



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

“Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo”

Mara Elga Medeiros Braga

*Engenheira Agrônoma
Mestre em Engenharia de Alimentos*

Profª. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Orientadora DEA/FEA - Unicamp

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte integrante da tese de doutorado na obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas – São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

B73o Braga, Mara Elga Medeiros
Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo / Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador – *Maria Angela de Almeida Meireles*

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Amido. 2. *Curcuma*. 3. Extração com fluido supercrítico. 4. *Lippia alba*. I. Meireles, Maria Angela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Obtaining bioactive compounds from *Curcuma longa* L. and *Lippia alba* M. by supercritical technology: global yields, extraction kinetics, chemical composition, and usage of the starchy residue

Palavras-chave em inglês (Keywords): Starch, *Curcuma*, Supercritical fluid extraction, *Lippia alba*

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles

Carmen Lucia Queiroga

Pedro Melilo de Magalhães

Martin Aznar

Antonio José de Almeida Meireles

Vivaldo Silveira Junior

Membros da banca examinadora da Defesa de Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Dr. Antonio José de Almeida Meireles
DEA/FEA – UNICAMP

Dra. Carmen Lucia Queiroga
CPQBA – UNICAMP

Dra. M. Angela de Almeida Meireles (Orientadora)
DEA/FEA – UNICAMP

Dr. Martin Aznar
DPQ/FEQ – UNICAMP

Dr. Pedro Melilo de Magalhães
CPQBA - UNICAMP

Dr. Vivaldo Silveira Junior
DEA/FEA – UNICAMP

Agradecimentos

À Fapesp, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Ciências Agrônômicas-UNESP e à Fazenda Experimental da EPAMIG em Maria da Fé-MG pela doação da matéria-prima utilizada nesta tese.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e seus professores pela visão de interdisciplinaridade.

À professora Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles, pela oportunidade, investimento, incentivo e credibilidade assistida a mim, compreensão e amizade.

Ao Dr. Paulo Rosa pela disposição em dividir o conhecimento a qualquer momento e pela amizade.

Ao professor Dr. Lin Chau Ming (FCA/UNESP) pelo constante apoio, respeito e amizade.

Ao Instituto Adolf Lutz na pessoa da Dra. Daisy Sato, pela parceria e amizade.

Ao CPQBA-Unicamp na pessoa do Dr. João Ernesto de Carvalho pela parceria.

A Dra. Rosiane Lopes da Cunha (Laboratório de Engenharia de Processos - FEA) e Dra. Fernanda Collares (Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos - FEA) pela disponibilidade e uso das instalações.

Ao Ariovaldo Astini, pela paciência e companheirismo.

À Melina P. Peruchi pela parceria e oportunidade de orientação de forma inestimável.

Aos amigos e colegas Silvânia, Junko, Bernardo, Patrícia, Sócrates, Alberto, Camila, Danielle, Thais e Julian, pelos ombros amigos e apoio constante.

Aos meus pais que me ensinaram o caminho,
Luzinete e José

Aos meus irmãos que me apoiaram,
Merval, Mildred, Magdiel, Metusael e Magda

Aos amigos que me compreenderam e sonharam
comigo nesta caminhada!

SUMÁRIO

<i>NOMENCLATURA</i>	XIII
<i>RESUMO</i>	XV
<i>ABSTRACT</i>	XVII

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	7
2.1.1 QUIMIOPREVENTIVOS FITOTERÁPICOS	10
2.1.1.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS QUIMIOPREVENTIVOS FITOTERÁPICOS NO PROCESSO DA CARCINOGENÊSE	11
2.2 USO DE ADITIVOS NATURAIS: CORANTES E ANTIOXIDANTES	13
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	14
2.4 MATÉRIAS-PRIMAS	18
2.4.1 CURCUMA LONGA L. - CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS	18
2.4.2 LIPPICIA ALBA M. - CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS	20
2.4.3 COMPOSTOS ALVO DE EXTRAÇÃO E DE ESTUDO	22
2.5 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO	24
2.5.1 O PROCESSO DE EXTRAÇÃO SUPERCRTICA	25
2.5.1.1 MODIFICADORES OU CO-SOLVENTES	27
2.5.1.2 EXTRAÇÃO ACELERADA COM SOLVENTE	29
2.5.1.3 EXTRAÇÃO FRACIONADA	30
2.5.1.4 GEOMETRIA DO LEITO	31
2.5.1.5 CINÉTICA DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA	33
2.6 REAPROVEITAMENTO DO RESÍDUO DO PROCESSO DE SFE	40

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PRÉ-PROCESSAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA	45
3.1.1 CURCUMA LONGA L	45
3.1.2 LIPPICIA ALBA	45
3.1.3 AMIDO DE CURCUMA E GENGIBRE	46
3.1.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	46
3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	47
3.3 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO	47
3.3.1 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO (SOXHLET)	47
3.3.2 HIDRODESTILAÇÃO	47
3.3.3 EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO	48
3.3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA	48
3.3.4.1 CURCUMA LONGA L.	49
3.3.4.1.1 ESTUDO DA GEOMETRIA DO LEITO	50

3.3.4.1.2 ESTUDO DA EXTRAÇÃO ACELERADA COM SOLVENTE	51
3.3.4.1.3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA FRACIONADA	51
3.3.4.2 LIPPIA ALBA L.	52
3.3.4.3 ANÁLISE DAS CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO	53
3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	54
3.4.1 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO EM CHAMAS (CG-DIC)	54
3.4.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	55
3.4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS CURCUMINÓIDES POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL	57
3.4.4 QUANTIFICAÇÃO DA OLEORESINA DE CÚRCUMA NOS EXTRATO DE SFE	57
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	58
3.6 ANÁLISES PARA ESTUDO DO RESÍDUO AMILÁCEO	58
3.6.1 ISOLAMENTO DO AMIDO	58
3.6.2 TEOR DE AMIOSE	58
3.6.3 FATOR DE INCHAMENTO DE GRÂNULOS	59
3.6.4 DIFRAÇÃO DE RAIO-X	59
3.6.5 CALORIMETRIA –DSC (DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY)	59
3.6.6 VISCOSIDADE	60
3.6.7 TURBIDEZ	60
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES **61**

4.1 CURCUMA LONGA LINNEU	61
4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	61
4.1.2 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESTRUTURAS SECRETORAS POR MEV	62
4.1.3 EXTRAÇÕES POR SOXHLET, BAIXA PRESSÃO COM SOLVENTE E HIDRODESTILAÇÃO	67
4.1.4 EXTRAÇÃO COM TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA	70
4.1.4.1 ENSAIOS DE ESTUDO DA GEOMETRIA DO LEITO	70
4.1.4.2 ENSAIOS DE EXTRAÇÃO ACELERADA COM SOLVENTE	73
4.1.4.3 EXTRAÇÃO FRACIONADA	77
4.1.4.4 MODELAGEM	79
4.1.5 PERFIL DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA	88
4.1.5.1 ESPECTROFOTOMETRIA	88
4.1.5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	89
4.1.6 ATIVIDADES ANTIMICOBACTERIANA E ANTIPROLIFERATIVA	101
4.1.7 CONCLUSÕES PARCIAIS	102
 4.2 LIPPIA ALBA MILL.	 104
4.2.1 PREDIÇÃO DA SOLUBILIDADE DO LIMONENO E DA CARVONA	104
4.2.2 RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO E CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO	104
4.2.3 EXTRAÇÃO À BAIXA PRESSÃO	107
4.2.4 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS: CCD E CG	108
4.2.5 ESTRUTURAS SECRETORAS DA <i>LÍPPIA ALBA</i>	115
4.2.6 CONCLUSÕES PARCIAIS	122

4.3 RESÍDUO AMILÁCEO DO PROCESSO SFE	127
4.3.1 COMPOSIÇÃO DO RESÍDUO: CÚRCUMA E GENGIBRE	127
4.3.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CÚRCUMA E GENGIBRE POR MEV	131
4.3.2.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO: MEV	143
4.3.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X	149
4.3.4 CALORIMETRIA-DSC	153
4.3.5 VISCOSIDADE	155
4.3.6 INCHAMENTO DOS GRÂNULOS, TEOR DE AMIOSE/AMILOPECTINA E TURBIDEZ	156
4.3.7 CONCLUSÕES PARCIAIS	158
<u>5. CONCLUSÕES</u>	<u>161</u>
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>163</u>
<u>7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA</u>	<u>173</u>
<u>8. ANEXOS</u>	<u>177</u>

Nomenclatura

Abreviações

ASE – Extração Acelerada com Solvente (Accelerated Solvent Extraction)

CC – Curcuminóides (%)

CER – Taxa de Extração Constante (Constant Extraction Rate)

FER – Taxa de Extração Decrescente (Falling Extraction Rate)

HD - Hidrodestilação

LPSE – Extração com Solvente a Baixa Pressão (Low Pressure Solvent Extraction)

M_{CER} - Taxa de transferência de massa do período CER (kg de extrato/s)

MIC - Mínima Concentração Inibitória (µg/mL)

OEC – Curva de Extração Global (Overall Extraction Curves)

SFE – Extração com Fluido Supercrítico (Supercritical Fluid Extraction)

SoE – Extração por Soxhlet (Soxhlet Extraction)

Símbolos

D – Coeficiente de difusão efetivo do soluto no leito (m^2/s) do modelo de Crank (1975) (cm^2/s)

D_B – Diâmetro do leito (m)

EtOH - Etanol

F - Massa de alimentação (kg)

H_B – Altura do leito (m)

Iso-C3 – Isopropanol

k – Parâmetro ajustável do modelo de Empírico (1999) (t)

K – Constante de equilíbrio de desorção do modelo de Goto (1993) (s^{-1})

k_{xa} – Coeficiente de transferência de massa na fase sólida (s^{-1})

k_{ya} – Coeficiente de transferência de massa na fase fluida (s^{-1})

Q - Vazão do solvente (kg/s)

R_{CER} - Rendimento do extrato na etapa de taxa constante de extração (%)

t_{CER} – Duração da etapa de taxa constante de extração (s)

$X_{0, S/F}$ – Rendimento de extrato obtido até razão S/F (massa de solvente no tempo t/alimentação de matéria-prima no sistema) (%);

Y_{CER} – Razão mássica de soluto na fase fluida (kg de extrato/kg de solvente) na etapa CER

Letras gregas

ϕ - Coeficiente global de transferência de massa do modelo de Goto (1993)

ρ - Densidade (kg/m^3)

ρ_{CO_2} – Densidade do CO_2 (kg/m^3)

TESE DE DOUTORADO

Autora – ***Mara Elga Medeiros Braga***

Título – Obtenção de Compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo

Orientadora – Prof^ª. Dra. ***Maria Angela de Almeida Meireles***

Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais (LASEFI) – Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) - UNICAMP

Resumo

Os compostos bioativos têm sido alvo de estudos, devido aos seus benefícios comprovados como fonte primária na prevenção de doenças, através da ingestão de alimentos funcionais. Algumas espécies utilizadas como fonte destes compostos são encontradas na alimentação diária, compondo as especiarias e plantas aromáticas e corantes naturais. Dentre as diversas espécies conhecidas cita-se a cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e a falsa melissa (*Lippia alba* M.), que apresentam atividades farmacológicas comprovadas como atividade anticâncer, antiinflamatória e anticolinesterase, utilizadas no tratamento de câncer e Alzheimer, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi identificar os parâmetros de processo da extração com fluido supercrítico (SFE) para maximização do rendimento de extratos da *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M., e comparar a outras metodologias convencionais de extração como hidrodestilação (HD), soxhlet (SoE) e extração com solventes orgânicos a baixa pressão (LPSE). Para a avaliação dos processos foram utilizadas as taxas de extração, tempo de processo, rendimento global de extração e perfil fitoquímico dos extratos, propriedades funcionais como atividade antiproliferativa e antimicobacteriana. Os experimentos foram conduzidos numa unidade de Extração Supercrítica (SFE) com extrator de leito fixo com diâmetro de $2,74 \times 10^{-2}$ m e comprimento de 0,375 m. Para a cúrcuma os experimentos foram realizados a 30 °C e 300 bar; a mistura de etanol e isopropanol, na proporção 1:1, foi usada como co-solvente. Foram estudados os efeitos da variação da geometria do leito, ou seja, da relação altura/diâmetro do leito (H_B/D_B), da extração acelerada com solvente e período estático, e extração fracionada. Os

extratos foram analisados por CG-DIC, CCD e Espectrofotômetro-UV. Na razão H_B/D_B de 1,8 obteve-se o maior rendimento em curcuminóides; maiores rendimentos em curcuminóides também foram obtidos com o uso de 50% de co-solvente com período estático de 30 minutos. O maior rendimento obtido na extração supercrítica de falsa melissa foi de aproximadamente 7 % (massa), as extrações a baixa pressão e por Soxhlet obtiveram altos rendimentos (17 e 20%, respectivamente), porém muitas substâncias indesejáveis foram co-extraídas. Para a obtenção dos compostos de interesse da falsa melissa, as melhores condições da SFE foram 80 bar/ 45 °C para a obtenção de carvona (80%, massa) e 120 bar/45 °C para a obtenção de limoneno (17%, massa); para todas as metodologias testadas a extração supercrítica promoveu a melhor extração de carvona e a hidrodestilação a extração do limoneno. O amido residual do processo de extração de oleoresina de cúrcuma e gengibre, que podem ser utilizados como amidos especiais, foram observados quanto às suas características físico-químicas e comparados, com amidos comerciais. A fração volátil do extrato de cúrcuma apresentou atividade antiproliferativa seletiva para as células cancerosas de mama e ovário, pulmão, próstata e cólon. A atividade antimicobacteriana foi identificada em todos os extratos de cúrcuma, independente da concentração dos curcuminóides.

Palavras-chave: amido, *Curcuma longa* L., extração supercrítica, extração supercrítica com co-solventes, *Lippia alba* M., parâmetros de processo.

DOCTORAL THESIS

Author – ***Mara Elga Medeiros Braga***

Title – Obtaining bioactive compounds from *Curcuma longa* L. and *Lippia alba* M. by supercritical technology: global yields, extraction kinetics, chemical composition, and usage of the starchy residue

Major Professor – ***Dr. Maria Angela de Almeida Meireles***

Laboratory of Supercritical Technology: Extraction, Fractionation, and Identification of Vegetable Extracts (LASEFI) – Department of Food Engineering (DEA) – College of Food Engineering (FEA) – UNICAMP (State University of Campinas)

Abstract

Bioactive compounds have been target of studies due to benefits proved as primary source to prevent diseases, through the intake of functional foods. Some species used as compounds bioactive source are presents in dairy foods, which are inside the category of spices, aromatic plants and natural colors. Among many species known, there are turmeric (*Curcuma longa* L.) and “falsa melissa” (*Lippia alba* M.), that have pharmacological activities as anticancer, anti-inflammatory and anticolinesterase activities used on cancer and Alzheimer treatments, respectively. The objective of this work was identify the process parameters of supercritical fluid extraction (SFE) for maximization of the extracts yield of *Curcuma longa* L. and *Lippia alba* M., and to compare to other conventional methodologies of extraction as hydrodistillation (HD), Soxhlet (SoE) and low pressure solvent extraction (LPSE) with organic solvents. As a methodology to evaluate the process, some process parameters were used as extraction rate, process time, global extraction yield and phytochemical profile of extracts, some functional properties as antiproliferative and antimycobacterial activities. The essays were conducted in the SFE Unity with fix bed extractor (2.74×10^{-2} m of diameter and 0.375 m of length). The turmeric essays were made at 30 °C and 300 bar; the mixture of ethanol and isopropyl alcohol was used (1:1) as cosolvent. The effects of the bed geometry were studied, in other words, the ratio of bed height / bed diameter (H_B/D_B); the accelerated solvent extraction and fractioned extraction as well as the effects of the static period were also studied. The extracts were analyzed using GC-FID, TLC and Spectrophotometer – UV. The essay done with $H_B/D_B = 1.8$ showed the largest yield in curcuminoids; using 50% of cosolvent and static period was

also possible to obtain higher contents of curcuminoids. The maximum extract yield obtained for SFE from the “falsa melissa” was approximately 7% (mass), the LPSE and Soxhlet extraction had very high yields (17 and 20%, respectively), but many undesirable compounds were extracted. To obtain the target compounds of “falsa Melissa”, the best conditions for SFE were 80 bar/45 °C to obtain large amounts of carvona (80%, mass) and 120 bar/45 °C to obtain large amounts of limonene (17%, mass); the highest yield in carvone was obtained by the SFE process while the largest yield in limonene was obtained in the hydrodistillation process. The residual starch from SFE process used to obtain turmeric and ginger oleoresins, which can be used as special starches, were observed with their chemical and physical characteristics and compared to industrial starches. The volatile fraction of turmeric extracts showed antiproliferative activity selective for cancers cells of breast and ovary, lung, prostate and colon. The antimycobacterial activity was identified among all turmeric extracts, independently of curcuminoids concentration.

Keywords: *Curcuma longa* L., *Lippia alba* M., process parameters, starch, supercritical extraction, supercritical extraction with cosolvent.

1. Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

Os alimentos têm sido cada vez mais usados como fonte primária de prevenção contra várias doenças que acometem a população, e hoje já se conhecem os benefícios oferecidos por estes alimentos na manutenção e restabelecimento do metabolismo humano (Surh, 1999).

As substâncias bioativas presentes nos alimentos funcionais são alvo de estudo, tanto do processo de obtenção quanto de suas atividades biológicas.

O câncer é uma destas doenças que acometem a população, cujas pesquisas mostram que 80-90 % da incidência de câncer são atribuídos a fatores de risco ambientais (Surh, 1999). O estudo dos quimiopreventivos sejam eles naturais ou sintéticos, objetiva suprimir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese, mantendo ou prolongando uma vida mais saudável.

Essas substâncias quimiopreventivas são encontradas naturalmente em plantas no grupo dos compostos do metabolismo secundário, como a curcumina e o gingerol, encontrando-se no interior de estruturas secretoras específicas que variam morfológicamente em cada espécie (Surh, 1999; Ferri, 1974).

As espécies *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M., conhecidas popularmente como açafrão da terra ou cúrcuma e falsa melissa, respectivamente, são alvos de estudos. Estas espécies são muito utilizadas na culinária e na indústria de alimentos; a cúrcuma em pó é utilizada como corante e flavorizante, e as folhas de falsa melissa são utilizados como condimento e flavorizante (Agência Rural, 2005). As substâncias presentes nos extratos destas plantas são utilizadas no tratamento de câncer e outras

importantes doenças, como mal de Alzheimer e leishmaniose (Trevisan et al, 2003; Gomes et al, 2002).

A produção nacional de cúrcuma de acordo com o último censo do IBGE em 1996 foi de 4.486 t de cúrcuma fresca/ano, cerca de 1000 t de cúrcuma seca/ano; já o consumo nacional em 2000 foi de 1200 t de cúrcuma seca/ano, sendo que 200 t foram importadas (Agência Rural-2005). A produção da região sudeste é de cerca de 63% do total produzido e a produção do estado de São Paulo representa 38% da produção nacional. O consumo de cúrcuma nacional é feito em 75% para uso de corantes em indústrias de alimentos na produção de massas e mostarda, e 25% como corantes e condimentos na preparação de pratos prontos, sopas e extratos (Agência Rural, 2005). A produção da falsa melissa no Brasil ainda não tem expressão provocada pela baixa demanda. O Estado de São Paulo possui grande potencial agrícola de produção destas espécies, indicando a necessidade de obtenção de dados científicos para melhor aproveitamento deste produto no mercado nacional ou até mesmo internacional.

Os processos de extração encontrados na literatura diferem principalmente na solubilização de substâncias de interesse com uso de diferentes solventes, uso da pressão e temperatura. O uso da tecnologia supercrítica para a obtenção de extratos tem sido muito intenso por obter bons rendimentos de extratos com maior grau de pureza. O uso de co-solventes (etanol e isopropanol) no processo de extração com fluido supercrítico (SFE – Supercritical Fluid Extraction) possibilita a extração de substâncias mais polares, possuindo grande potencial de uso na indústria de alimentos e farmacêutica (Pellerin, 1991; Taylor, 1996).

A extração realizada com fluido supercrítico pode ser otimizada quanto às condições de extração (temperatura e pressão) (Bruner, 1994) geometria do leito (Berna et al, 2000) e ainda associada a outras metodologias, como a extração acelerada com

solvente (ASE - Accelerated Solvent Extraction) (Chang et al, 2001) ou até mesmo a realização de uma extração fracionada (Reverchon, 1999). Este fracionamento durante o processo de extração pode ser obtido com as variações das condições de extração e com a variação do co-solvente utilizado e porcentagem deste. Através da caracterização destes extratos é possível identificar a variação do perfil químico de cada extrato, de forma comparativa entre as metodologias de extração utilizada (Braga et al, 2003).

A identificação das estruturas secretoras (tricomas e/ou células de armazenamento) que contém os compostos alvos de extração permite conhecer melhor o sistema escolhido para obtenção dos extratos de plantas, com maior rendimento destes metabólitos quando se conhece sua estrutura, tamanho e localização na matriz vegetal. Um estudo microscópico das estruturas secretoras, identificando a localização destas e sua morfologia, observando a solubilização dos compostos ou rompimento das estruturas, torna-se uma ferramenta importante para auxiliar o processo de extração. Gaspar et al (2001) utilizou folhas de *Origanum virens* (manjerição) para realizar estudos microscópicos e obter a eficiência do processo de extração do óleo com CO₂ comprimido.

O estudo realizado por Gaspar et al (2001) mostra a superfície da folha do manjerição, onde estão presentes as estruturas secretoras. Em outros órgãos de plantas como os rizomas, as estruturas secretoras encontram-se no interior do órgão, assim, para o estudo microscópico das estruturas de rizomas de cúrcuma foi necessário o desenvolvimento de metodologia adequada. A metodologia foi desenvolvida utilizando como objeto de estudo preliminar as estruturas secretoras das folhas da falsa melissa (*Lippia alba*), baseando-se na literatura de Gaspar et al (2001).

O resíduo amiláceo do processo de extração supercrítica de algumas tuberosas como cúrcuma e gengibre, pode ser um grande potencial de fonte de amido na indústria

de alimentos, com o reaproveitamento e geração de subprodutos na indústria de extração de oleoresina (Moreschi et al, 2004). Este reaproveitado do resíduo pode ser feito através de hidrólise do amido a fim de obter açúcares diversos (Moreschi et al, 2004). Os amidos de cúrcuma e gengibre possuem características similares aos amidos comerciais, sendo considerado o amido de cúrcuma de fácil digestibilidade com indicação à utilização em alimentos infantis (Jyothi et al, 2003).

1.2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

1. Observar a as estruturas secretoras de oleoresina presente nos rizomas de *Curcuma longa* L. através da microscopia eletrônica de varredura, para obtenção da eficiência do processo de extração supercrítica no rompimento destas estruturas, e obtenção de parâmetros de processo baseados na microestrutura da matriz vegetal. Tendo em vista a ausência na literatura sobre a obtenção destes parâmetros em rizomas, adotou-se como sistema modelo as folhas de *Lippia alba* M. para desenvolvimento da técnica.
2. Realizar a extração supercrítica da *Curcuma longa* L. através do estudo da melhor altura do leito de extração, variação da porcentagem de co-solvente com a extração com solvente acelerada e extração fracionada por adição de co-solvente, para a obtenção do óleo volátil e a fração rica em curcuminóides.
3. Realizar a predição da solubilidade da carvona e limoneno, verificando a influência da temperatura e da pressão na extração com fluido supercrítico da *Lippia alba* M. para identificar as condições de operação que maximizem o rendimento global e dos componentes desejados (carvona e limoneno), e comparar a composição química

dos extratos de SFE com os extratos obtidos por hidrodestilação e extração a baixa pressão com etanol.

4. Verificar a influência do processo de SFE sobre os amidos de cúrcuma e gengibre, para avaliar as possibilidades de uso destes subprodutos do processo SFE.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Alimentos Funcionais

Existe grande interesse sobre as propriedades reguladoras da saúde de componentes nutracêuticos em alimentos (Paliyath, 2003), e a forte relação entre o alimento que ingerimos e nossa saúde tem cada vez se tornado mais clara. O conhecimento científico a respeito de ingredientes de alimentos que previnem e tratam doenças específicas tem sido adquirido, paralelo a isso novas tecnologias como a biotecnologia e a engenharia genética especificamente têm criado uma era onde descobertas científicas, produtos inovadores e produção em massa serão muito grandes. Estes desenvolvimentos têm resultado num aumento do número de produtos potencialmente nutricionais com benefícios medicinais e para a saúde, sendo chamados de “alimentos funcionais”. Os alimentos funcionais, além do valor nutritivo básico com sua origem natural, conterão um equilíbrio próprio de ingredientes, os quais ajudarão diretamente na prevenção e tratamento de doenças (Goldberg, 1994). As substâncias bioativas presentes nos alimentos funcionais representam constituintes “extranutricionais” naturalmente presentes em pequenas quantidades na matriz do alimento (Kitts, 1994).

Os alimentos funcionais podem ser descritos por várias terminologias, como alimentos fortificados, alimentos para uso em dietas especiais, alimentos medicinais e suplementos dietéticos (Figura 2.1), considerando cinco fatores: a característica das substâncias, efeito esperado na saúde, forma, grupo alvo e processamento (Kwak e Jukes, 2001).

A Figura 2.1 mostra os cinco maiores grupos de alimentos com diferentes funções e suas sobreposições, gerando novos grupos de alimentos cada vez mais específicos em suas atuações sobre o metabolismo e organismo humano.

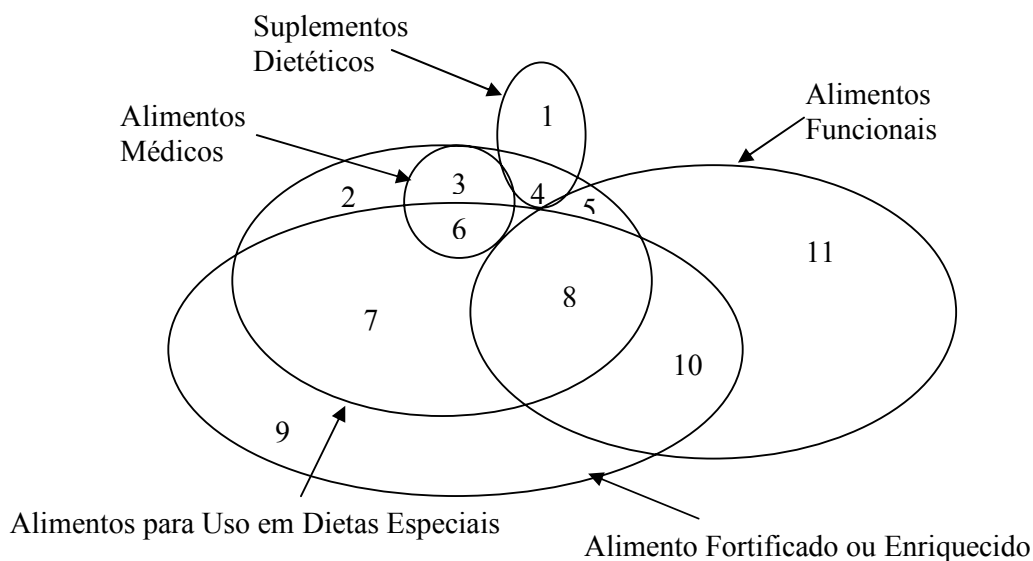


Figura 2.1 Relação entre os vários termos utilizados para alimentos funcionais (Kwak e Jukes, 2001).

Os cinco principais grupos de alimentos acabam por gerar novos grupos com suas características sobrepostas, como os “alimentos saudáveis”, termo não legal por não possuir evidências científicas para dar o suporte ao uso do mesmo; o termo “novo alimento” ou “novo ingrediente alimentar” que é oficialmente definido na comunidade europeia como um alimento ou ingrediente, os quais ainda não têm sido usados para o consumo humano num grau significativo para a comunidade, incluindo nesta categoria os alimentos e ingredientes geneticamente modificados.

A especificidade e/ou benefício podem ser critérios para a rotulação dos alimentos. Quando alguns alimentos usados em dietas especiais são alimentos medicinais necessitando de supervisão médica, são categorizados como 3 e 6 (Figura 2.1), ou quando usados para dietas especiais cujo objetivo seja nutricional ou a própria saúde, categorizados pelos números 2, 4, 5, 7 e 8 da Figura 2.1, se o alimento ainda oferece um benefício extra ao valor nutricional para um grupo específico de pessoas,

este é categorizado como alimento funcional (5, 8, 10, 11 da Figura 1) (Kwak e Jukes, 2001).

Geralmente, um alimento funcional pode ser definido como qualquer alimento que tem um impacto positivo sobre a saúde dos indivíduos, seja na performance física ou do estado da mente, em adição aos seus valores nutritivos. O termo FOSHU (Foods for Special Dietary Use) é o nome legal utilizado no Japão para alimentos com apelo a saúde, sendo uma sub-categoria dos alimentos com finalidades especiais (Kwak e Jukes, 2001). Os japoneses definem um alimento funcional através de três condições (Goldberg, 1994):

1. É um alimento (não está sob forma de uma cápsula, tablete ou em pó) derivado de ingredientes que ocorrem naturalmente;
2. Pode e deve ser consumido como parte da dieta diária;
3. O alimento tem uma função particular quando ingerido, servindo para regular um processo específico do corpo, como:
 - Aumento dos mecanismos biológicos de defesa;
 - Prevenção de uma doença específica;
 - Recuperação de uma doença específica;
 - Controle de condições físicas e mentais;
 - Retardamento do processo de envelhecimento.

Estes alimentos podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares, a incidência de câncer entre outros, através das substâncias antioxidantes presentes nestes alimentos, entre outras (Kwak e Jukes, 2001).

O uso do termo nutracêutico tem similar significado ao de alimentos funcionais que promovem um benefício saudável e medicinal incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças, mas que englobam produtos como nutrientes isolados,

suplementos dietéticos ou dietéticos geneticamente modificados, alimentos funcionais, produtos a base de ervas e alimentos processados como cereais, sopas e bebidas (Kwak e Jukes, 2001).

As substâncias que dão a características aos alimentos funcionais, são substâncias bioativas pertencentes ao grupo dos compostos do metabolismo secundário de plantas, também chamadas de compostos fitoquímicos, e podem ser definidos como substâncias derivadas de plantas que são altamente ativas do ponto de vista nutricional, fisiológico e/ou medicinal, excluindo amidos, proteínas, ácidos graxos, vitaminas e minerais essenciais (Goldberg, 1994).

2.1.1 Quimiopreventivos fitoterápicos

Muitos estudos foram realizados durante as duas últimas décadas na pesquisa de agentes quimiopreventivos naturais, na utilização em humanos. As vitaminas antioxidantes ou seus derivados sintéticos têm sido frequentemente investigados por suas possíveis eficácias quimiopreventivas entre populações de risco, como por exemplo, fumantes e obesos (Surh, 1999).

Muitos alimentos possuem substâncias com comprovada ação quimiopreventiva, como pro-vitaminas e vitaminas (β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol) com atividade antioxidante, produtos derivados fermentados do leite responsáveis pela inibição da formação endogênica de gens mutantes ou carcinogênicos com modificação da flora microbiana intestinal, substâncias presentes nas crucíferas como fenóis, flavonóides e monoterpenos monocíclicos como D-limoneno, mentol e carveol são responsáveis pela modulação do metabolismo com a inibição da ativação dos pro-mutagênicos (De Flora, 1998).

A maioria dos cânceres que acometem adultos são carcinomas de origem epitelial, com pulmão e útero como regiões primárias, os quais refletem a seletiva vulnerabilidade destes tecidos a uma injúria carcinogênica, como resultado da freqüente exposição a um ambiente externo. Baseado nisto, há uma estimativa que acima de 80-90% de todos os cânceres são atribuídos aos fatores de risco ambientais, incluindo químicos, radiações e viroses. A eliminação dos agentes carcinogênicos ambientais ou a não exposição a estes fatores oferece a oportunidade de prevenir mais cânceres, os quais são a base da prevenção primária (Surh, 1999).

Estratégias promissoras para a prevenção do câncer têm sido desenvolvidas no avanço do entendimento da carcinogênese em nível celular e molecular, a quimioprevenção. A quimioprevenção é definida como o uso específico de substâncias químicas, podendo ser naturais ou sintéticas, e suas misturas para suprimir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese. O primeiro objetivo da pesquisa de quimioprevenção é efetivamente identificar os agentes e/ou desenvolver eficientes estratégias para processos clínicos e aplicação em populações humanas (Surh, 1999). Existem muitos agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos conhecidos por exercer efeitos antiproliferativo ou citostático por indução da apoptose em células (pré-) malignas, como gingerol e paradol, curcumina e resveratrol (Surh, 1999).

2.1.1.1 Mecanismo de ação dos quimiopreventivos fitoterápicos no processo da carcinogênese

Para entender o mecanismo de ação da curcumina e outras substâncias bioativas sobre as células tumorais, é importante entender o mecanismo da carcinogênese que pode ser generalizado por três etapas: iniciação, promoção e progressão do câncer. A iniciação é um processo irreversível que começa quando as células de tecidos normais

são expostas ao agente carcinogênico com alterações estruturais na molécula de DNA, e final fixação do dano genotóxico causando a mutação. A promoção é a expansão das células danificadas para a proliferação multicelular de células como tumores pré-malignos. Progressão é um processo irreversível no qual é produzido um novo clone das células tumorais com aumento na capacidade de proliferação e início de uma metástase em potencial. A Figura 2.2 esquematiza estes processos oferecendo exemplos de substâncias que podem agir como bloqueadores ou supressores do processo de carcinogênese (Surh, 1999).

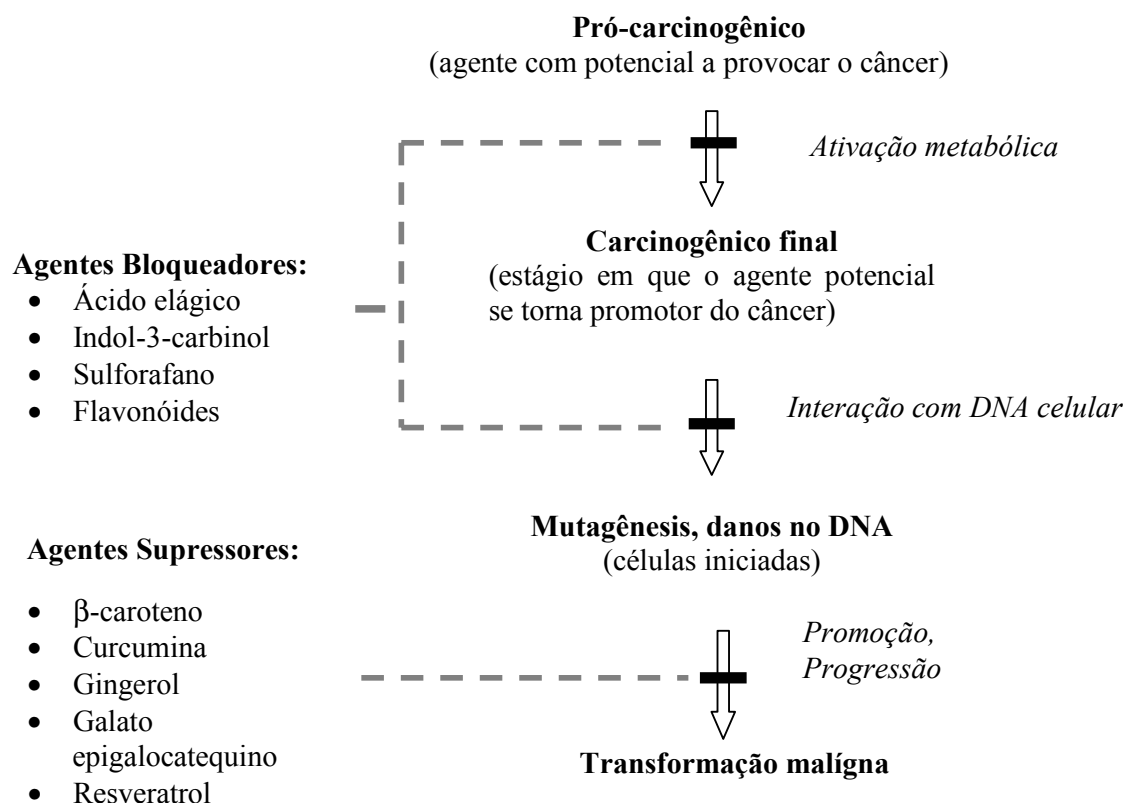


Figura 2.2 Classificação dos fitoquímicos preventivos baseado em seus mecanismos de ação (Surh, 1999).

Alguns agentes quimiopreventivos como a curcumina e o resveratrol, possuem mais do que um mecanismo de ação definido, possuindo ambas as propriedades de bloqueadores e supressores (De Flora, 1998).

2.2 Uso de aditivos naturais: corantes e antioxidantes

Alguns quimiopreventivos fitoterápicos são muito utilizados como aditivos alimentares, como o betacaroteno que possui função antioxidante e corante, proporcionando característica corante diferenciada ao produto, e evitando sua degradação através da sua atividade antioxidante.

O consumo de um alimento que possui em sua composição aditivos corantes naturais é associado à imagem de um alimento de qualidade e saudável; além dos corantes sintéticos possuírem a tendência de serem vistos como indesejáveis e prejudiciais, alguns são responsabilizados por reações alergênicas e de intolerância [Blenford (1995) citado por Wissgott e Bortlik (1996)].

Muitos destes componentes naturais usados por suas propriedades corantes também são nutracêuticos (funcionais), como por exemplo os carotenóides, antocianinas e flavonóides, isoprenóides e etc. Algumas espécies como cúrcuma, açafrão e pimenta vermelha são utilizados pelas suas propriedades corantes mas também por seus benefícios à saúde já conhecidos (propriedades antioxidantes) (Paliyath et al, 2003).

No Brasil, 54,17 % das indústrias produtoras de corantes produzem corantes naturais, principalmente corantes a partir do urucum, sendo que o Brasil é o maior produtor mundial de sementes de urucum, seguido da cúrcuma com mercado em expansão (Mascarenhas et al, 1999). Da pesquisa realizada, 54,55 % das indústrias consumidoras de corantes preferem o corante natural ao sintético para aplicação em seus produtos, cerca de 68% das indústrias acreditam na necessidade de criação de novas linhas de pesquisa para desenvolvimento de novos produtos no setor de corantes e 25 % das indústrias reconhecem a importância das pesquisas, priorizando as áreas toxicológicas, de extração e estabilidade (16,67 %) (Mascarenhas et al, 1999).

Corantes naturais foram utilizados na preparação de um gel a base de gelatina como alimento. Estes foram comparados às formulações comerciais e verificado a estabilidade durante a estocagem. Foram utilizadas de 0,05 a 0,4 % de curcumina, e os autores concluíram que a substituição dos corantes artificiais pode ser realizada pelo corante natural curcumina, não obtendo variação do produto quanto a cor após 36 dias de estocagem (Calvo e Salvador, 2000).

Karpinska et al (2001) estudaram o efeito da adição de antioxidantes naturais em carne de peru. A carne foi preparada mecanicamente em forma de bolas e adicionadas a uma mistura de ervas (sálvia, pimenta vermelha, pimenta preta, alho e orégano) e somente sálvia como fonte de antioxidantes. O produto foi frito em óleo de soja e estocado em refrigerador por 4 dias. Neste estudo obteve-se resultados positivos no retardamento do processo de oxidação quando adicionado sálvia (1,5 %) e a mistura de condimentos, a partir da observação do efeito da composição do produto sobre a intensidade do processo de oxidação da fração lipídica do produto.

McCarthy et al (2001) estudaram a adição de alguns condimentos como sálvia (0,05%), alecrim (0,1%), ginseng (0,25%), catequinas de chá (0,25%) entre outros, como fonte de antioxidantes, na preparação de pedaços de carne de porco crua e cozida, observado por 3, 6 e 9 dias, e comparados a antioxidantes sintéticos como BHA e BHT. Os resultados mostraram que para ambas as amostras de carne crua e cozida, a adição de alecrim e catequinas de chá mostraram efetivamente atividade antioxidante.

2.3 Metabólitos secundários

Os constituintes químicos encontrados no reino vegetal são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo das plantas (Di Stasi et al, 1994). Estes produtos originados do

metabolismo secundário não são necessariamente essenciais para o organismo produtor, mas garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, em seu ecossistema (Saito e Scramin, 2000). Os metabólitos secundários já têm reconhecidas suas funções em várias espécies, como defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em alelopatias (Harborne, 1997). Muitos destes compostos secundários são de grande importância para o homem como os alcalóides e os terpenóides (Schopfer, 1995), responsáveis pelo sabor e aroma de muitos produtos usados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos; entre estes também se encontram os óleos essenciais (Kretovich, 1964).

Os metabólitos secundários compreendem os óleos aromáticos, e estes são formados nas plantas superiores em células glandulares especiais, e muitas vezes secretadas na superfície das plantas, e em sua maior parte são formadas por terpenóides, especialmente mono-, di- e sesquiterpenos, voláteis e portanto com efeitos odoríferos (Schopfer, 1995). O óleo essencial contém terpenos voláteis com baixa massa molecular, e as resinas representam uma mistura de terpenos voláteis e não voláteis ou outras substâncias (Fahn, 1979). Os componentes não-voláteis da oleoresina podem ser óleos com poder de fixação, pigmentos e antioxidantes, e na forma concentrada geralmente é um líquido viscoso ou material semi-sólido (Ropa, 2000).

Os óleos essenciais são depositados em estruturas anatômicas que evoluíram de células oleíferas, cavidade e canais secretores a pêlos glandulares (Gottlieb e Salatino, 1987), e podem variar conforme as condições edafoclimáticas (clima, solo, regiões geográficas, duração do dia e da noite), da idade da planta, órgão onde se localiza e outros (Saito e Scramin, 2000).

Os óleos essenciais aparecem em grupos de células diferenciadas, que podem ser classificadas como estruturas secretoras externas e internas. As estruturas internas fazem parte da epiderme ou são modificações destas, tais como pêlos glandulares ou tricomas excretores. As estruturas secretoras internas se formam quando o óleo se acumula entre as células do tecido parenquimático, e podem se transformar em canais oleíferos [(HaagenSmit (1972) citado por Saito e Scramin (2000)], cavidades e ainda podem ser depositados no lenho das árvores (Gottlieb e Salatino, 1987). Estas células segregam uma grande variedade de substâncias como resinas, óleos, gomas, mucilagens, etc. Glândulas secretoras internas multicelulares podem constituir bolsas que se encontram, por vezes, nas folhas de muitas plantas. E ainda há os canais resiníferos, freqüentes nas gimnospermas entre outras plantas (Ferri, 1974).

