,07		1,7		2,35	1,9	2,78			1,17	1,14
33	Citronelol acetato	MTO	20,275	1350	1277		1,18	2,13			1,52				2,67	1,73		
34	N.I.		20,398										3,09	2,16			0,44	
35	Eugenol	CF	20,523	1356	1280	0,08			0,52	0,04	0,27	0,07			0,19	0,06	0,06	
36	Neril acetato	MTO	21,544	1359	1292			0,34			0,13				0,25		0,24	
37	beta-elemenol	ST	21,819	1389	1295				0,2	0,06	0,09	0,07	0,15		0,12	0,05	0,08	
38	N.I.		21,998			0,06	0,14	0,10	0,17	0,09	0,12	0,14	0,11	0,15	0,17	0,1	0,13	0,1
39	Jasmona	MTO	22,146	1392	1299		0,1		0,28	0,07	0,13	0,17	0,26	0,25	0,13	0,09	0,16	0,06
40	(Z)- β -cariofileno	ST	22,949	1417	1409	1,04	0,85	8,04	6,02	4,7	4,31	6,08	4,69	5,11	6,35	4,94	3,15	4,54
41	α -humuleno	ST	23,872	1452	1421		0,06	0,41	0,47	0,34	0,25	0,45	0,47	0,38	0,47	0,31	0,22	0,18
42	Aromadendreno	ST	24,582	1439	1430				0,11	0,08		0,07	0,13	0,04	0,07			
43	Germacreno D	ST	25,500	1484	1442	0,05	0,06	0,85	1,22	0,51	0,87	0,46	0,79	0,3	0,9	0,39	0,62	0,53
44	Citronelil butirato	STO	25,556	1530	1442					0,05	0,08	0,12	0,07	0,1	0,11	0,07		
45	Germacreno B	ST	26,131	1559	1450	0,04	0,1	0,31	1,06	0,39	0,41	0,54	0,91	0,64	0,76	0,41	0,27	0,45
46	N.I.		26,355						0,13	0,04			0,11		0,07		0,05	
47	γ -muuroleno	ST	26,728	1478	1457				1,15	0,14			0,24					
48	Δ -cadineno (+)-	ST	27,101	1522	1462			0,05	0,20	0,25		0,07	0,25		0,1			
49	γ -elemeno	ST	28,359	1434	1478				0,12		0,07		0,09	0,08				
50	N.I.		29,073	1478	1487							0,07	2,05					

Continuação Tabela 5.20

51	Cariofileno oxide		29,359	1582	1491						0,11	0,17						
52	Δ -cadinol		31,551	1638	1620						0,16							
53	α -cadinol	STO	32,050	1652	1627						0,18							
54	N.I.		36,553								0,46							
55	N.I.	HCO	38,506								0,06							
56	N.I.	HCO	39,824								0,16							
57	N.I.		41,666								0,25	0,08						
58	N.I.		43,140								0,35							
59	N.I.		43,130									0,19						
60	Viridiflorol	STO	44,024	1592	1854						0,09	0,08						
61	N.I.		41,475						3,18									
62	N.I.		41,650						0,51									
63	Fitol	DTO	47,242	1942	1880			0,67		0,16	4,84	2,77		0,09				
64	N.I.	HC	52,794									3,64						
65	N.I.	HC	55,592								0,1							
66	N.I.	HC	58,088								0,06							
67	N.I.	HC	60,168								0,08							
68	N.I.	HC	62,704								0,34	0,34	1,32					
69	N.I.	HC	66,504								0,44	0,32						
Total identificado						96,5	96,79	95,77	96,87	96,82	97,87	97,75	88,68	87,16	96,08	97,8	97,29	98,88

N.I.= Não Identificado.

T.I= Tipo de Componente.

AI*= Índice de van Deen Dolls e Kratz calculado.

MT= Monoterpeno; MTO= Monoterpeno Oxigenado; HCO= Hidrocarboneto Oxigenado; CF= Composto fenólico; ST= Sesquiterpeno; STO= Sesquiterpeno Oxigenado; DTO= Diterpeno Oxigenado; HC= Hidrocarboneto.

Os principais componentes, presentes em todos os extratos, foram o citrônalo, citrônalo e isopulego, os quais são frequentemente encontrados como compostos majoritários no OE de *C. citriodora*. Entre os compostos minoritários, uma grande diversidade de compostos foi identificada (terpenos, terpenos oxigenados, hidrocarbonetos, compostos fenólicos, entre outros).

De um modo geral, a porcentagem de área dos compostos variou conforme o método de extração empregado e a amostra, FTB ou FMG, sendo a presença dos compostos semelhante para os métodos convencionais e bastante diferenciado na SFE em função das condições empregadas. Na extração com CO₂ em condições sub e supercríticas, para a amostra FTB verifica-se que um aumento na pressão causou um aumento no número de picos detectados. Michielin *et al.* (2009), extraíram o OE de erva baleeira com CO₂SC e observaram o mesmo comportamento. Já para a amostra FMG, nota-se a influência da densidade, temperatura e pressão. Esta é mais uma constatação que os tipos de componentes extraídos são inerentes à espécie, embora a composição majoritária seja a mesma para ambas. Também se evidencia nestes ensaios que há como fracionar o OE de *C. citriodora* em função das condições de processo (P e T) empregadas.

No mapeamento da composição dos OEs obtidos por AV, os teores de citrônalo detectados pelo GC/MS foram de 79,86% e 76,65% para as amostras FTB e FMG, respectivamente. A Norma ISO 3044-1974 estabelece que o OE de *C. citriodora* deve ter um mínimo de 70% de citrônalo para ser comercializado. Observou-se variações tanto na quantidade dos compostos em comum bem como na composição química das amostras, o que está relacionado com as condições edafoclimáticas de cultivo das plantas.

Os extratos obtidos por SFE apresentaram teores de citrônalo entre 62,08 e 92,49% para a FTB e 47,59 e 71,86% para a FMG. De modo geral, os extratos obtidos na SFE para a amostra FMG apresentaram teores menores de citrônalo do que a FTB. O ensaio 4 da SFE, no qual se obteve um extrato rico em OE (sem a coextração de pigmentos), as amostras FTB e FMG apresentaram teores de citrônalo de 87,68 e 71,86%, respectivamente. Nota-se que para a FTB o teor de citrônalo foi superior ao que é obtido por AV ou HD. No entanto, com relação ao AV o mesmo não foi verificado para a FMG, sendo que este método apresentou um teor de citrônalo 4,79% maior que o obtido por SFE. Rozzi *et al.* (2002) avaliaram a composição química do OE extraído das folhas de *C. citriodora* por HD e SFE. Eles obtiveram um teor de citrônalo de 87% na HD enquanto que na SFE os teores variaram entre 61,3 e 78,5%, sendo a maior concentração obtida à 137,9 bar e 40°C.

Nos extratos obtidos por SFE notam-se diferenças na composição química bem como na quantidade de composto presentes. Isso torna o estudo das condições de P e T ainda mais necessário objetivando-se o fracionamento de grupos específicos de compostos (Tabelas 5.19 e 5.20).

Alguns dos componentes minoritários identificados na maioria dos extratos possuem algum tipo de atividade, a saber, os monoterpenos hidrocarbonetos, como por exemplo o limoneno que tem sido estudado por possuir atividade anticâncer (CROWELL, 1999; MORAES *et al.*, 2009; UEDO *et al.*, 1999), já o β -pineno possui efeito gastroprotetor (ROZZA *et al.*, 2011) e efeito acaricida (FERRARINI *et al.*, 2008), entre outras propriedades. Já o composto γ -terpineno apresenta capacidade antioxidativa, incluindo a habilidade de retardar a oxidação da LDL (GRAßMANN *et al.*, 2000; GRAßMANN *et al.*, 2001; GRAßMANN *et al.*, 2002 citados por MILDE *et al.*, 2004).

Dentre os monoterpenos oxigenados identificados, o eucaliptol é um composto bem conhecido, frequentemente empregado pela indústria farmacêutica por seus efeitos descongestionantes e para tratamento da tosse (LIMA *et al.*, 2013). Este composto também apresenta efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, hepatoprotetivos, antitumoral e antioxidante (ASANOVA *et al.*, 2003; CIFTICI *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013). O linalol possui atividade anti-inflamatória (PEANA *et al.*, 2002) e auxilia a permeabilidade de outros compostos em células tumorosas (MIYASHITA e SADZUKA, 2013). Park *et al.* (2012) verificaram que os compostos linalol e α -terpineol apresentaram alta atividade antimicrobiana contra bactérias periodontopáticas e cariogênicas. O efeito sinérgico dos compostos citral, β -pineno e linalol em conjunto com tratamento térmico à 55°C apresentaram atividade antimicrobiana contra a *Saccharomyces cerevisiae* em bebidas não carbonatadas prolongando seu *shelf life* (BELLETI *et al.*, 2010). O composto *p*-mentano-3,8-diol é conhecido por sua atividade repelente e facilmente sintetizado a partir do (+)-citronelal, principal componente do OE de *C. citriodora* (DRAPEAU *et al.*, 2011).

Os sesquiterpenos β -cariofileno, α -humuleno e germacreno D são conhecidos por possuírem atividade anticâncer, anti-inflamatória, e antioxidante (FERNANDES *et al.*, 2007; LEGAULT e PICHETTE, 2007) enquanto que misturas de β -cariofileno/germacreno D têm apresentado potencial atividade antimicrobiana (DOHI *et al.*, 2009 citado por MAIA *et al.*, 2010).

O diterpeno fitol é um potente imunomodulador porém com alta toxicidade. No entanto, os componentes quimicamente modificados a partir do fitol, fitanol e fitanil cloreto, possuem a capacidade de melhorar a imunidade sem serem tóxicos (CHOWDHURY *et al.*,

2013). Saikia *et al.* (2010) relatam que o fitol apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, causador da tuberculose. Apesar do potencial de atividade biológica destes compostos, frequentemente sua ação está associada ao efeito sinérgico com outros componentes presentes nos OEs (OJEDA-SANA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2008).