Uma espécie pode possuir várias estruturas secretoras em todos os seus órgãos e de forma diferenciada. A canela do Ceilão (*Cinnamomun zeylanicum* Breyne) é citada classicamente como exemplo desta variação: sua casca contém óleo com alta concentração de aldeído cinâmico, o óleo de suas folhas contém, principalmente, eugenol e da raiz se obtém alta porcentagem de cânfora [Costa (1972) citado por Saito e Scramin, 2000].

A Figura 2.3-A mostra uma representação esquemática da estrutura do *Zingiber officinale* obtida pelo corte transversal do rizoma, mostrando a localização das células que contém oleoresina e a Figura 2.3-B mostra um desenho esquemático de um tricoma na superfície de uma folha de *Phillyrea latifolia*. Através das estruturas secretoras mostradas na Figura 2.3, verifica-se a localização das mesmas tanto na superfície quanto no interior da matriz vegetal, identificando esforços distintos para rompimento destas, quando da utilização de órgãos vegetais diferentes em processos de obtenção de óleo essencial e oleoresina (Govindarajan, 1982; Gravano et al, 1998).

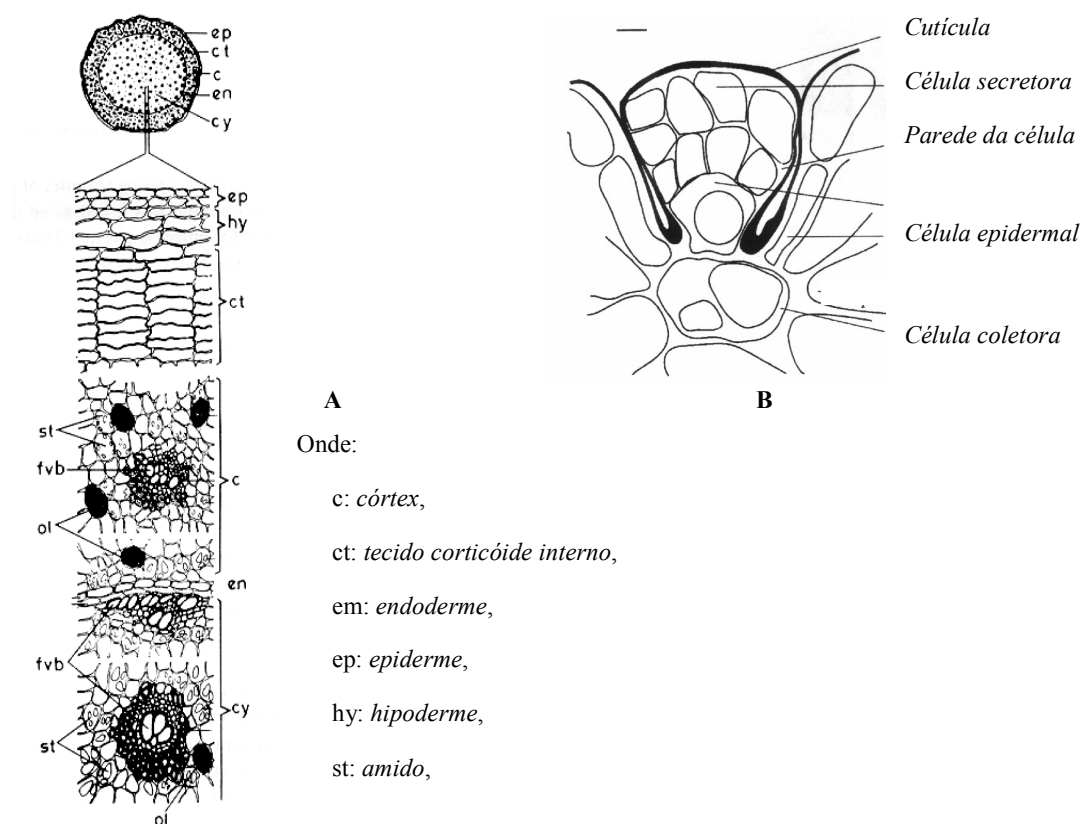


Figura 2.3 Seção transversal do rizoma e estrutura das camadas epidérmicas, córtex e cilindro central de *Zingiber officinale* (Govindarajan, 1982) e desenho esquemático de um tricoma maduro numa folha de *Phillyrea latifolia* (Gravano et al, 1998).

Na simulação da extração supercrítica do óleo essencial de *Mentha pulegium* L., Reis-Vasco *et al* (2000) mostraram que diferentes porcentagens de óleo essencial são obtidas dependendo da proximidade deste óleo na superfície da folha. Como esperado, o tempo de extração para atingir o rendimento total de óleo aumentou com a redução do óleo encontrado na superfície. Por exemplo com 20% do óleo próximo da superfície, mais que 120 minutos foram requeridos para remover 95% de total do óleo essencial, enquanto somente 60 minutos foram requeridos quando 90% do óleo estava sobre a superfície da folha. A localização do óleo foi baseada em considerações botânicas.

A identificação destas estruturas permite conhecer melhor o sistema escolhido para obtenção dos extratos de plantas, com maior rendimento destes metabólitos quando se conhece sua estrutura, tamanho e localização na matriz vegetal. Um estudo microscópico das estruturas secretoras, identificando a localização destas e seus tamanhos, observando a solubilização dos compostos ou rompimento das estruturas, torna-se uma ferramenta importante para auxiliar o processo de extração.

2.4 Matérias-primas

As matérias-primas para este trabalho foram escolhidas baseando-se em suas características fitoquímicas para a obtenção de extratos com atividade antioxidante, onde as partes da planta utilizadas fossem distintas, como raízes e folhas, e fossem destinadas às indústrias de alimentos e farmacêutica.

2.4.1 *Curcuma longa* L.- características e propriedades funcionais

A curcumina e outros dois curcuminóides (desmetoxi-curcumina e bis-desmetoxi-curcumina) são encontrados na oleoresina da espécie *Curcuma longa* L. A espécie pertence à família *Zingiberaceae*, originária da Índia, podendo ser encontrada na China, nas Ilhas Caribenhas e países da América do Sul. O extrato obtido do rizoma da cúrcuma possui uma coloração amarelo ouro-marrom (Govindarajan,1980; FAO, 2001). O corante obtido da cúrcuma é utilizado na indústria de alimentos para colorir principalmente alimentos preparados como sopas e massas (Govindarajan,1980; Jyothi et al, 2003).

A ação antioxidante e antimutante da oleoresina e da curcumina e as propriedades anti-inflamatórias foram estudadas para prevenção do câncer por Mukundan et al (1993), Chan et al (1998) e Krishnaswamy & Raghuramulu (1998). A

curcumina presente na oleoresina (uma das substâncias responsáveis pela coloração amarela) forma complexos estáveis com proteínas, possuindo propriedades antioxidantes, e esta propriedade é usada para formulação sofisticada de corantes naturais (Lauro, 1992).

A atividade antiproliferativa de células tumorais foi observada nos extratos de *Curcuma longa* L por Braga et al (2003), revelando que os extratos obtidos por extração supercrítica (SFE) possuíam atividade citocida e citostática nas células cancerosas selecionadas de pulmão, mama, melanoma, ovário, cólon, próstata, rim e leucemia, a partir de 0,25 µg/mL de extrato. Leal et al (2003) estudaram a atividade antioxidante dos extratos de cúrcuma, onde estes alcançaram porcentagem de inibição de 85 a 95% para todas as condições estudadas.

A atividade antimutagênica observada nos curcuminóides em culturas de células animais, teve um dos mecanismo bioquímicos atribuídos ao grupo carbonila (Chun et al, 199).

Um derivado da curcumina, a tetrahidrocurcumina, é rapidamente metabolizada durante a absorção intestinal, sendo esperado que tenha as mesmas importantes propriedades farmacológicas e fisiológicas como a forma ativa da curcumina *in vivo* (Sugiyama et al, 1996).

Estudos com a oleoresina verificaram também a sua atividade antimicrobiana (Allievi et al, 1984) e efeito vasorelaxante, sugerindo o potencial terapêutico destes componentes em doenças cardiovasculares (Ashraf et al, 1999). Olajide (1999) reconheceu o efeito antitrombótico do extrato de *Curcuma longa* em ratos. Singh et al (2002) estudaram a atividade antifúngica do óleo essencial de cúrcuma, composto por aproximadamente 52% de ar-turmerona e 12 % de ar-turmerol, onde o óleo essencial a 1000 ppm causou completa inibição do micélio de *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium*

moniliforme e na concentração de 2000 ppm a inibição do micélio de *Curvularia pallescens*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium*.

Gomes et al (2002) estudaram a atividade antileishmanial dos curcuminóides; os curcuminóides tiveram ação mais efetiva que o composto de referência, isotionato de pentamidina, contra *Leshmania amazonensis*. A curcumina foi provada ser mais potente contra a *Leshmania major* que a pentamidina: 100% de morte celular foi observada com 27 μ M de curcumina (Saleheen et al, 2002).

Mazumber et al (1995), citados por Araújo e Léon (2001) demonstraram que a curcumina tem atividade antiviral: a integrase do vírus HIV-1 foi inibida pela curcumina (IC₅₀= 40 μ M).

2.4.2 *Lippia alba* M. - características e propriedades funcionais

A *Lippia alba* é uma espécie utilizada na medicina da América do Sul e Central e na África tropical pela sua atividade antiulcerogênica para tratamento de distúrbios gastrointestinais. As espécies do gênero *Lippia* (família Verbenaceae) são principalmente distribuídas nos países da América do Sul e Central, e em territórios da África tropical; o gênero inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores (Treblanché et al, 1996).

Poucos estudos foram realizados sobre a composição química e farmacológica do gênero *Lippia*, gênero no qual a *Lippia multiflora* Moldenke e *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Pascual et al, 2001 a) estão incluídas.

A atividade antiulcerogênica da *L. alba* foi estudada com administração oral de uma infusão: neste extrato a prevenção da ulceração gástrica pareceu ser efetiva após a indução por indometacina (Pascual et al, 2001b). Efeitos anticonvulsivos e citostático foram descritos (López et al (1979), citado por Pascual et al (2001a). A

atividade antioxidante do óleo volátil de *L. alba* (20 g de extrato/L tampão) obtido por hidrodestilação foi de 78,5 %. Esta atividade é similar a obtida com a vitamina E (75,5 %) (Stashenko et al, 2004).

O óleo volátil de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown foi estudado em ratos (Vale et al, 1999) quanto aos efeitos de comportamento nas atividades ansiolítico, locomotora e miorelaxante. Zétola et al (2002) também encontraram efeitos miorelaxante e sedativo na fração não volátil do extrato de *Lippia alba* M., contendo nesta fração alto teor de flavonóides. O extrato obtido por sistema de percolação com etanol (80 %) obteve um teor de flavonóides de 66 mg/ 100 g, expressos em apigenina.

A *Lippia alba* também foi estudada no desenvolvimento de drogas no tratamento de deficiências cognitivas da doença de Alzheimer (uma doença neurodegenerativa caracterizada por perdas cognitivas e mudanças na personalidade). Os extratos das folhas utilizados na concentração de 2,1 mg de extrato/mL de etanol inibiram em 12% a atividade da acetilcolinesterase medida pela análise de microplacas Ellmann (Trevisan et al, 2003).

Os dois compostos majoritários encontrados nos extratos de *L. alba* foram carvona e limoneno (Stashenko et al, 2004). A aplicação técnica mais importante da carvona é o uso como supressor reversível do brotamento em batatas estocadas ou bulbos de flores (Oosterhaven et al, 1995), mas a carvona tem potencial para uso na inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Helander et al, 1998), e atividade antifúngica (Smid et al, 1995) em concentrações acima de 1 nM (Oosterhaven et al, 1995). O limoneno e alguns dos seus derivados são apresentados na literatura pela sua atividade bloqueadora de crescimento das células cancerígenas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Khalloukia et al, 2000). A fração volátil do extrato de partes aéreas de *Chrysanthemum iscidehirtum*, onde um dos compostos

majoritários encontrados foi o limoneno, apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella typhi* e *Proteus mirabilis*, mostrando também atividade antitumoral para *Bulinus truncatus* (Eumme et al, 1999).

A espécie *L. alba* é usada na Guatemala, Venezuela e Brasil como remédio para resfriados, gripes, bronquites, tosse e asma (Lemos et al, 1992), dores de estômago e indigestão (Ballero et al, 1998). Pode agir como carminativo (Heinrich et al, 1992) e na América Central e Amazônia Brasileira é usado no tratamento de doenças hepáticas (Distasi et al, 1994), sífilis (Zamora-Martínez et al, 1992), diarreia e disenteria (Cáceres et al, 1993). As folhas ou as partes aéreas e flores são usadas; os extratos são preparados por infusão ou decocção e administrados oralmente.

2.4.3 Compostos alvo de extração e de estudo

Os compostos de interesse presentes nestas espécies, *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M., são apresentadas a seguir:

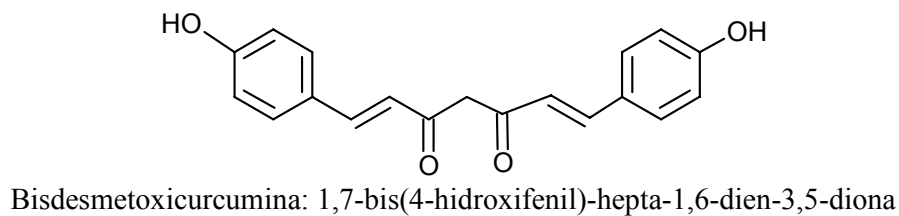
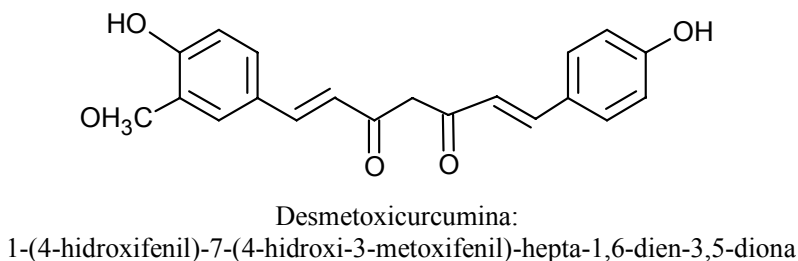
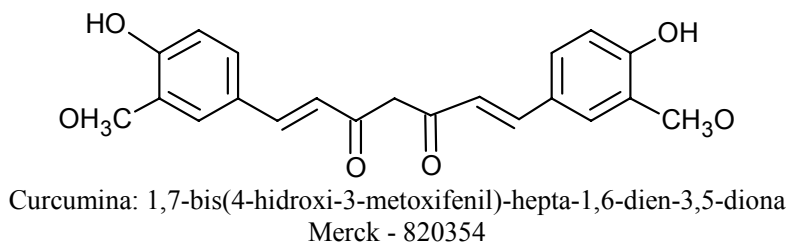
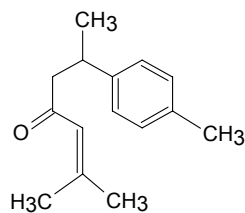
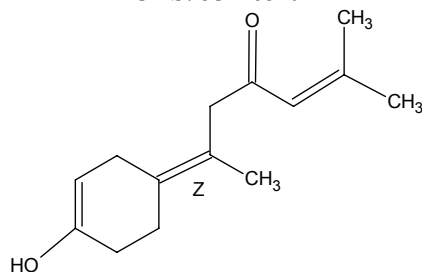


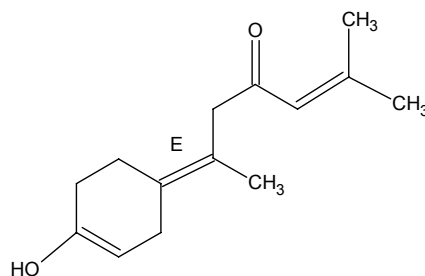
Figura 2.4 Compostos fenólicos da *Curcuma longa* L.: curcuminóides (He et al, 1998; He, 2000; Kim et al, 2001).



ar-turmerona: 2-heptanona-4-ona, 2-metil-6-(4-metilfenil)
CAS: 532-65-0

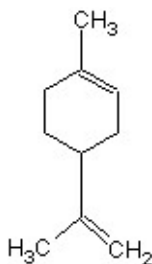


(Z)- γ -atlantona: (2-heptanona-4-ona, 2-metil-6-(4-metil-3-ciclohexeno-1-ilidene)-, (Z))
CAS: 108-549-48-0

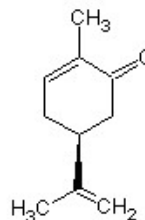


(E)- γ -atlantona: (2-hepta-4-one, 2-metil-6-(4-metil-3-ciclohexeno-1-ilidene)-, (E))
CAS: 108-549-47-9

Figura 2.5 Compostos terpênicos da *Curcuma longa* L: ar-turmerona, (Z)- γ - atlantona e (E)- γ - atlantona (Adams, 2001).



Metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno-1
Limoneno: CAS: 5989-27-5



Metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclohexano-1-ona-2-
Carvona: CAS: 6485-40-1

Figura 2.6 Compostos terpênicos da *Lippia alba* M.: limoneno e carvona (Adams, 2001).

2.5 Metodologias de extração

Existem na literatura várias metodologias de obtenção de extratos de vegetais, utilizando vários solventes, empregando ou não pressões e temperaturas ou até mesmo associando metodologias no intuito de obter um extrato com o perfil fitoquímico desejável, com alto rendimento e que não possua características indesejáveis como a presença de compostos co-extraídos como ceras e clorofila e a presença residual de solventes. A seguir são descritos alguns métodos que foram utilizados na obtenção de extratos de cúrcuma e falsa melissa.

Extratos de *Curcuma longa* L. foram obtidos pela extração com solventes orgânicos auxiliada por energia de microondas, para estudar a rápida e seletiva extração dos curcuminóides (CC). O processo foi otimizado utilizando acetona a 20%, obtendo 60% da extração de curcuminóides com 75% de pureza em 1 minuto (Dandekar et al, 2002).

Krishnamurthy et al (1976) realizaram a extração de cúrcuma por hidrodestilação, soxhlet e percolação com etanol, acetona e dicloro-etileno. Ambos os rendimentos dos extratos e do teor de curcuminóides obtidos com etanol e acetona foram semelhantes, aproximadamente 6% de extrato e 2,6 % de curcuminóides. A hidrodestilação foi realizada em vários cultivares obtendo valores de 3,3 a 7,2 % de óleo volátil. A extração por soxhlet com partículas selecionadas de 30 mesh, obteve rendimento de 3,2 a 8,2 %. Para a percolação a frio foram obtidos extratos com 3,6 a 9,5% de rendimento.

Extratos hidroalcoólicos, ou extraídos com outros solventes como hexano (Ramirez-Bosca et al, 2000) foram utilizados para estudos farmacológicos, mas nenhum estudo foi realizado em relação a eficiência dos processos de extração.

Stashenko et al (2004) analisaram extratos de *L. alba* obtidos por diferentes técnicas a concentração de 60 µL/µL de CH₂Cl₂ por cromatografia gasosa, e os resultados mostraram que o conteúdo de carvona e limoneno variaram de acordo com a técnica utilizada: hidrodestilação (51 e 32,6 % em área, respectivamente), microondas auxiliada por hidrodestilação (57,2 e 29,6 % em área, respectivamente), destilação simultânea com extração por solvente (45,1 e 36,9 % em área, respectivamente) e extração com fluido supercrítico (40 e 23,9 % em área, respectivamente).

A tecnologia supercrítica utilizando como solvente o CO₂ é considerada uma tecnologia limpa, sendo este considerado um solvente GRAS (Generally Recognized as Safe). O dióxido de carbono utilizado pode ser reciclado ou incorporado ao meio ambiente. A utilização do dióxido de carbono mantém o extrato isento de traços residuais de solvente, resultando assim num produto mais puro em relação à outras metodologias de extração.

2.5.1 O processo de Extração Supercrítica

O processo de extração supercrítica consiste em usar um fluido supercrítico, quando suas condições de temperatura e pressão em que se encontram são maiores que os seus valores críticos. As variações das propriedades de estado acima do ponto crítico podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (Sandler, 1989). O poder de solvatação de um solvente aumenta não somente a solubilidade de um certo produto, como o número de compostos solubilizáveis. Os aromas e óleos essenciais são extraídos utilizando-se o solvente em condições próximas ao seu ponto crítico, enquanto que oleoresinas de especiarias e óleos vegetais são extraídas em condições de altas pressões, acima do ponto crítico (Brogle, 1982).

O fluido supercrítico possui densidade semelhante à de um líquido e compressibilidade de um gás, portanto maior poder de solvatação. A densidade pode ser alterada com pequenas variações de pressão e/ou temperatura, o que permite controlar as condições para extração em processo supercrítico, visto que a solubilidade é função direta da variação de densidade (Fillipi, 1982).

Dentre os fluídos usados em SFE, o CO₂ é o mais usado por ser de fácil manipulação, possuir valores relativamente baixos de temperatura e pressão críticas, 31,2 °C e 73,8 bar respectivamente, ser um bom solvente e ser miscível com outros solventes, ter baixa toxicidade, ser inerte, não inflamável, não corrosivo e ter moderado custo (Staub, 1997).

A extração supercrítica com dióxido de carbono foi utilizada (Began et al, 2000) para obter extrato de cúrcuma, com a otimização do processo a 35 °C, 225 bar e vazão do solvente CO₂ a $4,72 \times 10^{-5}$ kg/s. A tecnologia com dióxido de carbono permitiu extrair somente a fração volátil da matéria-prima .

A carvona e o limoneno (substâncias presentes na *Lippia alba*) foram extraídos das sementes da alcaravia (*Carum carvi* L.) com dióxido de carbono supercrítico. As condições do processo foram otimizadas em relação a pressão, temperatura, vazão de CO₂ e tempo de extração. Altos rendimentos de carvona e limoneno foram obtidos a 125 bar e 32 °C, vazão de CO₂ de 4 kg/h e tempo de extração de 45 min (Baysal et al, 1999).

Kim e Hong (1999) estudaram o comportamento das fases do sistema binário: L-carvona-CO₂ e L-Limoneno-CO₂ a 39 e 49 °C com pressões de 60 a 100 bar. As solubilidades das substâncias no CO₂ aumentaram com o aumento da pressão e com o decréscimo da temperatura.

Raeissi e Peters (2001) estudaram o fenômeno da dupla retrogradação no sistema binário etano-limoneno. O trabalho apresenta os dados de ponto de bolha, de orvalho e ponto crítico para o sistema binário para cinco composições diferentes de limoneno em etano (intervalo de 99,50 a 99,93% (mol) de etano), a temperaturas de 7 a 57 °C e pressões de 30 a 60 bar. O sistema apresentou valores triplos e quádruplos de ponto de orvalho nas concentrações citadas anteriormente; o sistema binário também mostrou o fenômeno de dupla vaporização retrógrada. Os autores explicam que a dupla vaporização retrógrada ocorre num intervalo muito limitado de composição e temperatura, e muito próximo do ponto crítico dos componentes mais voláteis, isso é o resultado de uma transição contínua da fase do ponto crítico do componente volátil puro para o ponto crítico da mistura, altamente concentrado no componente mais volátil. Os autores Raeissi e Peters (2001) acreditam que este é um comportamento normal, o qual sempre ocorre nas misturas binárias com dois componentes que diferem grandemente no tamanho molecular. Não é facilmente encontrada experimentalmente, pois, segundo os autores, ocorre numa região muito pequena. Esses resultados indicaram que uma mudança muito pequena na concentração pode variar significativamente o tipo de curva do ponto de orvalho; eles mostraram quantitativamente o quão pequena é a variação de temperatura para a dupla vaporização retrógrada. O conhecimento do comportamento do equilíbrio de fases para os componentes majoritários do extrato de *L. alba* pode fornecer informações úteis permitindo a operação do sistema SFE nas regiões nas quais a solubilidade é um máximo.

2.5.1.1 Modificadores ou co-solventes

O dióxido de carbono possui pouca habilidade para dissolver moléculas polares mesmo em condições de altas densidades, porém esta característica pode ser modificada

pela adição de pequenas quantidades de substâncias polares, tais como água e etanol. Estas características ainda podem ser alteradas pelas condições operacionais como temperatura e pressão (Pellerin, 1991). Esses modificadores alteram as propriedades de solvatação dos fluidos supercríticos (Taylor, 1996).

Chang *et al* (2000) extraíram óleo essencial de chá verde comercial com dióxido de carbono adicionando como co-solventes água e etanol, concluindo que o etanol a 95% resulta em rendimento quatro vezes maior comparado à adição de água como co-solvente. Wang *et al* (2001) realizaram extração supercrítica com dióxido de carbono de raízes de ginseng, adicionando etanol 6% (molar) como co-solvente, obtendo maior rendimento em relação à extração com dióxido de carbono puro.

Mendez *et al* (2000) verificaram o aumento dos teores de curcumina na oleoresina após a adição do co-solvente etanol na extração a partir de rizoma de cúrcuma, com CO₂ na pressão de 300 bar a 318 K. Os valores de rendimento para oleoresina foram maiores quando se utilizou o co-solvente etanol (22,58%) em quantidade aproximadamente igual a 50% da massa de solvente utilizado no ensaio somente com CO₂; usando-se somente CO₂ foi possível obter de 5 a 6% da oleoresina presente na matéria-prima.

O melhor co-solvente para a obtenção de oleoresina de *Curcuma longa* L. foi selecionado por Braga *et al* (2003). O co-solvente utilizado que proporcionou maior rendimento em curcuminóides (0,21%) e rendimento total de extrato de 6,61% (base sólido seco) foi a mistura de etanol e isopropanol (1:1) e 95% (em massa) de CO₂, a pressão 300 bar e temperatura de 30°C. Neste ensaio 4,43% do rendimento total foi obtido após 140 minutos de extração. A SFE com co-solvente tem a capacidade de extrair tanto a fração leve quanto a pesada da cúrcuma, identificadas como óleo essencial e oleoresina.

2.5.1.2 Extração acelerada com solvente

A extração acelerada com solvente (Accelerated Solvent Extraction - ASE) tem sido utilizada em associação aos sistemas cromatográficos em condições supercríticas, como metodologia analítica para separação de compostos em escala laboratorial. Esta metodologia consiste em utilizar altas porcentagens de um co-solvente em alta velocidade de extração, promovendo assim a redução do tempo do processo com rápida obtenção dos compostos de interesse. A metodologia tem sido utilizada para recuperação de hidrocarbonetos e hidrocarbonetos aromáticos cíclicos (Polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs) (Popp et al, 1997), surfatantes aniônicos (Kreisselmeier e Dürbeck, 1997), lipídeos (Schäfer, 1998) e outros compostos orgânicos (Li et al, 2003).

Li et al (2003) estudaram a extração de hidrocarbonetos por extração acelerada com solvente e outros dois métodos (extração por energia de microondas e extração por ultrassom) visando comparar os rendimentos de substâncias como fenol e cresol, obtendo os maiores rendimentos quando utilizada a metodologia de extração acelerada com hexano.

Kreisselmeier e Dürbeck (1997) estudaram a determinação de compostos presentes em sedimentos com a utilização da extração acelerada com metanol (27,5 %) e dióxido de carbono em condições supercríticas (150 bar a 100 °C) com vazão de 1,0 mL/min. Quando as pressões foram alteradas para 200, 300 e 450 bar; a variação da pressão favoreceu a extração de compostos diferenciados, porém quando foram avaliados teores de 0-98% (v) de co-solvente (metanol), a extração obteve uma correlação linear entre recuperação dos compostos (%) e volume de co-solvente; com 98 % de co-solvente houve uma recuperação de quase 100 % dos compostos desejados. Chang et al (2000) e Chang et al (2001) usaram água e etanol como co-solvente para a

extração da fração volátil de chá verde; o uso de 95% de etanol aumentou o rendimento em quatro vezes quando comparado ao uso da água.

No processo de extração supercrítica, a literatura reporta alguns trabalhos que utilizaram como variável do processo a porcentagem de co-solvente utilizada no sistema, geralmente é adicionado até 10% de co-solvente no sistema (Rónyai et al, 1998; Badalyan et al, 1998; Zancan et al, 2002; Wang et al, 2001; Braga et al, 2003).

2.5.1.3 Extração Fracionada

A maior desvantagem dos processos de extração é a necessidade de um pré-tratamento na matriz vegetal, pois estes promovem a co-extração de compostos indesejáveis; no caso da SFE com CO₂ ocorre a co-extração de compostos pesados (ceras). A comparação de pré-tratamentos realizados em folhas de *Origanum virens* L. mostrou que o maior rendimento das ceras cuticulares foi obtido na cominuição normal (cerca de 1,8%) da matriz vegetal e a rápida descompressão obteve um dos menores valores, cerca de 0,8% (Gaspar et al, 2000). O uso de fracionamento na etapa de separação do extrato foi realizado por Reverchon (1997) resultando na precipitação das ceras num primeiro separador resfriado e a coleta de óleo essencial num segundo separador.

Reis-Vasco et al (2000) utilizaram dois separadores em série no fracionamento do extrato de *Mentha pulegium* L. para obtenção do óleo essencial. O primeiro separador foi operado a 80 bar e -16 °C para induzir a precipitação da cera cuticular, e o segundo foi operado a 18 bar e 0 °C para minimizar as perdas dos compostos voláteis do óleo essencial de *Mentha pulegium* L. No entanto o isolamento do óleo essencial tem sido um desafio, ceras cuticulares e óleo essencial são co-extraídos devido as suas

diferentes solubilidades em CO₂ supercrítico e diferentes localizações na matéria vegetal.

A separação por fracionamento do óleo e óleo essencial das sementes de funcho foi realizada por Reverchon et al (1999). O método consistiu em utilizar três diferentes vazões de CO₂ (0,5; 1,0 e 1,5 kg/h). No primeiro passo da extração o processo foi realizado a 90 bar e 50 °C visando a extração do óleo essencial, onde no primeiro separador, as ceras foram coletadas e no segundo separador o óleo essencial (com rendimento de 1,8%). No segundo passo a extração foi realizada em 40 °C e 200 bar para extração do óleo vegetal, ambos obtidos com sucesso. Quando realizado num único passo a 40 °C e 200 bar em três separadores (o primeiro para a cera, o segundo e o terceiro para o óleo vegetal) quase sempre a seletividade da precipitação era baixa, obtendo óleo essencial juntamente com óleo vegetal em pequenas quantidades.

Um processo alternativo no caso da *Curcuma longa* L. seria o caso de SFE fracionada: na primeira etapa seria obtido o óleo essencial, usando somente o CO₂; na segunda etapa um extrato com CO₂ e co-solvente, como realizado por Pasquel et al (1999) e Yoda et al (2001). Pasquel et al (1999) estudou a utilização do pré-tratamento com CO₂ na SFE de estêvia, observando que o rendimento de glicosídeos foi maior em folhas de estêvia pré-tratada com CO₂ em relação às folhas sem pré-tratamento. Yoda et al (2001) realizou SFE de estêvia com CO₂ como pré-tratamento, posteriormente adicionou água ao sistema, concluindo que no pré-tratamento com CO₂ o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A foram concentrados na matriz. Após a extração com CO₂ foi adicionado água ao sistema onde estes foram obtidos.

2.5.1.4 Geometria do leito

Berna et al (2000) estudaram a influência da altura do leito na cinética de extração por fluido supercrítico de óleo volátil de casca de laranja. Foram estudadas

diferentes escalas com volumes de extrações de 0,5 e 5 litros. Um dos fenômenos que ocorreu nos experimentos foi a formação de aglomerados de partículas, pelo conteúdo de óleo que aumentou a resistência à transferência de dentro da partícula, e a perda de homogeneidade na vazão do fluido pela variação da densidade das partículas. O modelo de Sovová (1994) ajustou bem os dados do processo quando avaliada a altura do leito no sistema casca de laranja + CO₂.

Reverchon e Marrone (1997) estudaram a extração de óleo volátil de flores de cravo para quatro diferentes alturas de leito num mesmo equipamento, com vazão de CO₂ de 1,2 kg/h, a 90 bar e 50 °C. As razões de H_B/D_B (H_B =altura do leito, D_B = diâmetro do leito) variaram de 3,9 a 0,96, mostrando que o perfil de concentração foi completamente desenvolvido no processo quando utilizado o menor comprimento de leito.

Carvalho et al (2005) estudaram a extração supercrítica de alecrim, com o objetivo de obter parâmetros de processo no estudo da razão de altura do leito/diâmetro do leito. Foram desenvolvidas duas equações que relacionam os parâmetros de processo: vazão de solvente, massa de alimentação, altura/diâmetro de leito e tempo de extração. A relação entre estes parâmetros permitiu estudar as cinéticas de extração em dois equipamentos com geometrias de leito diferentes, encontrando o mesmo comportamento para as cinéticas e reproduzindo os parâmetros cinéticos para o sistema alecrim + CO₂ nos equipamentos testados. Moura et al (2005) usaram a mesma correlação para estudar o sistema funcho + CO₂, mostraram que para leitos com o mesmo diâmetro, quando a razão H_B/D_B aumenta, a vazão do solvente deve aumentar para manter o mesmo tempo de extração ou a razão de massa de solvente/massa de alimentação.

2.5.1.5 Cinética de Transferência de Massa

O processo de extração de substratos de produtos naturais em partículas sólidas pode ser dividido em duas etapas: transporte de substâncias de dentro do material sólido até a interface sólido/fluido e solubilização das substâncias pelo solvente e o seu transporte para a fase fluida.

Graficamente, o comportamento de uma extração geralmente é descrito por uma curva global de extração obtida pela massa total de extrato em função do tempo de extração, mantida constante a vazão do solvente. As curvas típicas de rendimento global (OEC – Overall Extraction Curves) apresentam, três fases distintas. A primeira, onde se retira o óleo exposto na superfície da partícula, denominado período de taxa constante de extração (CER - Constant Extraction Rate). Na segunda etapa, a camada superficial de óleo na partícula começa a apresentar falhas e por isso menor quantidade de óleo é solubilizada. Esta etapa é denominada etapa de taxa decrescente de extração (FER - Falling Extraction Rate). Na terceira etapa o óleo é retirado de dentro da partícula, num processo difusional (Bruner, 1994; Meireles e Nikolov, 1994).

A estimativa dos diferentes parâmetros envolvidos na SFE pode ser realizada utilizando-se uma modelagem matemática. Segundo Reverchon (1997), vários modelos podem ser aplicados na interpretação da cinética de transferência de massa na SFE como Crank (1975), Goto et al (1993), Sovová (1994) e outros. Entretanto, devido às particularidades de cada matriz vegetal, diferentes mecanismos de transferência de massa e de equilíbrio termodinâmico foram considerados nos diferentes modelos.

Reverchon (1997) utilizou o modelo de Crank (1975). A partícula é considerada um sólido esférico contendo os solutos e o solvente que compõe o meio, afirmando que o mecanismo de transferência de massa que domina o processo é a difusão, sendo o coeficiente de difusão efetivo (D) o único parâmetro ajustável (Equações 1 e 2).

$$m_{extrato}(h = H, t) = \left(1 - \frac{X}{X_0}\right) X_0 F_t \quad (1)$$

onde:

$$\frac{X}{X_0} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi D t}{r^2}\right) \quad (2)$$

F = massa de alimentação (kg);

r = raio da partícula (m);

t = tempo (s);

D = coeficiente de difusão do soluto no leito (m²/s).

Esquível et al (1999) utilizaram um modelo empírico baseado na equação da cinética de crescimento microbiano para descrever a cinética de extração dos solúveis da polpa de azeitona (Equação 3). Este modelo não deixa explícitas as interações entre o soluto e a matriz sólida e/ou contabiliza o fracionamento do óleo durante o processo de extração. Contudo, o modelo apresentou bons resultados quando aplicado à extração de óleos de plantas medicinais e aromáticas utilizando dióxido de carbono (Naik e Lentz, 1989). Este modelo também foi utilizado para ajustar os dados de extração de óleo de khoa (*Satureja boliviana* B.) (Portillo-Prieto, 1999).

$$e = e_{\lim} \left(\frac{t}{k + t} \right) \quad (3)$$

onde:

e = massa de soluto extraído/massa de solvente (kg de extrato/kg de solvente na alimentação);

t = tempo (s);

e_{lim} = massa do soluto extraído/massa de solvente num tempo infinito de extração;

k = parâmetro ajustável.

Goto et al (1993), na modelagem das OEC de menta, apresentaram um modelo, onde o leito de extração é formado por partículas porosas, que envolvem óleos e lipídeos. A geometria da partícula é tratada como uma placa plana, onde a espessura é desprezível em relação às demais dimensões. O processo de extração é dominado tanto pela dessorção como pela transferência de massa na fase fluida. De acordo com esta interpretação, os parâmetros necessários para a modelagem das OEC são o coeficiente global de transferência de massa (Φ) e a constante de equilíbrio de desorção (K) (Equação 4).

$$m_{extrato}(h = H_B, t) = \frac{A[\beta/K + (1-\beta)]X_0\rho_s Q_{CO2}}{\rho_{CO2}} \left(\frac{\tau}{a_1} \left(\exp\left(a_1 \frac{t}{\tau}\right) - 1 \right) + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - \exp\left(a_2 \frac{t}{\tau}\right) \right] \right) \quad (4)$$

onde:

$$a_1 = \frac{1}{2} \left(-b + \sqrt{b^2 - 4c} \right); \quad (5)$$

$$a_2 = \frac{1}{2} \left(-b - \sqrt{b^2 - 4c} \right); \quad (6)$$

$$A = \frac{(1-\varepsilon)\phi}{[\beta + (1-\beta)K]\varepsilon(a_1 - a_2)}; \quad (7)$$

$$b = \frac{\phi}{\beta + (1-\beta)K} + \frac{1}{\varepsilon} + \frac{\phi(1-\varepsilon)}{\varepsilon}; \quad (8)$$

$$c = \frac{\phi}{[\beta + (1-\beta)K]\varepsilon}; \quad (9)$$

$$\phi = \kappa_p a_p \tau; \quad (10)$$

ε = porosidade do sólido (-);

K = constante de equilíbrio de adsorção (-);

τ = volume do leito/fluxo volumétrico do solvente (s);

ϕ = parâmetro relativo ao coeficiente de transferência de massa global;

κ_p = coeficiente de transferência de massa global (s^{-1});

a_p = área da partícula (m^{-1});

Q_{CO_2} = vazão do dióxido de carbono (g/min);

X_0 = quantidade máxima de extrato obtida no sólido ($g_{extrato}/g_{sólido}$)

ρ_s = densidade do sólido (g/cm^3)

Sovová (1994) apresentou um modelo no qual o extrato é considerado como proveniente de células rompidas no processo de moagem (fácil acesso), e proveniente de células intactas ou de difícil acesso. De acordo com esta hipótese, a autora afirma que o processo de extração pode ser modelado por dois mecanismos de transferência de massa: o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}), que descreve o período de taxa de extração constante (CER) e o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{XA}) que descreve o processo difusivo conforme as Equações (11) a (18):

para $t \leq t_{CER}$:

$$m_{extrato}(h = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-Z)] \quad (11)$$

para $t_{CER} < t \leq t_{FER}$:

$$m_{extrato}(h = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - t_{CER} \exp(Z_w - Z)] \quad (12)$$

para $t > t_{FER}$:

$$m_{extrato}(h = H, t) = m_{SI} \left\{ X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left[1 + \exp \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{m_{SI}} \right] (t_{CER} - t) \left(\frac{X_p}{X_0} \right) \right\} \quad (13)$$

Onde:

$$Z = \frac{m_{SI} k_{YA} \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon) \rho_s}; \quad (14)$$

$$W = \frac{m_{SI} k_{YA}}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon)}; \quad (15)$$

$$Z_W = \frac{ZY^*}{WX_0} \ln \left[\frac{X_0 \exp \left[\frac{WQ_{CO2}}{m_{SI}} (t_{CER} - t) \right] - X_K}{X_0 - X_K} \right]; \quad (16)$$

$$t_{CER} = \frac{m_{SI} X_P}{Y^* Z Q_{CO2}}; \quad (17)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_{SI}}{Q_{CO2} W} \ln \left[\frac{X_K + X_P \exp(WX_0 / Y^*)}{X_0} \right]; \quad (18)$$

Q_{CO2} = vazão mássica de solvente (kg CO₂/s);

Y^* = solubilidade do extrato no solvente (kg de extrato/ kg de CO₂);

m_{SI} = massa de sólido inerte (kg), sendo $m_{SI} = m_{SS} \cdot (1 - X_0)$;

m_{SS} = massa de sólido seco (kg);

X_0 = Rendimento Global = massa de soluto/massa de sólido total (kg de extrato/kg de matéria-prima na alimentação);

X_P = massa de soluto/ massa de soluto de fácil acesso (kg extrato/kg extrato de fácil acesso);

X_K = massa de soluto/massa de soluto de difícil acesso (kg extrato/kg extrato de difícil acesso);

k_{Xa} = coeficiente de transferência de massa na fase sólida (s⁻¹);

k_{Ya} = coeficiente de transferência de massa na fase fluida (s⁻¹);

ρ = densidade do sólido (kg/m³);

ρ_{CO2} = densidade do CO₂ (kg/m³);

ε = porosidade do leito;

t_{CER} = duração do período CER (s);

A hipótese de Sovová (1994) sobre microestrutura vegetal foi verificada na SFE de amêndoa (Marrone et al, 1998) e funcho (Reverchon et al, 1999) usando microscopia eletrônica de varredura. Estes autores mediram o número e a dimensão das células

intactas e rompidas. Baseados nas informações, ambos autores demonstraram que é possível fixar todos os parâmetros no modelo de Sovová, exceto o coeficiente relativo à transferência de massa na fase sólida (k_{XA}). Bons ajustes foram obtidos na modelagem das OEC usando coeficientes internos de transferência de massa de $8,0 \times 10^{-8}$ e $7,5 \times 10^{-9}$ m/s para a amêndoa e funcho, respectivamente. Reverchon *et al* (1999) reuniram informações sobre microestrutura de várias espécies de sementes, fixando as mesmas quanto a forma (esférica) para estudo da modelagem da extração dos óleos vegetais, com diferentes tamanhos de partículas, concluindo que o modelo não pode ser válido para todas as estruturas de sementes existentes na natureza. Uma análise das estruturas de sementes mostrou que as células que possuem óleo de várias sementes estudadas têm diferentes tipos e tamanhos.

Gaspar *et al* (2001) estudaram a microestrutura de folhas de *Origanum virens* L., rompendo os tricomas glandulares existentes nas folhas através de rápida descompressão (Fast Decompression - FD) no processo de extração do óleo com CO₂ comprimido. A eficiência do processo foi verificada através da quantificação das glândulas rompidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). No estudo das estruturas glandulares por MEV é possível obter dados da microestrutura foliar da espécie, como morfologia dos tricomas, tamanho e rompimento ou não destes pelo tratamento empregado nesta matriz, objetivando obter alto rendimento de óleo. O cálculo da eficiência do rompimento das glândulas secretoras é realizado pela Equação 19.

$$Eff = 100 \times \frac{E_{200}^{FD} - E_{200}^0}{100 - E_{200}^0} \quad (19)$$

O grau de extração da matriz não tratada e tratada são definidas pelas Equações 20 e 21.

$$E_{200}^0 = 100[X_A^0 + \alpha_{200}(X_B^{FD} + X_C^{FD})] \quad (20)$$

$$E_{200}^{FD} = 100(X_A^0 + X_B^{FD} + \alpha_{200}X_C^{FD}) \quad (21)$$

onde:

α_{200} = fração de óleo completamente extraída das glândulas rompidas em 200 min de extração;

X_A^0 = fração de glândulas rompidas na matriz vegetal sem tratamento, fração de óleo facilmente extraível na matriz vegetal sem tratamento;

X_B^{FD} = fração de glândulas rompidas durante o tratamento FD, fração de óleo liberada da matriz pelo tratamento FD;

X_C^{FD} = fração de glândulas que permaneceram intactas depois do tratamento FD, fração de óleo que permaneceu na matriz vegetal após o tratamento FD;

$$X_A^0 + X_B^{FD} + X_C^{FD} = 1$$

Reis-Vasco et al (2000) também realizaram modelagem do sistema *Mentha pulegium* L./CO₂ através de informações botânicas e microestruturais das folhas do *Mentha pulegium* L. Outras publicações como Reverchon (1997) e Sovová (1994) estudaram a resistência a transferência de massa no processo de extração supercrítica. Vários modelos publicados ainda que não diferem do ponto de vista matemático, diferem sobre os mecanismos de controle de transferência de massa no processo de extração supercrítica em diferentes matrizes vegetais, assim como a estrutura vegetal, o equilíbrio e a dispersão axial consideradas na formulação de modelos (Reis-Vasco, 2000).

Desta forma, a modelagem da extração supercrítica do óleo essencial para outras matérias vegetais necessita de maiores informações sobre os vários comportamentos presente nos diferentes tipos de matrizes vegetais (Reis-Vasco, 2000). Cada hipótese de

estrutura vegetal não pode ser utilizada para os diferentes tipos de matrizes e tem de ser particularizados para estruturas microscópicas específicas; a literatura apresenta somente dados de estruturas secretoras superficiais de matrizes vegetais.

2.6 Reaproveitamento do Resíduo do processo de SFE

As oleoresinas de cúrcuma e gengibre têm sido estudadas por suas características farmacológicas, e identificado os parâmetros do processo de extração supercrítica para maximizar o rendimento dos extratos destas espécies (Braga et al, 2003; Zancan et al, 2002). O Laboratório de Separações Físicas (DEA-FEA-Unicamp) têm realizado pesquisas com estas duas fontes de oleoresina, permanecendo até então o resíduo destas matérias-primas inutilizado pela escassez de estudos sobre o reaproveitamento deste material como subproduto.

O resíduo do processo de SFE para algumas espécies utilizadas na extração de óleo volátil e oleoresina, como tubérculos de cúrcuma e gengibre, contém cerca de 30-50% de amido (Braga et al, 2003). Estes resíduos de cúrcuma e gengibre podem conter traços de oleoresina, caracterizando-os então como amidos especiais com alto potencial comercial. O resíduo de cúrcuma apresentou traços de curcuminóides, ou seja coloração amarela. O resíduo originado em outros processos de extração de oleoresina e óleo volátil que utilizam altas temperaturas e umidade, pode ter sido gelatinizado pelo processo tornando o amido indisponível para o reaproveitamento.

O resíduo ou bagaço do gengibre obtido na extração com fluido supercrítico (SFE) quando hidrolisado com água subcrítica e CO₂ produziu açúcares redutores. O alto grau de hidrólise (97% depois de 15 minutos de reação) e alto rendimento de açúcares redutores (18% depois de 11 minutos de reação) foram estabelecidos a 200 °C

e 150 bar. Os resultados indicaram que a quantidade de açúcar reduzido foi degradada em furfural, ácidos e gases (Moreschi et al, 2004).

Jyothi et al (1999) estudaram as propriedades físico-químicas do amido de cúrcuma, e seus resultados indicaram uma viscosidade estável, um gel resistente e facilmente digerível, com algumas propriedades modificadas quando a cor amarela foi removida destes amidos. Isto enfatiza que a coloração do amido de cúrcuma é um potencial para aplicação na indústria de alimentos.

O amido é uma substância de reserva predominante em plantas e possui cerca de 70-80% de calorias consumidas pelos humanos no mundo todo. Alguns amidos modificados com características físicas específicas podem ser utilizados em alimentos com as características de baixo teor de gordura, promovendo a percepção sensorial de baixo teor de gordura e cremosidade (Whistler et al, 1999).

O amido é uma estrutura semicristalina natural e a cristalinidade é exclusivamente associada com a amilopectina, enquanto as regiões amorfas são representadas pela amilose (Whistler et al, 1999).

Muitos dos grânulos de amidos de tubérculos e raízes, como o amido de batata e mandioca, tendem a ser maiores que os amidos de sementes e são geralmente menos densos e fáceis de gelatinizar. Temperaturas acima da temperatura de gelatinização de 60 °C destroem a cristalinidade (Colonna et al, 1980).

A difração de raio-X têm sido utilizada para revelar a presença e características da estrutura cristalina do amido (Singh et al, 2003); o amido de cereal produz um padrão de raio-X (tipo A) que é indicativo da presença de duas hélices paralelas e separadas por água intersticial.

Para os tubérculos e raízes, o padrão de raio-X é tipo B com colunas de moléculas de água substituindo umas das duplas hélices, e o padrão tipo C é uma mistura dos tipos A e B (Hoover et al, 2001).

A magnitude da interação entre as cadeias de amidos nas regiões amorfas e cristalinas fornece informações sobre o poder de inchamento e a solubilidade do amido. As propriedades da viscosidade são supostamente dependentes das mudanças na estrutura, tamanho e composição dos grânulos de amido (Madse et al, 1996).

A entalpia e a temperatura de gelatinização do amido dependem da microestrutura e do grau de cristalinidade do grânulo e também do tamanho e tipo do grânulo, bem como da razão de amilose/amilopectina. Quanto menor o grânulo, maior será a temperatura de gelatinização (Aggarwal et al, 2004). Amidos de tubérculos contêm poucas e curtas cadeias de amilopectina, sendo estas ainda mais longas que as dos cereais (Hizukuri et al, 2004).

A estrutura tridimensional das grandes moléculas como proteínas e polissacarídeos podem ser rompidas pela alta pressão; o perfil da estrutura amilácea sob alta pressão depende da estrutura cristalina e da resistência do amido que aumenta na sequência dos padrões tipo A > tipo C > tipo B. Mas isso tem sido descrito para altas pressões da ordem e maiores que 1000 MPa, [Mertens (1993) citado por Francisco e Sivik, 2002].

Pressões de 80-300 bar foram usadas na gelatinização de amidos de mandioca, trigo e batata com dióxido de carbono supercrítico, e o processo não mudou o padrão de raio-X destes amidos. Mas ocorreram diferenças no grau de gelatinização: aumentando a pressão houve um decréscimo no grau de gelatinização (Mertens (1993) citado por Francisco e Sivik, 2002).

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é largamente usada em preparações de alimentos e de forma medicinal. Pela sua fácil digestibilidade, a cúrcuma tem sido usada na indústria para preparar alimentos especiais para crianças (Jyothi et al, 2003).

O gengibre (*Zingiber officinale*), originário do sul da Ásia (Govindarajan, 1982) é usado em alimentos, bebidas, indústrias cosméticas e farmacêuticas (Mustafá et al, 1990).

Propriedades agronômicas e fenotípicas de tubérculos e raízes tropicais têm sido bem documentadas (Whistler et al, 1999). Mas, as propriedades físicoquímicas de muitos amidos de tubérculos e raízes ainda não foram estudadas; existindo a necessidade de intensificar as pesquisas no desenvolvimento dos produtos para explorar estes amidos na indústria de alimentos. A maior quantidade de amido destes tubérculos focaliza a importância para sua utilização na indústria como subproduto da indústria de extração de óleo volátil e oleoresina. Em processos industriais, o amido pode sofrer algumas transformações físicoquímicas e tecnológicas para atender as aplicações da indústria, principalmente da indústria de alimentos.

Embora o amido de várias plantas pode ter dados analíticos similares, tanto sobre forma dos grânulos individuais de amostra para amostra, a análise microscópica é um bom procedimento de diagnóstico para amidos e produtos com amidos. Uma análise microscópica pode incluir um estudo de características do tipo, distribuição do tamanho do grânulo ou medidas de temperatura de gelatinização (Moss-Radley et al, 1976).

Os principais amidos comerciais podem ser analisados quanto a sua forma e tamanho. A batata (*Ipomoea batatas*) possui amido em sua maioria chapados e elipsoidais sendo os menores bem esféricos, com tamanho de 15 a 100 μm , porém a média fica entre 35,5 a 12,5 μm , e numerosos anéis concêntricos ao redor do hilo. A araruta (*Maranta arundinacea*) possui os grânulos semelhantes ao da batata, diferindo

no tamanho, podendo apresentar de 13 a 70 μm , com média de 27 a 54 μm , o hilo é geralmente central. Os grânulos do amido de mandioca (*Manihot esculenta*) são mais duros que os do milho com um contorno angular do tipo poliédrico e hilo marcadamente central, com tamanho de 5 a 35 μm . Algumas espécies de cúrcuma no leste da Índia possuem grânulos de amido com forma oval, elíptica arredondada e de espessura fina, com hilo central, do tamanho de 30 a 60 μm . A *Curcuma leucorrhiz*, possui geralmente o grânulo com tamanho de 105 μm podendo passar de 145 μm (Moss-Radley et al, 1976).

Hoover (2000) estudou o tamanho e o tipo de grânulos de amido de tubérculos e raízes. O tamanho dos grânulos variou de 1 a 110 μm dependendo da fonte do amido. A maior parte dos grânulos era oval, embora alguns apresentaram a forma redonda, esférica, poligonal e alguns tipos irregulares. Quando observado por microscopia eletrônica de varredura, a superfície de todos os grânulos apareceu lisa sem evidência de fissuras. A maior parte dos grânulos são comuns, a exceção são a mandioca e o taro, que apresentam uma mistura de grânulos compostos.

Vasanthan *et al* (1999) isolou amido de batata que possui grande importância comercial, principalmente pela sua polpa na fabricação de papel, e examinou por microscopia eletrônica de varredura. O amido foi pulverizado sobre uma fita adesiva em um porta-amostras de alumínio, recoberto por ouro e examinado num equipamento JOEL (JSM 6301) com potencial de aceleração de 5 kV. O tamanho de partículas encontradas nas diversas espécies de batatas foi entre 10-105 μm e mostraram similaridade em todos os tipos encontrados.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção e pré-processamento da matéria-prima

3.1.1 *Curcuma longa* L

Os ensaios foram realizados com três lotes de matéria-prima; o primeiro lote (M1) foi obtido na Unidade Experimental da EPAMIG (Maria da Fé, Minas Gerais, Brasil), sem nenhum processo de cultivo específico, somente um plantio intercalado na cultura do pessegueiro. O segundo (S1) e terceiro (S2) lotes foram obtidos na Fazenda Experimental do Lageado em Botucatu – UNESP em Botucatu/ São Paulo. O segundo lote foi cultivado sem adubação, porém o terceiro foi obtido à partir de ensaios experimentais de adubação e avaliado em função da biomassa e teor de óleo volátil e curcuminóides e selecionados para utilização no processo SFE, de acordo com estudos realizados na UNESP (Braga et al, 2004). A matéria-prima foi seca em estufa à 45 °C, e foi moída em moinho de facas (Marconi MA 340, Piracicaba – SP).

3.1.2 *Lippia alba*

As folhas de *Lippia alba* M. foram selecionadas a partir do cultivo na Fazenda Experimental do Lageado em Botucatu – UNESP em São Paulo. A seleção das plantas foi realizada de acordo com a produção em biomassa, em teor de óleo voláteis e principais componentes do óleo, carvona e limoneno. As plantas que produziram maior biomassa e rendimentos de óleo volátil foram selecionadas para este trabalho (Erhlet, 2003). As folhas foram secas em estufa à 35 °C, moídas por impacto em moinho de hastes (Tecnal TE 631, Piracicaba-SP).

3.1.3 Amido de cúrcuma e gengibre

Os resíduos amiláceos de cúrcuma e gengibre utilizados neste trabalho foram obtidos previamente em trabalhos desenvolvidos no Lasefi por Braga *et al* (2003) e Zancan *et al* (2002). Estas matérias-primas foram utilizadas na obtenção de extrato via SFE com CO₂ e EtOH/IsoC3 como co-solvente (10% v/v) a 300 bar e 30 °C para cúrcuma (Braga *et al*, 2003) e IsoC3 (1,5% v/v) e 250 bar para o gengibre (Zancan *et al*, 2002).

Estas amostras foram codificadas com os símbolos C_A (amido de cúrcuma antes da SFE), C_D (amido de cúrcuma depois da SFE), Z_A (amido de gengibre antes da SFE) e Z_D (amido de gengibre depois da SFE).

3.1.4 Caracterização da matéria-prima

O teor de umidade das matérias-primas cúrcuma e falsa melissa foram determinados pelo método de destilação com xylol (Jacobs, 1981).

As distribuições do tamanho de partículas do sólido para todas as matérias-primas utilizadas, foram determinadas utilizando um sistema de peneiras vibratórias (Bertel, model 1868, Caieiras, SP) por 10 minutos, com uma série de peneiras Série Tyler (W.S. Tyler, EUA). Para a cúrcuma e falsa melissa as partículas com meshes de 24, 32 e 48 em igual proporção foram utilizadas nas extrações, para os amidos as partículas foram separadas com 80 mesh. Após a separação granulométrica, a matéria-prima foi acondicionada em filmes de polietileno (espessura 0,1 mm) e armazenadas no LASEFI-DEA/FEA/Unicamp em freezer doméstico (Brastemp Frostfree, São Bernardo do Campo, SP à -10 °C), em ausência de luz para minimizar as perdas dos curcuminóides, no caso da cúrcuma.

3.2 Composição centesimal

Foram determinadas a composição centesimal para as matérias-primas cúrcuma e amido isolado do resíduo amiláceo de cúrcuma e gengibre seguindo metodologia da A.O.A.C (1995a, b) (cinzas: nº 4.1.10; lipídeos: nº 32.125; proteína bruta: nº 32.1.22; amido nº 32.2.05; açúcares redutores nº 960.06; fibras nº 4.6.01). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.3 Metodologias de extração

Foram utilizadas quatro metodologias de extração: Soxhlet (SoE), hidrodestilação (HD), extração a baixa pressão (LPSE) e extração com fluido supercrítico (SFE).

Para os extratos obtidos por extração por SoE, LPSE e SFE, o solvente foi removido por evaporação num sistema de rotaevaporação (Laborota, model 4001, Viertrieb, Alemanha) à 35 °C, com controlador de vácuo (Heidolph Instruments GMBH, model Rotavac control, Viertrieb, Alemanha) utilizando no máximo 120 mbar.

3.3.1 Extração com solvente orgânico (Soxhlet)

O extrato alcoólico foi obtido em um aparelho de Soxhlet utilizando a proporção de sólido/solvente de 1:30 (EtOH/IsoC3, 1:1) (96% de pureza, P.A., Merck); o sistema foi mantido em refluxo durante 180 min. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.3.2 Hidrodestilação

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação seguindo o método da A.O.A.C. número 962.17 (A.O.A.C., 1995a) mantido o refluxo por 120 minutos, o que permitiu a obtenção de um volume constante de óleo extraído. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.3.3 Extração a Baixa Pressão

Para a extração a baixa pressão foram utilizadas duas razões de sólido/solvente 1:10 e 1:100. Como ensaio preliminar foram realizadas extrações em leito agitado usando uma Incubadora Refrigerada Orbital (Modelo MA 420, Marconi, Piracicaba-SP) a 30 °C e 168 rpm por 6 h, utilizando o método de Povh et al (2001) adaptado. Em intervalos de 30 minutos amostras foram retiradas da incubadora e analisados os extratos.

Posteriormente, a extração a baixa pressão (Low Pressure Solvent Extraction - LPSE), tanto da cúrcuma quanto da falsa melissa, foi realizada a temperatura e pressão ambientes aproximadas de 25 °C e 0,935 bar, num extrator de leito fixo (coluna de vidro de comprimento de 30×10^{-2} m e diâmetro interno de $2,8 \times 10^{-2}$ m). O leito fixo foi formado no interior de uma célula de nylon (mesh 80). A vazão do solvente foi controlada por uma bomba Masterflex Pump Controller (Cole Parmer Instrument-Co, Chicago, EUA); etanol 96% (Merck, São Paulo SP) foi utilizado, e empregada uma razão de sólido/solvente de 1:10. O sistema foi mantido sob operação por 180 minutos. As extrações foram realizadas em triplicata.

Foram retiradas alíquotas de 1 mL do reservatório (1 L) a cada 30 minutos, não modificando a concentração do solvente por ser uma alíquota pequena, porém representativa.

3.3.4 Extração Supercrítica

Os ensaios de extração supercrítica foram realizados em uma unidade contando com uma célula de extração de aproximadamente 221×10^{-6} m³ (comprimento de $37,5 \times 10^{-2}$ m, diâmetro interno de $2,74 \times 10^{-2}$ m) e pressão máxima permitida de 400 bar, equipamento similar ao descrito por Braga et al (2003).

O rendimento global foi obtido para todas as metodologias utilizadas, sendo definido como o máximo rendimento obtido no processo de extração até o esgotamento do leito (X_0), é representado pela porcentagem de extrato obtida a partir da matéria-prima seca (Rodrigues et al, 2003).

3.3.4.1 *Curcuma longa* L.

Para a obtenção de extratos de cúrcuma, o leito foi formado com 0,015 – 0,061 kg de partículas de meshes de 24 a 48 dentro de uma célula de nylon (mesh 80); a densidade aparente do leito foi de 530 kg/m³. Os espaços que permaneceram vazios dentro da célula foram preenchidos com pérolas de vidro de meshes 8–10. O solvente usado foi CO₂ (99,5%, Gama Gases Especiais, Campinas - SP). As extrações foram finalizadas em 300 minutos. A separação do solvente/soluto foi realizada na válvula micrométrica, num frasco de vidro de 50 mL e numa coluna de vidro de 8 mm empacotada como adsorvente Porapak Q (80/100 mesh, Supelco Park, Bellefonte, EUA); a coluna de adsorção ou coluna de captura foi usada para recuperar o soluto que possa estar solúvel no CO₂ gasoso. A tubulação da linha de extração foi lavada com etanol para recuperação do extrato depositado na mesma durante o processo. Este solvente foi evaporado num rotaevaporador nas condições de 35 °C em vácuo máximo de 120 mbar. Assim, a massa total de extrato foi determinada pela soma de extrato obtida durante a extração, o extrato retido na coluna de adsorção e na limpeza da linha do processo.

Para os ensaios de extração de oleoresina de cúrcuma foram utilizadas condições de pressão e temperatura já determinadas por Braga et al (2003), ou seja, a pressão de 300 bar e temperatura de 30 °C e co-solvente EtOH/IsoC3 na proporção 1:1 (v/v).

O estudo com a espécie *Curcuma longa* L. foi realizado de acordo com o fluxograma de trabalho da Figura 2.7.

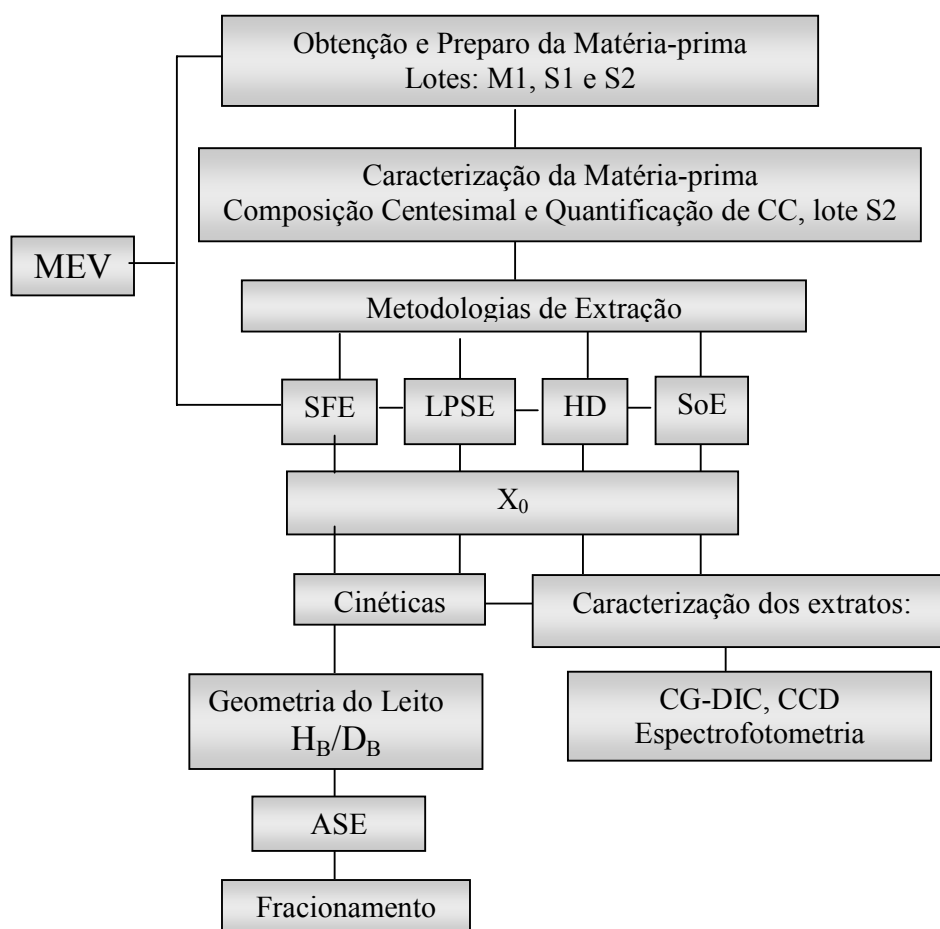


Figura 3.1 Fluxograma de trabalho com a espécie *Curcuma longa* L.

3.3.4.1.1 Estudo da Geometria do leito

Foram realizados ensaios com variação da relação altura do leito e diâmetro do extrator (H_B/D_B), mantendo constante a razão de solvente/sólido em 23,5, a densidade do leito em 530 kg/m^3 e a vazão do solvente ($\text{CO}_2 + \text{etanol} + \text{isopropanol}$) em $6 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$. Estes ensaios foram realizados em duplicata nas condições indicadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Condições operacionais dos experimentos para estudo dos efeitos da altura de leito de extração de *Curcuma longa* L. na cinética de extração

Altura (m)	Volume (cm ³)	H _B /D _B	Matéria-prima (kg)	Tempo de extração
0,05	38	1,8	0,015	131
0,10	75	3,6	0,037	261
0,15	113	5,4	0,061	392

3.3.4.1.2 Estudo da Extração Acelerada com Solvente

Foram realizados ensaios utilizando altas porcentagens de co-solvente, ou seja, utilizando a técnica de extração acelerada com solvente (ASE) com e sem período estático de 30 minutos. As porcentagens de co-solvente foram 10, 50 e 90% (v) de EtOH/IsoC3 (1:1 v/v), mantendo a temperatura, pressão e vazão constantes 30°C, 300 bar, e $5,8 \times 10^{-5}$ kg/s, respectivamente; a razão H_B/D_B foi de 1,8 (melhor razão determinada pelo estudo da seção 3.3.4.1.1) e tempo total de extração de 90 minutos.

3.3.4.1.3 Estudo da Extração Supercrítica Fracionada

Estabelecidas as melhores condições de pressão (300 bar), temperatura em 30 °C, co-solvente (EtOH/IsoC3, 1:1 v/v) (Braga et al, 2003), altura de leito (H_B/D_B =1,8) e proporção de co-solvente (50% v/v), foi estudada a extração supercrítica fracionada do extrato de cúrcuma.

A extração fracionada foi realizada em 2 etapas: *i*) usando-se CO₂ puro como solvente para obtenção da fração volátil, nas condições operacionais estudadas por Began et al (2000) pressão de 225 bar e temperatura de 35 °C; *ii*) usando-se CO₂ e co-solvente (50% de EtOH/IsoC3, 1:1 v/v) nas condições operacionais estabelecidas por Braga et al (2004) de 300 bar, 30 °C, EtOH/IsoC3 (1:1) em 50% (v).

3.3.4.2 *Lippia alba* L.

A espécie *Lippia alba* foi escolhida como mais um objeto de estudo pelas suas características fitoquímicas e quimioterapêuticas, e como um sistema controle no estudo microscópico das estruturas secretoras da espécie, com o objetivo de adaptar as técnicas relatadas na literatura para folhas em rizomas.

Para as extrações da *Lippia alba*, o leito foi formado com 0,003 kg de partículas de meshes de 24 a 48 dentro de uma cesta de nylon (mesh 80); a densidade aparente do leito foi mantida constante em 318,4 kg/m³. Foram realizados ensaios de extração exaustiva (rendimento global, X_0) e cinéticas de extração. Os ensaios foram realizados na unidade I para a obtenção das OECs, a unidade foi descrita por Braga et al, 2004.

Considerando que o limoneno e a carvona são os compostos majoritários da *Lippia alba*, sendo interessante trabalhar em condições próximas à temperatura e pressão de máxima solubilidade para aumentar o rendimento de extração, foram simulados os diagramas de equilíbrio para os sistemas binários limoneno-CO₂ e carvona-CO₂. Os parâmetros de interação binária foram calculados pela equação de estado de Peng-Robinson (PR-EOS), utilizando dados experimentais de Gamse e Marr (2000) a 30 °C; os dados foram ajustados utilizando o software Edeflash v 1.0 (Araújo et al, 1996). As propriedades críticas das substâncias puras foram calculadas pelo método de Joback com o auxílio do software Termofis v 1.0 (Moura et al, 2001). Baseado nos dados de equilíbrio de fases, os ensaios de extração foram feitos de acordo com um planejamento fatorial com dois níveis de temperatura (40 °C e 50 °C) e dois níveis de pressão (80 e 120 bar) e um ponto central a 45 °C e 100 bar com duplicata no ponto central.

O estudo com a espécie *Lippia alba* M. foi realizado de acordo com o fluxograma de trabalho da Figura 2.8.

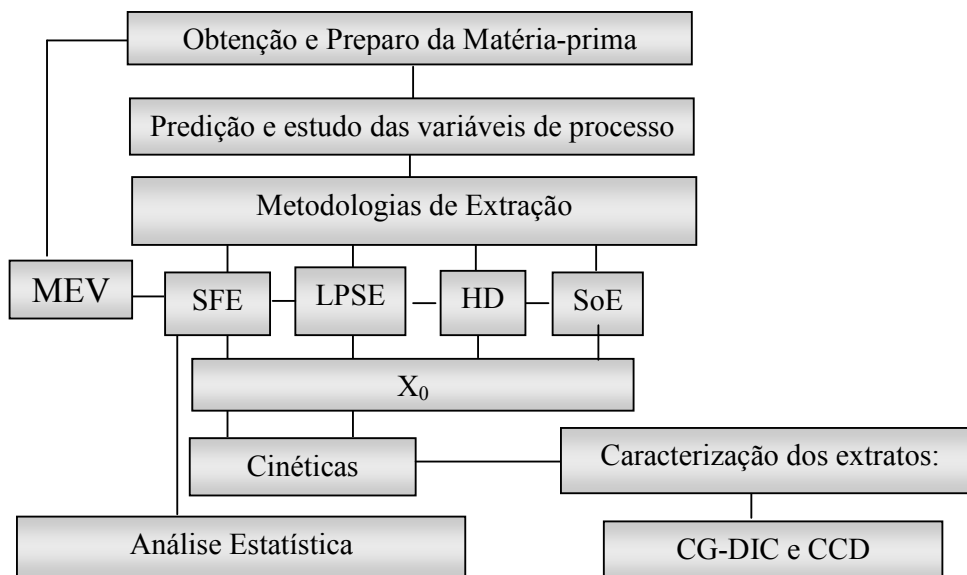


Figura 3.2 Fluxograma de trabalho com a espécie *Lippia alba* M.

3.3.4.3 Análise das Curvas Globais de Extração

Para todos os ensaios, as variáveis resposta consideradas foram: perfil fitoquímico e os parâmetros cinéticos: M_{CER} (taxa de transferência de massa para o período de taxa constante de extração - kg soluto/s); t_{CER} (duração do período de taxa constante de extração); Y_{CER} (razão mássica de extrato na fase fluida na saída do extrator, para o período de taxa constante de extração -kg/kg CO₂) e R_{CER} (rendimento para o período CER - % em massa); R_{TOTAL} (rendimento total obtido para tempo de extração tendendo a infinito).

Os parâmetros cinéticos foram obtidos através do ajuste de um spline linear (2 retas) usando o software SAS versão 6.12 e os procedimentos PROC REG e PROC GLM (Freud e Littell, 1995). Os relatórios de saída do software SAS estão apresentados no Anexo I.

Os dados experimentais foram ajustados aos modelos de Goto *et al* (1993), Crank (1975), Esquível *et al* (1999) e Sovová (1994) utilizando o software Tecanalysis desenvolvido no Lasefi-DEA/FEA-Unicamp.

Os parâmetros dos modelos utilizados estão apresentados na Tabela 3.2, identificando cada modelo.

Tabela 3.2 Parâmetros dos modelos utilizados para a descrição das OECs de *Curcuma longa* L.

Parâmetros de entrada	Modelos				
	Goto (1993)	Crank (1975)	Esquível (1999)	Sovová (1994)	
Porosidade do leito	X				X
X_0 (g óleo/g de massa de alimentação)	X	X	X		X
Densidade do sólido (g/cm ³)	X				X
Densidade do CO ₂ (g/cm ³)	X				X
Vazão do CO ₂ (g/min)	X				X
Altura do leito (cm)	X				X
Diâmetro da coluna (cm)	X				X
Diâmetro da Partícula (cm)		X			
Massa de sólido na coluna (g)		X	X		X
Porosidade da partícula	X				
M_{CER} (g/min)					X
Solubilidade do extrato no solvente (g extrato/g CO ₂)					X
Parâmetros a serem estimados	ϕ	K (s ⁻¹)	$D \times 10^7$ (cm ² /s)	k (min)	k_{ya} (s ⁻¹)

X: Dados de entrada

3.4 Análise da Composição Química dos Extratos

3.4.1 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC)

Os óleos essenciais de cúrcuma e da falsa melissa foram caracterizados em relação a sua composição química em cromatógrafo à gás com detector por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu, CG 17A, Quioto, Japão) com coluna capilar de sílica

fundida DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom - EUA). O gás hélio foi utilizado como gás carreador (1,7 mL/min, 99,99% de pureza, White Martins Gases Industriais, Campinas - SP). Volume de injeção de amostra de 1 µL e razão de split 1/30. Amostras de 5 mg foram diluídas em 1 mL de acetato de etila (grau cromatográfico, EM Science, lot 3903991, EUA).

Curcuma longa L: a coluna cromatográfica foi aquecida inicialmente a 50 °C e mantida a esta temperatura por 5 minutos, a seguir aquecida até 280 °C a 5 °C/min e mantida a esta temperatura por 5 min. As temperaturas do detector e injetor foram 280 °C e 240 °C, respectivamente.

Lippia alba: a programação da temperatura foi 50 °C aquecido até 280 °C a 5 °C/min e mantida a esta temperatura por 5 minutos. As temperaturas do detector e injetor também foram mantidas em 280 °C e 240 °C, respectivamente.

A identificação das substâncias foi baseada na comparação de cromatogramas de extratos de curcuma (Braga et al, 2003) e lippia (Erhlet, 2003) da literatura e nos padrões de carvona ((R)-(-)-carvona – CAS 6845-40-1, Aldrich, código 12.493-1, 98%, lote 24627PI-303) e limoneno ((R)-(+)-limoneno – CAS 5989-27-5 Aldrich, código 18.316-4, 97%, lote 03818JB-343) diluídos em acetato de etila (EM Science, lot 3903991). Todas as amostras pontuais das cinéticas de extração foram analisadas, e em algumas tabelas foram apresentadas os valores médios de porcentagem de área relativa para a cinética de extração.

3.4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após a obtenção dos extratos foi realizada a Cromatografia em Camada Delgada comparativa para a observação da composição total dos extratos observados com o

auxílio de um revelador em luz visível e da presença dos curcuminóides em luz ultravioleta:

a) para luz visível:

- Placa de sílica gel 60 (20 × 20 cm, 1 mm de altura, Merck, código 1055530001, lote 940378601; Alemanha),
- Fase móvel composta por hexano 80% (96% de pureza, P.A., Merck, lote K28659183 104, Alemanha) e acetato de etila 20% (99,5% de pureza, P.A., Merck, lote K225488323 837, Alemanha),
- Revelador: solução de anisaldeído (ácido acético glacial 10 %, ácido sulfúrico 5 %, metanol 85 % e anisaldeído 0,5 %) e aquecidas em chapa elétrica à 100 °C para a revelação das substâncias.

b) para luz ultravioleta:

- Placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm, 1 mm de altura, Merck, lot OB 132176, Alemanha),
- Fase móvel composta por clorofórmio 94% (99,4% de pureza, P.A., Merck, lote K31503045 301, Alemanha), etanol 5% (99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K32173883 325, Alemanha) e acetato de etila 1% (99,5% de pureza, P.A., Merck, lote K32703923 346, Alemanha) (Wagner et al, 1983).
- Fase móvel composta por clorofórmio 89% (99,4% de pureza, P.A., Merck, lote K31503045 301, Alemanha) e acetato de etila 11% (99,5% de pureza, P.A., Merck, lote K32703923 346, Alemanha) (Harborne et al, 1975).
- Revelador: 1% de 2-aminoetil difenilborinato (Sigma, lote 123k2512) em metanol (Wagner et al, 1983).

Os extratos, o óleo essencial e os padrões de curcuminóides (98%, Merck), carvona e limoneno, foram diluídos em acetato de etila e aplicados nas placas com o auxílio de uma seringa cromatográfica. Esta técnica permitiu identificar qualitativamente as substâncias extraídas pelos diferentes solventes.

3.4.3 Quantificação dos Curcuminóides por Espectrofotometria UV-visível

Para a quantificação da mistura de curcuminóides foi utilizado um espectrofotômetro-UV/Visível (Hitachi modelo U-3010, Tóquio, Japão) e a curva de calibração foi construída com dois diferentes padrões: padrão de curcuminóides (grau de pureza 90 %, purificado pelo Ital), padrão de curcumina (grau de pureza de 98%, Merck, lote S35083 205, Alemanha) e etanol (99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K31865683312, Alemanha) nas concentrações de 0,13-1,44 µg/mL de solução. A curva de calibração encontra-se no Anexo II.

Foi realizada a varredura de uma solução etanólica (etanol - 99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K31865683312, Alemanha) do padrão na concentração 1,44 µg/mL na região de 400 a 500 nm, com a finalidade de escolher o comprimento de onda de maior absorbância. Desta maneira definiu-se que as leituras de absorbância seriam efetuadas no comprimento de onda de 426 nm. O teor de curcuminóides (CC) foi calculado através de interpolações na curva padrão de curcuminóides, com os dados de leituras da absorbância obtidos para os extratos diluídos em etanol.

3.4.4 Quantificação da oleoresina de cúrcuma nos extrato de SFE

A quantificação da oleoresina foi realizada por método gravimétrico descrito por Povh et al (2001); as amostras foram colocadas em estufa (Estufa de Secagem e Esterilização, marca Fanem, modelo 320-SE, São Paulo, SP) a 150 °C por 16 h até peso constante. As análises foram realizadas em duplicata.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura vegetal e a morfologia dos grânulos de amido das matéria-primas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol, modelo SM 5800 LV, Tóquio, Japão) num potencial de aceleração de partículas de 15 kV. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita adesiva dupla-face e recobertas com uma camada de ouro de 24 nm. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp. As amostras foram observadas antes e depois do processo de SFE para detectar a influência da pressão sobre as estruturas secretoras e amido presentes nas matérias-primas estudadas.

Para a análise das imagens e realização das medidas referentes à morfologia dos grânulos de amido, foi utilizado o software Scion Image - version Beta 4.0.2 – Scion Corporation.

3.6 Análises para estudo do resíduo amiláceo

3.6.1 Isolamento do amido

O isolamento do amido da cúrcuma e gengibre foi realizado segundo o procedimento de Perez et al (1993), utilizando uma centrífuga (model BR4i, Jouen, St. Herblain, França). O método utilizou NaOH 0,25% (w) para romper a estrutura vegetal, seguido por sucessivas lavagens e centrifugação, até máxima separação do amido.

3.6.2 Teor de amilose

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinação do teor de amilose dos amidos de cúrcuma e gengibre, com o auxílio de um espectrofotômetro (Espectran Backman, modelo DU70, Alemanha), com padrão de amilose (96,8% de pureza, Sigma-Amilose tipo II-de potato, Lote 63H3910, EUA), medindo a absorbância

em 610 nm. O teor de amilopectina foi calculado por diferença. O teor de amilose foi analisado em relação a amilose aparente e não o teor de amilose real (realizado em amostras desengorduradas), porque é conhecido que os rizomas possuem pequenas quantidades de lipídeos (Sowbhagya et al, 1999).

3.6.3 Fator de inchamento de grânulos

A capacidade de inchamento dos grânulos de amido foi determinada, utilizando o método de Anderson et al (1969). O método consiste em acrescentar água ao amido, mantendo o mesmo em centrifugação, e por gravimetria identificar a massa de água absorvida pelos grânulos de amido.

3.6.4 Difração de Raio-X

Os difratogramas foram obtidos por um difratômetro de raio-X (Shimadzu, modelo XRD 600, Tóquio, Japão), a 40 kV, com ângulo de reflexão de 1θ , de 5 a 50° e irradiação de cobre. As análises foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química/Unicamp.

3.6.5 Calorimetria –DSC (Differential Scanning Calorimetry)

A temperatura de gelatinização foi medida por calorimetria diferencial de varredura TA Instruments Thermal Analysis (MDSC) (modelo 2920, New Castle, Inglaterra) com uma unidade de resfriamento mecânico acoplada. A razão de amido e água utilizada foi 1:3 (w:w) (Jyothi et al, 2003) e as panelas contendo as amostras foram aquecidas numa razão de 10 °C/min de 20 a 120 °C. A vazão dos gases: hélio a 25 mL/min e nitrogênio a 150 mL/min. Temperatura inicial (T_o), o pico de temperatura (T_p), a temperatura final (T_c) e a entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}) foram obtidos. As

análises de calorimetria foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Processos – LEP-DEA/FEA- Unicamp.

3.6.6 Viscosidade

Os parâmetros de gelatinização das amostras de amido de cúrcuma e gengibre foram determinados por um Rapid Visco Analyser (RVA-Newport Scientific Pty Ltda., Warriewood, Austrália), seguindo o método da AACC (método nº 22) (A.A.C.C. , 1995). As análises de determinação de viscosidade foram realizadas no Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos – DTA/FEA- Unicamp.

3.6.7 Turbidez

A turbidez dos amidos foi medida seguindo o método de Perera e Hoover (1999) por espectrofotometria com o auxílio de um espectrofotômetro (Espectran Backman, modelo DU70, Alemanha).

3.7 Análise estatística

A análise de variância (teste de Tukey) foi feita com o software MiniTab 2.0.

4. Resultados e Discussões

4.1 Curcuma longa Linneu

4.1.1 Caracterização da matéria-prima

As matérias-primas foram caracterizadas em relação à composição para a cúrcuma e os amidos isolados de gengibre e cúrcuma. A composição determinada para os dois primeiros lotes de cúrcuma (M1) e (S1) foram apresentadas por Braga et al (2003). A composição do lote S2 de cúrcuma, cujos ensaios agronômicos apresentaram maior rendimento em biomassa e teor de curcuminóides, está apresentada na Tabela 4.1. O teor de umidade das matérias-primas permaneceu abaixo de 10%.

O lote de cúrcuma S2 foi avaliado quanto à sua composição para as amostras cultivadas com nitrocálcio (NC) e adubação orgânica com esterco bovino (AO) nos níveis (30, 45 e 60 kg/ha) que apresentaram maior teor de curcuminóides avaliados por extração por Soxhlet em análise espectrofotométrica.

Tabela 4.1 Composição da *Curcuma longa* L. para diferentes adubações: nitrocálcio (NC) e adubação orgânica com esterco bovino (AO) e níveis (30, 45 e 60 kg/ha).

(%) Base Úmida	NC-30	NC-45	AO-45	AO-60	TESTEMUNHA
Amido	32 ± 3	*17 ± 2	31 ± 5	29 ± 2	31 ± 2
Proteína Total	12,2 ± 0,7	15,0 ± 0,9	13,2 ± 0,1	14,0 ± 0,1	15 ± 2
Cinzas	7,3 ± 0,7	7,0 ± 0,8	6,6 ± 0,3	7,0 ± 0,2	7,2 ± 0,7
Açúcares Totais	2,7 ± 0,9	3,5 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,3	3,3 ± 0,7
Lipídeos	*1,8 ± 0,4	*3,1 ± 0,5	4,8 ± 0,6	4,6 ± 0,2	4,2 ± 0,4
Fibras	4,5 ± 0,2	4,9 ± 0,6	4,3 ± 0,4	5,4 ± 0,5	6 ± 2
Curcuminóides	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,5

*Diferente significativamente da testemunha a 5%.

O teor de amido foi reduzido significativamente para o tratamento NC-45, em relação a testemunha o decréscimo foi cerca de 45%. Os teores de amido dos outros

tratamentos se mantiveram constantes em relação à testemunha. Os teores de proteína total, cinzas, açúcares totais e fibras se mantiveram constantes comparados à testemunha, sem influência dos tratamentos de adubação. O teor de lipídeos foi reduzido significativamente na adubação NC-30 e NC-45. A redução foi de 57 e 26% respectivamente em relação à testemunha, mantendo para a adubação orgânica o teor de lipídeos da testemunha. Entre os níveis de adubação orgânica não houve diferenças significativas para os teores de amido, proteína total, cinzas, açúcares totais, lipídeos e fibras.

Assim, a adubação orgânica manteve os teores dos compostos analisados (amido, proteína total, cinzas, açúcares totais, lipídeos e fibras) independentemente do nível de adubação utilizado (45 e 60), e o nitrocálcio reduziu os teores de amido e lipídeos em relação à testemunha.