Com relação ao teor do composto principal, nos OEs obtidos por AV e HD, a porcentagem de área do pico para o citronelal, foi de 79,86 e 79,58% para a amostra FTB e 76,65 e 57,99% para a FMG, respectivamente. Embora tenham sido feitas várias repetições da HD para a amostra FMG, não foi possível obter um OE com mais de 60% de citronelal como foi apresentado pela amostra obtida por AV. Castro *et al.* (2008) relatam uma variação no teor de citronelal de 67,64 à 87,99%, bem como no rendimento (entre 2,56 e 6,15%) do OE obtido por HD, o que indicou a influencia do local de cultivo com a época de colheita das folhas.

Pela análise de GC/MS, foi possível constatar para a amostra FTB que, através das condições adequadas de P e T, a técnica de SFE pode propiciar extratos mais ricos em citronelal do que as técnicas convencionais de AV e HD. No entanto, para a amostra FMG o teor máximo de citronelal obtido na SFE foi menor do que o método convencional de AV.

5.4.2 Análise da composição da OR por HPLC-DAD e UPLC-ESI-MS/MS

Na Figura 5.15 está apresentado o cromatograma obtido na análise de HPLC para a amostra FTB. As Figuras 5.16 e 5.17 mostram os cromatogramas de íons obtidos na análise de UPLC-ESI-MS/MS, enquanto que na Figura 5.18 está o TIC obtido por UPLC-ESI-MS/MS apenas da amostra FMG com o espectro de massa no modo positivo para os dois principais picos. Estas análises são preliminares e não estavam incluídas na proposta inicial deste projeto de pesquisa, no entanto, ao ser constatada a grande quantidade de OR das folhas de *C. citriodora* e sua forte pigmentação, optou-se por iniciar as análises destes componentes. Salienta-se que a análise da composição desta OR será tema de trabalhos futuros.

Em todas as análises de HPLC-DAD e UPLC foram detectados vários picos e uma boa separação destes não foi possível nestes primeiros testes. Na análise de HPLC-DAD nota-se uma maior quantidade de componentes detectados à 254 nm. Nos comprimentos de onda de 280 e 360 nm também se detectou vários componentes. Especificadamente à 280 nm detectou-se picos com intensidades mais elevadas. Detecções à 254 e 360 nm são indicativas de compostos fenólicos na composição (Figura 5.15).

Estas análises preliminares foram realizadas apenas com o intuito de se verificar as características dos cromatogramas que seriam obtidos, uma vez que a OR em sua forma bruta

pode conter vários compostos que interferem na identificação e quantificação de outros. Trabalhos futuros serão conduzidos, nos quais poderão ser utilizadas diversas metodologias de purificação para classes específicas de compostos com posterior ajuste das condições de análise no equipamento de UPLC-ESI-MS/MS. Assim, será possível a correta análise quantitativa e qualitativa dos compostos presentes na OR.

Na análise preliminar dos espectros de massas da amostra de OR proveniente das folhas de *C. citriodora* FTB obtido via UPCL-ESI-MS/MS no modo positivo, foram detectados com maior intensidade os íons m/z 437, 349, 327 e 338. Os íons produto derivados da fragmentação do íon m/z 338 foram os íons 321, 303, 135, 97 e 83. Já, na análise dos espectros de íons de massas da mesma amostra, fragmentada no modo negativo, notam-se com maior intensidade os íons m/z 455, 341, 281, 255 e 242 e como íons produtos da fragmentação do íon m/z 341 foram gerados em maior intensidade os íons m/z 269, 112, 101, 89 e 71 (Figura 5.16). Na amostra FMG também analisada por UPCL-ESI-MS/MS, utilizando a mesma coluna e mesmas condições cromatográficas no modo positivo, os íons m/z 437 e 338 continuaram com alta intensidade assim como o íon m/z 327.

A fragmentação do íon m/z 327 gerou como íon produto os íons m/z 312, 311, 284, 269, além dos íons m/z 180, 152 e 135. Este comportamento indica que o íon m/z 327 não é fragmento do íon 338, por exemplo, assim como o íon m/z 284 não é íon produto do m/z 338 (Figura 5.17). Estas análises indicam que na separação da fração cromatográfica analisada há mais de um componente presente, desta forma, antes da análise de ESI-MS/MS os métodos de separação por HPLC ou UPLC devem ser otimizados. Nesta mesma análise, mas agora no modo negativo a mesma constatação foi observada, pois nos íons produtos do íon m/z 507 observou-se os íons m/z 325 e 257 indicando uma perda de $[M-H-182]^-$ e $[M-H-250]$, respectivamente. O íon m/z 341 não é íon produto do m/z 507 (Figura 5.17).

As análises de HPCL e UPLC-ESI-MS/MS merecem ser instrumentos para a obtenção de resultados quando no estudo da caracterização da OR obtida na extração supercrítica das folhas de *C. citriodora*. Este produto, após sua identificação poderá ser utilizado como matéria-prima para indústria de cosmético e mesmo na pigmentação de alimentos após conhecida a atividade biológica.

Figura 5.15. Perfil cromatográfico, em diferentes comprimentos de onda (254, 280 e 360 nm), das ORs obtidas por HPLC no ensaio 4 (220 bar e 70°C) das amostras FTB.

Figura 5.16. Espectros de massa obtido HPCL-ESI-MS/MS nos modos (a) positivo e (b) negativo da amostra FTB.

Figura 5.17. Espectros de massa obtido por HPCL-ESI-MS/MS nos modos (a) positivo e (b) negativo da amostra FTB.

Na visualização da separação cromatográfica dos íons gerados na análise de UPLC-ESI-MS/MS (Figura 5.18) da amostra da OR proveniente das folhas de *C. citriodora* FMG, obtida à 50°C e 80 bar, nota-se dois relevantes picos nos tempos de retenção de 4,37 e 4,77 min. A fragmentação dos íons destes dois picos via ESI-MS/MS no modo positivo indicam como íons principais o m/z 313 e o m/z 327 respectivamente. Em ambos os espectros há os íons m/z 279 e 153. Nesta imagem verifica-se que os íons m/z 327 e m/z 312-313 estão presentes mas separados em picos cromatográficos diferentes. Este fato indica, mais uma vez que com a adequação destes métodos analíticos será possível a identificação da composição da OR das folhas de eucalipto proveniente da SFE.

Embora estas análises não sejam conclusivas neste trabalho, possibilitarão grande auxílio no desenvolvimento de trabalhos futuros, dando continuidade no desenvolvimento desta pesquisa.

Figura 5.18. Espectro de massa obtido por UPLC/MS da amostra FMG.

5.4.3 Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das amostras de OEs obtidas por AV e HD e do OE (100 bar e 60°) e OR (220 bar e 70°C) obtidos por SFE, bem como o padrão de citronelal à 95% e o antioxidante sintético BHT, foi determinada através dos métodos de captura do radical livre DPPH e reação de branqueamento do β -caroteno. Os resultados foram expressos em EC_{50} (mg/mL) e porcentagem de inibição na concentração de 1 mg/mL, respectivamente, e estão apresentados na Tabela 5.21.

Tabela 5.21. Atividade antioxidante das amostras obtidas por AV, HD e SFE, medida pelos métodos DPPH e branqueamento do β -caroteno.

Amostra	DPPH EC_{50} (mg/mL)	Branqueamento do β -caroteno % de inibição (à 1 mg/mL)
AVFTB	147,38±0,26 ^a	24,82±3,73 ^a
AVFMG	207,08±0,90 ^b	24,63±4,06 ^a
HDFTB	671,31±0,59 ^c	19,44±0,77 ^a
HDFMG	748,68±5,47 ^d	28,79±3,64 ^a
SFEFTB	197,98±1,75 ^e	29,08±2,22 ^a
SFEFMG	41,27±0,88 ^f	18,87±2,56 ^a
ORFTB	18,04±0,61 ^g	81,77±1,64 ^b
ORFMG	12,63±0,47 ^g	81,68±3,03 ^b
BHT	0,17±0,00 ^h	96,99±0,33 ^c
Citronelal	N.A.	19,25±0,65 ^a

AVFTB: Arraste à vapor folhas Três Barras; AVFMG: Arraste à vapor folhas Meneghetti; HDFTB: Hidrodestilação folhas Três Barras; HDFMG: Hidrodestilação folhas folhas Meneghetti; SFEFTB: Extração com fluido supercrítico folhas Três Barras; SFEFMG: Extração com fluido supercrítico folhas Meneghetti; ORFTB: Oleoresina folhas Três Barras; ORFMG: Oleoresina folhas Meneghetti; Média $\pm$ desvio padrão. Médias na mesma coluna, seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si ($p \leq 0,05$); N.A. = Não ativo.

Para o método DPPH, a capacidade antioxidante dos OEs diferiu significativamente conforme o tipo de extração empregada (AV, HD ou SFE) e amostra (FTB ou FMG). Os OEs, de ambas as amostras, obtidos por HD foram os que apresentaram os maiores valores de EC_{50} . Comparando-se os OEs obtidos por AV e SFE de ambas as amostras, nota-se que a SFE FMG foi a que apresentou o menor valor de EC_{50} (41,28±0,88 mg/mL). Na análise da composição química por GC/MS, este foi o extrato que apresentou o menor teor de citronelal (47,59%). Provavelmente, o maior teor dos compostos minoritários neste extrato (inclusive dos sesquiterpenos) e/ou sua sinergia contribuíram para a sua maior capacidade antioxidante.

O antioxidante sintético BHT foi o que apresentou o menor valor de EC_{50} sendo, portanto, o mais efetivo na captura do radical livre seguido pelas ORs de ambas as amostras,

FTB e FMG. As ORs apresentaram melhor atividade em relação aos OEs provavelmente devido à presença de compostos fenólicos. Singh *et al.* (2007) avaliaram a atividade antioxidante dos OEs, (hidrodestilados) e ORs (extraídas com acetona) obtidos a partir das folhas e cascas de canela pelo método DPPH. Das amostras testadas na concentração de 25µL, os extratos que apresentaram as maiores porcentagens de atividade antioxidante foram as ORs obtidas da casca (95,3%) e das folhas (91,2%) sendo seus valores próximos aos dos antioxidantes sintéticos BHA (96,4%) e BHT (94,9). Os OEs da casca e das folhas apresentaram 82,1 e 73,9% enquanto que os compostos E-cinamaldeído e eugenol apresentaram valores de 78,3% e 92,9%, respectivamente. Os autores associaram a maior capacidade antioxidante das ORs, frente aos OEs, à maior quantidade de compostos fenólicos presente nestes extratos. O mesmo comportamento foi observado em nossos ensaios, onde as ORs apresentaram maior capacidade antioxidante em comparação aos OEs que diferiram significativamente entre si (Tabela 5.21).