A manutenção e/ou aumento dos teores de lipídeos é importante no processo de extração para a obtenção de óleo essencial e oleoresina, estando presente nesta fração os curcuminóides que são corantes e possuem ação antioxidante.

Da mesma forma para o amido, a manutenção e/ou aumento seria importante para a utilização da cúrcuma como fonte de amido na indústria de alimentos. Assim, a matéria-prima escolhida como lote 3 foi a cúrcuma cultivada com AO-45 identificada como lote S2.

4.1.2 Observação morfológica das estruturas secretoras por MEV

Foram realizadas análises microscópicas nas estruturas secretoras de *Curcuma longa* antes e depois da SFE; porém não se encontram muitas informações sobre estruturas presentes no interior dos rizomas. Por se tratarem de amostras secas, não foram efetuadas a fixação, a desidratação e a secagem no ponto-crítico (etapas comuns de

preparação de amostras biológicas), passando direto para a etapa de montagem nos porta-amostras com fita adesiva dupla-face. As amostras foram recobertas com ouro e realizada a análise. A Figura 4.2 mostra a superfície de uma partícula de cúrcuma fatiada e seca, mostrando uma película sobre a superfície, alguns grânulos de amido e outras estruturas extracelulares.

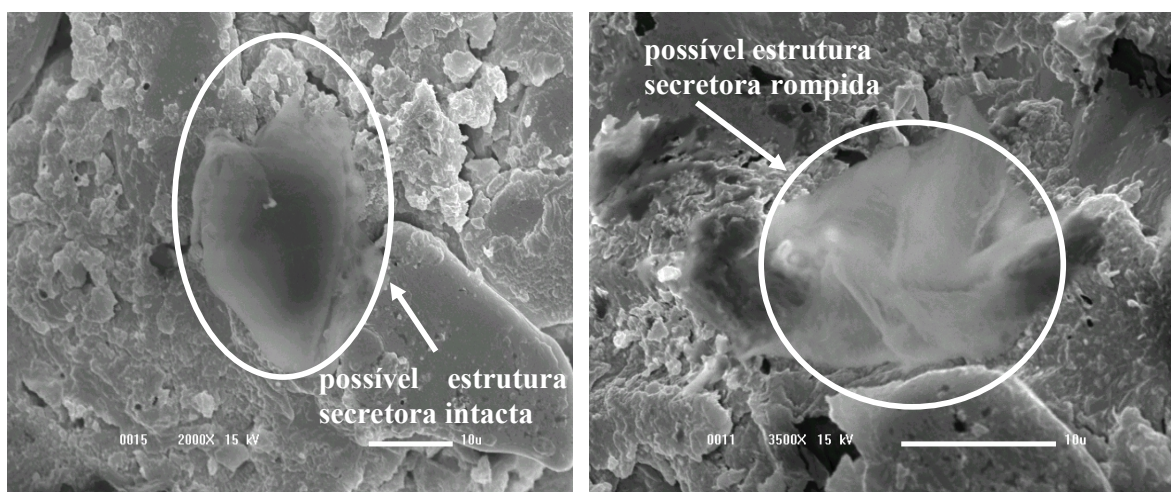


(850 ×, 15 kv)

Figura 4.2 Grânulos de amido sobre a superfície de um fragmento de curcuma seca e fatiada.

As Figura 4.3 e 4.4 mostram possíveis estruturas secretoras da curcuma após ser pré-tratada pelo secador e pelo moinho, tanto antes quanto depois da extração supercrítica.

Foram encontradas estruturas que pela sua aparência são de natureza lipídica ou contém lipídeos, mas não é confirmativo.

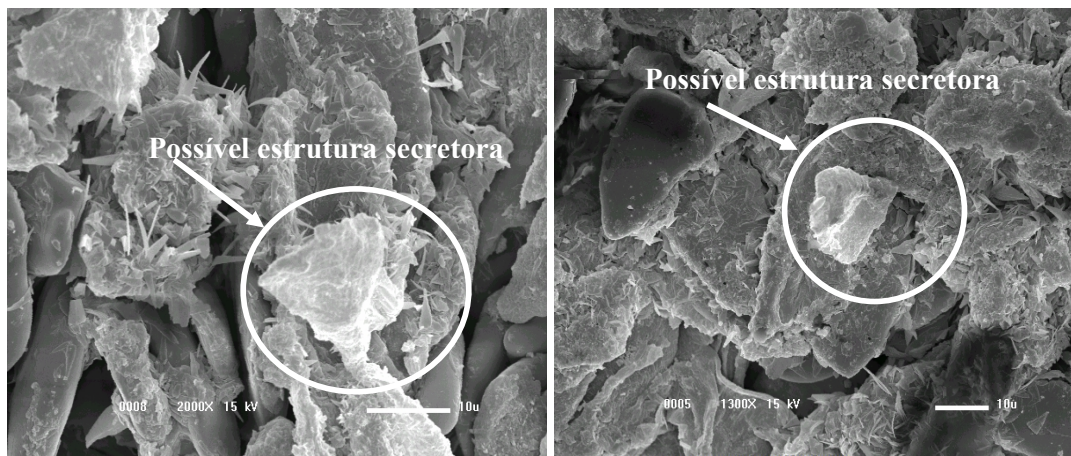


A (2000×, 15 kv)

B (3500 ×, 15 kv)

Figura 4.3 Possíveis células secretoras intacta (A) e rompida (B) presente na *Curcuma longa* L. antes da SFE.

Após o processo SFE não foi possível observar estruturas secretoras, apenas grânulos de amido e material extracelular sobre as partículas observadas (Figura 4.4). Isso pode ser explicado pela localização interna das estruturas secretoras no rizoma de cúrcuma, que após passar pelo processo de fatiamento e secagem, estas estruturas continuam internas e/ou não expostas à visualização.



(2000 ×, 15 kv)

(1300 ×, 15 kv)

Figura 4.4 Fragmento de *Curcuma longa* L. observado após o processo SFE.

Deepak et al (2002) realizaram análises de microscopia ótica em finas fatias de cúrcuma antes e após a extração assistida por microondas, identificando as células de oleoresina que após o processo de extração tornaram-se inchadas e algumas rompidas.

Como a microscopia eletrônica de varredura permite analisar somente a superfície da partícula, talvez fosse possível observar as estruturas secretoras após o pré-tratamento e processo de extração através da microscopia ótica, como o estudo realizado por Deepak et al (2002), onde a amostra analisada é obtida em finas fatias, podendo-se observar o conteúdo interno as partículas.

Estes resultados indicam que MEV não é uma técnica adequada para a determinação da fração de células rompidas durante o processo de cominuição. Desta forma, optou-se pelo estudo do processo de SFE da oleoresina de cúrcuma usando outras informações tais como o efeito da geometria do leito, o processo ASE e a SFE fracionada.

4.1.3 Extrações por Soxhlet, baixa pressão com solvente e hidrodestilação

Os rendimentos dos extratos obtidos via Soxhlet (SoE), hidrodestilação (HD) e baixa pressão (LPSE) são apresentados na Tabela 4.2. Os resíduos obtidos nas extrações supercríticas foram reutilizados para identificação do conteúdo restante de extrato por Soxhlet, e teor de curcuminóides na matéria-prima por espectrofotometria (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Rendimento global das extrações por hidrodestilação (HD), Soxhlet (SoE), baixa pressão utilizando incubadora (LPSE); R-M e R-S significam os resíduos de SFE de curcuma das matérias-primas M1 e S1, respectivamente, (SFE com CO₂ e a mistura de co-solvente EtOH/IsoC3; vazão de 4.4×10^{-5} e 3.5×10^{-5} kg/s).

Matéria-prima	Rendimento (base seca), %						Teor de Curcuminóides, % (base seca)					
	EtOH/IsoC3			EtOH			EtOH/IsoC3			EtOH		
	HD	LPSE	LPSE	SoE	SoE	SoE	HD	LPSE	LPSE	SoE	SoE	SoE
		1:100	1:10	1:100	1:10	1:100		1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
M1	2,1±0,5	9 ± 1	8,15± 0,02	21±1	17±2	21± 1	(2,0± 0,8)×10 ⁻⁴	2,1±0,5	0,34±0,04	4,38±0,02	5 ± 1	0,42
S1	3,1±0,2	13± 2	7,5 ± 0,4	16±1	15±5	27±2	(2 ± 1)×10 ⁻⁴	3,1±0,2	0,50±0,01	8,43±0,16	6,3±0,7	0,38
*R-M1	–	–	–	9,4±0,1		26± 5	–	–	–	3,7±0,4	–	1,4±0,2
*R-S1	–	–	–	10,3± 0,2		31±12	–	–	–	3,9±0,5	–	6,0±0,8

*R-M e R-S significam os resíduos de curcuma das matérias-primas M1 e S1, respectivamente, que resultaram da SFE desenvolvida com CO₂ e a mistura de co-solvente EtOH/IsoC3; vazão de 4.4×10^{-5} e 3.5×10^{-5} kg/s, para os lotes M1 e S1, respectivamente.

A Tabela 4.2 mostra o alto rendimento de extrato obtido pela metodologia do Soxhlet com etanol, quando utilizada a matéria-prima originada de São Paulo (S1), na razão de sólido/solvente de 1:100, embora o maior teor de curcuminóides (8,43%) tenha sido obtido com a mistura de solventes EtOH/IsoC3 (1:1). A extração por Soxhlet realizada no resíduo da SFE (31%), mostra que a SFE (Tabela 4.2) retirou apenas uma pequena parcela do extrato e dos curcuminóides presentes na matéria-prima. Considerando que a SFE com co-solvente utilizou uma quantidade de 10 a 100 vezes menor que as extrações por Soxhlet e baixa pressão, e obteve rendimentos de extratos semelhantes, assim, conclui-se que utilizando maiores porcentagens de co-solvente é possível obter maiores rendimentos de curcuminóides, como será visto na sessão sobre extração supercrítica acelerada com solvente.

A cinética de extração a baixa pressão realizada em leito agitado é apresentada na Figura 4.5. Os dados mostram uma variação muito grande, mostrando as dificuldades de quantificação da cinética de extração para o método utilizado com leito agitado.

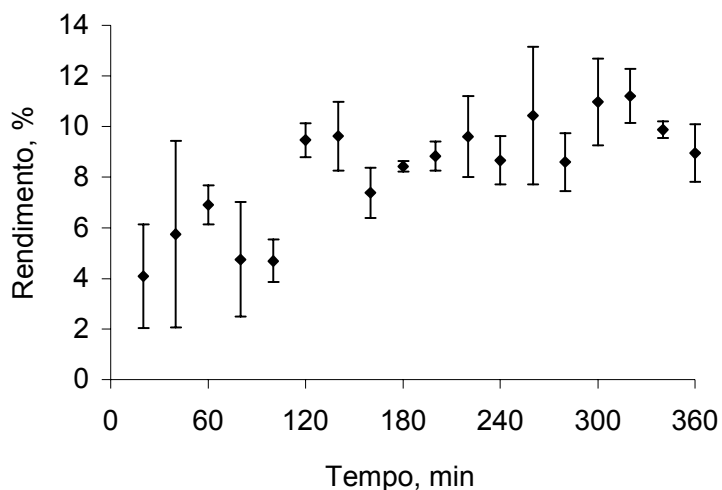


Figura 4.5 Cinética de extração de *Curcuma longa* (lote 1) à baixa pressão realizado em leito agitado, 30 °C e 168 rpm por 6h, solvente EtOH/IsoC3 (1:1) com razão de sólido:solvente de 1:10.

A Figura 4.6 mostra a cinética à baixa pressão para ensaio realizado em coluna extratora de leito fixo. A extração foi realizada utilizando a relação sólido: solvente de 1:1, numa vazão de $5,33 \times 10^{-3}$ kg/s, mostrando que embora a vazão utilizada tenha sido alta, o tempo de extração não foi suficiente para esgotar o leito, tendo o ensaio sido interrompido durante a etapa de taxa de extração aproximadamente linear. A Figura 4.6 mostra que a curva não formou um perfil esperado, embora haja um o crescimento da curva este se apresenta de forma desordenada.

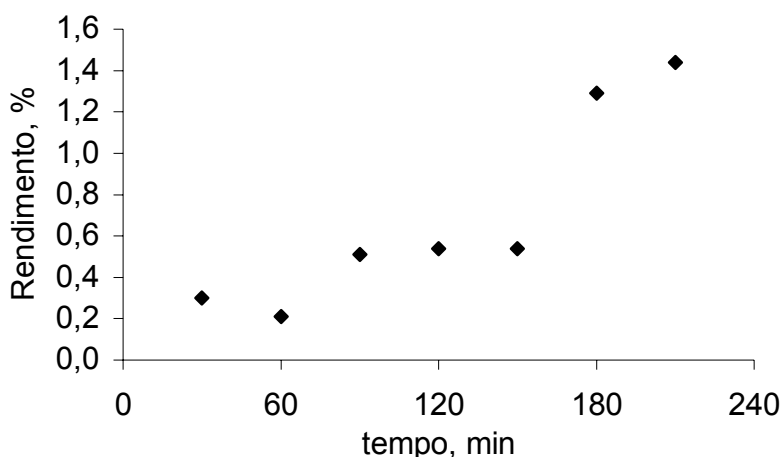


Figura 4.6 Cinética de extração de *Curcuma longa* (lote S2) à baixa pressão realizada em coluna de leito fixo, com solvente EtOH/IsoC3 na razão de sólido solvente (1: 10), 27 °C, 90 rpm (vazão de $5,33 \times 10^{-3}$ kg/s).

4.1.4 Extração com tecnologia supercrítica

4.1.4.1 Ensaios de estudo da geometria do leito

As extrações nestes ensaios foram realizadas com o lote M1 de matéria-prima. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.3 e Figura 4.7.

Esses ensaios possibilitaram avaliar o esgotamento do leito num menor tempo em função da altura do leito, fixando as variáveis: pressão, temperatura, vazão, razão sólido/solvente e densidade do leito. As razões de H_B/D_B utilizadas foram de 1,8, 3,6 e 5,4,

mantendo a razão de solvente/sólido constante ($S/F= 23,5$), a densidade 530 kg/m^3 e a vazão em $6 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$, pressão de 300 bar e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Estes ensaios foram realizados em duplicata, utilizando duas células diferentes, uma de aço inox e outra de nylon (80 mesh).

Os rendimentos globais (X_0) são apresentados na Tabela 4.3. O rendimento global foi similar para todos os valores de H_B/D_B , com redução no tempo de extração para a menor altura de leito. Comparativamente, a célula de nylon proporcionou um aumento para todas as razões de H_B/D_B estudadas, provavelmente pela redução da formação de espaços vazios entre a célula e o extrator, promovendo um fluxo de solvente mais homogêneo no leito de partículas.

Tabela 4.3 Rendimento ($X_{0,s/f=23,5}$) de extratos de *Curcuma longa* L. (lote M1) para diferentes razões H_B/D_B obtidos por SFE, utilizando duas células de extração, realizados com 10% de co-solvente etanol-isopropanol (1:1 v/v), 300 bar e $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $m_{\text{CO}_2}/m_{\text{alimentação}}=23,5$.

H_B/D_B	$X_{0, s/f=23,5} \text{ \% (base seca)}$	CC, %	$Q \times 10^{-5}, \text{ kg/s}$	$t_{\text{TOTAL}}, \text{ min}$
* Célula de aço inox				
1,8	$8,6 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,07$	$5,35 \pm 0,07$	131
3,6	$6,92 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,01$	$6,23 \pm 0,03$	261
5,4	$7,1 \pm 0,5$	$0,065 \pm 0,002$	$6,27 \pm 0,00$	392
** Célula de nylon				
1,8	$9,4 \pm 0,2$	$0,184 \pm 0,003$	$5,8 \pm 0,4$	131
3,6	$7,7 \pm 0,2$	$0,09 \pm 0,01$	$5,9 \pm 0,1$	261
5,4	11 ± 2	$0,08 \pm 0,01$	$6,0 \pm 0,1$	392

* célula de aço inox (diâmetro interno de $2,74 \times 10^{-2} \text{ m}$ e comprimento $37,5 \times 10^{-2} \text{ m}$)

** célula de nylon (diâmetro $2,70 \times 10^{-2} \text{ m}$ e comprimento $30 \times 10^{-2} \text{ m}$)

A Figura 4.7 mostra o comportamento comum de uma OEC observado em todos os ensaios, a etapa CER e a etapa FER. É possível observar a sobreposição da etapa CER para os ensaios com variação de H_B/D_B . A tangente inicial à curva rendimento acumulado versus $m_{CO_2}/m_{alimentação}$ é uma boa estimativa para a solubilidade do extrato no solvente medido para o sistema pseudo ternário formado pelo soluto, matriz vegetal e solvente, definido por Rodrigues et al (2002).

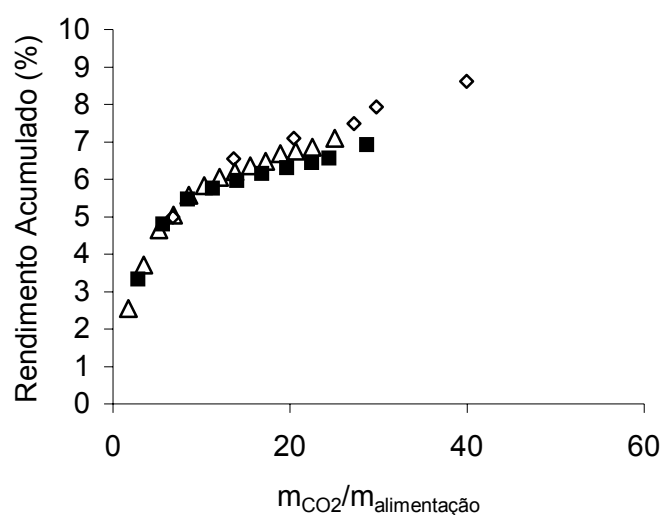


Figura 4.7 Cinéticas de rendimento de extração de *Curcuma longa* L. por SFE com variação de altura de leito em função do tempo de extração e da razão $m_{CO_2}/m_{alimentação}$, com o último ponto do rendimento representando a etapa da despressurização ◊ $H_B/D_B = 1,8$
 ■ $H_B/D_B = 3,6$ Δ $H_B/D_B = 5,4$

Os parâmetros cinéticos estão na Tabela 4.4. Com o aumento da razão H_B/D_B , o rendimento total aumentou. Os valores de M_{CER} e Y_{CER} praticamente se mantiveram constantes, porém o t_{CER} aumentou com o aumento da razão H_B/D_B . Na menor razão H_B/D_B foi possível obter o maior teor de curcuminóides (0,18 %) com o rendimento de extrato total semelhante aos outros ensaios quando aumentado a razão de H_B/D_B , mantendo fixa a vazão. O perfil de concentração foi completamente desenvolvido no processo quando

utilizado o menor comprimento de leito, assim como nos ensaios de flores de cravo, realizados por Reverchon e Marrone (1997) na menor razão $H_B/D_B = 0,96$.

Para se obter um menor t_{CER} para os ensaios de razão $H_B/D_B = 3,6$ e $5,4$, a vazão deveria ser aumentada, obtendo assim um alto rendimento. Não foi possível a realização de ensaios com a variação do diâmetro do leito, pois não havia disponível para uso um extrator com outro diâmetro compatível ao equipamento que utiliza co-solvente, necessário para as extrações de cúrcuma.

Tabela 4.4 Parâmetros cinéticos de extração de *Curcuma longa* L. (lote S1) para diferentes razões H_B/D_B obtidos por SFE, com $CO_2 + EtOH/IsoC3$ (1:1) em 10% e vazão total aproximada de $6 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$.

Altura H_B/D_B (cm)		Parâmetros Cinéticos							
		$Q \times 10^{-5}$ (kg/s)	$M_{CER} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^{-3}$ (kg/kg)	t_{CER} (s/60)	R_{CER} (%)	$X_{0,s/f=23,5}$ (%)	CC, (%)	t_{TOTAL} , (min)
0,05	1,8	$5,8 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,3$	37 ± 1	$5,3 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,00$	131
0,10	3,6	$5,9 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,4$	68 ± 6	$5,1 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,2$	$0,09 \pm 0,01$	261
0,15	5,4	$6,0 \pm 0,1$	5 ± 1	7 ± 2	104 ± 21	$4,8 \pm 0,4$	11 ± 2	$0,08 \pm 0,01$	392

Dados de rendimentos obtidos em base seca.

4.1.4.2 Ensaios de extração acelerada com solvente

Nos ensaios para a avaliação da metodologia de extração acelerada com solvente foi empregado o lote S1 de matéria-prima. Estes ensaios foram realizados com a célula de nylon, pois como mostrado na Tabela 4.3 no item 4.1.4.1, esta célula é mais adequada. O rendimento global dos ensaios com alta razão de co-solvente mostraram uma pequena redução no rendimento quando não utilizado o período estático, variando de 8 a 11% de extrato a 90 minutos do processo (Tabela 4.5). O teor de curcuminóides no extrato aumentou quando utilizado o período estático para os ensaios com 50 e 90% de co-

solvente; com o uso do período estático o ensaio de 50% de co-solvente foi obtido um aumento de 0,36 a 0,72% de curcuminóides (aumento de 50%), e para o ensaio de 90% de co-solvente um aumento de 56% (de 0,34 para 0,53% de curcuminóides) sobre o processo sem o uso do período estático de 30 minutos, Tabela 4.5. Com a utilização de uma razão de co-solvente de 10 % e 30 minutos de período estático, o teor de curcuminóides foi reduzido em 25% em relação a ausência de período estático.

Utilizando a técnica de extração acelerada com solvente, a exaustão do leito foi muito rápida com baixos valores de t_{CER} quando usado 50% de co-solvente; a alta taxa de transferência de massa (M_{CER}) e altos valores de Y_{CER} para o período CER são mostrados na Tabela 4.5, para ambos os tratamentos: com e sem o período estático de 30 minutos utilizando 50% de co-solvente.

Os valores de Y_{CER} aumentaram cerca de 4 vezes, o valor de t_{CER} foi reduzido aproximadamente em 55%, quando a razão de co-solvente aumentou de 10 para 50% sem considerar o período estático. Mas, quando a quantidade de co-solvente foi aumentada de 50 para 90% os parâmetros cinéticos M_{CER} , Y_{CER} foram reduzidos, aumentando o t_{CER} e mantendo constante os valores de X_o quando comparados a 50%, com e sem período estático. Os maiores teores de CC foram obtidos a 50% de co-solvente e utilização de período estático, sendo esta a razão ótima de 50% de EtOH/IsoC3 a ser utilizada, de acordo com este estudo.

Tabela 4.5 Parâmetros cinéticos para ensaios de SFE usando solvente ($\text{CO}_2 + \text{EtOH} + \text{IsoC3}$), vazão total aproximada de $6 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$, 300 bar, 30 °C; a densidade do leito foi de 530 kg/m^3 e razão de massa de CO_2 por massa de alimentação foi de 23,5 e altura do leito de $H_D/D_B = 1,8$ em 90 minutos de extração.

co-solvente, período estático, (%) (min)		Parâmetros Cinéticos						
		$Q \times 10^{-5}$ (kg/s)	$M_{\text{CER}} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$Y_{\text{CER}} \times 10^{-3}$ (kg/kg)	t_{CER} (s/60)	R_{CER} (%)	X_0 (%)	CC, (%)
10	-	5,8	3,7	6,2	40	5,5	$9 \pm 0,01$	0,16
10	30	6,6	1,9	2,8	50	3,9	$8 \pm 0,01$	0,12
50	-	3,6	9,6	26,7	18	7,1	$10 \pm 0,01$	0,36
50	30	5,8	6,9	11,8	20	4,8	$10 \pm 0,01$	0,72
90	-	7,1	4,6	6,4	47	8,7	$11 \pm 0,02$	0,34
90	30	5,6	4,4	7,7	39	7,6	$9 \pm 0,01$	0,53

Dados de rendimentos obtidos em base seca; $R_{\text{TOTAL}} \pm$ erro presumido

A Figura 4.8 mostra que os maiores rendimentos foram obtidos usando 50 e 90% de co-solvente com a menor razão $m_{\text{CO}_2}/m_{\text{alimentação}}$.

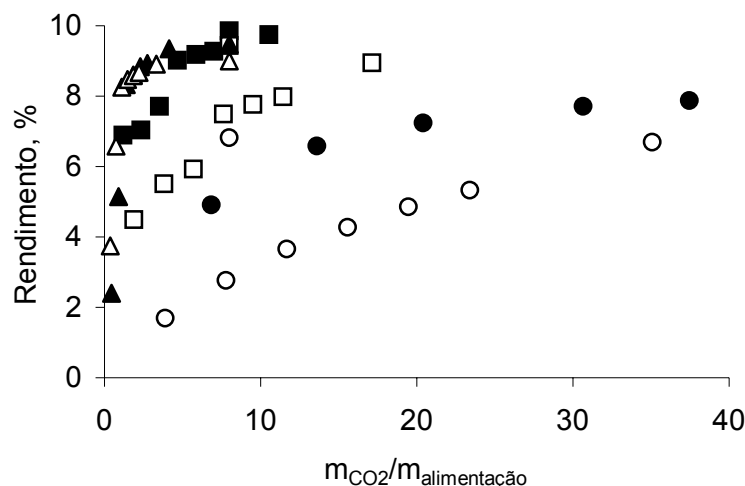


Figura 4.8 Curvas de cinéticas de extração por SFE a 30 °C, 300 bar e 10, 50 e 90 % (v/v) de co-solvente com e sem período estático (30 e 0 minutos, respectivamente): ● 10 % - 0', ○ 10 % - 30'; ■ 50 % - 0', □ 50 % - 30'; ▲ 90 % - 0', △ 90 % - 30'.

É possível observar na Figura 4.9, que o período estático influenciou igualmente o rendimento na etapa CER, R_{CER} , para os ensaios que utilizaram 50 e 90% de co-solvente,

sendo os maiores rendimentos obtidos quando não houve um período estático antes do início da extração (Figura 4.9 A). Porém, este efeito foi maior na extração de curcuminóides, principalmente quando utilizado co-solvente a 50% (Figura 4.9 B).

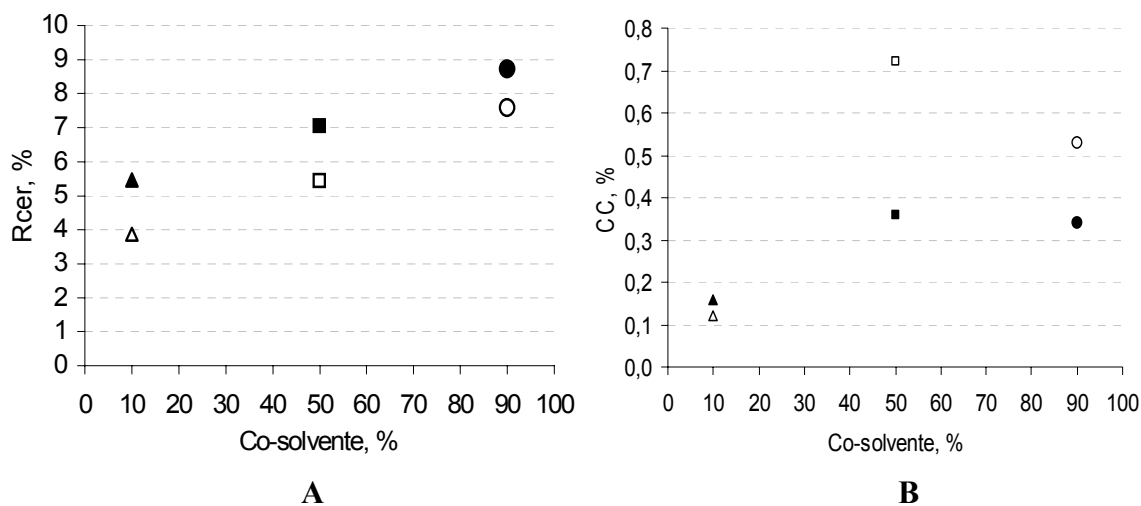


Figura 4.9 Rendimentos de extrato na etapa CER e de curcuminóides (%) obtidos por SFE a 30 °C, 300 bar e 10, 50 e 90 % (v/v) de co-solvente com e sem período estático de 30 minutos: ● ■▲ sem período estático ○ □ Δ com período estático.

Para analisar os lotes de matérias-primas obtidas em São Paulo, foram determinadas curvas cinéticas de extração para os mesmos com o intuito de compará-los. As OECs apresentadas na Figura 4.10 foram realizadas com os lotes S1 e S2 de curcuma, sendo o lote S2 diferenciado do lote S1 pelo cultivo diferenciado de adubação orgânica (esterco bovino a 45 kg/ha). Para realizar a comparação apenas da matéria-prima, foram mantidas as condições de 300 bar e 30°C, 10% (v) de EtOH/IsoC3 (1:1), vazão média de 6×10^{-5} kg/s para os ensaios. O rendimento total do extrato obtido no lote S2 foi de 12,11 % e do lote S1 9,4%, o lote S2 foi aproximadamente 29% superior em rendimento, quando comparados os rendimentos obtidos nas mesmas condições de extração (Figura 4.10). Assim, o lote que obteve maior rendimento (lote S2) foi utilizado no ensaio de extração fracionada, como pode ser visto no item 4.1.4.3.

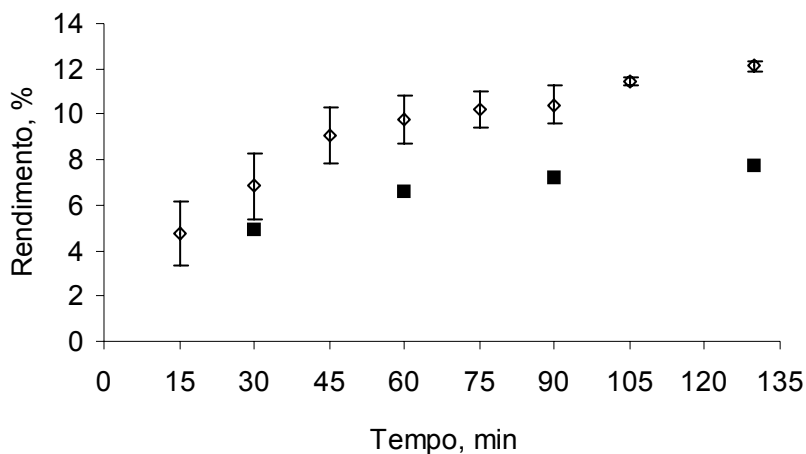


Figura 4.10 Cinéticas de extração de cúrcuma a 300 bar e 30°C, 10% (v) de EtOH/IsoC3 (1:1), vazão média de 6×10^{-5} kg/s ■ Lote S1 □ Lote S2.

4.1.4.3 Extração fracionada

Os ensaios para a avaliação da extração fracionada foram realizados com o lote S2 de matéria-prima. Neste caso a extração foi realizada inicialmente utilizando somente CO₂ nas condições de 225 bar e 35 °C para obtenção do óleo volátil. Após o aparente esgotamento do leito em relação ao óleo volátil, foi introduzido no sistema a mistura de co-solvente EtOH/IsoC3 (1:1) à 50% (v), $H_B/D_B = 1,8$. Este ensaio foi realizado com duração de 480 minutos (Figura 4.11).

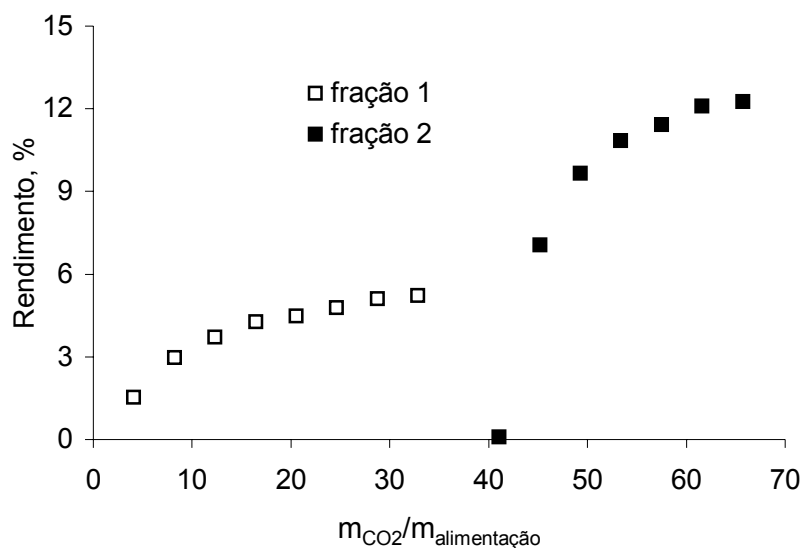


Figura 4.11 Cinéticas de extração fracionada de *Curcuma longa* L. (lote S2): 1º etapa- 225 bar, 35 °C - CO₂; 2º etapa- 300 bar e 30 °C, 50 % (v) EtOH/IsoC3 (1:1); H_B/D_B =1,8, 480 min, vazão de $6,3 \times 10^{-5}$ kg/s.

Pode-se observar que nos dois períodos do processo (Figura 4.11), o máximo rendimento foi alcançado completando o período CER da OEC, obtendo ao final do processo duas frações: leve (composta na sua maior parte pelos óleos voláteis) e pesada (composta em sua maioria pela oleoresina).

A extração supercrítica convencional utilizada para obtenção de oleoresina de cúrcuma, utiliza o co-solvente desde o início da extração, mantendo o óleo volátil e a oleoresina juntas. No ensaio convencional realizado com a razão H_B/D_B: 3,6, vazão de $\sim 6 \times 10^{-5}$ kg/s, 300 bar e 30 °C obtendo 16,1 % $\pm$ 0,4 e 15,9 % $\pm$ 0,6 de oleoresina; destes dados determinou-se que do rendimento total de extrato obtido na SFE, aproximadamente 16 % é oleoresina.

Então, este rendimento pode ser superado quando realizada a extração fracionada (Figura 4.11), obtendo o esgotamento do leito de forma seletiva para obtenção da oleoresina. Neste processo a extração com CO₂ tem o papel de pré-tratamento quanto se

tem como alvo a extração da oleoresina para a obtenção dos curcuminóides, concentrando a oleoresina na matriz vegetal sendo retirada com o co-solvente posteriormente. Na extração fracionada foi obtido durante todo o processo 12,25 % de extrato, onde 5 e 7 % foram os rendimentos da fração volátil e oleoresina, respectivamente, onde a oleoresina representa cerca de 57% do total de extrato obtido pela metodologia da extração fracionada. Comparativamente a SFE convencional, a extração fracionada proporciona maior rendimento de oleoresina de cúrcuma.

Estudo realizado para a identificação dos curcuminóides da cúrcuma por cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) mostrou a eficiência do sistema HPTLC para separação dos curcuminóides com acetona, obtendo a máxima recuperação quando utilizado este solvente, porém com pequenas diferenças de recuperação o solvente etanol se mostrou eficiente na recuperação dos três curcuminóides presentes no extrato de cúrcuma 1,8 % de curcumina 1,05 % de desmetoxicurcumina e 0,94 % de bisdesmetoxicurcumina (Gupta et al, 1999). Assim, pode-se inferir que há possibilidades de fracionamento por SFE com utilização de co-solvente etanol e/ou isopropanol também para os curcuminóides.

4.1.4.4 Modelagem

As OECs de cúrcuma foram ajustadas aos modelos de Crank (1975), Esquivel et al (1999), Goto et al (1993) e Sovová (1994) e mostradas nas Figuras 4.12, 4.13 e 4.14. O modelo de Sovová requer como dado de entrada a solubilidade do soluto no solvente, como este parâmetro não foi determinado experimentalmente, a solubilidade foi assumida igual ao valor da tangente às curvas da Figura 4.7.

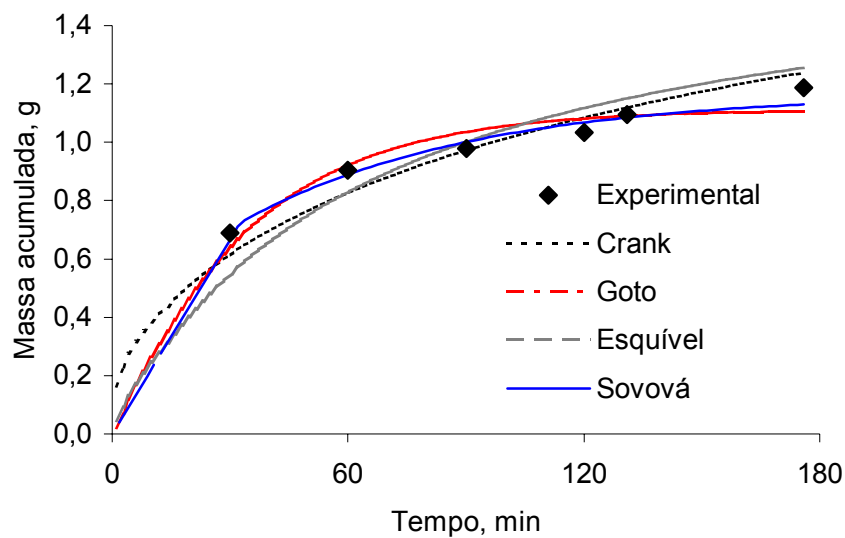


Figura 4.12 Comparação entre dados experimentais e calculados para as curvas de extração de *Curcuma longa* L. (lote M1) com altura de leito de 0,05 m ($H_B/D_B = 1,8$), 300 bar e 30 °C.

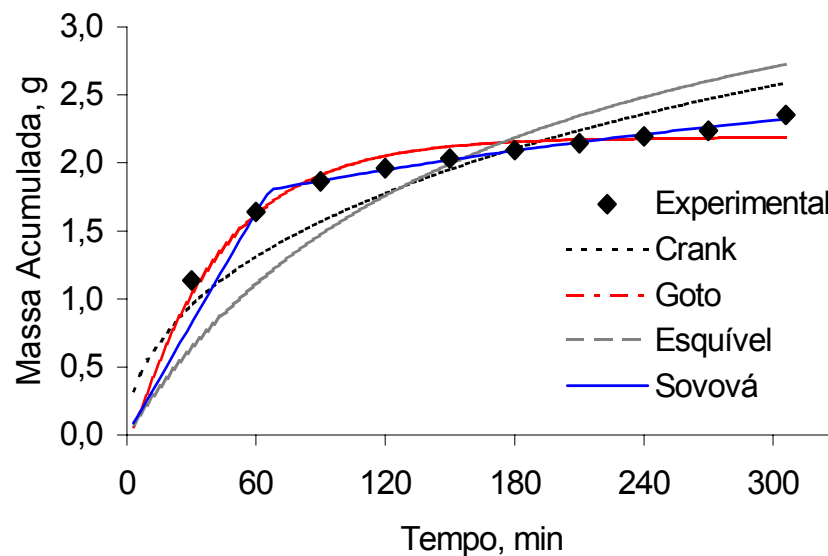


Figura 4.13 Comparação entre dados experimentais e calculados para as curvas de extração de *Curcuma longa* L. (lote M1) com altura de leito de 0,10 m ($H_B/D_B = 3,6$), 300 bar e 30 °C.

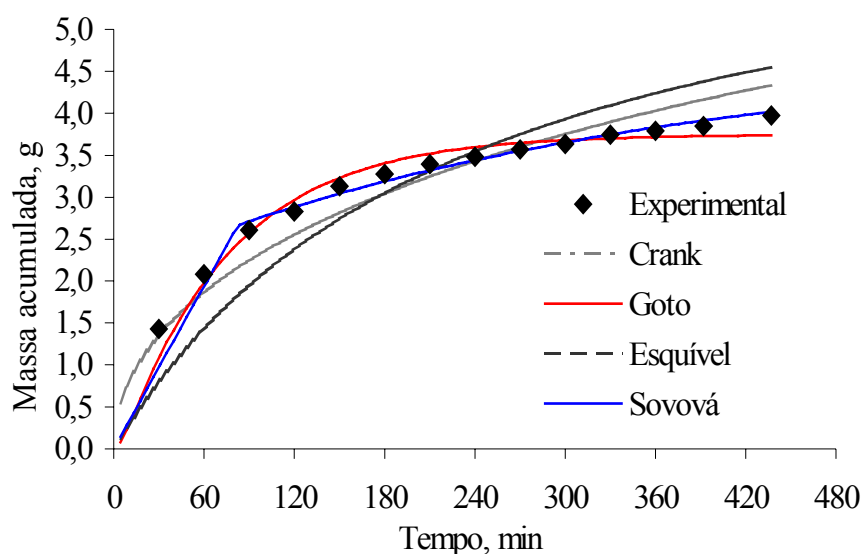


Figura 4.14 Comparação entre dados experimentais e calculados para as curvas de extração de *Curcuma longa* L. (lote M1) com altura de leito de 0,15 m ($H_B/D_B = 5,4$), 300 bar e 30 °C.

Os modelos de Goto *et al* (1993) e Sovová (1993) descrevem bem todas as curvas de extração (OECs) para os diferentes valores de H_B/D_B (Figuras 4.12-4.14). Na Tabela 4.6 encontram-se os valores dos parâmetros ajustados e a soma dos quadrados dos resíduos.

Para o modelo de Goto o parâmetro relativo ao coeficiente de transferência de massa (Φ) diminuiu com o aumento de H_B/D_B , enquanto a constante de equilíbrio de desorção (K) permaneceu aproximadamente constante para H_B/D_B igual a 1,8 e 3,6 e diminuiu para H_B/D_B igual a 5,4 (Tabela 4.6).

O modelo de Sovová apresentou bons ajustes para todas as razões H_B/D_B . Neste modelo o parâmetro K (coeficiente de transferência de massa) apresenta valores diferentes com a variação de H_B/D_B , com um comportamento diferente ao apresentado por Berna *et al* (2000) que usaram o modelo de Sovová (1994) e correlacionaram o coeficiente de

transferência de massa à altura do leito, propondo uma relação inversamente proporcional do coeficiente de transferência de massa com a altura do leito.

Para o modelo de Crank (1975) o coeficiente de difusão efetivo diminuiu com o aumento de H_B/D_B e o parâmetro do modelo empírico (Esquível *et al*, 1999) aumentou com o aumento da razão H_B/D_B , (Tabela 4.6). Como todos os parâmetros destes modelos são globais, não é possível estabelecer uma relação direta entre a variação de H_B/D_B e os mesmos.

Para os dados obtidos nos ensaios com extração acelerada com solvente (Figura 4.15), o modelo utilizado para o ajuste foi o modelo de Goto et al (1993), um dos modelos que ajustou todas as outras OECs. Na Tabela 4.6 é possível observar que o parâmetro K do modelo de Goto, não sofreu grandes variações com a utilização do período estático de 30 minutos, mostrando apenas um pequeno aumento quando utilizado o período estático. O parâmetro Φ mostrou uma redução de 62 % quando utilizado 10 % de co-solvente e período estático de 30 minutos, da mesma forma quando utilizado 50 % de co-solvente com redução de 82%; já o oposto aconteceu a 90 % de co-solvente quando utilizado o período estático de 30 minutos, o parâmetro Φ aumentou em 52 %. O maior valor obtido para o parâmetro Φ foram nos ensaios a 50 % de co-solvente. Estes modelos não consideram o uso de co-solvente no processo de extração.

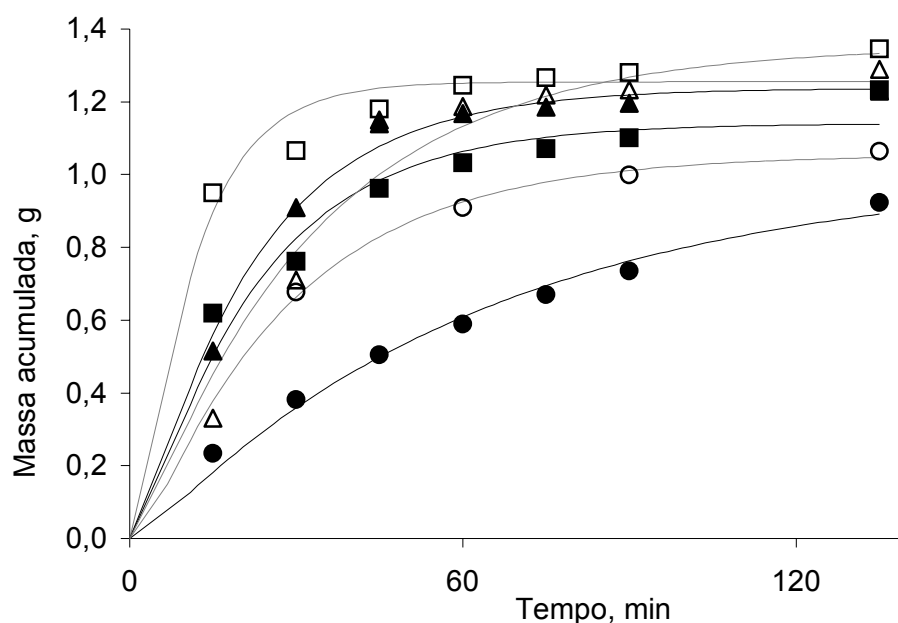


Figura 4.15 Comparação entre as curvas de extração experimentais de *Curcuma longa* L. (lote S1) obtidas utilizando diferentes razões de co-solvente e período estático (PE), e as curvas ajustadas pelo modelo de Goto *et al* (1993): ● 10% de EtOH/IsoC3, 30'; ○ 10% de EtOH/IsoC3, 0'; ■ 50% de EtOH/IsoC3, 30'; □ 50% de EtOH/IsoC3, 0'; ▲ 90% de EtOH/IsoC3, 30'; △ 90% de EtOH/IsoC3, 0'.

Tabela 4.6 Parâmetros dos modelos utilizados para as OEC obtidas na SFE de *Curcuma longa* L.

Parâmetros de entrada	Modelos							
	Goto (1993)		Crank (1975)		Esquivel (1999)		Sovová (1994)	
	Ensaios							
	H _B /D _B	ASE	H _B /D _B	ASE	H _B /D _B	ASE	H _B /D _B	ASE
Porosidade do leito	0,603	0,603						
X ₀ (g óleo/g de massa de alimentação)	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085
Densidade do sólido (g/cm ³)	1,301	1,301					1,301	1,301
Densidade do CO ₂ (g/cm ³)	0,948	0,948					0,948	0,948
Vazão do CO ₂ (g/min)	6	10% - 0' = 3,5					6	10% - 0' = 3,5
		10% - 30' = 4,0						10% - 30' = 4,0
		50% - 0' = 2,2						50% - 0' = 2,2
		50% - 30' = 3,5						50% - 30' = 3,5
		90% - 0' = 4,2						90% - 0' = 4,2
		90% - 30' = 3,4						90% - 30' = 3,4
Altura do leito (cm)	1,8 H _B /D _B	5					1,8 H _B /D _B = 5	5
	3,6 H _B /D _B						3,6 H _B /D _B = 10	
	5,4 H _B /D _B						5,4 H _B /D _B = 15	
Diâmetro da coluna (cm)	2,74	2,74					2,74	2,74
Diâmetro da Partícula (cm)			0,0315	0,0315				
Massa de sólido na coluna (g)			1,8H _B /D _B = 13,80	15	1,8H _B /D _B	15	1,8H _B /D _B	15
			3,6 H _B /D _B = 34,04		3,6 H _B /D _B		3,6 H _B /D _B	
			5,4 H _B /D _B = 56,12		5,4 H _B /D _B		5,4 H _B /D _B	
Porosidade da partícula	0,54							
M _{CER} (g/min)							1,8 H _B /D _B	10% - 0' = 0,059
							3,6 H _B /D _B =	10% - 30' = 0,065
							5,4H _B /D _B	50% - 0' = 0,055
								50% - 30' = 0,083
								90% - 0' = 0,198
								90% - 30' = 0,19
Solubilidade do extrato no solvente (g extrato/g CO ₂)							0,06	0,06

Tabela 4.6 continuação.

Parâmetros estimados									
Ensaio	Goto (1993)			Crank (1975)		Esquivel (1999)		Sovová (1994)	
	ϕ	$K \text{ (s}^{-1}\text{)}$	SSD	$D \times 10^7 \text{ (cm}^2\text{/s)}$	SSD	$k \text{ (min)}$	SSD	$k_{ya} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	SSD
$H_B/D_B = 1,8$	0,897	1,04	0,0157	5,71	0,0114	63,89	0,0157	0,036	0,0012
$H_B/D_B = 3,6$	0,148	1,08	0,0766	2,06	0,3569	168,02	0,7722	0,014	0,0189
$H_B/D_B = 5,4$	0,112	0,85	0,3814	1,50	0,6081	231,28	1,6895	0,025	0,2187
ASE 10% - 0°	0,2178	1,157	0,0008	-	-	-	-	-	-
ASE 10% - 30°	0,0817	1,256	0,0059	-	-	-	-	-	-
ASE 50% - 0°	1,3725	0,841	0,0277	-	-	-	-	-	-
ASE 50% - 30°	0,2417	0,996	0,0299	-	-	-	-	-	-
ASE 90% - 0°	0,0965	0,740	0,0491	-	-	-	-	-	-
ASE 90% - 30°	0,2035	0,861	0,0066	-	-	-	-	-	-

4.1.5 Perfil de composição química

4.1.5.1 Espectrofotometria

Foram quantificados os teores de curcuminóides no extrato (base seca) para os ensaios de cinética de extração de cúrcuma. A curva de calibração da curcumina encontra-se no Anexo II. A Figura 4.16 mostra o rendimento de curcuminóides (CC, %) para os ensaios realizados com $H_B/D_B=1,8$, 3,6 e 5,4, o maior teor de curcuminóides foi obtido para a $H_B/D_B= 1,8$. Este resultado mostra que um grande excesso de solvente favorece a extração.

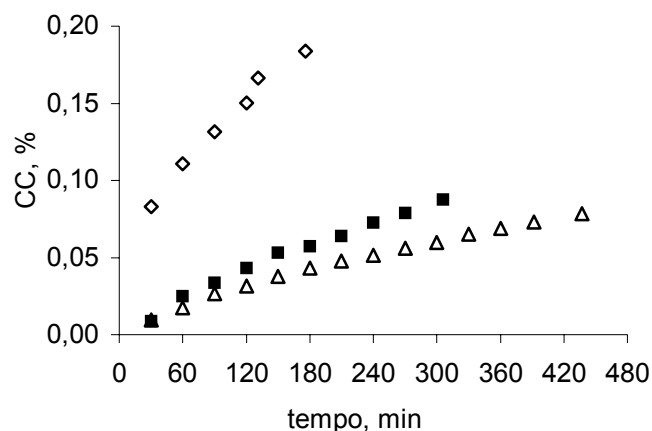


Figura 4.16 Cinéticas de extração de curcuminóides de *Curcuma longa* L. por SFE com variação da razão H_B/D_B em função do tempo de extração. $\diamond H_B/D_B= 1,8$ $\blacksquare H_B/D_B= 3,6$ $\triangle H_B/D_B= 5,4$

A Figura 4.17 mostra as OECs de teor de curcuminóides extraídos, para as OECs obtidas no processo ASE. A influência do período estático foi maior quando utilizada as porcentagens de 50 e 90% de co-solvente para a extração dos curcuminóides. Possivelmente, com maior quantidade de co-solvente as interações entre matriz celulósica/soluto/ CO_2 /co-solvente tenham se intensificado, resultando em maiores rendimentos.

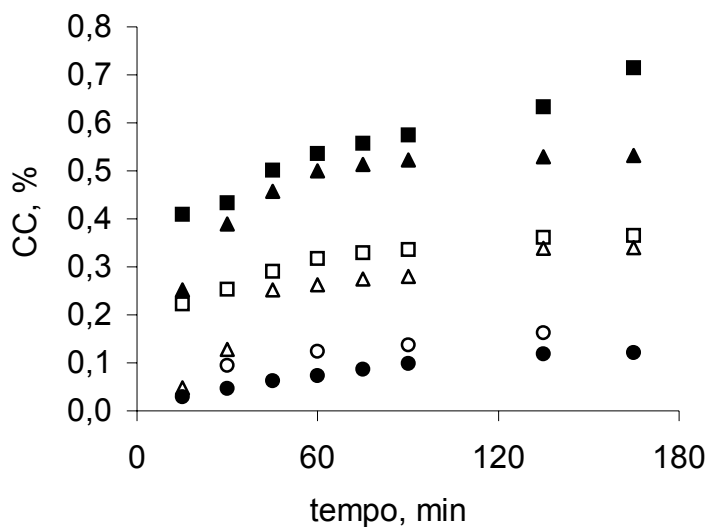


Figura 4.17 Cinéticas de extração de curcuminóides de *Curcuma longa* L. por SFE com solvente acelerada com EtOH/IsoC3 e período estático; ● 10 % EtOH/ IsoC3 – 30', ○ 10 % EtOH/ IsoC3 – 0'; ■ 50 % EtOH/ IsoC3 – 30', □ 50 % EtOH/ IsoC3 – 0'; ▲ 90 % EtOH/ IsoC3 – 30', △ 90 % EtOH/ IsoC3 – 0'.

Foi analisado o extrato obtido da cúrcuma por hidrodestilação quanto ao teor de curcuminóides, pela metodologia da espectrofotometria. O teor de curcuminóides de aproximadamente $(2 \pm 1) \times 10^{-4} \%$ no extrato de hidrodestilação, mostra que a presença dos curcuminóides não ocorre na fração volátil do extrato.

4.1.5.2 Cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada

A composição química dos extratos obtidos em todos os ensaios está apresentada nas Tabelas a seguir. A composição dos extratos nos ensaios com a variação da razão H_B/D_B é apresentada na Tabela 4.7; foram analisadas somente alguns pontos da curva de extração que representavam cada etapa da curva cinética, identificadas na tabela por frações (1, 3, 5, 8 e 12). Estas frações correspondem a amostras de extrato coletadas a 15, 45, 75, 120 e 180 minutos de extração.

Tabela 4.7 Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos nos ensaios de SFE realizados com a variação da razão H_B/D_B, utilizando como solvente o CO₂+ EtOH/IsoC3 (1:1) em 10%, vazão total aproximada de 6×10⁻⁵kg/s.

Substâncias	Porcentagem relativa (área, %)											
	H _B /D _B											
	1,8			3,6				5,4				
frações	1	3	5	1	3	5	8	1	3	5	8	12
α-pineno	0,4	0,6	0,7	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	-	-
1,8 cineol	0,4	0,6	1,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,3	0,4	0,4	-	-
trans-cariofileno	0,5	0,5	tr	0,5	0,5	tr	-	0,5	tr	1,4	tr	-
Ar-curcumeno	1,7	1,6	1,5	1,7	1,5	1,7	-	1,7	1,4	2,3	1,5	1,6
β-zingibereno	3	2,5	2,5	2,9	2,6	2,6	2,9	2,9	2,5	0,5	2,6	2,8
β-bisaboleno	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	tr	0,7	0,6	0,3	2,3	0,7	tr
β-sesquifelandreno	2,8	2,7	2,9	2,8	2,6	3,03	3,1	2,8	2,4	0,2	2,4	2,7
Ar-turmerol	0,9		0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	1	0,9	0,8
Diidro-ar-turmerona	0,8	-	-	0,5	0,6	-	-	0,6	0,8	0,7	tr	tr
Isomero ar-turmerol	1	-	-	0,1	0,9	-	0,9	0,5	0,9	0,9	0,8	1,5
1-epi-cubenol	1,3	-	1,3	1,4	1,3	1,2	1,4	0,4	tr	1,2	1,3	1,3
Ar-turmerona	52,3	48,2	46,7	51,2	49,3	52	53,8	53,5	55,4	48,5	51,5	58,4
(Z)-γ-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-
(E)-γ-atlantona	18	16,6	16,4	17,5	17,01	19,6	19	18,3	19,2	17	18	20,4
65,7 R-bisabolona	1,3	tr	0,8	0,8	0,82	1,2	tr	tr	0,9	1,1	0,8	tr
(Z)-α-atlantona	0,4	0,4	tr	tr	tr	tr	tr	0,5	0,6	tr	0,4	tr
(E)-α-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
n.i.	15	25,8	24,6	18,5	21	17,2	16,6	16,5	14,3	22,4	19,1	10,5
Total	85	74,2	75,4	81,5	79	82,8	83,4	83,5	85,7	77,6	81	90

tr=traço, % ≥ 0,2; n.i.= não identificado

Na Tabela 4.8 é apresentado o perfil fitoquímico dos extratos dos ensaios realizados por ASE. O perfil fitoquímico apresentado na literatura para extratos de *Curcuma longa* revela uma composição diferente da cúrcuma estudada em questão. Na literatura é reportada (Began et al, 2000) a presença em grande quantidade de turmerona e ar-turmerona (também obtidas neste trabalho), cubebeno e α -curcumeno característicos da espécie, assim como carvona e linalol entre outros. O estudo de Began et al (2000) foi realizado no Japão e há de salientar que embora a espécie seja identificada como *Curcuma longa* L. as condições de cultivo podem influenciar e variar composição química.

Tabela 4.8 Composição química (% em área) média dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos nos ensaios de SFE realizados com a metodologia ASE na variação do co-solvente (EtOH/IsoC3) e período estático.

Porcentagem relativa (área, %)						
Co-solvente	10%	10%	50%	50%	90%	90%
Período estático	-	30 min	-	30 min	-	30 min
Substâncias						
trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	1,0	1,4	tr	1,3	1,3	1,2
β-zingibereno	2,1	1,8	2,0	1,6	1,9	1,6
β-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β-sesquifelandreno	2,0	2,4	3,1	2,2	2,8	2,3
Ar-turmerol	1,2	tr	tr	0,9	1,0	1,0
Diidro-ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Isomero ar-turmerol	tr	1,7	tr	1,1	0,9	1,3
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	1,6	1,5	1,4
Ar-turmerona	65	59,4	63,7	61,0	64,9	62,0
(Z)-γ-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-γ-atlantona	22	21,2	24,0	24,2	25,8	24,5
65,7 R-bisabolona	1	1,6	tr	1,3	0,9	1,2
(Z)-α-atlantona	1	-	-	-	-	-
(E)-α-atlantona	1,5	2,0	tr	tr	tr	tr
ni	9	12,2	7,0	9,6	5,7	8,9
total	91	87,8	91,4	88,8	92,7	89,5

tr=traço, % ≥ 1 ; n.i.= não identificado

A Tabela 4.9 mostra o perfil fitoquímico das amostras obtidas na extração supercrítica fracionada, da hidrodestilação e da LPSE. Os dados apresentados nesta tabela

correspondem à médias obtidas entre todos os pontos analisados da OEC. É possível observar a diferença da composição para os extratos obtidos em todas as metodologias testadas. Na segunda etapa da SFE fracionada com utilização de 50% de co-solvente também se obteve alto rendimento de fração volátil diferentemente da LPSE. A ar-turmerona extraída em grande quantidade e recuperada na fração volátil da SFE fracionada, pode apresentar grande potencial econômico baseado nas pesquisas de Ferreira et al (1992) que estudou a atividade biológica e antifúngica deste composto.

Parte desta redução de voláteis observada na LPSE provavelmente ocorreu durante o processo de evaporação do solvente com perda dos voláteis juntamente com a retirada do solvente, pois muitos compostos ainda permaneceram na segunda etapa da SFE fracionada.

Tabela 4.9 Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos nos ensaios de SFE fracionada, extração à baixa pressão e hidrodestilação.

Substâncias	Porcentagem relativa (área, %)				
	Processo de extração				
	SFE fracionada		LPSE	HD	SFE
	CO ₂	CO ₂ + EtOH/IsoC3 (1:1) 50%	EtOH/IsoC3 (1:1)		CO ₂ +EtOH/IsoC3 (1:1) 50%
α-pineno	-	-	-	0,04	0,6
1,8 cineol	-	-	-	-	0,8
trans-cariofileno	-	-	-	0,03	0,5
Ar-curcumeno	-	1,2	-	1,5	1,6
α-zingibereno	-	1,3	-	1,1	2,6
β-bisaboleno	tr	0,3	-	0,14	0,5
β-sesquifelandreno	tr	2	-	1,6	2,8
Ar-turmerol	1,5	0,6	-	1,3	0,8
Diidro-ar-turmerona	1	-	-	0,4	0,8
Isomero ar-turmerol	1	-	-	0,7	0,9
1-epi-cubenol	-	-	-	0,4	1,3
Ar-turmerona	60	62	-	59	40
(Z)-γ-atlantona	-	21	-	-	9,4
(E)-γ-atlantona	1,6	25	-	21	17
65,7 R-bisabolona	1,7	-	69,4	1,1	1,1
(Z)-α-atlantona	-	-	-	1,1	0,4
(E)-α-atlantona	-	-	-	-	tr
Total	63	81	69,4	89,4	78,2

tr=traço, % ≥ 0,03; n.i.= não identificado

Uma análise da composição química da fração volátil (Figura 4.18) obtida com $m_{\text{CO}_2}/m_{\text{alimentação}}$ constante mostra que o parâmetro H_B/D_B não afeta a composição do extrato conforme esperado, pois trata de uma grandeza que expressa tão somente a hidrodinâmica do extrator de leito fixo.

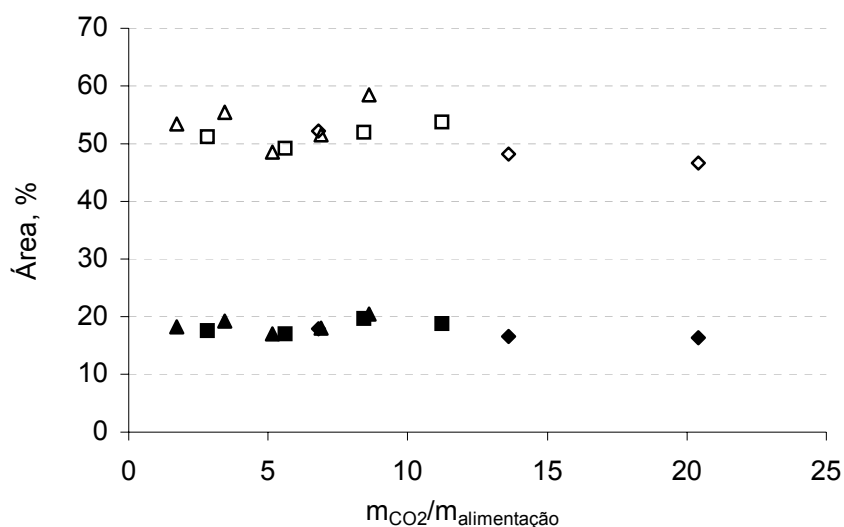


Figura 4.18 Composição (ar-turmerona e γ -atlantona) dos extratos de *Curcuma longa* L., durante as cinéticas de SFE nos ensaios de estudo de geometria de leito (área, %); ar-turmerona: $\diamond$ $H_B/D_B = 1,8$, $\square$ $H_B/D_B = 3,6$, $\triangle$ $H_B/D_B = 5,4$; γ -atlantona: $\blacklozenge$ $H_B/D_B = 1,8$, $\blacksquare$ $H_B/D_B = 3,6$, $\blacktriangle$ $H_B/D_B = 5,4$

Da mesma forma ocorre com a composição dos extratos obtidos nos ensaios de extração acelerada com solvente (Figura 4.19). Os dados em área dos picos cromatográficos (%) mostram uma flutuação nos valores, mas se mantêm numa faixa de valores bem definida. Para a composição dos extratos obtidos por SFE fracionada (em função da ar-turmerona) foi observada uma grande variação durante a cinética de extração ($61\% \pm 12$) (Figura 4.20).

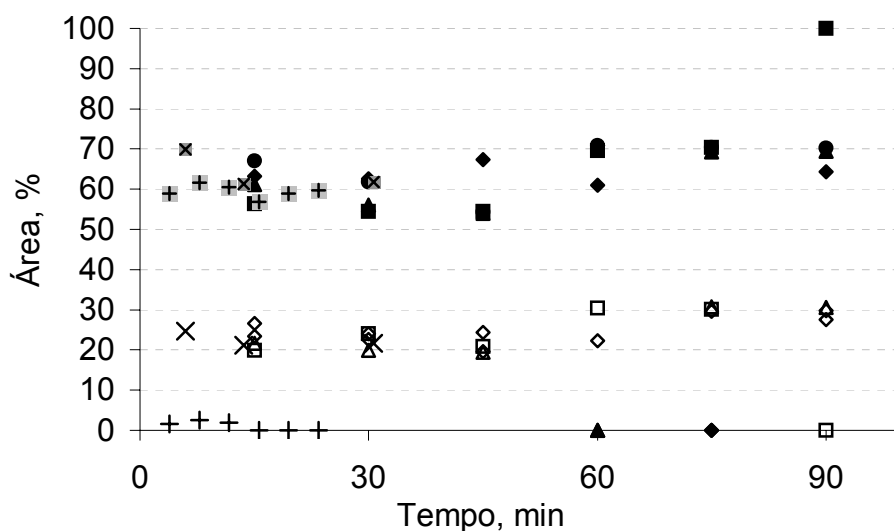


Figura 4.19 Composição (ar-turmerona e γ -atlantona) dos extratos de *Curcuma longa* L., durante as cinéticas de SFE fracionada: ar-turmerona: × 10% 0' + 10% 30' ◆ 50% 0' ■ 50% 30' ● 90% 0' ▲ 90% 30'; γ -atlantona: × 10% 0' + 10% 30' ◇ 50% 0' □ 50% 30' ○ 90% 0' Δ 90% 30'

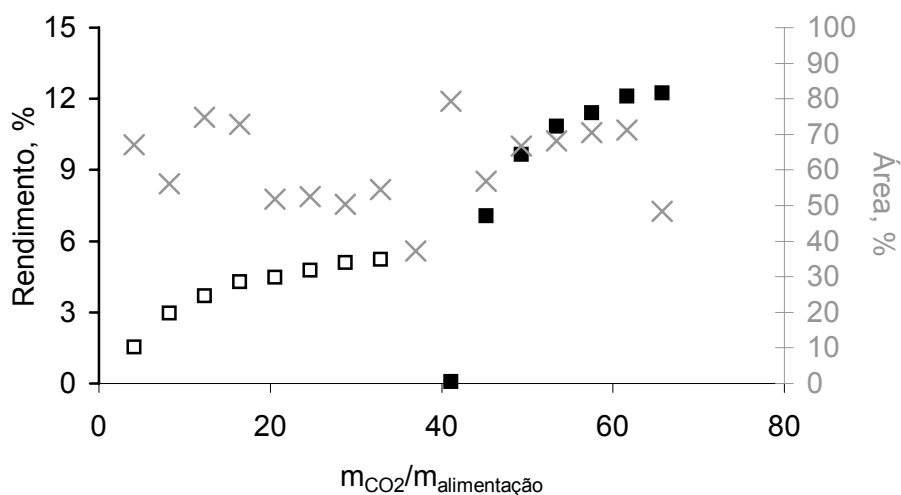


Figura 4.20 Composição (ar-turmerona; área, %) dos extratos de *Curcuma longa* L., durante a cinética de SFE fracionada: □ fração 1 ■ fração 2 (rendimento, %) × ar-turmerona (área, %).

A Figura 4.21 apresenta a placa de CCD com os extratos obtidos nos ensaios de SFE realizados com a metodologia ASE e período estático. Todas as amostras foram

aplicadas na placa em concentrações aproximadas de 2 mg/mL de acetato de etila. Na Figura 4.21 é possível observar que as bandas da amostra 1 possuem maior intensidade que as demais. Através da análise da CCD é possível a identificação de duas bandas intensas na parte superior das colunas, podendo ser os compostos majoritários da fração volátil como as turmeronas e atlantonas, e a curmunina que se manteve na origem.

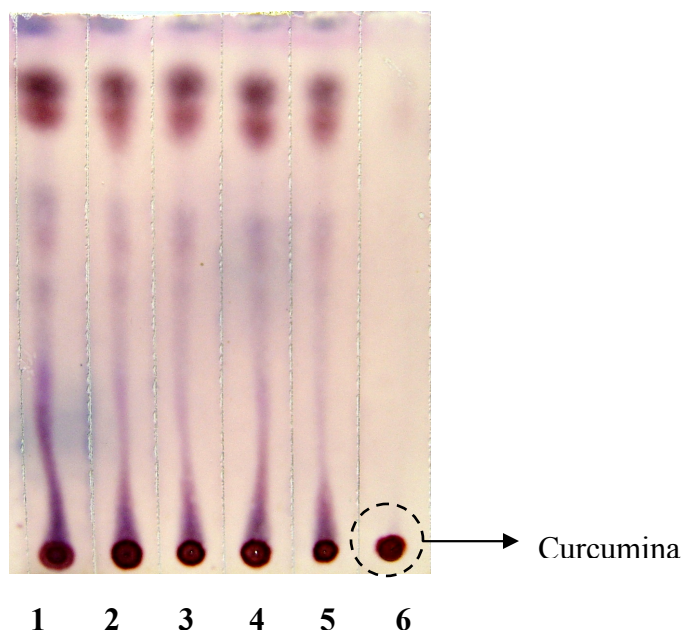


Figura 4.21 Análise de CCD das amostras de *Curcuma longa* L. obtidas por SFE e variação da porcentagem de co-solvente (EtOH/IsoC3): **(1)** 10% - 30'; **(2)** 50% - 0' **(3)** 50% - 30'; **(4)** 90% - 0' **(5)** 90% - 30' e **(6)** padrão de curcumina (Merck). Eluente hexano (80 %) e acetato de etila (20%) e solução de anisaldeído como revelador.

A placa CCD para as frações obtidas no ensaio SFE fracionada é apresentada na Figura 4.22. É possível observar ao longo da extração, a variação da concentração de algumas substâncias, com maior concentração nas colunas 3-9, mostrando perfil semelhante ao extrato obtido por hidrodestilação (coluna 2). A partir da coluna 14, esta concentração de substâncias semelhantes a hidrodestilação começa a reduzir, permanecendo apenas a banda na aplicação do ponto de origem onde está localizada a

curcumina padrão com uma pequena cauda, e algumas manchas suaves na parte superior da placa sem resolução; na parte superior final da placa aparecem bandas ao longo de toda a placa. A banda 19 que representa extrato obtido por LPSE possui comportamento semelhante às últimas bandas da SFE, porém com menor intensidade.

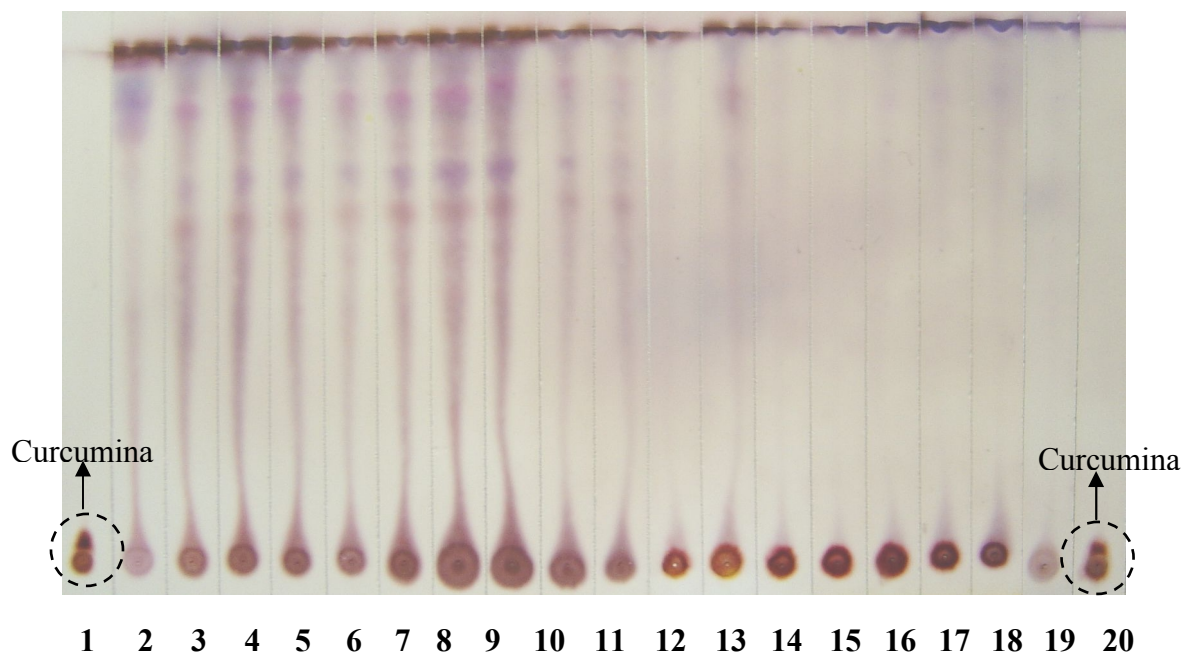


Figura 4.22 CCD da cinética de SFE fracionada de *Curcuma longa* L.: o padrão de curcumina (Merck, 98%) está nas posições 1 e 20, amostra de óleo volátil na posição 2; as amostras extraídas com CO₂ estão na sequência 3-10 e foram obtidas em 240 minutos de extração e extraídas com CO₂+ EtOH/IsoC3 (1:1) em 50% na sequência de 11-18 obtidas a partir de 240 até 480 minutos de extração; amostra obtida por baixa pressão extraídas com EtOH/IsoC3 (1:1) na posição 19; a placa foi eluída com hexano/acetato de etila (8:2) e revelador de anisaldeído.

A Figura 4.23 mostra a CCD dos extratos obtidos por HD, SFE e LPSE e o padrão de curcumina, observados em câmara UV de acordo com a literatura (Wagner et al, 1983). A literatura mostra uma banda bem luminosa correspondente a curcumina com $R_f = 0,6$, a banda do curcuminóide desmetoxicurcumina aparece num $R_f = 0,5$ muito próximo a zona da curcumina, já o bisdesmetoxicurcumina aparece entre o $R_f = 0,4$ e $0,3$ (Wagner et al, 1983). Na Figura 4.23 é possível observar o aparecimento de três bandas diferenciadas pela

intensidade, porém não muito bem definidas, inclusive no padrão utilizado, o que indica que o padrão também é composto pelos outros isômeros da curcumina. A coluna relativa ao extrato de hidrodestilação não mostrou nenhuma banda indicando a ausência de curcuminóides nestes extratos.

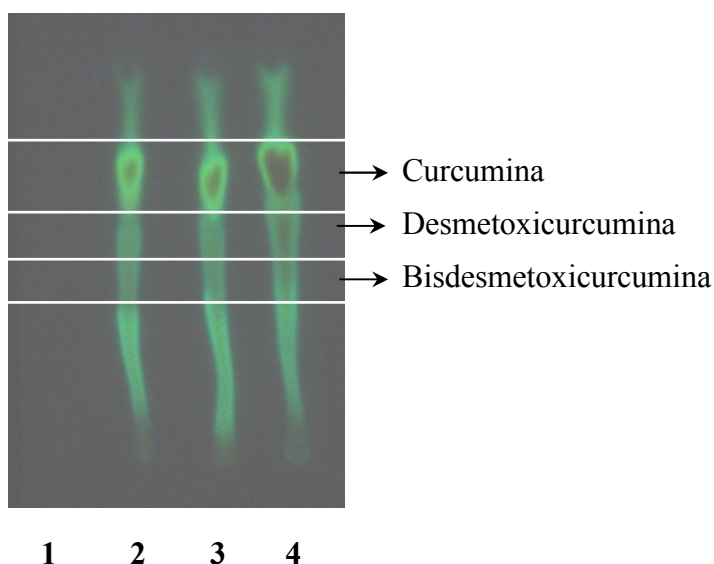


Figura 4.23 CCD das amostras de *Curcuma longa* L. do lote S2: **(1)** hidrodestilação; **(2)** SFE [300 bar, 30 °C, 10 % de EtOH/IsoC3 (1:1)]; **(3)** LPSE com EtOH/IsoC3; **(4)** padrão de curcumina (Merck); desenvolvido com o eluente clorofórmio/etanol/acetato de etila (94:5:1) e observados em câmara com luz ultravioleta a 360 nm.

Também foram testados eluente e revelador para a identificação de grupos fenólicos, mostrado na Figura 4.24, revelando as bandas de forma mais nítida para o extrato de LPSE e do padrão de curcumina.

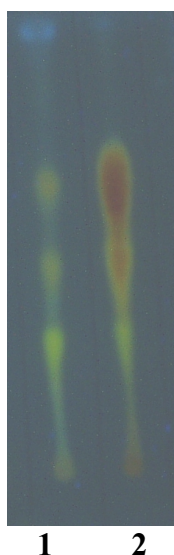


Figura 4.24 CCD de extrato de *Curcuma longa* L.: (1) LPSE (EtOH/IsoC3) e (2) padrão de curcumina (98%, Merck) eluído em CHCl_3 :EtOAc (8:1) e revelador para flavonóides (1% de 2-aminoetil difenilborinato em metanol) em câmara de luz UV.

4.1.6 Atividades Antimicobacteriana e Antiproliferativa

Para todos os ensaios realizados vários foram os parâmetros que auxiliaram na escolha da melhor e mais eficiente condição de processo, entre eles os parâmetros de processo com as taxas de extração, tempo de processo, rendimento de extrato, rendimento de curcuminóides, perfil fitoquímico da fração volátil e também as atividades antimicobacteriana e antiproliferativa.

A determinação da atividade antimicobacteriana para os extratos de *Curcuma longa* L. foi realizada no Instituto Adolf Lutz de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade da Dra. Daisy Sato e os resultados encontram-se no Anexo III. Os extratos analisados foram extratos obtidos por HD e SFE. Os resultados da CIM (Concentração Inibitória Mínima) indicam que a atividade antimicobacteriana dos extratos de cúrcuma são significativas (32-128 $\mu\text{g/mL}$) e sugerem que estes podem ser fonte de compostos com potencial terapêutico, mas futuros estudos devem identificar os compostos ativos associados a esta ação. O

conteúdo de curcuminóides não teve influência sobre a CIM para todos os ensaios, somente a presença destes promoveu a ação contra a micobactéria (Tabela 1-Anexo III).

A atividade antiproliferativa dos extratos foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Divisão de Farmacologia e Toxicologia sob a responsabilidade do Dr. João Ernesto de Carvalho e os resultados encontram-se no ANEXO IV. Foram realizadas análises do óleo essencial obtido da *Curcuma longa* do lote M1 e S1, e do padrão de curcuminóides (Merck). A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada em 9 linhagens originárias de tumores humanos. As amostras testadas apresentaram efeito citostático e citocida, com atividade seletiva do óleo volátil para células tumorais de ovário e mama, e do padrão de curcuminóides para as células de pulmão e rim, a partir de 0,25 µg/mL de extrato.

4.1.7 Conclusões parciais

Na razão $H_B/D_B = 1,8$ foi determinado o maior rendimento na etapa CER num tempo de processo aproximadamente igual a 1/3 daquele para $H_B/D_B = 5,4$ conforme esperado. No entanto, para se verificar a adequabilidade desta relação para equipamentos maiores ($V_E > 5$ L) ensaios adicionais seriam necessários. Além disto, aspectos como os custos de construção dos extratores podem tornar proibitivo o uso de baixos valores de H_B/D_B . Para o estudo da extração acelerada com solvente, os maiores rendimentos para extrato total e curcuminóides foram obtidos quando utilizado 50% (v) de co-solvente e período estático de 30 minutos.

A extração fracionada constitui um método eficiente de separação de grupos de compostos por afinidade química, quando alternados os solventes utilizados no processo de

extração, podendo ser realizada utilizando a tecnologia supercrítica com co-solvente para obtenção de compostos não solúveis em CO₂, como os curcuminóides.

Os modelos matemáticos que melhor representaram as curvas de extração foram os modelos de Goto (1993) e Sovová (1994).

De acordo com os dados obtidos para as atividades antimicobacteriana e antiproliferativa, os extratos possuem atividade farmacológica: para as análises antimicobacterianas todos os extratos possuem atividade e no caso das análises de atividade antiproliferativa, os extratos possuem atividade seletiva com grande potencial de pesquisa.

4.2 *Lippia alba* Mill.

4.2.1 Predição da solubilidade do limoneno e da carvona em CO₂

Os dados de equilíbrio de fase calculados para os sistemas limoneno+CO₂ e carvona+CO₂ estão em gráficos de pressão *versus* solubilidade apresentados na Figura 4.25. A Figura 4.25 indica que as temperaturas de 40 e 50 °C deveriam ser usadas, pois temperaturas mais elevadas podem degradar os compostos, e pressões relativamente baixas (próxima de 80 a 100 bar).

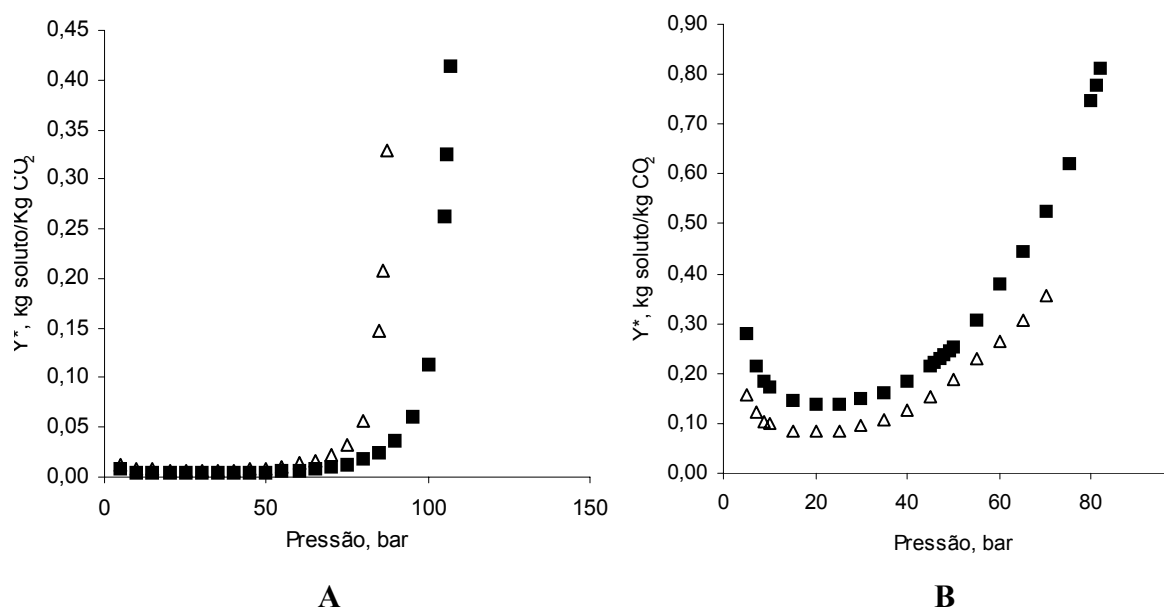


Figura 4.25 Solubilidade do limoneno (A) e carvona (B) em CO₂, respectivamente, calculada pela equação de estado de PR–EOS, Δ 40 °C ■ 50 °C

4.2.2 Rendimento global de extração e cinéticas de extração

A Tabela 4.10 mostra o rendimento (X_0) obtido nos vários processos de extração estudados para a *Lippia alba*. Os ensaios foram obtidos na unidade I pertencente ao laboratório Lasefi, durante 300 minutos. Os compostos majoritários presentes no extrato e *L.alba* (limoneno e carvona) foram quantificados, a composição apresentada na Tabela 4.10 mostra a porcentagem mássica média obtida na análise do extrato obtido na OEC.

Tabela 4.10 Condições de operação da SFE e rendimento de extração da *L. alba*, $X_{0,S/F}$, quantificação do limoneno e carvona (compostos majoritários do extrato).

Condições de operação para SFE			X_0 (%, massa)	s/f	$Q_{CO_2} \times 10^4$ (kg/s)	Velocidade superficial $\times 10^5$ (m/s)	$M_{CER} \times 10^9$ (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^9$ (kg/s)	t_{CER} (s/60)	R_{CER} (%)	Teor dos compostos majoritários (%, massa)	
Pressão (bar)	Temperatura (°C)	ρ_{CO_2} (kg/m ³)									Limoneno	Carvona
80	40	292	4,1	558	0,85	4,9	-	-	-	-	15,3	50,2
80	50	221	4,3	697	1,06	8,1	-	-	-	-	1,2	80
120	40	654	5,6	705	1,07	2,8	5,1	4,8	152,1	1,5	2	64
120	50	478	2,2	691	1,05	3,7	3,3	3,5	191,2	1,3	17	53
100	45	481	7±2	973	1,09	3,8	3,1	2,8	163,4	5,0	0,5	32,1
Etanol a 0,96 bar e 360 min (LPSE)			17±2	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
Etanol a 0,96 bar e 180 min (Soxhlet)			21±2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Hidrodestilação a 0,96 bar e 120 min			0,8±0,1	-	-	-	-	-	-	-	24	13,4

X_0 , rendimento global (kg extrato/kg alimentação); M_{CER} , taxa de transferência de massa para o período de taxa constante de extração; Y_{CER} , razão da massa de soluto na fase solvente (kg extrato/kg CO₂); t_{CER} , tempo de duração do período de taxa constante de extração; R_{CER} , rendimento de extrato no período de taxa constante de extração; tr=traços.