O composto purificado citronelal não apresentou nenhuma atividade antioxidante, mesmo em altas concentrações como 500 mg/mL. Singh *et al.*, (2012) testaram a atividade antioxidante do OE de *C. citriodora* e dos compostos citronelal, β-citronelol e isopulegol pelo mesmo método. Dentre estes, o citronelal foi o que apresentou o maior valor de EC₅₀, de 1.042,4±41,5 µg/mL enquanto que o do OE foi de 425,4±6,79 µg/mL, o que indica a contribuição dos compostos minoritários na capacidade antioxidante. Diferenças na metodologia utilizada pelos autores em relação a que foi usada neste trabalho, podem ter influenciado no resultado obtido para o composto puro citronelal (Tabela 5.21), mas os resultados conclusivos são os mesmos, pois no trabalho de Singh *et al.*, (2012), a concentração de citronelal para que tenha alguma atividade antioxidante precisa ser extremamente elevada o que reflete na não indicação deste componente para este fim.

Com relação ao método de branqueamento do β-caroteno, verifica-se que os OEs obtidos por AV, HD e SFE e o padrão citronelal não diferiram entre si e apresentaram baixa capacidade de inibição quando testados para uma concentração de 1.000 ppm. Apesar disto, em comparação com o método DPPH, estes OEs exibiram melhor atividade antioxidante em concentrações mais baixas. Sacchetti *et al.* (2005) avaliaram a atividade antioxidante de 11 OEs por diferentes métodos e verificaram o mesmo comportamento para o OE de *E. globulus*. Embora este método seja o mais indicado para avaliar a atividade antioxidante de OEs, Siramon e Ohtami (2007) relataram que a atividade antioxidante dos OEs das folhas de três diferentes clones de *E. camaldulensis*, obtidos por AV, apresentaram melhor atividade

antioxidante quando avaliada pelo método DPPH do que no de branqueamento do β -caroteno, portanto o método utilizado sempre será inerente ao material analisado.

Do mesmo modo que para o DPPH, o antioxidante sintético BHT apresentou a melhor capacidade antioxidante seguido pelas ORs de ambas as amostras quando analisadas suas atividades antioxidantes pelo método de branqueamento do β -caroteno. Apesar da diferença significativa entre a capacidade antioxidante do BHT e das ORs, há de se considerar que o BHT foi testado na sua forma purificada. A OR, na sua forma bruta, contém diversos compostos com potencial antioxidante que podem atuar tanto de forma sinérgica como antagonista, podendo mesmo agir como pró-oxidantes, especificamente na representação dos resultados obtidos nota-se que os compostos das ORs atuaram de forma sinérgica ao ponto de propiciar os melhores valores de atividade, superior ao BHT (Tabela 5.21).

A Figura 5.19 mostra o aumento da capacidade antioxidante com o aumento da concentração dos extratos das amostras FTB e FMG pelos dois métodos testados, DPPH e branqueamento do β -caroteno. Para o método DPPH observa-se um aumento gradativo da atividade antioxidante com a concentração do extrato em uma tendência não linear. O antioxidante sintético BHT apresentou uma atividade máxima (95,1%) na concentração de 1 mg/mL. As ORs das amostras FTB e FMG apresentaram atividade máxima de 71,3 e 88,5%, respectivamente, na concentração de 40 mg/mL. Os extratos das amostras AVFTB, AVFMG e SFE FTB demonstraram possuir uma atividade antioxidante de 80,7, 73,8 e 73,3%, respectivamente, na concentração de 415 mg/mL. Já as amostras HDFTB e HDFMG, na mesma concentração, os valores obtidos foram 44,1 e 32,7%, respectivamente. A baixa capacidade antioxidante dos OEs obtidos por HD pode ser devido ao aquecimento prolongado em contato com a água o que pode induzir a hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou decomposição de outros compostos, diminuindo a atividade biológica (ALMEIDA, 2006).

Para o método de branqueamento do β -caroteno observa-se que, para o antioxidante sintético BHT, a atividade máxima (96,99%) foi alcançada com 1 mg/mL, sendo que para concentrações maiores este exibiu um leve efeito pró-oxidante. Nesta mesma concentração, as ORs exibiram 81,77 e 81,68% de atividade. As amostras AVFMG, AVFTB, SFEFTB e HDFMG mostraram um aumento gradativo na atividade antioxidante até atingirem os valores de 64,29, 46,09, 46,08 e 44,53%, respectivamente, na concentração de 5 mg/mL. As amostras SFEFMG e HDFTB mostraram máxima atividade nas concentrações de 1 mg/mL e 2,5 mg/mL sendo 28,06 e 19,45%, respectivamente. Neste método, o citronelal apresentou uma leve atividade antioxidante de 22,77% quando empregou-se uma concentração de 2,5 mg/mL, estabilizando-se em seguida.

Figura 5.19. Atividade Antioxidante Total (%) das amostras FTB e FMG avaliada pelos métodos (a) DPPH e (b) branqueamento do β -caroteno em diferentes concentrações dos extratos de *C. citriodora* bem como do citronelal purificado e o antioxidante sintético BHT.

A comparação entre os dois métodos mostra que, para o OE e para a OR extraídos das folhas de *C. citriodora*, a atividade antioxidante foi melhor quantificada pelo método de branqueamento do β -caroteno, já que mostrou melhores resultados e comportamento mais coerente. De modo geral, os extratos polares tendem a possuir maior capacidade de captura do radical livre. Porém, a polaridade não consiste em um único parâmetro de influência na atividade antioxidante. As características estruturais dos antioxidantes são mais importantes que a polaridade dos extratos, sendo também influenciada pela composição complexa destes produtos (VEGGI, 2013).

5.4.4 Polifenóis totais e flavonoides totais da OR

A Tabela 5.22 apresenta os resultados de capacidade redutora, pelos métodos de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia, e flavonoides totais das ORs das amostras FTB e FMG.

Tabela 5.22. Conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes na OR das amostras FTB e FMG obtidas por SFE 220 bar e 70°C.

Amostra	Capacidade redutora Folin-Ciocalteu (mg EAG/100g de folhas)	Capacidade redutora Azul da Prússia (mg EC/100g de folhas)	Flavonóides Totais (mg EQ/100g de folhas)
ORFTB	15,76±1,62	74,22±4,03	26,74±3,94
ORFMG	12,92±0,55	84,88±2,40	20,40±0,99

ORFTB: Oleoresina folhas Três Barras; ORFMG: Oleoresina Folhas Meneghetti;

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; EC: Equivalentes de Catequina; EQ: Equivalentes de Quercetina.

As amostras apresentaram um conteúdo de compostos fenólicos bastante variável conforme o método de análise empregado, sendo maior para o método que emprega Azul da Prússia. Além disso, o teor de flavonoides totais foi maior do que o conteúdo de compostos fenólicos totais medido pelo método de Folin-Ciocalteu.

Segundo Reis *et al.* (2012), o reagente de Folin-Ciocalteu contém, em sua composição, complexos ácidos fosfomolibdico/fosfotungstênio. O teste é baseado na transferência de elétrons, em meio alcalino, dos compostos fenólicos e outras espécies redutoras do molibdênio, formando complexos azuis que são monitorados espectrofotometricamente, de acordo com a Equação (5.6).

Para o método Azul da Prússia, o poder de redução é baseado na capacidade dos fenólicos em reduzir a forma férrica amarela para a forma ferrosa azul pela ação dos antioxidantes doadores de elétrons. Quando as espécies antioxidantes são Fe (III) ou $Fe(CN)_6^{3-}$ no composto reagente ferrocianeto, tanto o Fe(II) como o $Fe(CN)_6^{4-}$, são formados como produtos da redução com o antioxidante combinando com outro componente reagente para produzir a cor Azul da Prússia, $KFe[Fe(CN)_6]$ como produto colorido. Assim, quando Fe^{3+} é utilizado com o $Fe(CN)_6^{3-}$ como agente oxidante, tanto um como outro par da reação reagem, ambos gerando o mesmo produto colorido. A cor azul resultante, medida espectrofotometricamente, é dada como linearmente relacionada com a capacidade redutora

dos antioxidantes doadores de elétrons (REIS *et al.*, 2012). A reação química que representa esta reação é apresentada nas equações (5.7) e (5.8).

ou

Assim, os diferentes mecanismos de ação de cada método irão influenciar na quantificação da capacidade redutora do extrato. Queiroz *et al.* (2002) avaliaram os extratos obtidos por extração com solventes orgânicos, acetona-água (AA) e metanol-água (MA), da madeira de aroeira preta com relação ao teor de compostos fenólicos. Do mesma forma que os resultados alcançados neste trabalho, os autores verificaram que o método do Azul da Prússia (AA=55,4 e MA=42,6 mg EAG/g de madeira seca) produziu maiores rendimentos em compostos fenólicos do que o método de Folin-Ciocalteu (AA=43,8 e MA=37,7 mg GAE/g de madeira seca). A natureza química dos fenólicos de plantas varia de substâncias simples à altamente polimerizadas que incluem proporções variáveis de ácidos fenólicos, fenilpropanóides, antocianinas e taninos, entre outros. Eles podem estar complexados com carboidratos, proteínas e outros componentes da planta (NACZK e SHAHIDI, 2004). Assim, os reagentes dos métodos tradicionais, como o Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia, podem reagir com outros compostos além dos fenólicos e os redutores interferentes devem ser removidos antes de se conduzir o ensaio (ANTOLOVICH *et al.*, 1997; NACZK e SHAHIDI, 2004). Isto provavelmente explica os valores encontrados em nossos experimentos, uma vez que as ORs das amostras FTB e FMG foram analisadas em sua forma bruta.

Em se tratando de extratos como as ORs, a adoção de procedimentos para a purificação de classes específicas de compostos, embora trabalhoso, pode ser muito útil para a correta identificação e quantificação dos compostos presentes. De modo geral, na SFE as ORs são obtidas em condições de P e T que proporcionam altas densidades, o que diminui a seletividade do processo e pode aumentar a quantidade de compostos interferentes.

6. Conclusões

Na análise da composição química, os OEs obtidos por AV, HD, e SFE das folhas de *C. citriodora* cultivadas em Torrinha (SP) demonstraram possuir maior teor de citronelal e rendimento em OE do que as cultivadas em São João do Paraíso (MG).