Os dados de X_0 (Tabela 4.10) permaneceram aproximadamente constantes a 80 bar com o aumento da temperatura 40 para 50 °C e redução da densidade do CO_2 de 292 para 221 kg/m^3 . A 120 bar, o rendimento global a 40 °C ($\rho_{\text{CO}_2} = 654 \text{ kg/m}^3$) foi 2,5 vezes maior que o rendimento global a 50 °C ($\rho_{\text{CO}_2} = 478 \text{ kg/m}^3$), evidenciando a predominância do efeito da densidade do solvente sobre a solubilidade, ou seja, no rendimento global, sobre o efeito da pressão de vapor do soluto. A 100 bar e 40 °C ($\rho_{\text{CO}_2} = 481 \text{ kg/m}^3$) o rendimento global foi 1,25 vezes o rendimento global medido a 120 bar e 50 °C ($\rho_{\text{CO}_2} = 478 \text{ kg/m}^3$), nestas duas condições as densidades do solvente são muito próximas, logo o efeito da baixa pressão de vapor do soluto sobre a solubilidade predominou sobre o efeito da densidade na temperatura de 40 °C e pressão de 100 bar. A Tabela 4.10 mostra os parâmetros cinéticos obtido para o sistema *L. alba* + CO_2 . A análise de variância realizada utilizando os dados da Tabela 4.10, detectou que os efeitos da pressão e temperatura foram significantes, e o efeito da pressão foi mais importante ($p_{\text{valor}}=0,0018$) que o efeito da temperatura ($p_{\text{valor}}=0,098$).

Figura 4.26 mostra que as curvas de extração global a 100 e 120 bar têm o perfil esperado exibindo o período de taxa constante de extração (CER), o período de taxa de decréscimo de extração (FER) e o período controlado pela difusão, enquanto que, as OECs não têm o formato tradicional. Assim, os parâmetros cinéticos (Tabela 4.10) foram estimados apenas para as OECs obtidas a 100 e 120 bar. Apesar de usar a mesma vazão para todos os ensaios, as mudanças na densidade do solvente promoveram variações importantes na velocidade superficial. Esses dados associados aos parâmetros cinéticos (Tabela 4.10), podem ajudar a entender os efeitos das variáveis de operação na cinética de transferência de massa. A taxa de transferência de massa a 120 bar decresceu de $5,1 \times 10^{-8} \text{ kg/s}$ para $3,3 \times 10^{-8} \text{ kg/s}$ com o aumento da temperatura de 40 para 50 °C. Ao mesmo tempo,

a velocidade superficial aumentou de $2,8 \times 10^{-5}$ kg/s para $3,7 \times 10^{-5}$ kg/s. Assim, o aumento da densidade do solvente a 120 bar e 40 °C compensou a pequena velocidade usada. O rendimento para o período CER representou aproximadamente 50% do rendimento total e o maior valor de R_{CER} foi obtido a 100 bar e 40 °C com 168 minutos de processo.

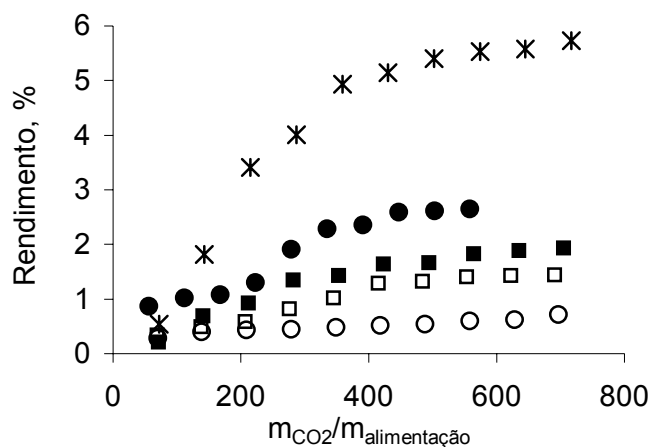


Figura 4.26 Curvas do rendimento global de extração da *L. alba* por SFE: (x) 100 bar/ 45°C, (■) 120 bar/ 40 °C, (□) 120 bar/ 50 °C, (●) 80 bar/ 40 °C, (○) 80 bar/ 50 °C.

4.2.3 Extração à baixa pressão

Os rendimentos globais para processos convencionais (LPSE, Soxhlet e hidrodestilação) foram 17%, 21% a 0,8% (base seca), respectivamente. A Figura 4.27 mostra a cinética de extração por LPSE.

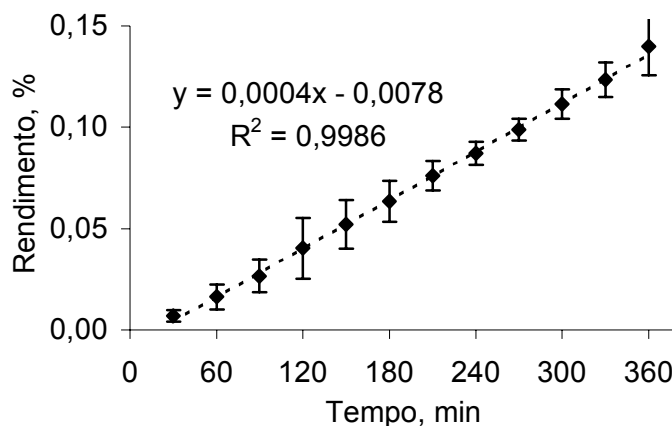


Figura 4.27 Curvas do rendimento Global de extração para o sistema *L. alba* + etanol obtido a pressão ambiente ($P=0,945$ bar e $28\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.2.4 Caracterização da composição química dos extratos: CCD e CG

As Figuras 4.28 e 4.29 mostram as placas de cromatografia em camada delgada para os vários extratos obtidos da *L. alba*. As colunas de 1-6 mostram as variações na composição dos extratos obtidos na SFE. As colunas 7 e 8 apresentam o óleo volátil obtidos por HD e LPSE, e nas colunas 9 e 10 são mostrados os padrões de carvona e limoneno, respectivamente. A 80 bar e temperaturas de 40 e 50 $^{\circ}\text{C}$, era esperado que a composição química dos extratos de SFE fosse muito similar à do óleo volátil, mas isto não foi observado. Assim, nas condições intermediárias de temperatura e pressão, estes extratos podem ser muito diferentes dos extratos obtidos pelas outras técnicas, incluindo a hidrodestilação. O teor de carvona e limoneno nos extratos obtidos por SFE, LPSE, Soxhlet e HD mostraram que, como esperado, o óleo volátil (hidrodestilação) contém grande quantidade de limoneno e carvona, enquanto estas substâncias não foram detectadas ou somente traços destes compostos foram detectados nos extratos etanólicos (Tabela 4.10).

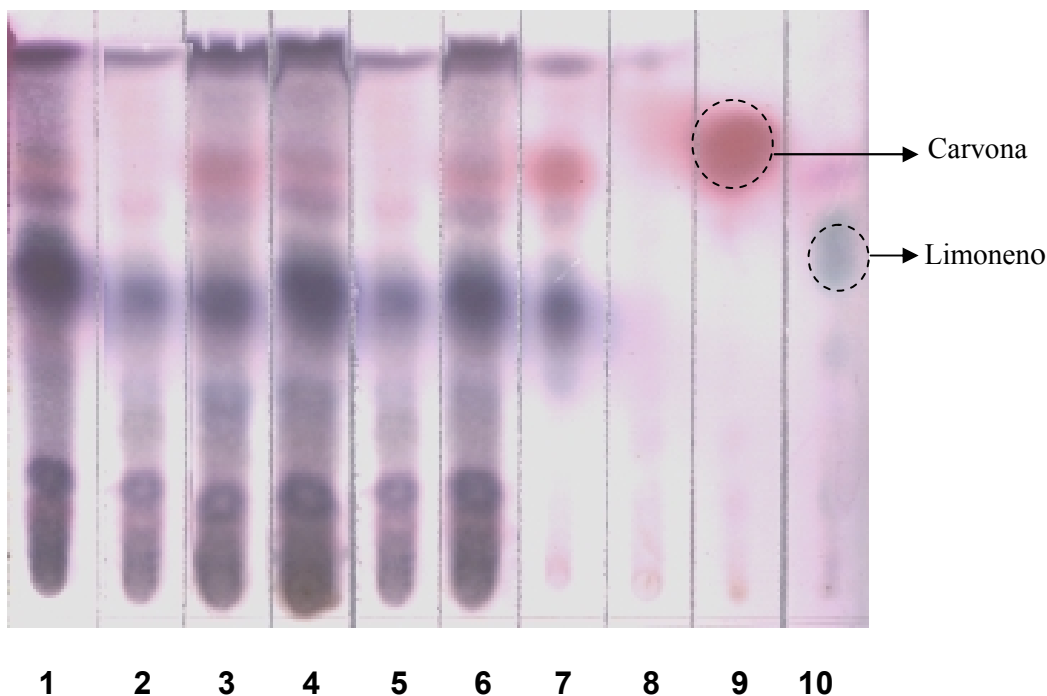


Figura 4.28 CCD de extratos de *L. alba*. 1: 80 bar/40 °C 2: 80 bar/50 °C; 3: 100 bar 45 °C; 4: 100 bar 45 °C; 5: 120 bar/ 40 °C; 6: 120 bar/50 °C; 7: Óleo Volatil; 8: LPSE; 9: Padrão de Carvona; 10: Padrão de Limoneno (todas as amostras foram injetadas usando a diluição: 20 µL de solução: 6mg de extrato ou padrão /mL de acetato de etila).

O sistema de separação do soluto/solvente oferece algumas informações sobre o fracionamento dos extratos de *L. alba*. A Figura 4.29 mostra que o extrato coletado durante a extração (coluna 1), assim como o extrato retido na tubulação do sistema (coluna 4), possuem composição similar. O extrato retido na coluna de adsorção (coluna 3) contém grandes quantidades de substâncias hidrofóbicas (grandes manchas no topo da coluna 3 com semelhanças entre as colunas 1 e 4), no extrato obtido durante a despressurização predominou a presença das substâncias hidrofílicas (grande mancha na base da coluna 2), logo o frasco coletor funcionou como um estágio de equilíbrio. A massa de extrato recuperada na coluna de adsorção foi de 7-14 % do total de massa de extrato. A massa de

extrato recuperada na despressurização representou de 8-73% da massa total. As diferenças na composição das 4 frações nos extratos de SFE, demonstraram que o processo de extração fracionada pode ser desenvolvido para obter extrato de *Lippia alba* com diferentes composições.

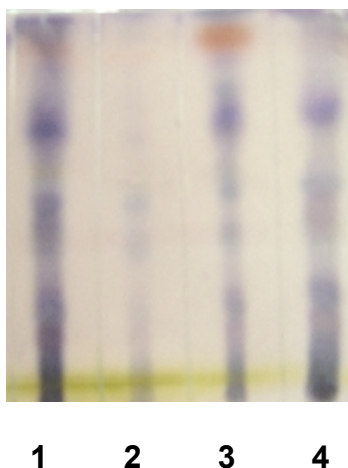


Figura 4.29 Extratos de SFE obtidos a 100 bar/ 45 °C: 1: Extrato coletado na extração; 2: Extrato coletado na despressurização; 3: Extrato coletado na coluna de adsorção; 4: Extrato coletado durante a limpeza do sistema.

As análises de cromatografia gasosa (Tabela 4.12 e 4.13) confirmaram os resultados mostrados na CCD. A Tabela 4.12 mostra a proporção relativa (% área) para as várias substâncias para os extratos de *L. alba*. A carvona e o limoneno são geralmente considerados substâncias de interesse obtidas da *L. alba*, entretanto, os resultados das Tabelas 4.12 e 4.13 mostram que a *L. alba* pode ser fonte de outras substâncias como guaiol e bulnesol, por exemplo. Estas substâncias são reportadas na literatura como possuidoras de atividades antiinflamatórias e antimicrobacteriana, sendo inibidores da acetilcolinesterase importante ação para o tratamento da doença de Alzheimer (Trevisan e Macedo, 2003).

As substâncias de interesse (carvona e limoneno) foram extraídas e retidas na coluna de adsorção (Tabela 4.13 e Figura 4.29), mostrando a necessidade de se instalar uma coluna de captura das frações voláteis após o sistema de separação soluto/solvente.

Stashenko et al (2004) encontraram para a mesma espécie composição total diferente da identificada nas Tabelas 4.12 e 4.13 em extratos obtidos por SFE. Embora tenham encontrado a carvona e o limoneno em grandes quantidades, as frações identificadas por Stashenko et al (2004), possuíam porcentagem relativa em área cerca de 40% e 24%, respectivamente para carvona e limoneno; a Tabela 4.13 apresenta para a carvona cerca de 68 % e para o limoneno o máximo de 20%. Quando da quantificação destas substâncias a carvona atingiu valores de 80% (massa) e o limoneno 17% (massa).

Tabela 4.11 Composição química (área, %) das frações voláteis de *Lippia alba* obtidas por diferentes técnicas de extração.

Substâncias	Processos de extração					HD	LPSE	Soxhlet
	SFE							
	80 bar/40°C	80 bar/50 °C	120 bar/40 °C	120 bar /50 °C	100 bar /45 °C			
Limoneno	0,5	-	-	-	1,3	24,5	-	-
t-carvil	-	-	-	-	tr	-	-	-
Carvona	6,0	6,3	6,0	1,8	5,6	55,9	-	37,63
β-bourboneno	-	-	-	-	1,5	-	-	12,09
β-cubebeno	-	-	-	-	-	-	-	-
Cis-cariofileno	-	-	-	-	1,2	-	-	-
t-cariofileno	-	-	-	-	tr	-	55,65	-
γ-muuruleno	0,6	0,9	-	-	5,0	-	-	21,50
γ-cadineno	0,7	-	-	1,0	2,0	-	-	-
Elemol	4,8	1,0	8,8	7,2	10,2	-	-	-
Geranil butirato	-	-	-	-	2,6	-	-	-
t-nerolidol	1,0	-	-	1,4	2,6	-	-	-
Germacreno D-4-ol	-	9,1	-	-	2,7	-	-	-
Guaiol	1,1	0,8	1,9	1,3	2,7		1,64	-
Bulnesol	1,7	1,5	-	1,0	1,4	-	1,18	-
Khusimol	3,8	-	-	-	3,7	-	-	-
Total	20,1	20,4	16,7	13,6	40,0	80,5	60,0	71,2
n.i	79,9	79,6	83,3	86,4	60,0	19,5	40,0	28,8

n.i.: não identificados, tr: traços ≤ 0,5%

Tabela 4.12 Composição química dos extratos (área,%) de SFE recuperados na coluna de adsorção (A), na despressurização (D) na limpeza (L).

Substâncias	Processos de extração														
	80 bar/40 °C			80 bar/50 °C			120 bar/40 °C			120 bar /50 °C			100 bar /45 °C		
	A	D	L	A	D	L	A	D	L	A	D	L	A	D	L
Triciclono	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	-	-
α -pineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	-	-
Sabineno	tr	-	-	tr	-	-	Tr	-	-	0.9	-	-	-	-	-
Mirceno	tr	-	-	tr	-	-	Tr	-	-	0.4	-	-	-	-	-
Limoneno	13.2	18.6	-	0.6	-	-	2.1	-	-	20.1	-	-	0.4	-	0.6
t-ocimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	0.0	-	-
γ -terpineno	0.7	-	-	-	-	-	0.5	-	-	0.8	-	-	0.5	-	-
Terpinoleno	0.4	-	-	-	-	-	0.3	-	-	0.5	-	-	0.4	-	-
Linalol	0.9	-	-	0.6	-	-	0.9	-	-	1.0	-	-	1.1	-	-
t-carvil	0.3	-	-	-	-	-	0.5	-	-	0.4	-	-	0.5	-	-
Carvona	45.4	-	-	59.0	-	-	68.1	-	-	51.0	-	-	59.1	-	1.4
Piperitona	0.5	-	-	0.7	-	-	0.8	-	-	0.5	-	-	0.7	-	-
β -bourboneno	1.1	-	-	1.5	-	-	1.5	-	3.2	1.2	1.7	-	1.3	-	-
β -cubebeno	0.8	-	-	0.6	-	-	0.6	-	-	0.5	-	-	0.5	-	0.8
Cis-carifileno	0.6	-	1.0	0.7	-	-	0.7	-	-	0.6	-	-	0.8	-	-
t-cariofileno	-	-	1.0	0.6	-	-	0.7	-	-	0.6	-	-	0.6	-	0.7
γ -muuruleno	9.1	-	3.8	10.8	-	-	7.7	-	5.3	9.3	5.5	-	11.1	-	1.3
γ -cadineno	0.6	-	-	0.7	-	-	0.7	0.8	-	0.4	0.0	-	0.9	-	0.8
Elemol	2.0	-	3.3	3.4	-	-	2.5	8.8	3.2	1.6	5.6	-	3.6	-	5.1
t-nerolidol	0.6	-	-	0.9	-	-	0.7	1.8	6.1	0.4	-	-	1.0	-	1.0
Germacreno D-4-ol	0.4	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8
Guaiol	-	-	5.8	0.9	-	10.1	0.6	2.1	-	0.3	7.5	-	0.9	6.7	0.9
Bulnesol	0.3	-	1.1	0.5	20.8	-	1.0	2.2	-	-	-	-	0.6	-	2.3
Khusimol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.8
Total	76.8	18.6	16.0	81.8	20.8	10.1	89.9	15.8	17.8	90.9	20.3	-	83.9	6.7	24.4
n.i	23.2	81.4	84.0	18.2	79.2	89.9	10.1	84.2	82.2	9.1	79.7	-	16.1	93.3	75.6

n.i.: não identificados, tr: traços $\leq 0,3\%$

4.2.5 Estruturas secretoras da *Lippia alba*

Foram realizadas análises microscópicas nas estruturas secretoras das folhas de *Lippia alba*. As estruturas secretoras estão presentes na superfície das folhas e descritas na literatura. Por se tratarem de amostras secas, não foram efetuadas a fixação, a desidratação e a secagem no ponto-crítico (etapas comuns de preparação de amostras biológicas), passando direto para a etapa de montagem nos porta-amostras com fita adesiva dupla-face. As amostras foram recobertas com ouro e realizada a análise. Foram obtidas imagens da *Lippia alba* antes e depois da SFE para identificar as estruturas secretoras das mesmas. As estruturas secretoras da falsa melissa podem ser visualizadas na superfície da partícula da folha (Figura 4.30).

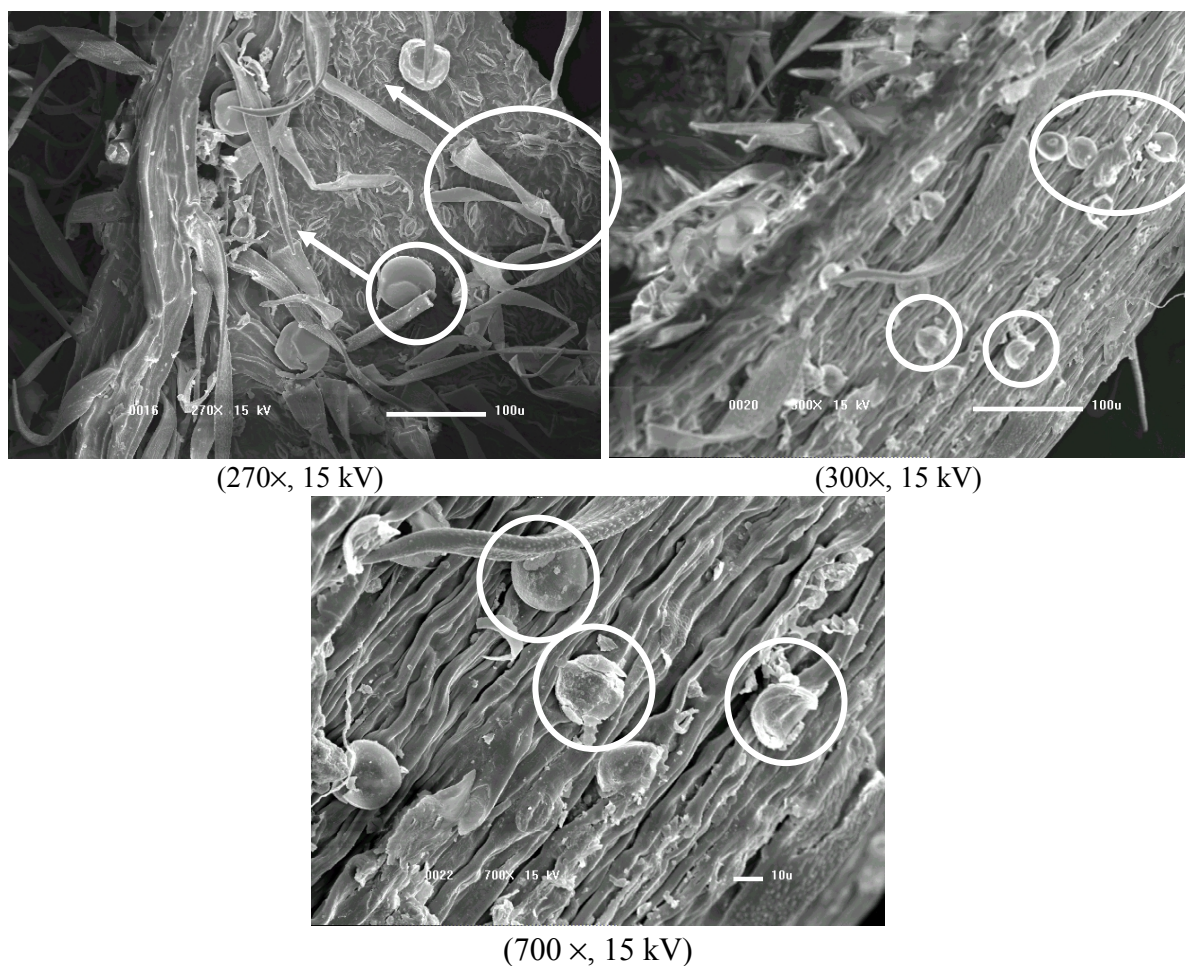


Figura 4.30 Estruturas secretoras na superfície de uma folha de *Lippia alba*.

É possível observar dois tipos diferentes de estruturas: tricomas glandulares e tectores (Figura 4.30). Os tricomas glandulares estão presentes por toda a superfície dos fragmentos de folhas analisados, como pêlos e outras estruturas celulares, assim como estômatos responsáveis por trocas gasosas.

As Figuras 4.31 e 4.32 mostram tanto as estruturas intactas quanto estruturas rompidas antes e depois da SFE. O não rompimento das estruturas após o processo de extração indica que a pressão do processo não foi suficiente para romper todas as estruturas e as células da matriz vegetal para a retirada do óleo, sendo o rompimento celular observado causado provavelmente pela secagem, cominuição e/ou extração.

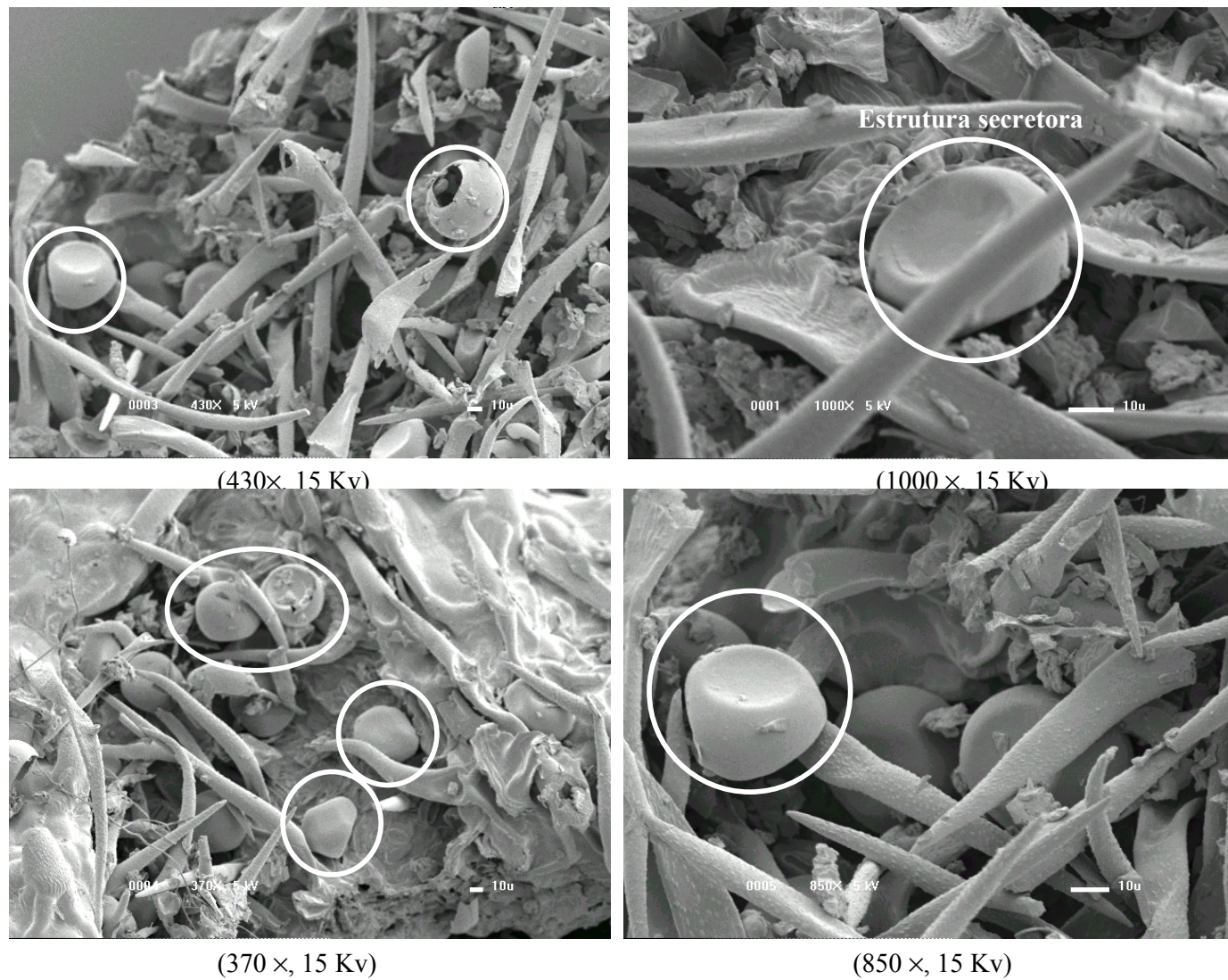


Figura 4.31 Estruturas secretoras intactas e rompidas na superfície de uma folha de *Lippia alba* antes do processo SFE .

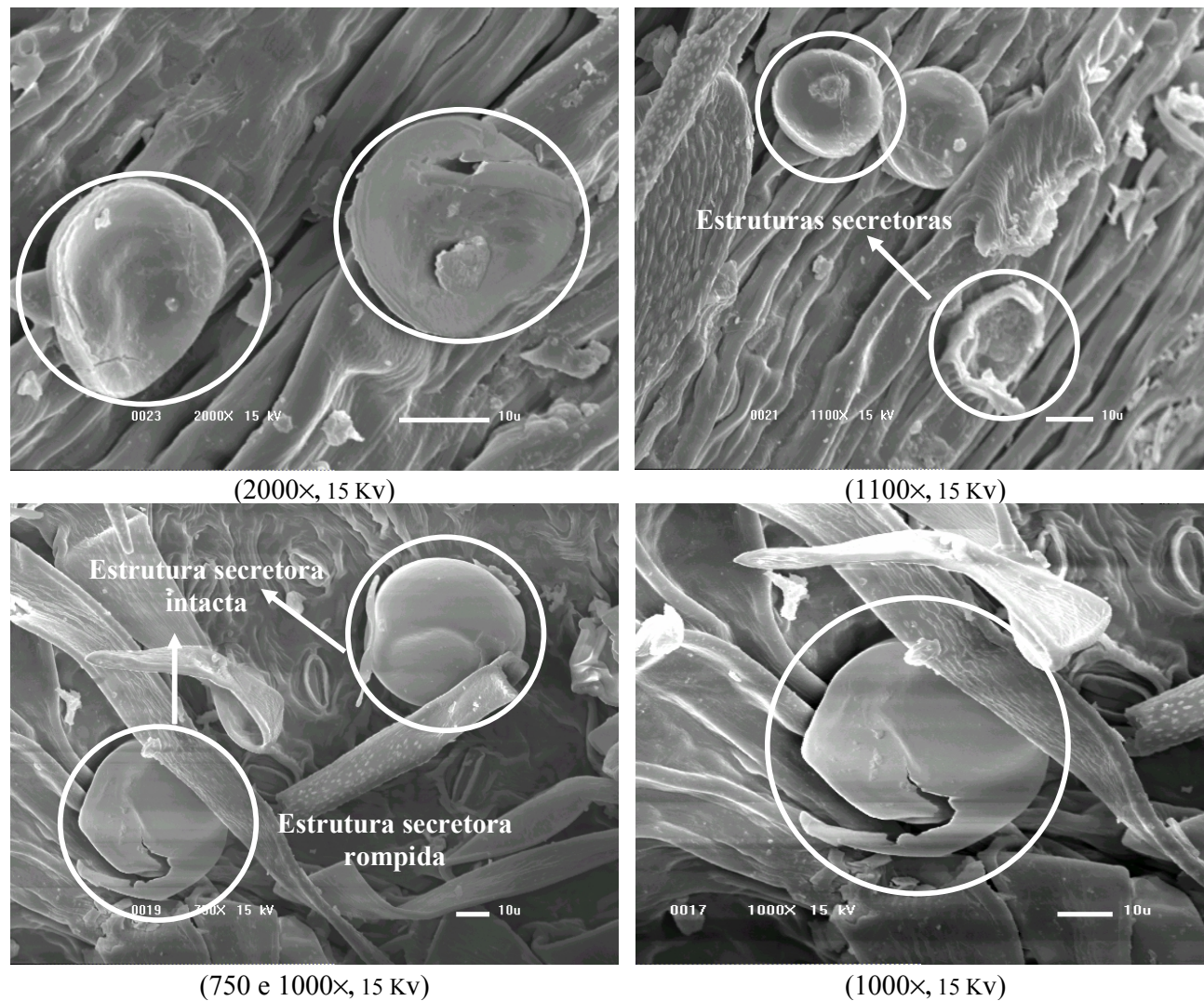
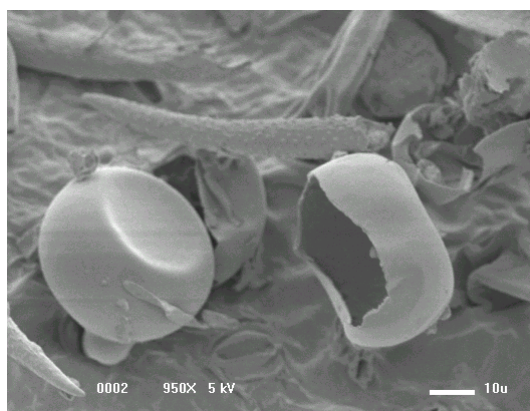


Figura 4.32 Estruturas secretoras intactas e rompidas na superfície de uma folha de *Lippia alba* após o processo SFE.

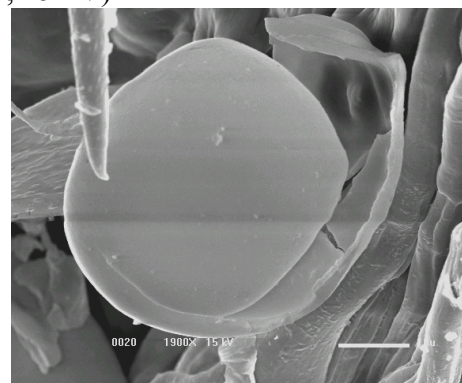
Na Figura 4.33 foi observado alguns tricomas peltados com medidas próximas de $50\ \mu$ a $1400\times$. A Figura 4.33 (A) mostra as estruturas intactas e rompidas (devido ao processo de cominuição) antes da SFE, enquanto a Figura 4.30 (B e C) mostram as estruturas intactas (B) e as rompidas (C) depois da SFE. Os resultados mostraram que a SFE não afetou significativamente as estruturas secretoras da *Lippia alba* como no processo de cominuição. Ou seja, o processo de extração por SFE não é tão drástico como a moagem da matéria-prima em relação ao rompimento das estruturas secretoras.



A (950 $\times$, 15 kV)



B (1400 $\times$, 15 kV)



C (1900 $\times$, 15 kV)

Figura 4.33 Estruturas secretoras da *L. alba* observadas por smicroscopia eletrônica de varredura (MEV), antes (A) e depois (B e C) da SFE.

4.2.6 Conclusões parciais:

A composição química dos extratos foi diferente para todos os processos estudados; a co-extração de substâncias pesadas e/ou hidrofóbicas ocorreu para os processos de LPSE e Soxhlet.

As condições de operações para maximizar o rendimento da extração de carvona (80%) e limoneno (17%) foram 80 bar/ 50 °C e 120 bar/50 °C, respectivamente.

A maior taxa de transferência de massa foi obtida com as menores velocidades superficiais, correspondendo à maior densidade do solvente usado.

Aproximadamente 50% do rendimento global do extrato foi obtido durante o período CER.

Os extratos de *L. alba* podem ser fonte de outras substâncias, como o guaiol e bulnesol. Os resultados mostraram que a SFE não afetou significativamente as estruturas secretoras como o processo de cominuição.

4.3 Resíduo amiláceo do processo SFE

4.3.1 Composição do resíduo da SFE: cúrcuma e gengibre

A Tabela 4.13 mostra a composição química dos amidos isolados de cúrcuma e gengibre. Os dados mostram similaridade entre o teor de amido antes e depois do processo de extração supercrítica, isto pode indicar que a estrutura amilácea não foi modificada pelo processo de extração supercrítica.

Tabela 4.13 Composição dos amidos dos tubérculos de *Curcuma longa* Linneu (C) e *Zingiber officinale* Roscoe (Z).

Base seca (%)	<i>Curcuma longa</i>		<i>Zingiber officinale</i>	
	C _A	C _D	Z _A	Z _D
Amido	76 ± 4	77 ± 2	85 ± 2	84 ± 1
Proteína Total	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.53 ± 0.01	0.56 ± 0.01
Cinzas	1.5 ± 0.2	1.43 ± 0.04	0.91 ± 0.04	0.16 ± 0.03
Açúcares Redutores	tr	tr	tr	tr
Lipídeos	n.q	n.q	n.q	n.q
Umidade	11.8 ± 0.4	12.1 ± 0.5	8.2 ± 0.8	9.7 ± 0.1
não quantificado	10.1	8.97	5.36	5.58

tr = traço < 0,01 %; n.q= não quantificado;
os subíndices **A** e **D** significam antes e depois da SFE, respectivamente.

Os amidos isolados de cúrcuma e gengibre atingiram a pureza de 77 e 85%, respectivamente. A amostra C_D mostrou uma intensa coloração amarela, após exaustivas lavagens e durante a centrifugação no processo de isolamento, indicando a presença de curcuminóides (Figura 4.334). Isso pode ser explicado pela complexação lipídeo-amilopectina (Hoover, 2001) a qual dificultou a clarificação do amido por lavagem. Como já é observado na literatura, algumas propriedades dos amidos de cúrcuma, são modificadas pela presença e ausência de curcuminóides, pigmentos responsáveis pela coloração (Jyothi

et al, 2003), sendo que, em ambas as situações, este amido se torna interessante para a aplicação na indústria de alimentos.



Figura 4.34 Coloração natural dos amidos de *Curcuma longa* após o isolamento nas amostras C_A e C_D, respectivamente.

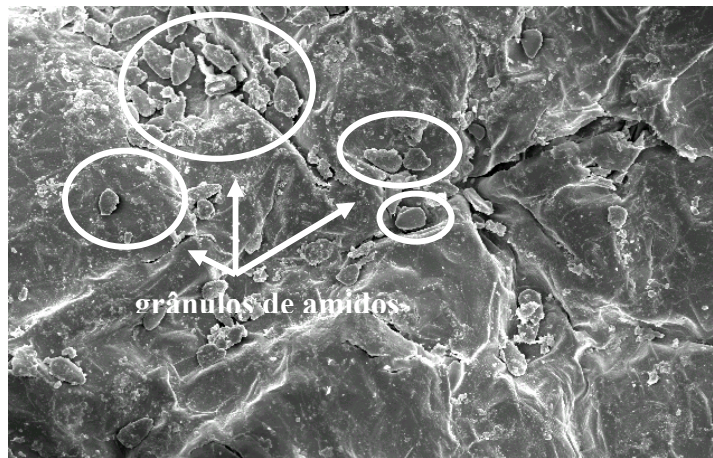
A porcentagem da composição não quantificada foi de aproximadamente 8-10% para a cúrcuma e em torno de 5% para o gengibre. Estas quantidades podem envolver os lipídeos e os minerais não quantificados, bem como os erros de análise. Estes amidos podem ser utilizados na indústria como amidos especiais, possuindo ligeiro aroma, sabor e coloração (cúrcuma), podendo ser dispensada a exigência de alto grau de pureza exigido dos amidos isolados comerciais, o que reduz o tempo de processo de obtenção destes, assim como o seu custo. Estes amidos especiais podem ser utilizados na preparação de sopas, massas e até mesmo na preparação de biofilmes com características antioxidantes, devido à presença de curcuminóides.

O teste de Tukey realizado para os dados da (Tabela 4.3.1), demonstrou que para o conteúdo de cinzas das amostras C_A e C_D, a diferença não foi estatisticamente significativa (5%) enquanto que para as amostras de amido de gengibre (Z_A e Z_D) e entre as espécies as diferenças foram estatisticamente significantes. Entretanto, as diferenças dos conteúdos de

amido para as amostras de cúrcuma e gengibre não foram estatisticamente significantes (5%), enquanto que entre as espécies (cúrcuma e gengibre) a diferença foi estatisticamente significativa. As diferenças no conteúdo de proteína total, açúcar redutor e dos outros componentes analisados, não foram estatisticamente significantes.

4.3.2 Análise das amostras de cúrcuma e gengibre por MEV

Imagens de amostra de cúrcuma fatiada e seca, antes da moagem, mostra uma superfície recoberta por uma película e a presença de grânulos de amido sobre a mesma, assim como outros materiais extracelulares (Figura 4.35).



(230 x, 15 kV)

Figura 4.35 Amido na superfície do fragmento de curcuma fatiada e seca.

A Figura 4.36 obtida das amostras de cúrcuma (*Curcuma longa*) antes do processo de extração supercrítica (SFE) mostra a presença de grânulos de amido em cavidades delimitadas por membranas. A Figura 4.37 mostra imagens da cúrcuma após a SFE, revelando um desarranjo nas paredes celulares que envolvem os grânulos de amido, possivelmente pela alta pressão utilizada (300 bar), mas ainda é possível observar a presença dos mesmos.

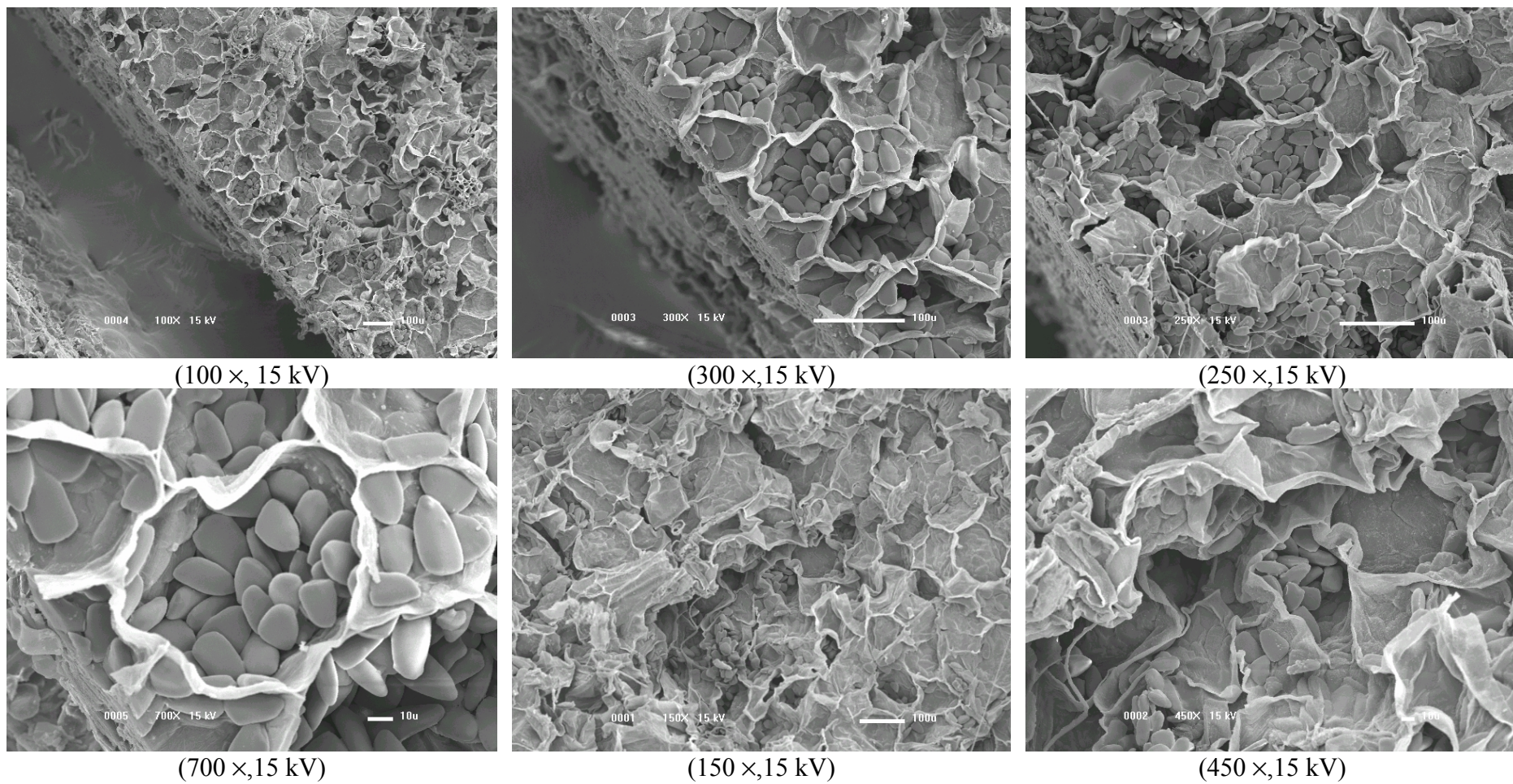


Figura 4.36 Amido presente na *Curcuma longa* L. antes da SFE.