No estudo da influência do método de extração na qualidade do OE, verificou-se que a SFE pode proporcionar extratos de maior qualidade, ou seja, maior teor de citronelal em relação aos métodos convencionais de AV e HD.

Nas condições de processo avaliadas, o aumento da pressão demonstrou ter um efeito positivo sobre o rendimento e no teor de citronelal do OE; a temperatura não demonstrou influência significativa, indicando que baixas temperaturas podem ser utilizadas no processo, o que evita a degradação de compostos termossensíveis e pode reduzir custos operacionais.

As condições que proporcionaram os maiores rendimentos em OE, sem a coextração de pigmentos, para ambas as amostras foi à 100 bar e 60°C. Para a OR os maiores rendimentos foram obtidos quando os maiores valores de pressão e temperatura foram aplicados (220 bar e 70°C).

Através da SFE, foi possível a obtenção de dois extratos, com melhor aproveitamento da matéria-prima em relação aos métodos convencionais. O OE apresentou-se mais concentrado no composto principal e a OR demonstrou possuir potencial antioxidante.

O método do branqueamento do β -caroteno mostrou-se mais adequado para avaliar a capacidade antioxidante dos OEs e ORs de ambas as amostras. Os OEs apresentaram baixa capacidade antioxidante ao contrário das ORs.

Os resultados obtidos nas análises de HPLC, capacidade redutora pelos métodos Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia e no teor de flavonoides da OR não foram conclusivos provavelmente devido ao fato de que o extrato foi testado em sua forma bruta. Assim, embora tenha sido evidenciada a atividade antioxidante e considerada concentração de compostos fenólicos, estes resultados indicam ainda a necessidade de purificação para correta análise de sua composição.

Acredita-se que os resultados aqui apresentados serão essenciais para o direcionamento de pesquisas futuras que visarão a identificação da composição das ORs provenientes das folhas de *C. citriodora*. A identificação da possibilidade de obtenção desta resina fortemente pigmentada das folhas de eucalipto tornam os resultados obtidos neste trabalho inéditos, assim como a sua continuidade.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar a influência da umidade das folhas na SFE. A umidade pode influenciar de diferentes formas no rendimento de extração e depende de fatores relacionados à composição e estrutura da planta.
- Após a otimização das condições de obtenção do OE, escolher a condição de melhor rendimento e aplicar um planejamento experimental sequencial para verificar quais condições proporcionam os maiores rendimentos em OR e qualidade da composição química do extrato.
- Fazer extrações do OE intercaladas com TE e TD; isto pode alterar a estrutura da matriz e liberar o OE além de poder diminuir o TE de contato. Da mesma forma, isto pode reduzir o TD de extração tanto do OE quanto da OR.
- Fazer a modelagem matemática da cinética de extração do OE e OR a partir das folhas bem como do citronelal.
- Fazer a separação das ceras utilizando-se equipamento com vários estágios de separação para verificar o rendimento em ceras e OE e avaliar sua atividade biológica.
- Avaliar a atividade biológica da OR com relação à sua atividade microbiológica e anticancerígena. Atualmente, alguns pesquisadores vêm estudando a atividade da OR das folhas de *C. citriodora* obtida com solventes em diversas células cancerígenas com resultados promissores.
- Realizar a purificação da OR por diferentes metodologias para análise em equipamento HPLC-ESI-MS/MS bem como a otimização das condições de análise. Assim, será possível a identificação completa dos compostos presentes na OR.
- Avaliar a toxicidade da OR *in vivo*.
- Avaliar a estabilidade da OR quanto à sua atividade antioxidante bem como testar sua eficácia em sistemas alimentícios.
- A partir dos testes de estabilidade, verificar a necessidade de microencapsulação de forma a proteger a OR das condições adversas como pH, temperatura, luz e oxigênio.

8. Referências Bibliográficas

- ALBUQUERQUE, L. C. Extração supercrítica de matrizes vegetais oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.
- ALMEIDA, S. Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.). 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- American Botanical Council. Disponível em: <http://cms.herbalgram.org/herbalgram/issue53/article2207.html?ts=1377021818&signature=f463a98121ecbe7764d2e17d70555738>. Acesso em 03/02/2013.
- ANDRADE, A.M.; GOMES, S. S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, vol.7, n.1, p.181-189, 2000.
- ASANOVA, Z. H. K.; SULEIMENOV, E. M.; ATAZHANOVA, G. A.; DEMBITSKII, A. D.; PAK, R. N.; DAR, A.; ADEKENOV, S. M. Biological activity of 1,8-cineole from levant wormwood. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. V. 37, p. 32-30, 2003.
- BAILER, J.; AICHINGER, T.; HACKL, G.; HUEBER, K.; DACHLER, M. Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. **Industrial Crops and Products**. V. 14, p. 229–239, 2001.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**. V 46, p. 446–475, 2008.
- BALASUMDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. V. 99, p. 191–203, 2006.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, 991 p.
- BATISH, D, R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. V. 256, p. 2166-2174, 2008, Índia.
- BERNARDI, M. R.; JUNIOR, M. S.; DANIEL, O.; VITORINO, A. C. T. Crescimento de mudas de *Corymbia citriodora* em função do uso de hidrogel e adubação. **Cerne**. V. 18, p. 67-74, 2012, Brasil.
- BELLETTI, N.; KAMDEM, S. S; TABANELLI, G.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Modeling of combined effects of citral, linalool and β -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**. V. 136, p. 283–289, 2010.

- BHAGAT, M.; SHARMA, V.; SAXENA, A. K. Anti-proliferative effect of leaf extracts of *Eucalyptus citriodora* against human cancer cells in vitro and in vivo. **Indian J Biochem Biophys**. V. 49, p. 451, 2012.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. V. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BOCEVSKA, M.; SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. **J. of Supercritical Fluids**. V. 40, p. 360–367, 2007.
- BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N. *Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Canberra: Inkata, 1991.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm.-Wiss. U. Technol.** V. 30, p. 609-615, 1997.
- BRAGA, N. P. Influência da secagem no rendimento e na composição do óleo essencial das folhas de *E. citriodora*. 2002. 181 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** V. 28, p. 25-30, 1995.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**. V. 67, p. 21–33, 2005.
- BRUNNER, G. Gas extraction : an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes . **New York : Springer, 1994**.
- CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresina. **J. of Supercritical Fluids**. V. 34, p. 163–170, 2005.
- CARLSON, L. H. C.; MACHADO, R. A. F.; SPRICIGO, C. B.; PEREIRA, L. K.; BOLZAN, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**. V. 21, p. 33–39, 2001.
- CARVALHO, R. N. Jr. Supercritical extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**. V. 35, p. 197-204, 2005, Brazil.
- CAVALCANTI, R. N. Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. 2013. 197 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2013.
- CAZES, J. Encyclopedia of chromatography. 3ª ed. Boca Raton: Florida, 2010, 2850 p.

- CASTRO, N. E. A. de. Caracterização fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre o protozoário tripanossomídeo *Herpetomonas samuelpessoai*. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.
- CASTRO, N.E.A.; CARVALHO, G.J.; CARDOSO, M.G.; PIMENTEL, F.A.; CORREA, R.M.; GUIMARÃES, L.G.L. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, V.10, n.1, p.70-75, 2008.
- CCI KK. Antiallergic agent used for preventing and treating allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, atopic dermatitis and asthma, comprises water extract of *Eucalyptus citriodora* and *Cynara scolymus*. Número da patente: JP2003286184-A. Ano: 2004.
- CHOWDHURY, R. R.; FITCH, R. W.; GHOSH, S. K. Efficacy of phytol-derived diterpenoid immunoadjuvants over alum in shaping the murine host's immune response to *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. V. 31, p. 1178– 1186, 2013.
- CLEMENTE, M. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; GOMES, F. T.; PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res.** V. 107, p. 987–992, 2010.
- CIFTCI, O.; OZDEMIR, I.; TANYILDIZI, S.; YILDIZ, S.; OGUZTURK H. Antioxidative effects of curcumin, b-myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. **Toxicology and Industrial Health**. 2011.
- CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 79, p. 213–220, 213-220, 2001.
- COMBRINCK, S.; REGNIERA, T.; KAMATOUB, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**. V. 33, p. 344–349, 2011.
- COURTNEY, J. L.; L'ASSAK, E. V.; SPEIRS, G. B. Leaf wax constituents of some myrtaceous species **Phytochemistry**. V. 22, p. 941-949, 1983.
- CRAMPTON, C.; MOUAHID, A.; TOUDJ, S. A.; LÉPINE, O. BADENS, E. Influence of pretreatment on supercritical CO₂ extraction from *Nannochloropsis oculata*. **J. of Supercritical Fluids**. 2012.
- CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **The Journal of Nutrition**. Symposium on Phytochemicals. 1999.
- DELLA PORTA, G.; TADDEO, R.; D'URSO, E. REVERCHON, E. Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO₂ extraction. **Lebensm- Wiss. U. Technol.** V. 31, p. 454-460, 1998.
- DELLA PORTA, G.; S. PORCEDDA, S.; MARONGIU, B.; REVERCHON, E. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction . **Flavour and Fragrance Journal**. V. 14, p. 214-218, 1999.

- DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.* V. 57, 4313-8, 2009.
- DZINGELEVIČIUS, N.; MARUŠKA, A.; RAGAŽINSKIENĖ, O.; OBELEVIČIUS, K. Optimization of hop essential oil extraction by means of supercritical CO₂. *Biologija*. V. 57, p. 63–69, 2011.
- DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; FARAGO, P. V.; PAULA, J. P.; NAKASHIMA, T. Anatomia foliar de *Corymbia calophylla* (Lindl.) K.D.Hill & L.A.S. Johnson, Myrtaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* V. 20, p. 361-367, 2010.
- DRAPEAU, J.; ROSSANO, M.; TOURAUD, D.; OBERMAYR, U.; GEIER, M.; ROSE, A.; KUNZ, W. Green synthesis of para-Menthane-3,8-diol from *Eucalyptus citriodora*: Application for repellent products. *C. R. Chimie*. V. 14, p. 629–635, 2011.
- DUARTE, H. S. M. Crescimento e teor de óleo essencial em plantas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* tratadas com homeopatia. 202 f. (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- DUH, P.; CHEN, Z.; LEE, S.; LIN, T.; WANG, Y.; YEN, W.; KUO, L.; CHU, H. Antiproliferative activity and apoptosis induction of *Eucalyptus citriodora* resin and its major bioactive compound in melanoma B16F10 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 60, p. 7866-7872, 2012.
- ELAISSI, A.; SALAH, K. H.; NABROUK, S.; LARBI, K. M.; CHEMLI, R.; SKHIRI. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. *Food Chemistry*, 2011.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.
- FAO. Flavours and fragrances of plant origin: Eucalyptus oil. FAO Document Repository. Acessado em: 01/04/2012: <http://www.fao.org/docrep/v5350e/v5350e07.htm>
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenácea*. *European Journal of Pharmacology*. V. 569, p. 228–236, 2007.
- FERRARINI, S. R.; DUARTE, M. D.; ROSA, R. G.; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V. L. S. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and b-amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. *Veterinary Parasitology*. V. 157, p. 149–153, 2008.
- FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*. 2012
- FREITAS, M. O.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Polyphenol compounds of the kino of *Eucalyptus citriodora*. *Química Nova*. V. 30, p. 1926-1929, 2007.

- GARLET, T. M. B. Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha* L. (Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio. 2007. 113 f. (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.
- JOACHIN D. GBENOU, J. D.; AHOUNOU, J. F.; AKAKPO, H. B.; LALEYE, A.; YAYI, E.; GBAGUIDI, F.; BABA-MOUSSA, L.; DARBOUX, R.; DANSOU, P.; MOUDACHIROU, M.; KOTCHONI, S. O. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Mol Biol Rep.** V. 40, p. 1127–1134, 2013.
- GHASEMI, E.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N.; SEFIDKON, F. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia sibieri*. **Journal of Food Engineering.** V. 79, p. 306-311, 2007.
- GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry.** V. 119, p. 731-737, 2010.
- GRABMANN, J.; SCHNEIDER, D.; WEISER, D.; ELSTNER, E. F. Antioxidative effects of lemon oil and its components on copper induced oxidation of low density lipoprotein. **Arzneimittelforsch.** V. 51, p. 799–805, 2001.
- GRABMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiol. Biochem.** V. 40, p. 471–478, 2002.
- GUO, Q.; YANG, X. Cypellocarpin C and other compounds from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. **Biochem. Syst. Ecol.** V. 34, p. 543–545, 2006.
- GUPTA, S. D. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton: CRC Taylor e Francis, 2011, 380 p.
- HAKKI, Z.; CAO, B.; HESKES, A.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; WILLIAMS, S. J. Synthesis of the monoterpenoid esters cypellocarpin C and cuniloside B and evidence for their widespread occurrence in Eucalyptus. **Carbohydrate Research.** 345, 2010, p. 2079–2084.
- HATAMI, T.; CAVALCANTI, R. N.; TAKEUCHI, T. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) flowers: Kinetic, experiments and modeling. **J. of Supercritical Fluids.** V. 65, p. 71–77, 2012.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.** V. 53, p. 1841-1856, 2005.
- ELMHALLI, F. H.; PALSSON, K.; ÖRBERG, J.; JAENSON, T. G. T. Acaricidal effects of *Corymbia citriodora* oil containing para-menthane-3,8-diol against nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol.** V. 48, p. 251–262, 2008.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed. Artimed, 2010, 900 p.

IPEF. Disponível em <<http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/citriodora.asp>>. Acesso em: 01/03/2013.

IVANOVIC, J.; ZIZOVIC, I.; RISTIC, M.; STAMENIC, M.; SKALA, D. The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction. **J. of Supercritical Fluids**. V. 55, 983–991, 2011.

KANAKDANDE, D. BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modiWed starch. **Carbohydrate Polymers**, V. 67, p. 536–541, 2007.

KASSAMA, L. S.; SHI, J.; MITTAL, G. S. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. **Separation and Purification Technology**. V. 60, p. 278–284, 2008.

LIMA, P. R.; MELO, T. S.; CARVALHO, K. M. M. B.; OLIVEIRA, Í. B.; ARRUDA, B. R.; CASTRO BRITO, G. A. B.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. 1,8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice. *Life Sciences*. V. 92 1195–1201, 2013.

LIZA, M. S.; RAHMAN, R. A.; MANDANA, B.; JINAP, S.; RAHMAT, A.; ZAIDUL, I. S. M.; HAMID, A. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). **Food and Bioproducts Processing**. V. 88, p. 319-326, 2010.

KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Eucalypt oils for the control of *Parthenium* (*Parthenium hysterophorus* L.). *Crop Production*. V. 17, p. 119-122, 1998.

KOCH, K.; KLAUS DIETER HARTMANN, K. D. H.; SCHREIBER, L.; BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C. Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. *Environmental and Experimental Botany*. V. 56, p. 1–9, 2006.

LAMBERTON, J.A. The occurrence of 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-6-methylflavone in eucalypt waxes. **Aust. J. Chem.** V. 17, p. 692-6, 1964.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of *b*-caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 59, p. 1643–1647, 2007.

LEFFINGWELL, J. C. Cooling ingredients and their mechanism of action. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3 ed. New York: Informa Healthcare, 2009.

LENARDÃO, E. J.; BOTTESELLE, G. V.; AZAMBUJA, F.; PERIN, G.; JACOB, G. Citronellal as key compound in organic synthesis. **Tetrahedron**. V. 63, p. 6671–6712, 2007.

LOCHERA, C.; CURRIEB, L. Revisiting kinos—An Australian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 128, p. 259–267, 2010.

- MACEDO, I. T. F. Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp sobre nematoides gastrintestinais. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2008.
- MAIA, A. I. V.; TORRES, M. C. M.; PESSOA, O. D. L.; MENEZES, J. E. S. A.; COSTA, S. M. O.; NOGUEIRA, V. L. R.; MELO, V. M. M.; SOUZA, E. B.; CAVALCANTE, M. G. B.; E MARIA ROSE JANE R. ALBUQUERQUE, M. R. J. R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* E *Vernonia brasiliiana*: composição química e atividade biológica. **Quim. Nova**. V. 33, p. 584-586, 2010.
- MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; MUNIZ, L. B.; SILVA, E. Y. Y. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema beta-caroteno/ácido linoléico. Comunicado técnico 68, Embrapa, 2009.
- McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOT, P. Unit Operations of Chemical Engineering. 7ª ed. New York: MacGraw-hill Companies, 2005. 1140 p.
- MICHIELIN, E. M. Z.; ROSSO, S. R.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G. R.; CORAZZA, M. L. J.; OLIVEIRA, V.; FERREIRA, S. R. S. High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene. **J. Chem. Thermodynamics**. V. 41, p. 130–137, 2009.
- Milde, J.; Elstner, E. F.; Graßmann, J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, γ -terpinene, and ascorbic acid. **Phytomedicine**. V. 11, p. 105–113, 2004.
- MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F. C.; SANTOSA, R. C.; ROCHA, L. R. M.; MARQUES, M. O.; VILEGASC, W.; HIRUMA-LIMA, C. H. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**. V. 180, p. 499–505, 2009.
- MIYASHITA, M.; SADZUKA, Y. Effect of linalool as a component of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. **Food and Chemical Toxicology**. V. 53, p. 174–179, 2013.
- MOURA, P. M.; PRADO, G. H. C.; MEIRELES, M. A. A.; PEREIRA, C. G. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **J. of Supercritical Fluids**. V. 62, p. 116– 122, 2012.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUES, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑES, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**. V. 72, p. 145-171, 2001
- MUKHOPADHYAY M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton: CRC Press, p. 132, 133, 2000.
- NASCIMENTO E SANTOS, D. Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora*). 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.
- OJEDA-SANA, A. M.; BAREN, C. M. VAN; ELECHOSA, M. A.; JUÁREZ, M. A.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main componentes. **Food Control**. V. 31, p. 189-195, 2013.

- OLIVO, C. J.; AGNOLIN, C. A.; PARRA, C. L. C.; VOGEL, F. S. F.; RICHARDS, N. S. P. S.; PELLEGRINI, L. G.; WEBE, A.; PIVOTO, F.; ARAUJO, L. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. **Ciência Rural**. V. 43, p. 331-337, 2013.
- OLIVEIRA, E. L. G.; SILVESTRE, ARMANDO J. D.; SILVA, C. M. Review of kinetic models for supercritical fluid extraction. **Chemical Engineering Research and Design**. V. 89, p. 1104-1117, 2011.
- OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural Antioxidants Isolated from *Eucalyptus* Leaf Waxes. **J. Agric. Food Chem.** V. 33, 1985.
- PARK, S.; LIM, Y. K.; FREIRE, M. O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**. V. 18, p. 369-372, 2012.
- PATEL D. K.; KUMAR, R.; LALOO, D.; HEMALATHA, S. Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. P. 411-420, 2012.
- PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTI, M. D. L. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**. V. 9, p. 721-726, 2002.
- PEREZ, R. M.; ZAVALA, M. A.; PEREZ, S.; PEREZ, C. Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. **Phytomedicine**. V. 5, p. 55-75, 1998.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food Bioprocess Technol.** V. 3, p. 340-372, 2010.
- PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. Método para Determinação de Umidade de Plantas Aromáticas. Embrapa- Comunicado técnico *on line*, n 136. ISSN 1679-6535, 2008.
- PINEDO, D. N. H. Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. 1989. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.
- Psmicrographs. Disponível em: <<http://www.psmicrographs.co.uk/eucalyptus-leaf-section--eucalyptus-citriodora-/science-image/80015352>>. Acesso em: 30/01/2013.
- Queiroz, C. R. A. A.; Moraes, S. A. L.; Nascimento, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **R. Árvore**. V. 26, p. 485-492, 2002.
- RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**. V. 73, p. 261-262, 2002.
- Reis-Vasco, E. M. C.; Coelho, J. A. P.; Palavra, A. M. F.; Marrone, C.; Reverchon, E. Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction. **Chemical Engineering Science**. V. 55, 2917-2922, 2000.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products **Journal of Supercritical Fluids**. V. 10, p. 1-37, 1997.

REVERCHON, E.; MARCO, I. de. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**. V 38, p. 146–166, 2006.

Revista da Madeira. Disponível em:

<http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1380&subject=Eucalipto&title=%D3leo%20de%20eucalipto%20se%20destaca%20entre%20os%20n%E3o-madeireiros>. (Acessado em 31 de março de 2013).

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. Química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

RIBEIRO, M. A.; BERNARDO-GIL, M. G.; ESQUÍVEL, M. M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercritical Fluids**. V. 21, p. 51–60, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; NICHOLAS, J. M.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**. V. 2, 1997.

RICE-EVANS, C. Flavonoid Antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**. V. 8, p. 797-807, 2001.

ROSSI, T. Estudo do potencial de uso do resíduo efluente gerado da destilação do óleo de folhas de eucalipto (*Corymbia citriodora* (Hook) Pryor e Johnsin 1976), como corante natural para o tingimento têxtil de algodão. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

EL-ROKIEK, E.; EID, R. A. Allelopathic effects of *Eucalyptus citriodora* on amaryllis and associated grassy weed. **Planta Daninha**. V. 27, p. 887-899, 2009.

ROSSO, S. Qualidade da madeira de três espécies de Eucalyptus resultante da combinação dos métodos de secagem ao ar livre e convencional. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ROZZI, N., L.; PHIPPEN, W.; SIMON, J. E.; SINGH, R. K. Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals. **Lebensm- Wiss. U. Technol.** V. 35, p. 319-324, 2002.

ROZZA, A. L.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; ORTIZ, M.; MARQUES, M.; BAUAB, T. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-Biological Interactions**. V. 189, p. 82–89, 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado técnico 127. Embrapa. 2007.

- SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M.; JINAP, S.; KARIM, A. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**. V. 95, p. 240–253, 2009.
- SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J. K.; CHANOTIYA, C. S.; SHANKER, K.; NEGI, A. S.; Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V. 20, p. 508–512, 2010.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. V. 91, p. 621–632, 2005.
- SANDLER, S. I.; Chemical and Engineering Thermodynamics. 2ª Ed. Wiley Series, 1989, p. 622.
- SANTOS, D.; MATARAZZO, P. H. M.; SILVA, D. F. P.; SIQUEIRA, D. L.; SANTOS, D. C. M. LUCENA, C. C. Caracterização físico-química de frutos cítricos apirênicos produzidos em Viçosa, Minas Gerais. **Rev. Ceres, Viçosa**. V. 57, p. 393–400, 2010.
- SETIA, N.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. **Journal of Environmental Biology**. V. 28, p. 63–66, 2007.
- SIDDIQUE, Y. H.; MUJTABA, S. F.; JYOTI, S.; NAZ, F. GC–MS analysis of *Eucalyptus citriodora* leaf extract and its role on the dietary supplementation in transgenic Drosophila model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**. V. 55, p. 29–35, 2013.
- SINGH, G.; MAURYA, S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**. V. 45, p. 1650–1661, 2007.
- SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiber officinale. **Food and Chemical Toxicology**. V. 46, p. 3295–3302, 2008.
- SINGH, H. P.; KAUR, S.; NEGI, K.; KUMARI, S.; SAINI, V.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT - Food Science and Technology**. V. 48, p. 237–241, 2012.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.** V. 16, p. 144–58, 1965.
- Siramon, P.; Ohtani, Y. Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. **Journal Wood Science**. V. 53, p. 498–504, 2007.
- SHEN, K.; CHEN, Z.; DUH, P. Cytotoxic Effect of *Eucalyptus citriodora* Resin on Human Hepatoma HepG2 Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, V. 40, n. 2, p. 399–413, 2012.
- SHI, J. Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technology. Boca Raton: Taylor e Francis, 2007.

- QUISPE-CONDORI, S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenácea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare*. 2005. 203 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2005.
- SOVOVÁ, H.; SÁFRTOVÁ, M.; BARTLOVÁ, M.; OPLETAL, L. Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. **J. of Supercritical Fluids**. V. 30, p. 213–224, 2004.
- SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **J. of Supercritical Fluids**. V. 33, p. 35–52, 2005.
- Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2008. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>
- SHAHWAR, D.; ASAM RAZA, M. A.; BUKHARI, S.; BUKHARI, G. Ferric reducing antioxidant power of essential oils extracted from Eucalyptus and Curcuma species. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. P. 1633-1636, 2012.
- STEINBAUER, M. J.; DAVIES, N. W.; GAERTNER, C.; DERRIDJ, S. Epicuticular waxes and plant primary metabolites on the surfaces of juvenile *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* (Myrtaceae) leaves. **Australian Journal of Botany**. V. 57, 474–485, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.
- TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculate. **Letters in Applied Microbiology**. V. 39, p. 60–64, 2004.
- TONON, R. V. Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto. 2009. 242 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.
- TZIA, C.; LIADAKIS, G. Extraction Optimization in Food Engineering. New York: Taylor & Francis, 2005. 456 p.
- UEDO, N.; TATSUTA, M.; IISHI, H. BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Cancer Letters**. V. 137, p. 131-136, 1999.
- UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. **Journal of Food Engineering**. V. 65, p. 55-66, 2004.
- VAGHASIYA, Y.; NAIR, R.; CHANDA, S. Antibacterial and preliminary phytochemical and physico-chemical analysis of *Eucalyptus citriodora* Hook leaf. **Natural Product Research**. V. 22, p. 754-762, 2008.
- VEGGI, P. C. Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom. 2013. 189 f. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

VIANA, R. G.; SANTOS, L. D.; DEMUNER, A. J.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, E. A.; MACHADO, A. F. L.; SANTOS, M. V. Quantification and Chemical Composition of Epicuticular Wax of Eucalyptus Leaves. **Planta Daninha**. V. 28, p. 753-758, 2010.

VICKERY, M.; VICKERY, B. Secondary Plant Metabolism. Hong Kong: The MacMillan Press LTDA, 1981.

ALEXIS VISENTÍN, A.; CISMONDI, M.; MAESTRI, D. Supercritical CO₂ fractionation of rosemary ethanolic oleoresins as a method to improve carnosic acid recovery. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. V. 12, p. 142–145, 2011.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de Eucalipto. Documentos Florestais, n. 17, 30p. 2003.
VERSCHUERE, M; SANDRA, P.; DAVID, F. Fractionation by SFE and microcolumn analysis of the essential oil and the bitter principles of hops. **J. Chromatogr Sci**. V. 30, p. 388-91, 1992.

MARTIUS, S. VON; HAMMER, K.A.; LOCHER, C. Chemical characteristics and antimicrobial effects of some Eucalyptus kinos. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 144, p. 293–299, 2012.

WANG, H.; LIU, Y.; WEI, S.; YAN, Z. Application of response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn. **Food Chemistry**. V. 132, p. 582–587, 2012.

WANG, H.; LIU, Y.; WEI, S.; YAN, Z. Application of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn. **Food Chemistry**. V. 132, p. 582-587, 2012.

WILLIAMS, C.; PENG, Y.; DUNNE, R. Eucalyptus oils as green collectors in gold flotation. **Minerals Engineering**. V. 42, p. 62–67, 2013.

WIRTHENSOHN, M. G.; SEDGLY, M.; JONES, G. P. Epicuticular wax of juvenile Eucalyptus leaves and headspace analysis of leaf volatiles. **Journal of Essential Oil Research**. V. 12, p. 401-411, 2011.

9. Anexos

9.1 Outras atividades desenvolvidas

Durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado outras atividades foram desenvolvidas, dentre elas a participação com apresentação oral do trabalho intitulado “Extraction of essential oil and oleoresin from *Eucalyptus citriodora* leaves using near and supercritical CO₂” no 10th International Symposium on Supercritical Fluids realizado em San Francisco, California, EUA que ocorreu no período de 13-16 de Maio de 2012.

Extraction of essential oil and oleoresin from *Eucalyptus citriodora* leaves using sub and supercritical CO₂

Mirelle Dogenski*, Ana Carolina Velho, Débora Nascimento e Santos,
Nilson Ferreira, Alessandra Lopes de Oliveira

University of São Paulo, Department of Food Engineering, Pirassununga, São Paulo, Brazil 13635-900

Corresponding author: alelopes@usp.br; Phone: +55 (19) 35654280

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effects of pressure, temperature and density of CO₂ in essential oil and oleoresin yield of *E. citriodora* using a response-surface methodology. The eucalyptus leaves were first subjected to subcritical extraction conditions in which the essential oil was extracted and then using the same material packaged in the extractor, the conditions were switched to supercritical and oleoresin was then obtained. The sequence of sub to supercritical extraction was made at random following a central composite rotational design (CCRD). The higher pure essential oil yield was 1.66% (100 bar, 60°C and ρ_{CO_2} of 403.16 g.cm⁻³ for this condition) and yield in sequential supercritical condition was 2.98% (180 bar, 60°C and 689.31 g.cm⁻³) totaling 4.64% in extracts. For the oleoresin, which contained intense yellow pigmentation, the highest yield was 4.28% (220 bar, 70°C and 696.53 g.cm⁻³), whereas the yield in earlier extraction was 0.92% (80 bar, 50°C and 219.71 g.cm⁻³) in essential oil, totaling 5.2% in extracts. The essential oil yield was superior to that obtained commercially via hydrodistillation (1-1.6%). Preliminary analysis of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) indicated high citronellal yields (~90%), the main compound of *E. citriodora* essential oil. The results suggest that the application of supercritical technology for extraction of *E. citriodora* essential oil provides a essential oil rich in citronellal, free of off-flavors and good yields. The biological activities of eucalyptus essential oil are already known and the strong yellow pigmentation of the oleoresin indicates the presence of antioxidants in the extract. The confirmation of this hypothesis may show that the use of sub and supercritical extractions can provide two products with biological activities using a single process, featuring technological innovation in obtaining extracts of natural and typically Brazilian products.

INTRODUCTION

Brazil has a prominent place in the production of eucalyptus essential oils, along with India, China and Indonesia, which are considered the four major world producers. The largest consumers are the USA (40%) and EU (30%), France leading imports [1] [2]. The genus *Eucalyptus*, *Myrtaceae* family, is composed of species with multiple uses. The wood can be used as poles, fuel for the steel industry, in furniture industry, in civil construction, honey and pulp production and eucalyptus leaves are used for essential oils extraction. In Brazil, eucalyptus species cultivated for essential oil production are *E. globulus*, *E. staigeriana* and *E. citriodora* being the latter the most widely cultivated in the country, as it is less susceptible to soil and climatic variations [2] [3].