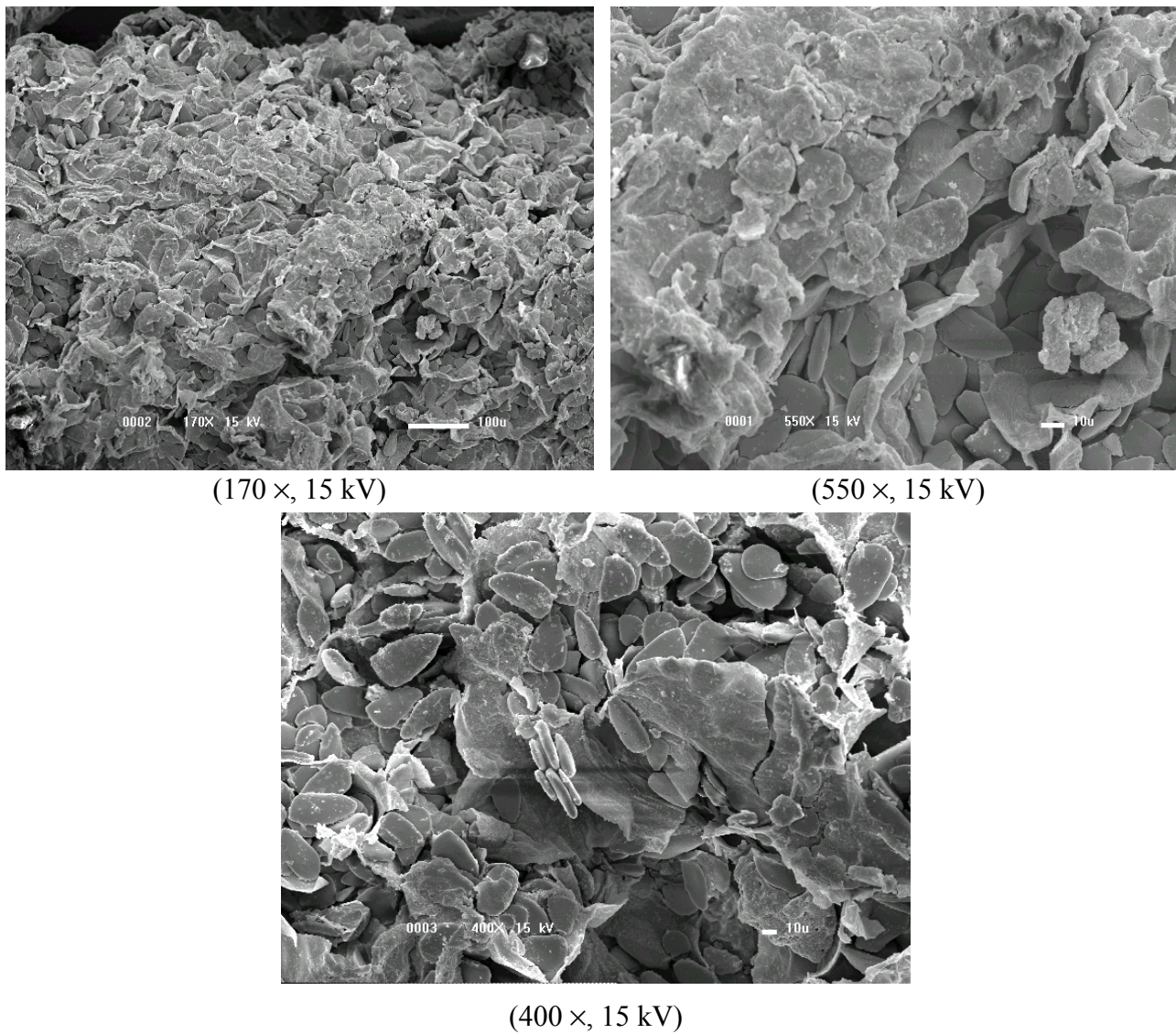


Figura 4.37 Amido presente na *Curcuma longa* L. após SFE.

Da mesma forma é possível observar a presença de grânulos de amido nas amostras de gengibre, porém antes mesmo da SFE as cavidades onde se encontram os grânulos já possuem um nível de desorganização (Figura 4.38) aumentando esta desorganização após a SFE (Figura 4.39), com muitos grânulos sobre a superfície da partícula observada.

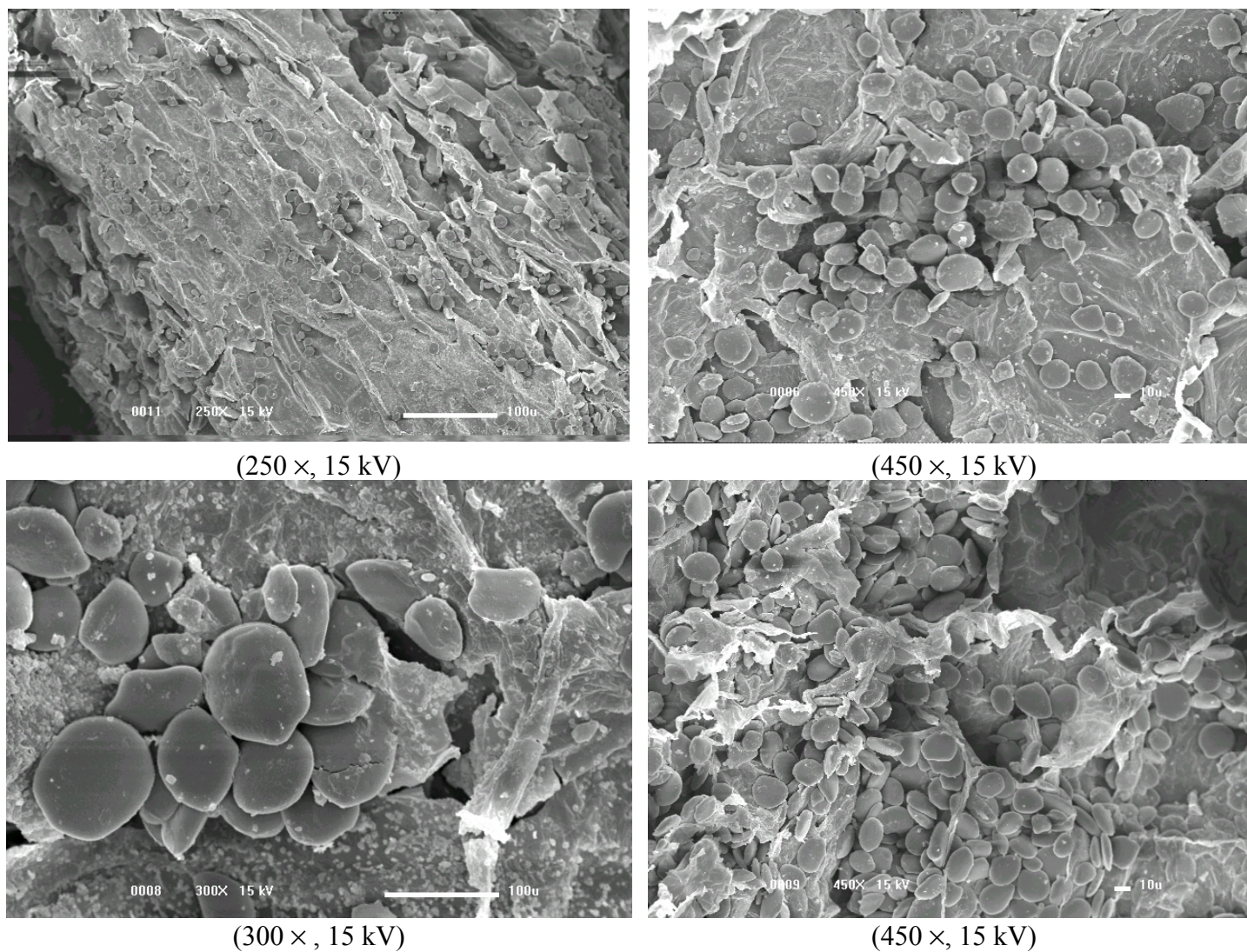


Figura 4.38. Amido presente na *Zingiber officinale* antes da SFE (250, 450, 450, 300 ×, 15 kV).

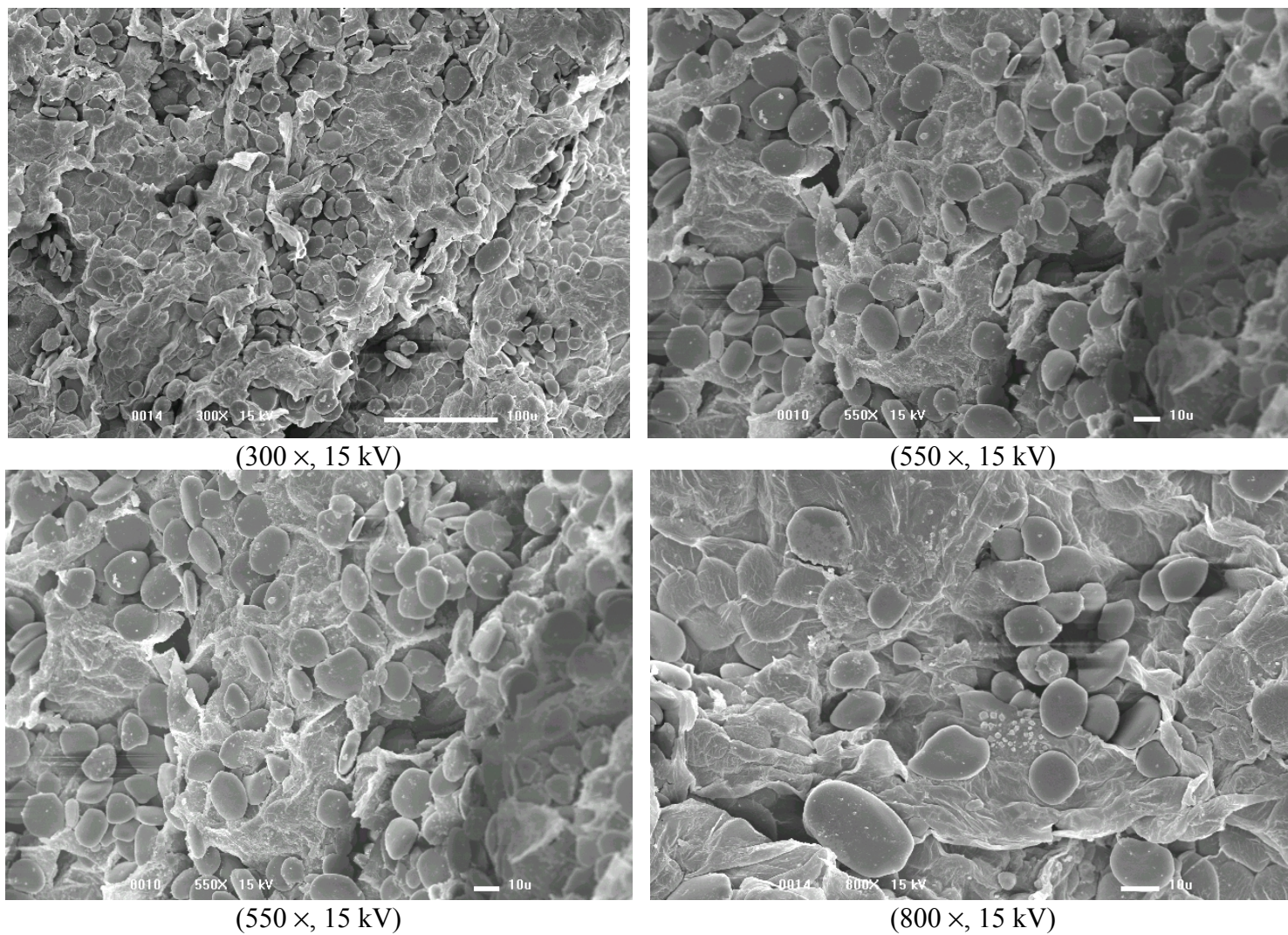


Figura 4.39 Amido presente na *Zingiber officinale* após SFE (300, 550, 800 e 550 ×, 15 kV).

4.3.2.1 Análise morfológica dos grânulos de amido: MEV

As imagens (Figura 4.40 e 4.41) mostram os grânulos de amido isolados intactos, tanto na amostra antes do processo quanto depois do processo de SFE. Os grânulos de amido são semelhantes aos descritos na literatura para a cúrcuma: forma oval, elíptica arredondada e de espessura fina; para o gengibre os grânulos possuem forma redonda com algumas irregularidades, o que difere do amido da cúrcuma.

As Figuras 4.40 e 4.41 dos amidos isolados de cúrcuma e gengibre antes e depois da SFE, mostram detalhadamente os grânulos. A observação da morfologia da superfície dos grânulos mostrou que o processo SFE, usando CO₂ e co-solventes (etanol/isopropanol), não alteraram a superfície e a morfologia dos grânulos observada por MEV (Figuras 4.40 e 4.41). Jyothi et al (2003) obtiveram um tamanho médio dos grânulos de amido para a *C. zedoaria* e *C. malabarica*, de 33 µm. Grânulos de amido de batata podem ser tão largos quanto 100 µm ao longo do maior eixo (Whistler e BeMiller, 1999). Os grânulos de amido de gengibre têm diferentes dimensões dos grânulos de cúrcuma e suas diferenças morfológicas são muito bem definidas: os grânulos de gengibre são esféricos (10-28 µm no seu maior eixo) e os grânulos de cúrcuma são elípticos (10-33 µm no seu maior eixo). A superfície dos grânulos de amido de cúrcuma mostrou fissuras na amostra C_A (Figura 4.40); isto foi reportado na literatura como indicativo de fortes pontes entre o amido e a matriz protéica (Jyothi et al, 2003).

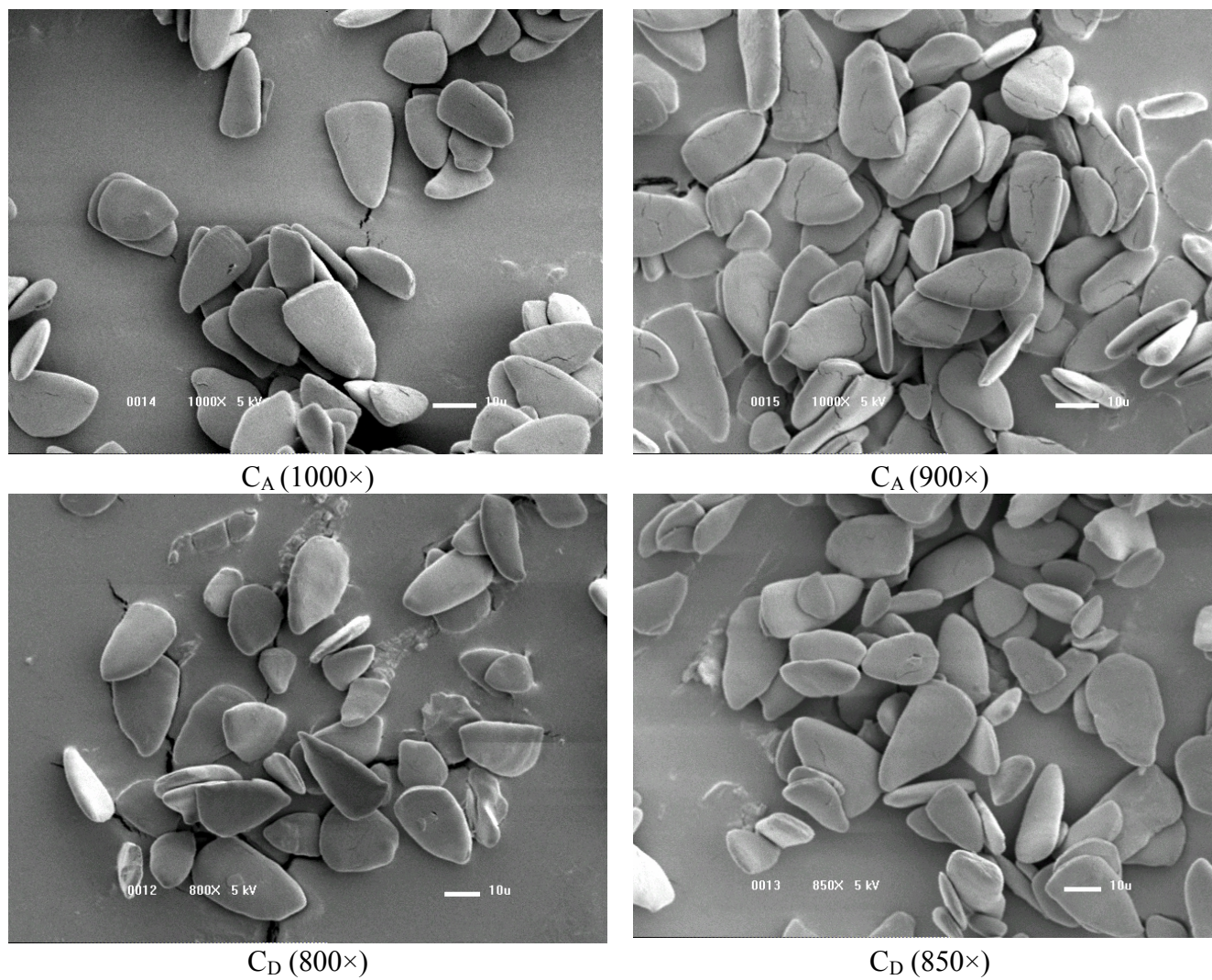


Figura 4.40 Amidos de *Curcuma longa* antes (C_A) e depois (C_D) do processo SFE analisado por MEV, 5 kV.

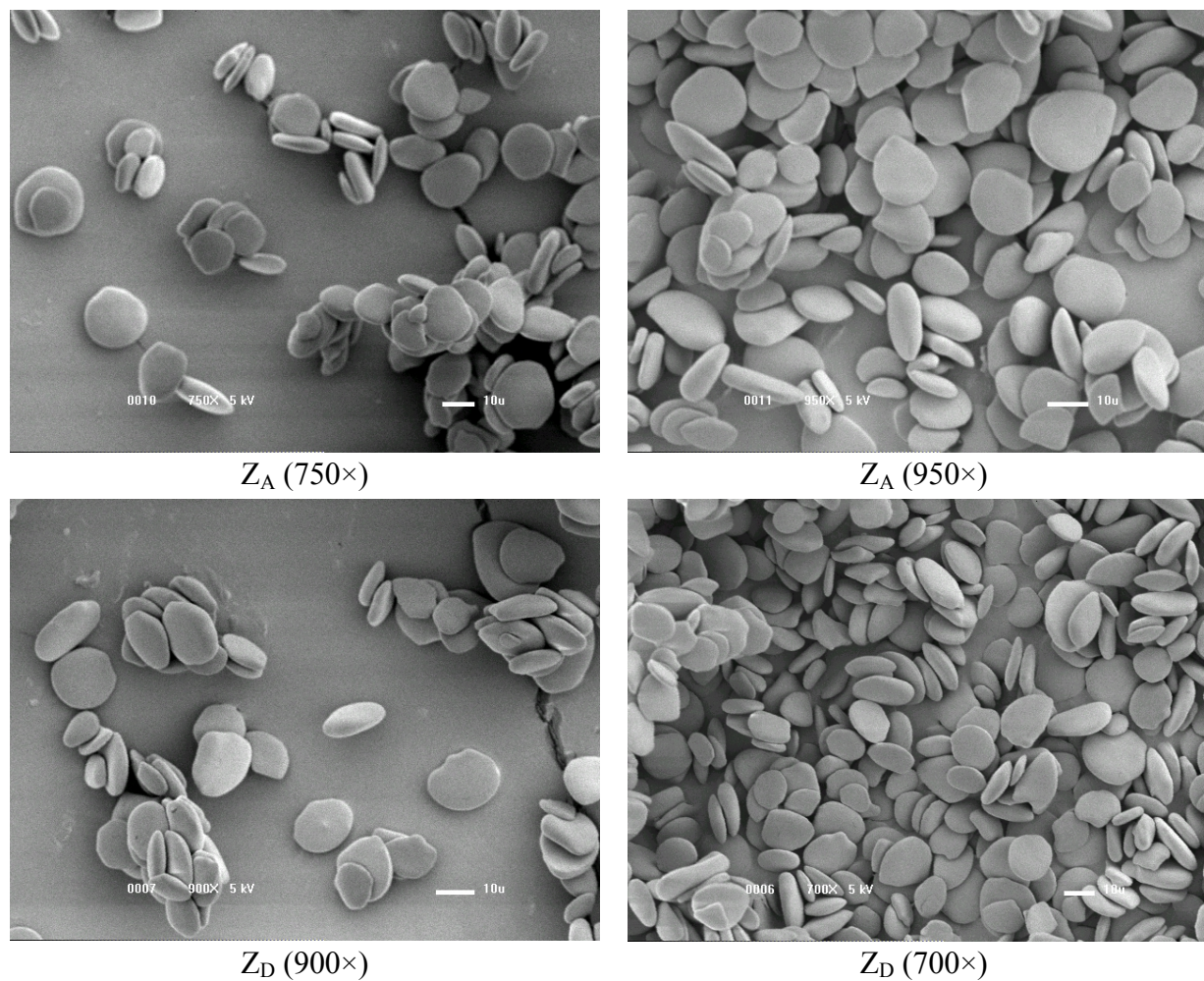


Figura 4.41 Amidos de *Zingiber officinale* antes (Z_A) e depois (Z_D) do processo SFE analisado por MEV, 5 kV.

4.3.3 Difração de Raio-X

A 42 mostra o padrão de raio-X para as amostras. O amido de gengibre foi identificado como tipo C, similar aos amidos de *Ginko biloba* e *Manihot esculenta* (Gunaratne e Hoover, 2002), e os amidos de cúrcuma como tipo B, como a batata comum, *Solanum tuberosum* (Hoover, 2001).

As amostras C_A e C_D apresentaram picos similares a 17, 22 e 24° a 2 θ sem diferença na intensidade, o que indica que o processo de SFE alterou minimamente a estrutura física da macromolécula de amido. A máxima intensidade foi 926 cps para C_D.

Os picos para o gengibre foram 15, 17 e 23° com a máxima intensidade a 1015 cps para Z_D, mas as intensidades entre as amostras mostraram diferenças que variaram de 200 a 240 cps, porém estas diferenças não podem ser atribuídas ao padrão de raio-X ou ao conteúdo de amilopectina. Provavelmente estas diferenças podem ser devidas à maneira pela qual as duplas hélices são arranjadas nas regiões cristalinas dos grânulos, indicando que o processo SFE causou um desarranjo nas duplas hélices dos grânulos.

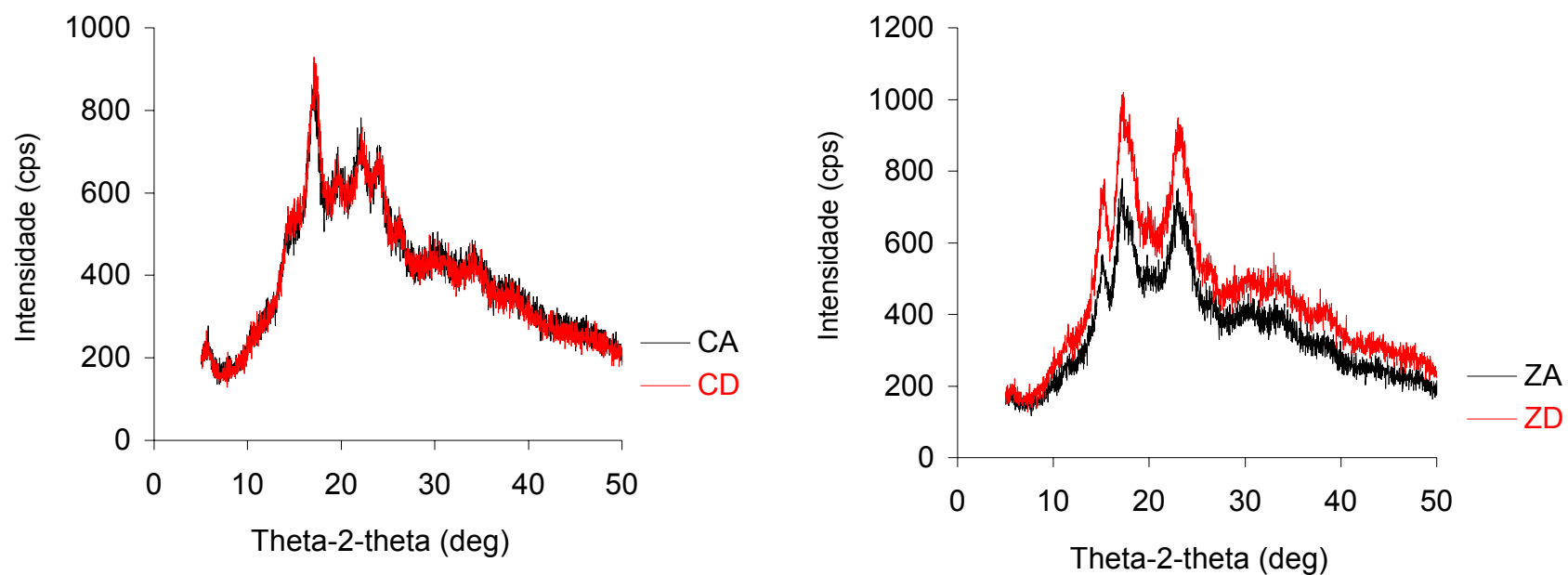


Figura 4.42 Difrátogramas de amidos de *Curcuma longa* L. e *Zingiber officinale* R. (antes do processo SFE: C_A e Z_A; depois do processo SFE: C_D and Z_D).

4.3.4 Calorimetria-DSC

A Figura 4.4343 mostra o comportamento de gelatinização para ambos os amidos de gengibre e cúrcuma. As diferenças nos valores de T_{pico} ($^{\circ}\text{C}$) (Tabela 4.14) entre as amostras C_A - C_D e Z_A - Z_D , não foram estatisticamente significantes (5%); isto também aconteceu para as diferenças entre as amostras de cúrcuma e gengibre. Os valores de T_{pico} ($^{\circ}\text{C}$) para o gengibre foram maiores que para a cúrcuma. O T_0 ($^{\circ}\text{C}$) das amostras de cúrcuma foram menores que os valores da literatura para *C. zedoaria* ($79,7^{\circ}\text{C}$), mas o T_{pico} e o T_{final} foram similares (Jyothi et al, 2003).

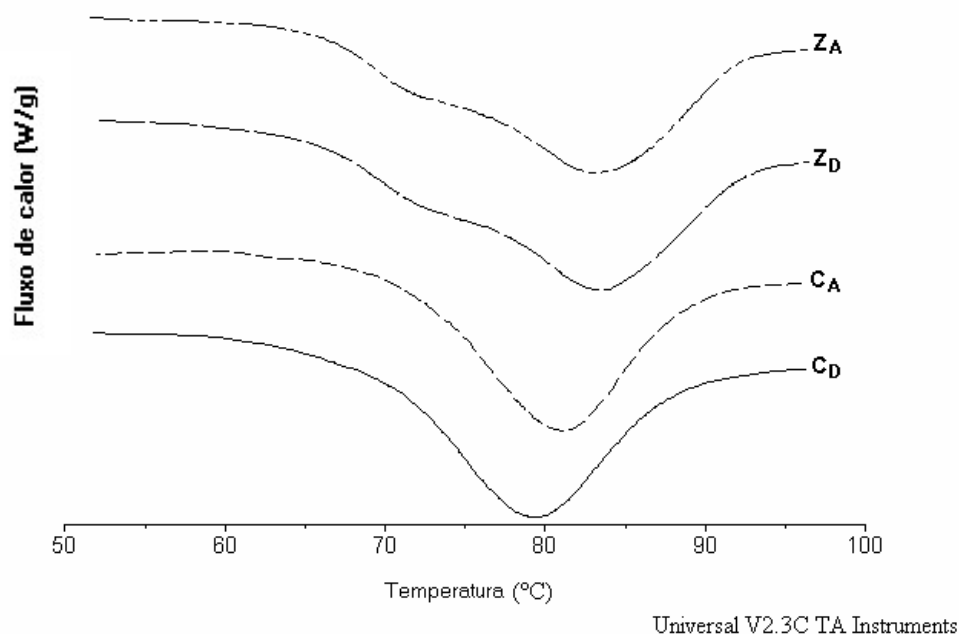


Figura 4.43 Curvas de gelatinização de amidos de *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. por DSC (antes do processo de SFE: C_A e Z_A ; depois do processo de SFE: C_D e Z_D).

As diferenças entre os dados de entalpia de gelatinização (Tabela 4.14) de todas as amostras não foram estatisticamente significantes (5%) pelo teste de Tukey.

Tabela 4.14 Entalpia de gelatinização dos amidos de *Curcuma longa* L. (C) e *Zingiber officinale* Roscoe (Z) (base seca) obtidos por DSC.

Amostras	T _o (°C)	T _{pico} (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o (°C)	ΔH _{gel} (J/g)
C _A	69.3 ± 0.1	79.2 ± 0.2	96 ± 1	27 ± 1	19 ± 1
C _D	70.8 ± 0.4	81.0 ± 0.2	97 ± 1	26 ± 1	18 ± 1
Z _A	69 ± 2	83.24 ± 0.05	99 ± 1	30 ± 3	20 ± 1
Z _D	66.3 ± 0.4	82.6 ± 0.5	96 ± 1	30 ± 1	19 ± 1

*os subíndices **A** e **D** significam antes e depois da SFE, respectivamente.

T_o: temperatura no tempo 0; T_{pico}: temperatura do pico; T_c: temperatura final; ΔH_{gel}: entalpia de gelatinização

Todas as amostras mostraram maiores valores de T_{pico} (°C) e ΔH_{gel} (J/g) que os amido de batata publicado por Hoover e Vasanthan (1994) (T_{peak} = 58,8 °C e ΔH= 16,8 J/g), assim como para os amidos de mandioca (T_{pico} = 71,5 °C e ΔH= 12,3 J/g) (Gunaratne e Hoover, 2002). O valor de entalpia foi similar ao valor para *C. zedoaria* com a presença de curcumina (Jyothi et al, 2003). Aggarwal et al (2004) concluíram que as diferenças dos valores de entalpia para os amidos de ervilha podem ser atribuídos ao comprimento de cadeia da amilopectina; com cadeias longas que requerem muito maior temperatura para quebrá-las. Embora os valores do teor de amilopectina tenham mostrado diferença estatisticamente significativa para ambas as espécies, os valores de entalpia são similares indicando que, provavelmente ambas as espécies possuem amilopectina com comprimentos de cadeias similares.

4.3.5 Viscosidade

A Figura 4.44 e a Tabela 4.15 mostram as características viscográficas dos amidos isolados de cúrcuma e gengibre. A temperatura de gelatinização, o tempo necessário para atingir o pico de viscosidade e o pico de viscosidade para o amido de cúrcuma foram similares para a *C. zedoaria*, estudada por Jyothi et al (2003), mas a amostra C_D teve um decréscimo no valor do pico de viscosidade.

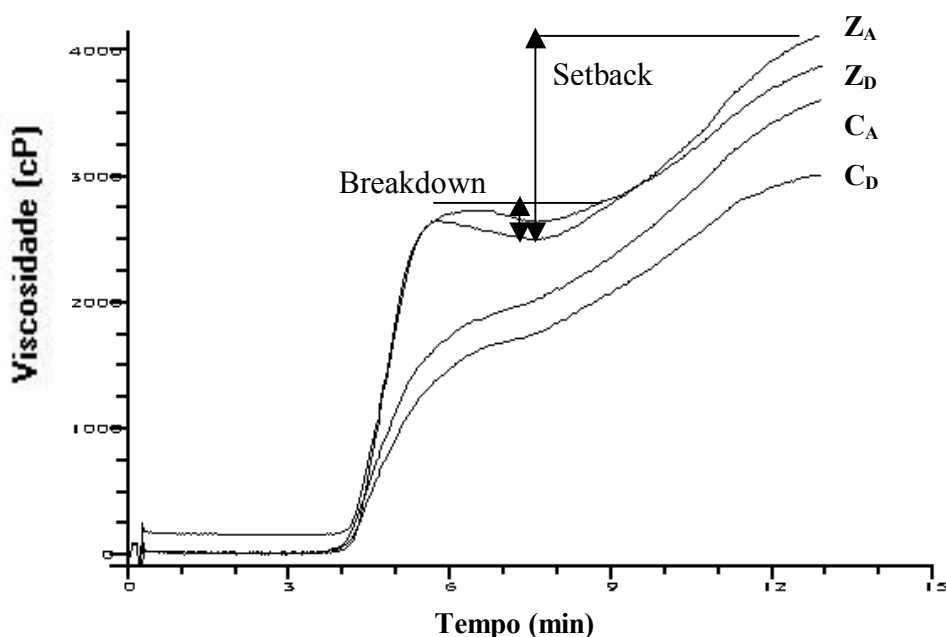


Figura 4.3.1 Curvas de viscosidade dos amidos de *Curcuma longa* L. e *Zingiber officinale* R. (antes do processo de SFE: C_A e Z_A; depois do processo de SFE: C_D e Z_D).

Houve uma diferença entre os valores de pico de viscosidade entre as amostras C_A e C_D, como mostra a Tabela 4.15. Poderia estar ocorrendo um “breakdown” na viscosidade, verificado nas curvas de gelatinização, sendo que a taxa de redução depende da temperatura e grau de mistura ou cortes aplicados à mistura, e a própria natureza do material. O baixo valor de “breakdown” pode indicar a presença de ligações cruzadas no

amido, o que pode resultar no aumento da resistência deste amido. Houve um decréscimo do valor do “breakdown” (cerca de 42 %) depois da SFE de 199 para 116 cP para a cúrcuma e os valores de “breakdown” para gengibre aumentaram (cerca de 16 %) de 148 para 172 cP, mostrando uma suave perda da sua resistência. Os valores de “setback”, que envolvem a retrogradação ou reorganização das moléculas de amido, foram reduzidos depois da SFE para ambos, cúrcuma e gengibre. O pico de viscosidade do amido de cúrcuma foi próximo ao valores do de amido de milho (~2100 cP) e menor que o do amido de ginko (Spence e Jane, 1999), e muito menor que o do amido de batata (~4680 cP) (Erlinger et al, 1997).

Tabela 4.15 Parâmetros de viscosidade dos amidos de *Curcuma longa* L. (C) e *Zingiber officinale* R. (Z).

Amostras	Temperatura de gelatinização (°C)	Tempo do pico (min)	Pico de Viscosidade (cP)	Breakdown (cP)	Viscosidade final (cP)	Setback (cP)
C _A	85	7	1951	199	3631	1879
C _D	86	7	1632	116	3045	1529
Z _A	86.6	5.9	2650	148	4175	1673
Z _D	86.5	6.0	2769	172	4060	1463

* os subíndices A e D significam antes e depois da SFE, respectivamente.

4.3.6 Inchamento dos grânulos, teor de amilose/amilopectina e turbidez

Os valores do fator de inchamento de grânulos são mostrados na Tabela 4.16. Os dados não mostram diferença depois do processo SFE para ambas as espécies, entretanto o fator de inchamento para o amido de gengibre alcançou valor maior que para o de cúrcuma, este comportamento provavelmente é devido ao fato do gengibre possuir um padrão tipo C (como mostrado no raio-X, 42), o qual possui alto conteúdo de água.

A Tabela 4.16 mostra os conteúdos de amilose e amilopectina. A diferença entre os amidos de gengibre e cúrcuma foi estatisticamente significativa (5%), mas o processo SFE não alterou o conteúdo de amilopectina para ambas as espécies. O amido de gengibre apresentou alto teor de amilopectina e assim, alta cristalinidade. O conteúdo de amilose para *Curcuma longa* foi maior do que os valores para outras espécies de cúrcuma encontradas na literatura, como a *Curcuma malabarica* e a *Curcuma zedoaria* que possuem 25 e 28% de amilose, respectivamente (Jyothi et al, 2003). O conteúdo de amilose de amido de batata varia de 23-31% para genótipos de batata comum (Kim et al, 1995).

Tabela 4.16 Fator de inchamento, teores de amilose e amilopectina de amidos de *Curcuma longa* L. (C) e *Zingiber officinale* R. (Z).

Amostras	Amilose (%)	Amilopectina (%)	Factor de inchamento	Turbidez (ABS)
C _A	48 ± 3	52 ± 3	2.3 ± 0.2	2.93 ± 0.03
C _D	48 ± 3	52 ± 3	2.11 ± 0.04	2.43 ± 0.01
Z _A	34 ± 2	66 ± 2	4.45 ± 0.04	2.20 ± 0.02
Z _D	34 ± 1	66 ± 1	4.41 ± 0.02	2.25 ± 0.04

* os subíndices **A** e **D** significam antes e depois da SFE, respectivamente.

Os valores de turbidez para amidos de cúrcuma (Tabela 4.16) diferem significativamente, mas o processo de SFE não alterou a turbidez do amido. A turbidez do amido de cúrcuma foi maior que a da *C. zedoaria* e *C. malabarica*, apresentando valores aproximadamente similares aos de ervilha reportados por Aggarwal et al (2004).

Robyt et al (1996) estudaram a modificação ácida do amido em álcoois (metanol, etanol, 2-propanol, butanol) e observaram um decréscimo no grau de polimerização na dextrina limite com o aumento do teor de álcool. Os autores propõem que estes alcóois ou a combinação destes expõe ou torna disponível diferentes tipos de ligações no amido para a

hidrólise ácida, envolvendo a conversão das regiões cristalinas do grânulo em regiões amorfas. Estas ligações suscetíveis ao ácido são dependentes do tipo de álcool e suas relativas proporções, a temperatura, o tipo de amido e sua concentração ácida. A modificação ácida do amido na presença de alcóois (etanol e 2-propanol) a 25 °C, mostrou a formação de séries de dextrinas limites formadas em 12 horas, com misturas de álcool de 0-100% (v/v), 0,36% (w/v) HCl e razão de amido/álcool de 1:4, resultando em 245-235 graus de polimerização para o amido de batata. O grau de polimerização das dextrinas limite decresceu com o aumento do teor de álcool e concentração ácida dentro do grânulo, consequência da ação do álcool nas micelas cristalinas e nas duplas hélices, causando rompimento destas estruturas, tornando fácil a penetração do ácido no grânulo (Robyt et al, 1996).

A porcentagem de co-solvente utilizada no processo de SFE foi baixa (gingibre:etanol 5:1 (m/m) cúrcuma:etanol 1:1(m/m)) e o tempo do processo reduzido (200 minutos para gengibre e 375 minutos para a cúrcuma). Nesta situação, a ação do co-solvente (etanol) pode ter contribuído para uma suave modificação ocorrida nos grânulos de amido de cúrcuma e gengibre.

4.3.7 Conclusões Parciais

A pressão aplicada no processo SFE não alterou morfológicamente os grânulos, observados por SEM, embora a estrutura do amido tenha sido fisicamente alterada como demonstrado pelo raio-X e a variação dos picos de intensidade. Um leve rearranjo foi observado nas moléculas de amido, que pôde ser verificado pelo valor de “setback” na análise de viscosidade, porém pode-se considerar que os amidos de cúrcuma e gengibre não

sofreram fortes modificações sob pressões de 250 e 300 bar, aumentando suavemente a resistência dos grânulos de amido do gengibre.

A porcentagem de co-solvente utilizada no processo SFE foi baixa, porém poderia ter contribuído para suaves modificações físico-químicas nos grânulos de amido.

A presença da coloração amarela no amido de cúrcuma poderia indicar sua utilização como um amido especial na indústria de alimento.

5. Conclusões

Curcuma longa L.

Não foi possível observar as estruturas secretoras no rizoma de cúrcuma com uso da MEV, provavelmente pela anatomia e localização destas, internas ao rizoma, dificultando sua visualização após a cominuição do material vegetal, diferindo das estruturas da falsa melissa, que são superficiais.

A extração acelerada com solvente (ASE) foi eficiente na obtenção de maiores teores de curcuminóides quando utilizado 50% (v) de co-solvente etanol/isopropanol (1:1).

A extração fracionada constitui um método eficiente de separação das frações do extrato, utilizando a variação dos solventes durante o processo de extração.

Os modelos de Goto (1993) e Sovová (1994) foram os que melhor representaram as curvas cinéticas, para os ensaios com variação da altura, e o modelo de Goto para os ensaios de extração acelerada com solvente.

Lippia alba M.

A predição dos dados de solubilidade de substâncias de interesse em CO₂ pela Equação de Estado de Peng-Robinson é possível, para sistemas onde os compostos de interesse são majoritários no extrato, como no caso da carvona e do limoneno.

As melhores variáveis do processo SFE para a extração de carvona foi 80 bar/50 °C e para o limoneno 120 bar/50 °C.

Aproximadamente 50 % do rendimento global do extrato foi obtido durante o período CER.

Os resultados mostraram que a SFE não afetou significativamente as estruturas secretoras como no processo de cominuição.

Todos os processos estudados (hidrodestilação e baixos pressão) para a obtenção de extrato de *Lippia alba*, mostraram extrair compostos diferentes e co-extração nos extratos etanólicos.

Amidos de cúrcuma e gengibre

A pressão aplicada no processo SFE não alterou morfologicamente os grânulos, observadas por SEM, embora a estrutura do amido tenha sido fisicamente alterada como demonstrado pelo raio-X e a variação dos picos de intensidade. Os grânulos apresentaram um leve rearranjo e um aumento suave na resistência dos grânulos de amido e gengibre. A porcentagem de co-solvente utilizada no processo SFE foi baixa, porém poderia ter contribuído para suaves modificações químico-físicas nos grânulos de amido. A presença da coloração amarela do amido de cúrcuma poderia indicar sua utilização como um amido especial na indústria de alimento.

6. Referências bibliográficas

- Adams, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois-EUA. 2001, p. 456.
- Agência Rural. Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário. <http://www.agenciarrural.go.gov.br>, 26 jan. 2005.
- Aggarwal, V.; Singh, N.; Kamboj, S.S.; Brar, P. S. Some properties of seeds starches separated from different Indian pea cultivars. **Food Chemistry**. 85, 585-590, 2004.
- Allievi, L.; Gualandris, R. Ricerca sull'attività antimicrobica dell'estratto di curcuma (Turmeric). **Industrie Alimentari**. 23, 867-870, 1984.
- American Association of Cereal Chemists**. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 9ªed. 1995. St. Paul, Minnesota. Compiled by the Approved Methods Committee. v. 1-2.
- Anderson, R.A.; Conway, H.F.; Pfeifer, V.; Fand Griffin, E.L. Jr. Gelatinization of corn grifts by roll and extrusion cooking. **Cereal Science Today**. 14,11-12, 1969.
- Araújo, C.A.C.; Leon, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96, 723-728, 2001.
- Araújo, M.E.; Foster, C.H.Q.; Meireles, M.A.A. **EDEFIash**, Programa para Cálculo de Equilíbrio de Fases e Ajuste de Parâmetros de Interação para Equações de Estado Cúbicas, para Windons 95 (doc. SRP-001) 1996.
- Ashraf, M. Z.; Khan, M. S. Y.; Hameed, H. A.; Hussain, M. E.; Fahim, M. Endothelium modulated vasorelaxant response of a polypharmaceutical herbal drug (lipotab) and its individual constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. 66, 97-102, 1999.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed.; 3rd rev.; Cuniff, P., Ed.; AOAC International: Arlington, VA, 1995a; Vol. 1.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed.; 3rd rev.; Cuniff, P., Ed.; AOAC International: Arlington, VA, 1995b; Vol. 2.
- Badalyan, A. G.; Wilkinson, G. T.; Chun, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. **Journal of Supercritical Fluids**. 13, 319-324, 1998.
- Ballero, M.; Poli, F.; Santus, M. Plants used in folk medicine of Monteleone (Northern Sardinia). **Fitoterapia**, 69, 52-57, 1998.
- Baysal, T.; Starmans, D.A.J. Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed. **Journal of Supercritical Fluid**. 14, 225-234 1999.