The essential oil of *E. citriodora* is an input of great demand in the market, composing products such as flavoring, soaps, toothpastes, detergents, sweets, perfumes, deodorants, disinfectants, waxes, sachets, insecticides, repellents, etc. [4]. Besides being an important commodity in the fragrance industry, the citronellal, the main compound of this essential oil is used as a key compound in numerous reactions of organic synthesis for insertion and/or induction of chirality in complex molecules due to its high versatility [5]. Several studies have also shown antimicrobial and antifungal properties of essential oils against a wide range of microorganisms [6] [7] [8] [9].

The essential oils of plants are usually obtained by hydrodistillation, steam distillation or solvent extraction. Concerning the *E. citriodora* essential oil, normally obtained by steam distillation, yields range from 1 to 1.6% and the concentration of citronellal is between 65-85%. In Brazil, this oil is traded crude or based on the performance of its main compound [2]. However, these techniques have several disadvantages, such as low yield, time consuming process, loss of volatile compounds, degradation of thermo-sensitive compounds and few adjustable parameters to control the process selectivity. Therefore, the search for extraction techniques with high efficiency and selectivity is desirable [10].

The supercritical fluid extraction (SFE) has emerged as a viable alternative to conventional methods to obtain essential oils [11]. The SFE has several advantages: selectivity, environmentally safe, fast and better reproducibility among others. CO₂ is the most used solvent in SFE because of its various advantages, as it is non-flammable, non-toxic, chemically inert, has high availability, low cost, is considered GRAS (Generally Regarded As Safe) and has a critical point of 31.06°C and 73.8 bar, easily obtained on industrial scale [10] [12] [13].

In addition to the essential oil, the oleoresin can also be obtained by SFE. In general, selective sequential extraction and fractionation of essential oils, oleoresins and pigments are possible with changes in the conditions of extraction with supercritical CO₂ after the exhaustion of each fraction [13]. Several studies with different types of plants have shown a high bioactivity in such extracts due to the presence of antioxidant compounds and/or antimicrobials. Currently, there is concern in replacing synthetic antioxidants by natural ones and oleoresins has emerged as an alternative. Recent identification of the oleoresins compounds obtained from various species of eucalyptus has shown the presence of compounds with antitumor activity [14] [16].

Although Brazil has its importance in global production, these oils suffer lack of quality standards maintenance, have low national coverage and low government investments in the sector [1]. There is an urgent need for the strategic development of research to increase production capacity, increasing biomass productivity, yield and oil quality to ensure competitiveness and stimulate the sector [16]. These factors coupled with the SFE advantages were the motivations for this research.

Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of extraction conditions (Temperature and Pressure) in the amount of essential oil and citronellal concentration obtained by SFE and the quantification of oleoresin.

MATERIALS AND METHODS

Materials

E. citriodora leaves and samples of essential oil and its corresponding oil obtained by steam distillation were kindly provided by industry Três Barras (Torrinha, SP) in April 2011. The intact leaves, after separated from the larger branches, were stored in plastic bags at -18°C, whereas the sample of essential oil was stored at 4°C for subsequent analysis. The pattern of 95% citronellal was purchased from Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). The purity of the CO₂ used in the extraction was 99.9%.

For the extractions, leaves and smaller branches were shredded. The grinding of the material was avoided because during this process, due to high volatility and fragile structure of the leaves, the volatiles are lost to the environment, lowering the final yield of the extract [19] [17].

Moisture content of *E. citriodora* leaves

The moisture content analysis was performed by distillation using dichloromethane as organic solvent [19]. The analyzes were performed in triplicate. The moisture content (%) was determined by the relationship shown in equation (1):

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{V \text{ (ml)}}{m \text{ (g)}} \times 100 \quad (1)$$

where V is the volume of water and m is the amount of sample.

Apparent density

The apparent density of leaves, equation (2), was determined empirically as the ratio between the mass of the conditioned leaves in fixed bed extractor volume (300cm³). The leaves were packed into the extractor until it was completely filled. Then, these leaves were removed and weighed. The procedure was repeated 10 times and the average value of weights (53.12 ± 2.26 g) was the amount of raw material used in all assays.

$$\rho_{ap} = \frac{m}{V} \quad (2)$$

where m is the mass of the leaves (g) and V the extractor internal volume (cm³).

Hydrodistillation

The hydrodistillation of the leaves was made by adding 40 g of the material and 500 ml of distilled water in a 1000 ml volumetric flask attached to a Clevenger type device for 1 hour. The hydrodistillation was performed in triplicate. The essential oil was recovered and stored at 4°C for posterior analysis.

Experimental design and extraction with CO₂ sub and supercritical

The eucalyptus leaves were submitted to the extraction process following a central composite rotational design (CCRD) 2² with two variables (pressure and temperature). The extractions occurred in two phases, under conditions that included the states of the sub and supercritical CO₂. In the first phase the CO₂ in subcritical state condition was applied to extract volatiles. In the second phase of extraction, with the same material wrapped in phase 1, supercritical conditions was applied to extract oleoresin rich in pigments.

Two experimental designs were developed, covering ranges of P and T that were specific to each phase. The experimental designs were called CCD-SUB for the essential oil and CCD-SUPER for oleoresin, and are shown in Table 1.

The extraction consisted in providing the contact of eucalyptus leaves in a fixed bed extractor for different conditions of P and T studied. The extraction of the essential oil in subcritical conditions lasted 4 hours and the period of static balance was 30 minutes, determined in preliminary tests. For the oleoresin, after modification of the system for supercritical conditions, the dynamic period was 4 hours with no static period. The temperature was controlled by thermostatic bath in which the pump was immersed. The system pressure was controlled by the drive fluid pump (Model S-100-AA, Eldex, Napa, CA) carrying the fluid to the extractor by manual control of the micrometer valve (Autoclave Engineers, 10VRMM2812) at the system output. The extraction equipment, consists of the pump, control valves, the cylinder stores the liquid CO₂, a cooling system to ensure that the liquid CO₂ reaches the pressurizing pump and avoid cavitations, a reservoir (tank lung) that stores the pressurized CO₂ and serves to equalize the P in fixed bed extractor, control valves, the collection system and gas flow meter at the output of the system. The collection flask was kept in an ice bath to prevent degradation of sensitive compounds.

Analysis of GC/MS

The volatile composition of essential oils obtained by steam distillation (provided by Três Barras industry) and supercritical fluid in this study was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) (QP 2010 Plus, Shimadzu, JP) with autosampler (AOC-5000, SWI). A RtxR-5MS capillary column was used (30m x 0.25mm id x 0.25 mM DF, 5% dimethylpolysiloxane difenil/95%) (Restek, USA) and Helium as carrier gas, the internal pressure of 60 psi. 1 µl of extract, diluted in dichloromethane in proportion of 1%, was injected at a split ratio of 1:10. The injector temperature was 220°C and the interface between the ion source and the column was 250°C. The furnace temperature was regulated so as to obtain a linear 60-246°C in a gradient of 3°C per minute [20]. The ionization energy was 70 eV source, and the mass scan range was 50-500 m/z. Treatment of spectra was done using software GC/MS Solutions V. 2.5 that has a database libraries NIST 08 and NIST 08s.

RESULTS AND DISCUSSION

The moisture content from the eucalyptus leaves was 15.3±0.05% and apparent density of material was 0.177 g.cm⁻³. The yield of the steam distillation was 1.6±0.15, i. e., similar performance is obtained commercially (from 1 to 1.6%).

Essential oil yield

The values of the essential oil yield obtained for each test are shown in Table 1.

In the analysis of the specific essential oil yield (CCD-SUB), tests 1, 3, 4, 5, 8 and the central points, 9, 10 and 11, whose yield ranged from 0.39% to 1.66%, the extract obtained had basically essential oil and it looked clear and transparent. In the experiments whose yields were higher (tests 2, 6 and 7), between 3.0 to 3.67%, the solvent had a greater power of high molecular weight compounds solvation and this was influenced by the increase of fluid density. The extract of test 7, with 3.0% of yield, had a light yellow pigment and was fully liquid at ambient temperature. For the tests 2 and 6, with a yield of 3.48% and 3.67%, respectively, there was oleoresin co-extraction. In these tests, the higher fluid density caused greater amount of co-extracted oleoresin. The progressive solubility increase of high molecular weight compounds with the increase of solvent density was already demonstrated in scientific literature [21]. Variations in P and T, besides enabling different values for the fluid density, also modify other thermodynamic properties of the solvent; increasing or decreasing their affinity for certain compounds [13].

The waxes co-extraction, also known as paraffinic compounds (solid at room temperature and white in color), was observed in addition to the essential oil. There was presence of waxes in almost all tests. Waxes are located on the surface and not related to any leaf structure, so they are very easily extracted [22] [23].

Table 1. Matrix of central composite rotational design (CCRD) for two variables in the study of the effect of temperature (T) and pressure (P) on the yield of essential oil of eucalyptus, citronellal and concentration of oleoresin - Variables coded and real.

CCD-SUB							
Test	Coded Variable		Variable		ρCO_2 (g×m ⁻³)	Yield (%)	Citronella l concentration (%)
	P	T	P (bar)	T (°C)			
1	-1	-1	60	40	149,4	0,52	82,1
2	1	-1	100	40	632,3	3,67	90,4
3	-1	1	60	60	124,9	0,39	68,6
4	1	1	100	60	291,5	1,66	80
5	-1	1,41	51,8	50	104,9	0,45	42,6
6	1	1,41	108,2	50	390,9	3,48	92,4
7	-1,41	0	80	35,9	443,3	3	88,1
8	1,41	0	80	64,1	183,6	0,56	73,9
9*	0	0	80	50	219,7	1,03	85,1
10*	0	0	80	50	219,7	1,16	89,3
11*	0	0	80	50	219,7	0,92	83,7
CCD-SUPER							
Earlier test	Test	Coded variables		Variables		ρCO_2 (g×m ⁻³)	Yield (%)
		P	T	P (bar)	T (°C)		
9	12	-1	-1	140	50	675	2,53
6	13	1	-1	220	50	807,99	1,46
1	14	-1	1	140	70	460,93	2,55
11	15	1	1	240	70	696,53	4,28
5	16	-1	-1,41	123,6	60	439,35	2,75
3	17	1	1,41	236,4	60	765,94	1,77
7	18	-1,41	0	180	45,9	791,12	1,51
8	19	1,41	0	180	74,1	585,05	3,76
4	20*	0	0	180	60	689,31	2,98
2	21*	0	0	180	60	689,31	1,32
10	22*	0	0	180	60	689,31	3

Statistical analysis of essential oil yield (Y) showed that a significant first order predictive model can be used to describe their behavior as a function of the P and T variables.

Adjusting models of the studied variables under best conditions results could be described with a linear model (Equation 3).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (3)$$

where Y is the response prediction, β_0 is the coefficient of intercession, β_i are the linear terms, β_{ij} are the interaction terms, x_i and x_j are the coded levels of the independent variables.

Statistical analysis of the CCD-SUB and CCD-SUPER was performed using the Statistica V. 7.0 program with a confidence level of 95%. The statistically significant parameters were used to analyze the behavior of the chosen model.

The influence of the variables in a Pareto diagram (Figure 1) shows that P considerably influenced the extract yield. An increase in P results in an increase in fluid density, occasioning a higher solute solubility. There was no influence of temperature (T) or interaction between variables ($P \times T$).

In ANOVA, the first order effects analyzed showed significant influence at 95% confidence level, indicating that at least one of the variables have significant influence on the process and consequently, on the model derived from experimental data.

The linear model calculated using the yield data was statistically significant ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) and predictive since the determination coefficient (R^2) was 0.93.

$$R = 1,336 + 1,105P - 0,535T - 0,470PT \quad (4)$$

The response surface generated by the linear model (equation 4) (Figure 2) shows the behavior of variables in the essential oil yield. The conditions that gave a higher yield, within the studied P and T ranges, correspond to the ones of high P and low T (above 80 bar and below 50°C). These conditions are favorable to obtain thermo-sensitive substances when compared to conventional extraction process by steam distillation. Furthermore, the use of low temperatures in the process can minimize operating costs.

Figure 1. Pareto diagram of the main effects of the variables in the study of essential oil yield of *E. citriodora* (CCD-SUB).

Table 2. ANOVA for the first order model of the CCRD for yield (%) extracts of *E. citriodora* (CCD-SUB).

Factor	Sum of squares	Degree Freedom	Medium square	F_{calc}	F_{list}
Regression	6,9126	3	2,3042	13,8723	9,28
Residue	0,4984	3	0,1661		
Total	7,4110	6

Figure 2. Response surface for the essential oil yield (%).

Oleoresin yield

Even after essential oil extraction using sub-critical CO₂ conditions, other extracts mainly composed of pigments were obtained from eucalyptus leaves (Figure 3). The relatively high yield values and the experimental design randomly applied are shown in Table 1. The extract obtained by supercritical CO₂ conditions, the higher yield (4.28%) occurred when we used 240 bar and 70°C (test 15). The previous extraction (test 11/CDD-SUB) of the same material packed, yielded 0.92% of essential oil. In the supercritical CO₂ extraction study of *E. globulus* essential oil, the condition for a higher yield (2.4%) occurred at 90 bar, 50°C and 240 min., a condition which prevented co-extraction of undesirable components, except waxes. After extraction, using the same material, the conditions were changed to 200 bar and 50°C obtaining a dark orange solid extract with 0.74% yield [25].

Statistical analysis of oleoresin yield (Y) the linear and quadratic models tested were not able to describe their behavior as a function of the variables P and T. At 95% confidence F_{calc} values were lower than F_{list} and determination coefficients were low ($R^2 = 0.67$ for the linear model and $R^2 = 0.45$ for the quadratic model). Therefore, the models were not significant or predictive and the response surface could not be generated with accuracy.

Figure 3. (a) Essential oil from the test 7 (1) and test 4 (2); (b) Oleoresin from test 15.

Concentration of citronellal

Analysis of GC/MS, showed that essential oils were high in citronellal yields, except for tests 3, 5 and 8 (Table 1). The higher citronellal concentration was obtained in test 6, at 108.2 bar and 50°C, in which there was oleoresin co-extraction. In this condition CO₂ density (390.9 g.m⁻³) is relatively high, which occurred by an increased in pressure. It provided the pigments co-extraction, but also an increase in citronellal concentration. Normally, the density increase, depending on the extraction condition, can decrease the oxygenated terpenes concentration in the extract; but it occurs at low temperature which also contributes to the non volatilization of these compounds. An example of such behavior is the pepper mint extraction whereas the increase in CO₂ density decreases the oxygenated terpenes concentration [24].

Also, specifically for our experiment, the oleoresin co-extracted with the essential oil may have acted as a matrix for fixing oxygenated terpenic compounds, in this case, the citronellal.

It can be inferred that the best essential oil yield without oleoresin co-extraction occurred in the test 4 (100 bar and 60°C), with 80% of citronellal, that shows the influence of high temperature on the volatile extraction.

Figure 4 shows the total ion chromatogram (TIC) of the extracts obtained in the test 6 (higher citronellal yield), in the test 4 (higher essential oil yield free of pigments) and the sample of essential oil provided by the producer. Generally, the three major peaks were present in all samples. The preliminary identification of these compounds by GC/MS determined them as isopulegol, citronellal (the higher peak) and citronellol.

Figure 4. Total Ion Chromatogram (TIC) of essential oils obtained by SFE in tests 4 (—) and 6 (—) and by steam distillation (—).

Although the citronellal peak in the test 4 was the largest one in the TICs (Figure 4), it is noted that also other compounds were detected by the GC/MS equipment, lowering the concentration of main component (Table 3).

Table 3. Key compounds in the extract of the test 4 (100 bar and 60°C).

Peak	Retention time	Compound
1	11.803	Isopulegol
2	12.380	citronellal
3	15.222	citronellol
4	19.501	ciclohexanol
5	23.019	caryophyllene

CONCLUSIONS

The essential oil showed good yield and presented high citronellal concentrations, the main compound in the essential oil from *E. Citriodora* leaves, with better results than those obtained by conventional steam distillation in some operational conditions.

The experiments optimization demonstrates that high P and low T provided higher essential oil yield. Also, extracts obtained in supercritical conditions presented a strong orange color indicating a great amount of pigments. Thus, the study of the extraction method in sub and supercritical conditions in the same *modus operandi* provides higher essential oil yield, without the degradation of components, typical from process that use high temperatures as so as the conventional steam distillation. It can be seen in the TIC comparison (Figure 4) with the presence of small peaks in the essential oil supplied by Brazilian producer.

To complement the submitted studies, we intend to make a complete identification of compounds present in essential oil, test the antioxidant activity of oleoresin and identify its main compounds by HPLC/MS.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of master thesis of M. Dogenski. The authors are grateful to FAPESP (Process 2010/14145-2) for the financial support.

REFERENCES

- [1] BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M.; REZENDE, C. M. *Quimica Nova*. 32, 2009, p. 588-594
- [2] VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. *Documentos Florestais*. 17, 2003, p. 30.
- [3] MACEDO, I. T. F. Atividade anti-helmintica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp sobre nematoides gastrintestinais. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2008.
- [4] ANDRADE, A.M.; GOMES, S. S. *Floresta e Ambiente*. 7, 2000, p.181-189.
- [5] LENARDÃO, E. J.; BOTTESELLE, G. V.; AZAMBUJA, F.; PERIN, G.; JACOB, G. *Tetrahedron* 63, 2007, p. 6671-6712.
- [6] BATISH, D, R. et al. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Managment*. 256, 2008, p. 2166-2174.
- [7] ELAISSI, A.; SALAH, K. H.; MABROUK, S.; LARBI, K. M.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. *Food Chemistry*. XX, 2011, p. 8.
- [8] GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. *Food Chemistry*. 119, 2010, p 731-737.
- [9] RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. *Fitoterapia*. 73, 2002, p. 261-262.
- [10] GHASEMI, E.; RAOFIE, F.; NAJAFI, N. M. *Food Chemistry*. 126, 2011, p. 1449-1453.
- [11] UQUICHE, E.; HUERTA, E.; SANDOVAL, A.; VALLE, M. *Journal of Food Engineering*. 109, 2012, p. 230-237.
- [12] McCABE, W. L.; Smith, J. C.; Harriott, P. *Unit Operations of Chemical Engineering*. 7 ed. New York: MacGraw-hill Companies, 2005. 1140 p.
- [13] MUKHOPADHYAY M. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Boca Raton: CRC Press, p. 132, 133, 2000.
- [14] HAKKI, Z.; CAO, B.; HESKES, A.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; WILLIAMS, S. J. *Carbohydrate Research*. 345, 2010, p. 2079-2084.
- [15] GOODGER, J. Q. D.; CAO, B.; JAYADI, I.; WILLIAMS, S. J. WOODROW, I. E. *Phytochemistry*. 70, 2009, p. 1187-1194.
- [16] Revista da Madeira. Disponível em: http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=407&subject=%D3leos%20Essenciais&title=%D3leos%20essenciais%20de%20eucalipto. (acessado em 17de agosto de 2010).
- [17] ROZZI, N., L.; PHIPPEN, W.; SIMON, J. E.; SINGH, R. K. *Lebensm- Wiss. U. Technol*. 35, 2002, p. 319-324.
- [18] PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. ISSN 1679-6536, 2008.
- [19] BENSEBIAA, O.; BARTHB, D.; BENSEBIAA, B.; DAHMANIA, A. J. *of Supercritical Fluids*. 49, 2009, p. 161-166.
- [20] ADAMS, R. P; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatograph/Mass Spectroscopy*. ALLURED BOOKS. (ed) 1995, p. 804.
- [21] GUINAMANT, J. *Parfums, cosmetiques, aromes*. V. 104, 1929.
- [22] CARLSON, L. H. C.; MACHADO, R. A. F.; SPRICIGO, C. B.; PEREIRA, L. K.; BOLZAN, A. [The Journal of Supercritical Fluids](#). 21, 2001, p. 33-39.
- [23] REVERCHON, E. *Journal of Supercritical Fluids*. 10, 1997, p. 1-37.
- [24] REVERCHON, E.; AMBRUOSI, A.; SENATORE, F. Isolation of peppermint oil using supercritical CO₂ extraction, *J. Flavour Fragrance*. V. 9, 1994.
- [25] DELLA PORTA, G.; PORCEDDA, S.; MARONGIU, B. REVERCHON, E. *Flavour and Fragrance Journal*. 14, 1999, p. 214-218.