- Began G.; Goto, M.; Kodama, A ; Hirose, T. Response Surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide. **Food Research International**. 33, 341-345, 2000.
- Berna, A.; Tárrega, A.; Blasco, M.; Subirats, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. **Journal of Supercritical Fluids**. 18, 227-237, 2000.
- Braga, M.E.M., LEAL, P.F., Carvalho, J.E., Meireles, M.A.A. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 6604- 6611, 2003.
- Braga, M.E.M.; Marques, M.O.M.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Influence of Nitrogen Fertilizer Application in the content of colorant (curcuminoids) of *Curcuma longa* L. rhizomes. In Proceedings of the *International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants*, III – ISMAP, July 5-8, 2004. Campinas, São Paulo.
- Brogie, H. CO₂ as a Solvente: its properties and applications. **Chemistry and Industry**. 12, 385-390, 1982.
- Brunner, G. **Gas Extraction**: Na Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Applications to Separation processes. 1^a ed. Darstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994, p. 387
- Cáceres, A.; Fletes, L.; Aguilar, L.; Ramirez, O.; Figueroa, L.; Taracena, A.M.; Sama Yoa, B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 38, 31-35, 1993.
- Calvo, C.; Salvador, A. Use of natural colorants in food gels. Influence of composition of gels on their colour and study of their stability during storage. **Food hydrocolloids**, 14, 439-443, 2000.
- Carvalho Jr., R. N.; Moura, L.S.; Rosa, P.T.V.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, *In Press*, 2005.
- Chan, M.M; Huang, H.; Fenton, M. R.; Fong, D. In Vivo Inhibition of Nitric Oxide Synthase Gene Expression by Curcumin, a Cancer Preventive Natural Product with Anti-Inflammatory Properties. **Biochemical Pharmacology**. 55, 1955-1962, 1998.
- Chang, C. J.; Chiu, K. L.; Chen, Y. L.; Yang, P. W. Effect of Ethanol Content on Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, 14, 75-82, 2001.
- Chang, C. J.; Chiu, K.; Chen. Y.; Chang, C. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**. Analytical, Nutrition and Clinical Methods Section. 68, 109-113, 2000.

- Chun, K; Sohn, Y.; Kim, H.; Kim, O; Park, K.; Lee, J.; Moon, A.; Lee, S.; Surth, Y. Antitumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. **Mutation Research**. 428, 49-57, 1999.
- Colonna, P.; Gallant, D.; Mercier, C. *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: studies of fractions obtained after dry and wet protein extraction processes. **Journal of Food Science**. 45, 1629-1636, 1980.
- Crank, J. The Mathematics of Diffusion, Clarendon Press, Oxford, 1975, 85p.
- Dandekar, D.V.; Gaikar, V.G. Microwave assisted extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. **Separation Science and Technology**. 37, 2669-2690, 2002.
- De Flora, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**. 402, 151-158, 1998.
- Di Stasi, L.C.; Hiruma, C.A.; Guimarães, E.M.; Santos, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**. 65, 529-534, 1994.
- Ehlert, P. A. D. Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo limoneno-carvona. Botucatu, 2003. 108 p. **Tese** (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.
- Erlingen, R. C.; Jacobs, H.; Block, K.; Delcour, J.A. Effects of hydrothermal treatments on the rheological properties of potato starch. **Carbohydrate Research**. 297, 347-356, 1997.
- Esquível, M.M.; Bernardo-Gil, M.G. & King, M.B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil, **The Journal of Supercritical Fluids**. 16, 43-58, 1999.
- Eumme, J.T.; Gibbs, B.S.; Zahn, T.J.; Sebolt-Leopold, J.S.; Gibbs, R.A. Novel Limonene Phosphonate and Farnesyl Diphosphate Analogues: Design, Synthesis, and Evaluation as Potential Protein-Farnesyl Transferase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 7, 241-250, 1999.
- Fahn, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic. 1979, 302p.
- Ferreira, L.A.F.; Henriques, O.B.; Andreoni, A.A.S.; Vital, G.F.R.; Campos, M.M.C.; Habermehl, G.G.; Moraes, V.L.G. Antivenom and Biological Effects of Ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**. 30, 1211-1218, (1992).
- Ferri, M. G. **Botânica: Morfologia Interna das plantas**. Ed Melhoramentos. São Paulo. 1974, 113p.
- Fillipi, R. P. CO₂ as a Solvente: Application to Fats, Oils and Other Materials. **Chemistry and Industry**. 12, 390-394, 1982.
- Food and Agriculture Organization of The United States, 2001 <http://www.fao.org>
- França, L.F.; Reber, G.; Meireles, M.A.M.; Machado, N.T.; Brunner, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**. 14, 247-256, 1999.
- Francisco, J. C.; Sivik, B. Gelatinization of cassava, potato and wheat starches in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluid**. 22, 247-254, 2002.

- Freund, R. J.; Littell, R. C. **SAS System for Regressions SAS Series in Statistical Applications**, 2nd ed.; SAS Institute Inc.: Cary, NC, 1995; 211p.
- Gamse, T.; Marr, R. High-pressure equilibria of the binary systems carvone-carbon dioxide and limonene-carbon dioxide at 30, 40 and 50°C. **Fluid Phase Equilibria**. 171, 165-174, 2000.
- Gaspar, F.; Santos, R.; King, M. B. Disruption of glandular trichomes with compressed CO₂: alternative matrix pre-treatment for CO₂ extraction of essential oils. **Journal of Supercritical Fluids**. 21, 11-22, 2001.
- Goldberg, I. **Functional Foods: designer foods, pharmafoods, and nutraceuticals**. Chapman & Hall, New York, 1994, 571p.
- Gomes, D.C.; Alegrio, L.V.; De lima, M.E.; Leon, L.L.; Araújo, C.A. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. **Arzneimittelforschung**. 52, 120-124, 2002.
- Goto, M.; Sato, M. Hirose, T. Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**. 26, 401-407, 1993.
- Gottlieb, O. R.; Salatino, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, 39, 707-716, 1987.
- Govindarajan, V. S. Ginger-Chemistry, technology, and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 17, 13, 1982.
- Govindarajan, V. S. Turmeric-Chemistry, technology, and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 12, 199-301, 1980.
- Gravano, E.; Tani, C.; Bennici, A.; Gucci, R. The Ultrastructure of Glandular Trichomes of *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) Leaves. **Annals of Botany**. 81, 327-335, 1998.
- Gunaratne, A.; Hoover, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydrate Polymers**. 2002, 49, 425-437.
- Gupta, A.P.; Gupta, M.M.; Kumar, S. Simultaneous Deterination of Curcuminoids in Curcuma Samples Using High Performance Thin Layer Chromatography. **Journal Liq. Chrom. & Rel. Technol**. 22, 1561-1569, 1999.
- Harborne, J.B. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic. 1997, 554 p.
- Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. The Flavonoides. Eds. Harborne, J.B.; Mabry, T.J., Mabry, H. New York, Academic Press, 1975, 1204 p.
- He, X. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, 880, 203-232, 2000.
- He, X.; Lin, L.; Lian, L.; Lindenmaier, M. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). **Journal of Chromatography A**, 818, 127-132, 1998.

- Heinrich, M.; Rimpler, H.; Barrera, N.A. Indigenous phytoterapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixed community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**. 36, 63-80, 1992.
- Helander I.M.; Alakomi, H.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; L.G.M. Gorris; A. Wright, Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 3590-3595, 1998.
- Hizukuri, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. **Carbohydrate Research**, 141, 295-306, 2004.
- Hoover R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**. 45, 253-267, 2001.
- Hoover, R.; Vasanthan, T. The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. **Journal of Food Biochemistry**, 1994, 17, 303-325.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Banco de Dados Agregados. Tabela 523- Quantidade produzida por produtos da horticultura e grupo de atividade econômica. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/>, 26 jan. 2005.
- Jacobs, M. B., **The chemical analysis of foods and products**, in: Robert Krieger Eds. Publishing Co., New York, 1981, 21p.
- Jyothi, A.N.; Moorthy, S.N.; Vimala, B. Physicochemical and functional properties of starch from two species of *Curcuma*. **International Journal of Food Properties**. 6, 135-145, 2003.
- Karpinska, M.; Borowski, J.; Danowska-Oziewicz, M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve- food. **Food Chemistry**, 72, 5-9, 2001.
- Khalloukia, F.; Hmamouchia, U.M.; Younosb, C.; Soulimanib, R.; Bessierec, J.M.; Essassi, E.M. Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Chrysanthemu iscidehirtum*. **Fitoterapia**, 71, 544-546, 2000.
- Kim, D.S.H.L.; Park, S.; Kim, J. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) aht protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from bA(1-42) insult. **Neuroscience Letters**, 303, 57-61, 2001.
- Kim, K.H.; Hong, J. Equilibrium solubilities of spearmint oil components in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**. v.164, 107-113, 1999.
- Kim, S.Y.; Wiesenborn, D.P.; Orr, P.H.; Grant, L.A. Screening potato starch for novel properties using differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* **1995**, 60, 1060-1065.
- Kitts D.D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 72, 4, 423-34, 1994.
- Kreisselmeier, A.; Dürbeck, H. W. Determination of alkylphenols, alkylphenolethoxylates and linear alkylbenzenesulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**. 775, 187-196, 1997.

- Kretovich, V. L. **Principles of Plant Biochemistry**. Moscow. Pergamon press Ltda. 1964. 454p.
- Krishnamurthy, N.; Mathew, A.G.; Nambudiri. E.S.; Shivashankar, S.; Lewis, Y.S.; Natarajan, C.P. Oil and oleoresin of turmeric. **Tropical Science**. 18, 37-45, 1976.
- Kwak, N.; Jukes, D. J. Functional foods. Oart 2: the impact on current regulatory terminology. **Food Control**. 12, 109-117, 2001.
- Lauro, G. J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**. 36, 949-953, 1991.
- Leal, P.F.; Braga, M.E.M.; Sato, D.N.; Carvalho, J.E.; Marques, M.O.M.; Meireles, M.A.A. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2520-2525, 2003.
- Lemos, T.L.G.; Monte, F.J.Q.; Matos, F.J.A.; Alencar, J.W.; Craveiro, A.; Barbosa, R.C.S.B.; Lima, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**. v. 63, 266-271, 1992.
- Li, K.; Landriault, M.; Fingas, M.; Llompart, M. Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor. **Journal of Hazardous Materials**, 102, 93-104, 2003.
- Madsen, M. H.; Christensen, D.H. Changes in Viscosity Properties of Potato Starch During Growth. **Starch/Stärke**. 48, 245-249, 1996.
- Marrone, C.; Polleto, M.; Reverchon, E.; Stassi, A. Almond Oil Extraction by Supercritical CO₂: experiments and modeling. **Chemical Engineering Science**. 53, 3711-3718, 1998.
- Martinez, J.; Monteiro, A. R.; Rosa, P. T. V.; Marques, M. O. M.; Meireles, M. A. A. Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Ind. Eng. Chem. Res**. 42, 1057-1063, 2003.
- Mascarenhas, J.M.O.; Strigheta, P.C.; Lara, J.E.; Reis, F. P. O Perfil das Indústrias Produtoras de Corantes. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. 3, 1-8, 1999.
- McCarthy, T.L.; Kerry, J.P.; Kerry, J.F.; Lynch, P.B.; Buckley, D.J. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. **Meat Science**, 57, 45-52, 2001.
- Meireles, M.A.A.; Nikolov Z.L. Extraction and fractionation of essential oil with liquid carbon dioxide, In: **Spices, Herbs and Edible Fungi**. G. Charalambous Ed, 1994, 171p.
- Méndez, A. L. C.; Machado, N. T.; Araújo, M. E.; Maia, J. G. S.; Meireles, M. A. A. Supercritical CO₂ Extraction of Curcumin and Essential Oil from the Rhizomes of Turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial & Engineering Chemical Research**. 39, 4729-4733, 2000.
- Moreschi, S.R.M.; Petenate, A.J.; Meireles, M.A.A. Hydrolysis of ginger bagasse starch in subcritical water and carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, 1753-1758, 2004.

- Moss, G.E. The Microscopy of starch. *In: Examination and analysis of starch and starch products*. Ed. RADLEY, J.A. Applied Science Publishers LTD. London, 1976, 220p.
- Moura, L.S.; Carvalho Jr., R.N.; Stefanini, M.B.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, *In Press*, 2005.
- Moura, L.S.; Carvalho Júnior, R.N.; Leal, M.C.F.; Meireles, M.A.A., In: IV Encontro Brasileiro sobre Fluidos Supercríticos - IV EBFS 2001, 2001, Salvador, BA. **Livro de Resumos**, 109, 2001.
- Mukundan, M. A.; Chacko, M. C. Annapurna, V. V.; Krinsnaswamy, K. Effect of turmeric and Curcumin on BP-DNA adducts. **Carcinogenesis**, 14, 493-496, 1993.
- Mustafá, T.; Srivastava. K.C. Ginger (*Zingiber officinale*) in migraine headache. **Journal of Ethnopharmacology**. 29, 267-273, 1990.
- Naik, S.N.; Lentz, H. Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapour equilibrium conditions. **Fluid Phase Equilibria**. 49,115-126 ,1989.
- Olajide, O. A. Investigation of the effects of selected medicinal plants on experimental thrombosis. **Phytotherapy Research**. 13, 2-6, 1999.
- Oosterhaven, K.; Poolman, B.; Smid, E.J. S-carvone as a Natural Potato Sprout Inhibiting, Fungistatic and Bacteristatic Compound. **Ind. Crop. Prod.** 4, 23-27, 1995.
- Paliyath, G. Natural colorants for food and nutraceutical use. **Trends in Food Science & Technology**, 14, 438, 2003.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, 76, 201, 2001a.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, M.E.; Villar, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae). **II Pharmaco**. 56, 501, 2001b.
- Pasquel, A.; Meireles, M.A.A.; Marques, M.O.M.; Petenate, A.J. Extraction of stevia glycosides with CO₂+water, CO₂+ethanol, and CO₂+water+ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 17, 271–282, 2000.
- Pellerin, P. Extraction of natural raw materials for the flavor industry. **Perfumer & Flavorist**. v. 56, 37-41, 1991.
- Perera, C.; Hoover, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**. 64, 361-375, 1999.
- Perez, E.; Bahnassey, Y.A.; Breene, W.M. A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. **Starch/Stärke**. 45, 211-214, 1993.
- Popp, P.; Keil, P.; Möder, M.; Paschke, A.; Thuss, U. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins

- and dibenzofurans in solid wastes. **Journal of Chromatography A**, 774, 203-211, 1997.
- Portillo-Prieto, R. Extração do óleo essencial de khoa (Satureja boliviana Benth Briq) por diferentes processos: destilação por arraste a vapor, solventes orgânicos e dióxido de carbono pressurizado. Campinas – FEA/Unicamp. Tese (**Doutorado**) 192 p. 1999.
- Povh, N. P.; Marques, M.O.M.; Meireles, M.A.A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **Journal of Supercritical Fluids**. 21, 245–256, 2001.
- Raeissi, S.; Peters, C.J. On the phenomenon of double retrograde vaporization: multi-dew point behavior in the binary system ethane + limonene. **Fluid Phase Equilibria**. 191, 33-40, 2001.
- Ramirez-Bosca, A; Soler, A; Carrion; M.A.; Díaz-Alperi, J.; Bernd, A.; Quintanilla, C.; Almagro, E.Q.; Miquel, J. An hydroalcoholic extract of *Curcuma longa* lowers the apo B: apo A ratio Implications for atherogenesis prevention. **Mechanisms of Ageing and Development**. 119, 41–47, 2000.
- Reis-Vasco, E.M.C.; Coelho, J. A. P.; Palavra, A. M.F.; Marrone, C.; Reverchon, E. Mathematical modeling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction. **Chemical Engineering Science**. 55, 2917-2922, 2000.
- Reverchon, E. Supercritical Fluid Extraction of essential oils and related materials. **Journal of Supercritical Fluids**. 10, 1-37, 1997.
- Reverchon, E. Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: experiments and mathematical modelling. **Industrial & Engineering Chemistry Research** 38, 3069-3075, 1999.
- Reverchon, E.; Marrone, C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modelling. **Chemical Engineering Science**, 52, 3421-3428, 1997.
- Robyt, J.F.; Cho Robyt, J.F.; Choe, J.; Fox, J.D.; Hahn, R.S.; Fuchs, E. B. Acid modification of starch granules in alcohols: reactions in mixtures if two alcohols combined in different ratios. **Carbohydrate Research**. 283, 141-150, 1996.
- Rodrigues, V. M.; Sousa, E.M.B.D.; Monteiro, A.R.; Chiavone-Filho, O.; Marques, M.O.M.; Meireles, M. A. A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent, **Journal of Supercritical Fluids**. 22, 21, 2002.
- Rodrigues, V.M.; Rosa, P.T. V.; Marques, M.O. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A.A. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 1518-1523, 2003.
- Ronyai, E.; Simandi, B.; Tomoskozi, S.; Deak, A.; Vigh, L.; Weinbrenner, Zs. Supercritical fluid extraction of corn germ with carbon dioxide-ethyl alcohol mixture. **Journal of Supercritical Fluids**. 14, 75-81, 1998.
- Ropa, D. **A Brief Overview of the World Market for Oleoresins**. Disponível na Internet: <http://members.tripod.com/roparesearch/oleores>. 07 jan. 2000.

- Saito, M. L.; Scramin, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 48p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 20).
- Saleheen, D.; Ali, S.A.; Ashfaq, K; Siddiqui, A.A.; Agha, A.; Yasinzai, M.M. Latent activity of curcumin against Leishmaniasis *in vitro*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 25, 286-389, 2002.
- Sandler, I.S. **Chemical and Engineering Thermodynamics**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 622 p.
- Schäfer, K. Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. **Analytica Chimica Acta**, 69-77, 1998.
- Schopfer, M. **Plant Physiology**. Springer. Printed in Germany. 1995. 629p.
- Scion Corporation, Scion Image software- version Beta 4.0.2, www.scioncorp.com, 2005.
- Singh, G.; Singh, O. P.; Maurya, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian curcuma species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**. 75-81, 2002.
- Singh, N.; Singh, J.; Kaur, L.; Sodhi, N.S.; Gill, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**. 81, 219-231, 2003.
- Smid, E.J.; Witte, Y.; Gorris, L.G.M., Secondary plant metabolites as control agents of postharvest Penicizzium rot on tulip bulbs. **Postharvest Biology and Technology**, 303-306, 1995.
- Souza, T.; Corazza, M. L.; Cardozo-Filho, L.; Guirardello, R.; Meireles, M. A.A. Phase Equilibrium Measurements for the System Clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂. **J. Chemical Engineering Data**, 49, 352-358, 2004.
- Sovová, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-modeling of extraction curves, **Chemical Engineering Science**, 49, 409-414, 1994.
- Sowbhagya, C.M.; Bhaattacharya, K.R. A simplified method for determination of amylose content in rice. **Starch/Stärke**. 23, 5-56. 1999.
- Spence K.E.; Jane, J. Chemical and physical properties of ginkgo (*Ginkgo biloba*) starch. **Carbohydrate Polymers**. 40, 261-269, 1999.
- Stashenko, E.E; Jaramillo, B.E.; Martínez, J.R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, 1025, 93, 2004.
- Staub, C. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. **Forensic Science International**. 84, 295-304, 1997.
- Sugiyama, Y.; Kawakishi, S.; Osawa, T. Involvement of the b-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. **Biochemical Pharmacology**. 52, 519-525, 1996.
- Surh, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutation Research**, 428, 305–327, 1999.

- Taylor, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**. John Wiley & Sons Inc., Canada, 1996, 181p.
- Terblanché, F.C.; Kornelius, G.; Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)- A literature review. **Journal of Essential Oil Research**. 8, 471, 1996.
- Trevisan, M.T.S.; Macedo, F.V.V. Seleção de Plantas com Atividade Anticolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**. 26, 301-304, 2003.
- Vale, T.G.; Matos, F.J.A.; De Lima, T.C.M.; Viana, G.S.B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**. 176, 127, 1999.
- Vasanthan, T.; Bergthaller, W.; Driedger, D.; Yeung, J. Sporns, P. Starch from Alberta potatoes: wet: isolation and some physicochemical properties. **Food Research International**. 32, 355-365, 1999.
- Wagner H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. Plant Drug Analysis. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 1983. p. 320.
- Wang, H.; Chen, C.; Chang, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. **Food Chemistry**. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section.72, 505-509, 2001.
- Whistler, R.L.; BeMiller, J. N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota, USA: Eagan, 1999, 241p.
- Wissgott, U.; Bortlik, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Foods Science & Technology**, 7, 289-302, 1996.
- Yoda, S.K.; Marques, M.O.M.; Petenate, A.J.; Meireles, M.A.A. Supercritical Fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂+water: extraction kinetics and identification of extracted components. **Journal of Food Engineering**. 57, 125 –134, 2003.
- Zamora-Martinez, M.C.; Nieto De Pascual, C. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**. 35, 229-257, 1992.
- Zancan, K. C.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and cosolvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**. 24, 57-76, 2002.
- Zétola, M.; De Lima, T.C.M.; Sonaglio, D.; González-Ortega, ; Limberger, R.P.; Petrovick, P.R.; Bassani, V.L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**. 82, 207- 215, 2002.

7. Produção Científica

7.1 Produção com autoria principal

7.1.1 Artigos publicados em revistas científicas

- a) Braga, M.E.M.; Leal, P. F.; Carvalho, J.E.; Meireles, M.A.A. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6604-6611, 2003 (Fator de Impacto 2,102, 2003).
- b) Braga, M.E.M, Ehlert, P.A.D.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Supercritical Fluids*. 34, 149-156, 2005 (Fator de Impacto 2,275, 2004).

7.1.2 Trabalhos publicados em anais de eventos: completos

- a) Braga, M. E. M., Ehlert, P.A.M., Marques, M. O. M., Ming, L. C., Meireles, M. A. A. Determination of the global yield for the system *Lippia alba* + CO₂ and modeling of the phase equilibrium of the major constituents: limonene and carvone. Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids, Versailles, França – 01, 315 – 320, 2003.
- b) Braga, M.E.M; Meireles, M.A.A. Determination of the Global Yield for SFE Turmeric (*Curcuma longa* L.): an Evaluation of the Effect of the Bed Height and of

the Cosolvent Ratio. In Proceedings do *Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos, V- V EBFS*, 2004. Florianópolis, Santa Catarina. CD–Rom.

- c) Braga, M.E.M.; Ehlert, P.A.D.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Comparison of the Global Yield for the System *Lippia alba* + CO₂ of Extracts obtained by SFE, Soxhlet and Low Pressure Solvent Extraction. In Proceedings do *Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos, V- V EBFS*, 2004. Florianópolis, Santa Catarina. CD–Rom.

7.1.3 Trabalhos publicados em anais de eventos: resumos expandidos

- a) Braga, M.E.M., Peruchi, M.P., Queiroga, C.L., Montanari Junior, I., Meireles, M.A.A. Comparison of Yield of *Achyrocline satureioides* Flowers Extracts Obtained by Different Techniques. *International Symposium on Supercritical Fluids*. 1-4 de maio, 2005, Orlando, Flórida, EUA.

7.1.4 Trabalhos publicados em anais de eventos: resumos

- a) Braga, M.E.M., Meireles, M.A.A. Modeling of Supercritical Overall Extraction Curves for Turmeric (*Curcuma Longa* L.). 11th *International Symposium & Exhibition Supercritical Fluid Chromatography, Extraction, & Processing*, 1-4 de agosto, 2004, Pittsburgh, Pennsylvania, EUA.
- b) Braga, M.E.M.; Marques, M.O.M.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Influence of Nitrogen Fertilizer Application in the content of colorant (curcuminoids) of *Curcuma longa* L. rhizomes. In Proceedings of the *International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants*, III – ISMAP, 5-8 de Julho, 2004. Campinas, São Paulo.

- c) Braga, M.E.M.; Ehlert, P.A.D.; Ming, L.C.; Meireles, M.A.A. Obtenção do óleo essencial e oleoresina a partir de folhas de *Lippia alba*, por diferentes métodos de extração, e observação de suas estruturas secretoras por MEV. In *Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais*, II. 3-5 de novembro, 2003, Campinas, São Paulo, Anais.

7.2 Produção em co-autoria

7.2.1 Artigos publicados em revistas científicas

- a) Moreschi, S. R. M.; Leal, J. C., Braga, M.E.M.; Meireles, M.A.A. Ginger and turmeric starches hydrolysis using subcritical water + CO₂: the effect of the SFE pre-treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **Aceito**, 2005.

7.2.2 Trabalhos publicados em anais de eventos: resumo expandido

- a) Sato, D.N.; Pereira, F.M.; Leite, C.Q.J.; Braga, M.E.B. M.; Meireles, M.A.A. Antimycobacterial activity of extracts of *Curcuma longa* obtained via supercritical fluid extraction. 11th *International Symposium & Exhibition Supercritical Fluid Chromatography, Extraction, & Processing*, 1-4 de agosto, 2004. Pittsburgh, Pennsylvania, EUA.

7.2.3 Trabalhos publicados em anais de eventos: resumos

- a) Pereira, F.M.; Sato, D.N.; Braga, M.E.M.; Meireles, M.A.A.; Leite, C.Q.F. Avaliação in vitro da Atividade Antimicobacteriana de Extratos de *Curcuma longa* L. In *Jornada Farmacêutica*, VI. 2003. Ribeirão Preto, São Paulo, Anais;

- b) Sato, D.N; Pereira, F.M.; Leite, C.Q.J.; Braga, M.E.B. M.; Meireles, M.A.A. Antimycobacterial activity of extracts of *Curcuma longa* obtained via supercritical fluid extraction. In Proceedings of the *International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants*, III – ISMAP, 5-8 de Julho de 2004. Campinas, São Paulo.

Orientações:

Co-orientação em trabalho de Iniciação Científica da aluna Melina P. Peruchi intitulado: Obtenção de extratos de flores de *Achyrocline satureioides* por hidrodestilação, Soxhlet, baixa pressão e extração supercrítica. Iniciado em agosto de 2004, bolsista PIBIC-CNPq – processo nº 105034/2004-5.

8. Anexos

ANEXO I – Relatório de ajustes das OECs obtidos pelo software SAS.

Ensaio SFE- *Curcuma longa* L. - $H_B/D_B = 1.8$; 300bar/30°C; CO₂+EtOH/IsoC3 (10%)

The REG Procedure					
Dependent Variable: mext					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.14948	0.07474	386.02	0.0002
Error	3	0.00058085	0.00019362		
Corrected Total	5	0.15006			

Root MSE	0.01391	R-Square	0.9961
Dependent Mean	0.98120	Adj R-Sq	0.9935
Coeff Var	1.41812		

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.09149	0.10921	-0.84	0.4637
tmin	1	0.02599	0.00330	7.88	0.0043
AL1	1	-0.02353	0.00340	-6.91	0.0062

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	30	0.6882	0	0.68820	-0.000000
2	60	0.9041	24	0.90328	0.000820
3	90	0.9796	54	0.97721	0.002392
4	120	1.0331	84	1.05114	-0.018036
5	131	1.0940	95	1.07824	0.015757
6	176	1.1882	140	1.18913	-0.000935

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase					
Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0915	0.0260	-0.0235	36.0000	0.000582
1	-0.0915	0.0260	-0.0235	35.9999	0.000581

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary	
Method	Gauss-Newton
Iterations	1
R	4.716E-8
PPC	6E-10
RPC(b2)	0.000181
Object	0.001152
Objective	0.000581
Observations Read	6
Observations Used	6
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	5.9260	1.9753	386.02	0.0002
Residual	3	0.000581	0.000194		
Uncorrected Total	6	5.9266			
Corrected Total	5	0.1501			

The NLIN Procedure				
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0915	0.0139	-0.1358	-0.0472
b1	0.0260	.	.	.
b2	-0.0235	0.000159	-0.0240	-0.0230
knot1	35.9999	0.8415	33.3220	38.6778

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	.	-0.0000000	-0.7029067
b1	.	1.0000000	.	.
b2	-0.0000000	.	1.0000000	-0.6380490
knot1	-0.7029067	.	-0.6380490	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L. $H_B/D_B = 3,6$; 300bar/30°C; CO₂+EtOH/IsoC3 (10%)

The REG Procedure
Dependent Variable: mext
Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	1.12598	0.56299	286.99	<.0001
Error	7	0.01373	0.00196		
Corrected Total	9	1.13971			

Root MSE	0.04429	R-Square	0.9880
Dependent Mean	1.96460	Adj R-Sq	0.9845
Coeff Var	2.25444		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.52603	0.08923	5.90	0.0006
tmin	1	0.01998	0.00162	12.37	<.0001
AL1	1	-0.01762	0.00172	-10.26	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	30	1.1335	0	1.12556	0.007936
2	60	1.6378	0	1.72510	-0.087295
3	90	1.8626	27	1.84899	0.013612
4	120	1.9587	57	1.92003	0.038668
5	150	2.0303	87	1.99108	0.039224
6	180	2.0934	117	2.06212	0.031280
7	210	2.1442	147	2.13316	0.011037
8	240	2.1964	177	2.20421	-0.007807
9	270	2.2349	207	2.27525	-0.040351
10	306	2.3542	243	2.36050	-0.006304

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext - Method: Gauss-Newton

Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.5260	0.0200	-0.0176	45.0000	0.8996
1	0.5341	0.0200	-0.0175	61.1151	0.0202
2	0.6292	0.0168	-0.0147	70.8570	0.00822
3	0.6292	0.0168	-0.0147	72.6873	0.00242

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.025831
Object	0.705364
Objective	0.002422
Observations Read	10
Observations Used	10
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	39.7338	9.9335	939.19	<.0001
Residual	6	0.00242	0.000404		
Uncorrected Total	10	39.7362			
Corrected Total	9	1.1397			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.6292	0.0449	0.5193	0.7391
b1	0.0168	0.000947	0.0145	0.0191
b2	-0.0147	0.000953	-0.0170	-0.0124
knot1	72.6873	2.2506	67.1802	78.1944

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9486833	0.9432696	0.6156566
b1	-0.9486833	1.0000000	-0.9942935	-0.7919813
b2	0.9432696	-0.9942935	1.0000000	0.7471711
knot1	0.6156566	-0.7919813	0.7471711	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L.- $H_B/D_B = 5,4$; 300bar/30°C; CO₂+EtOH/IsoC3 (10%)

The REG Procedure
Dependent Variable: mext
Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	6.82585	3.41292	254.40	<.0001
Error	11	0.14757	0.01342		
Corrected Total	13	6.97342			

Root MSE	0.11583	R-Square	0.9788
Dependent Mean	3.19994	Adj R-Sq	0.9750
Coeff Var	3.61961		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.62945	0.17134	3.67	0.0037
tmin	1	0.02559	0.00234	10.93	<.0001
AL1	1	-0.02191	0.00250	-8.75	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	30	1.4340	0	1.39711	0.03689
2	60	2.0836	0	2.16477	-0.08117
3	90	2.6074	5	2.82290	-0.21550
4	120	2.8314	35	2.93339	-0.10199
5	150	3.1299	65	3.04389	0.08601
6	180	3.2753	95	3.15438	0.12092
7	210	3.3940	125	3.26487	0.12913
8	240	3.4819	155	3.37537	0.10653
9	270	3.5664	185	3.48586	0.08054
10	300	3.6325	215	3.59635	0.03615
11	330	3.7469	245	3.70685	0.04005
12	360	3.7883	275	3.81734	-0.02904
13	392	3.8503	307	3.93520	-0.08490
14	437	3.9773	352	4.10094	-0.12364

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext Method: Gauss-Newton
Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.6295	0.0256	-0.0219	85.0000	0.1476
1	0.7844	0.0217	-0.0180	93.8036	0.1311
2	0.8683	0.0196	-0.0163	107.0	0.0738
3	0.8683	0.0196	-0.0163	108.4	0.0682

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.012864
Object	0.075312
Objective	0.068228
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	150.3	37.5650	337.36	<.0001
Residual	10	0.0682	0.00682		
Uncorrected Total	14	150.3			
Corrected Total	13	6.9734			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits
b0	0.8683	0.1262	0.5871 1.1494
b1	0.0196	0.00195	0.0152 0.0239
b2	-0.0163	0.00196	-0.0207 -0.0120
knot1	108.4	7.1192	92.5350 124.3

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.9179733	0.5954759
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9915245	-0.8106941
b2	0.9179733	-0.9915245	1.0000000	0.7572489
knot1	0.5954759	-0.8106941	0.7572489	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L.- 10% EtOH/IsoC3; 300bar/30°C

The REG Procedure
Dependent Variable: mext
Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.10913	0.05456	92.40	0.0107
Error	2	0.00118	0.00059053		
Corrected Total	4	0.11031			
Root MSE		0.02430	R-Square	0.9893	
Dependent Mean		0.94698	Adj R-Sq	0.9786	
Coeff Var		2.56615			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.02020	0.12271	0.16	0.8844
tmin	1	0.02188	0.00348	6.28	0.0244
AL1	1	-0.02023	0.00368	-5.50	0.0315

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	30	0.6765	0	0.67650	0.000000
2	60	0.9093	20	0.92819	-0.018886
3	90	0.9993	50	0.97757	0.021734
4	135	1.0634	95	1.05163	0.011766
5	165	1.0864	125	1.10101	-0.014614

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext
Grid Search

b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0.0202	0.0219	-0.0202	0	2.9859
0.0202	0.0219	-0.0202	40.0000	0.00118

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext
Iterative Phase
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.0202	0.0219	-0.0202	40.0000	0.00118
1	0.0201	0.0219	-0.0202	39.9984	0.00118

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	1
R	3.858E-7
PPC	8.19E-9
RPC(b0)	0.00495
Object	0.000709
Objective	0.001181
Observations Read	5
Observations Used	5
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Approx Pr > F
Regression	3	4.5930	1.5310	92.40	0.0107
Residual	2	0.00118	0.000591		
Uncorrected Total	5	4.5942			
Corrected Total	4	0.1103			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits
b0	0.0201	0.0243	-0.0845 0.1247
b1	0.0219		
b2	-0.0202	0.000301	-0.0215 -0.0189
knot1	39.9984	1.7219	32.5895 47.4072

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	.	0.0000000	-0.6974796
b1	.	1.0000000	.	.
b2	0.0000000	.	1.0000000	-0.6260213
knot1	-0.6974796	.	-0.6260213	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L.- 10% EtOH/IsoC3; período estático de 30 min.; 300bar/30°C

The REG Procedure					
Dependent Variable: mext					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.08548	0.04274	80.77	0.0784
Error	1	0.00052914	0.00052914		
Corrected Total	3	0.08601			
Root MSE		0.02300	R-Square	0.9938	
Dependent Mean		0.91213	Adj R-Sq	0.9815	
Coeff Var		2.52191			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.34058	0.06745	5.05	0.1245
tmin	1	0.01120	0.00164	6.81	0.0928
AL1	1	-0.00919	0.00193	-4.76	0.1317
Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	30	0.6765	0	0.67650	0.000000
2	60	0.9093	10	0.92049	-0.011195
3	90	0.9993	40	0.98064	0.018658
4	135	1.0634	85	1.07086	-0.007463

The NLIN Procedure					
Dependent Variable mext					
Grid Search					
b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares	
0.3406	0.0112	-0.00919	0	0.7089	
0.3406	0.0112	-0.00919	50.0000	0.000530	

The NLIN Procedure					
Dependent Variable mext					
Method: Gauss-Newton					
Iterative Phase					
Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.3406	0.0112	-0.00919	50.0000	0.000530
1	0.3405	0.0112	-0.00920	49.9941	0.000529

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary	
Method	Gauss-Newton
Iterations	1
R	2.267E-6
PPC(knot1)	6.55E-8
RPC(b2)	0.000554
Object	0.000897
Objective	0.000529
Observations Read	4
Observations Used	4
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	3.4134	1.1378	80.77	0.0784
Residual	1	0.000529	0.000529		
Uncorrected Total	4	3.4139			
Corrected Total	3	0.0860			

The NLIN Procedure					
Approximate 95% Confidence Limits					
Parameter	Estimate	Std Error	Approx	Limits	
b0	0.3405	0.0230	0.0482	0.6328	
b1	0.0112	.	.	.	
b2	-0.00920	0.000431	-0.0147	-0.00372	
knot1	49.9941	3.5766	4.5494	95.4387	

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	.	0.0000000	-0.6994467
b1	.	1.0000000	.	.
b2	0.0000000	.	1.0000000	-0.5896602
knot1	-0.6994467	.	-0.5896602	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L.- 50% EtOH/IsoC3; 300bar/30°C

The REG Procedure					
Dependent Variable: mext					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.12707	0.06353	26.65	0.0022
Error	5	0.01192	0.00238		
Corrected Total	7	0.13899			

Root MSE	0.04883	R-Square	0.9142
Dependent Mean	1.21156	Adj R-Sq	0.8799
Coeff Var	4.03023		

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.08720	0.33690	0.26	0.8061
tmin	1	0.05755	0.01969	2.92	0.0329
AL1	1	-0.05570	0.01989	-2.80	0.0380

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	15	0.9505	0	0.95050	0.000000
2	30	1.0650	12	1.14544	-0.080436
3	45	1.1804	27	1.17328	0.007120
4	60	1.2454	42	1.20112	0.044276
5	75	1.2672	57	1.22897	0.038232
6	90	1.2806	72	1.25681	0.023787
7	135	1.3447	117	1.34035	0.004355
8	165	1.3587	147	1.39603	-0.037333

The NLIN Procedure					
Dependent Variable mext					
Grid Search					
b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares	
-0.0872	0.0576	-0.0557	0	10.7372	
-0.0872	0.0576	-0.0557	18.0000	0.2564	

The NLIN Procedure					
Dependent Variable mext					
Iterative Phase					
Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0872	0.0576	-0.0557	18.0000	0.2564
1	0.0873	0.0576	-0.0557	18.0002	0.0119

Estimation Summary	
Method	Gauss-Newton
Iterations	1
R	2.927E-8
PPC	1.205E-9
RPC(b0)	2.00055
Object	0.953511
Objective	0.011921
Observations Read	8
Observations Used	8
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	11.8701	3.9567	26.65	0.0022
Residual	5	0.0119	0.00238		
Uncorrected Total	8	11.8821			
Corrected Total	7	0.1390			

The NLIN Procedure					
Approximate 95% Confidence Limits					
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	0.0873	0.0488	-0.0383	0.2128	
b1	0.0576	.	.	.	
b2	-0.0557	0.000409	-0.0567	-0.0546	
knot1	18.0002	1.0609	15.2732	20.7272	

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	.	0.0000000	-0.8264343
b1	.	1.0000000	.	.
b2	0.0000000	.	1.0000000	-0.4684397
knot1	-0.8264343	.	-0.4684397	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L.- 50% EtOH/IsoC3; período estático de 30 min.; 300bar/30°C

The REG Procedure					
Dependent Variable: mext					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.34418	0.17209	41.41	0.0008
Error	5	0.02078	0.00416		
Corrected Total	7	0.36496			
Root MSE		0.06447	R-Square	0.9431	
Dependent Mean		1.01005	Adj R-Sq	0.9203	
Coeff Var		6.38273			

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.04561	0.28838	-0.16	0.8805
tmin	1	0.04427	0.01550	2.86	0.0356
AL1	1	-0.04083	0.01576	-2.59	0.0487

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	15	0.6185	0	0.61850	-0.00000
2	30	0.7608	10	0.87428	-0.11348
3	45	0.9619	25	0.92589	0.03601
4	60	1.0325	40	0.97751	0.05499
5	75	1.0711	55	1.02912	0.04198
6	90	1.1008	70	1.08073	0.02007
7	135	1.2336	115	1.23557	-0.00197
8	165	1.3012	145	1.33880	-0.03760

The NLIN Procedure					
Dependent Variable mext					
Grid Search					
b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares	
-0.0456	0.0443	-0.0408	0	5.0654	
-0.0456	0.0443	-0.0408	20.0000	0.0208	

The NLIN Procedure					
Dependent Variable mext - Method: Gauss-Newton					
Iterative Phase					
Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0456	0.0443	-0.0408	20.0000	0.0208
1	-0.0455	0.0443	-0.0408	20.0005	0.0208

Estimation Summary	
Method	Gauss-Newton
Iterations	1
R	7.844E-9
PPC	5.23E-10
RPC(b0)	0.001315
Object	7.198E-6
Objective	0.020781
Observations Read	8
Observations Used	8
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	8.5058	2.8353	41.41	0.0008
Residual	5	0.0208	0.00416		
Uncorrected Total	8	8.5266			
Corrected Total	7	0.3650			

The NLIN Procedure					
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	-0.0455	0.0645	-0.2113	0.1202	
b1	0.0443				
b2	-0.0408	0.000540	-0.0422	-0.0394	
knot1	20.0005	1.8984	15.1206	24.8803	

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	.	-0.0000000	-0.8317634
b1	.	1.0000000	.	.
b2	-0.0000000	.	1.0000000	-0.4575333
knot1	-0.8317634	.	-0.4575333	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L. - 90% EtOH/IsoC3; 300bar/30°C

The REG Procedure					
Dependent Variable: mext					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.84524	0.42262	2281.52	<.0001
Error	5	0.00092618	0.00018524		
Corrected Total	7	0.84617			

Root MSE	0.01361	R-Square	0.9989
Dependent Mean	1.05379	Adj R-Sq	0.9985
Coeff Var	1.29155		

Parameter Estimates					
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.08160	0.01894	-4.31	0.0077
tmin	1	0.02700	0.00049797	54.21	<.0001
AL1	1	-0.02593	0.00057558	-45.05	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	15	0.3314	0	0.32334	0.008061
2	30	0.7111	0	0.72828	-0.017182
3	45	1.1503	0	1.13323	0.017074
4	60	1.1880	13	1.20109	-0.013086
5	75	1.2192	28	1.21709	0.002112
6	90	1.2330	43	1.23309	-0.000089
7	135	1.2895	88	1.28109	0.008407
8	165	1.3078	118	1.31310	-0.005296v

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext - Grid Search

	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
-0.0816	0.0270	-0.0259	0	9.5400	
-0.0816	0.0270	-0.0259	47.0000	0.000927	

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0816	0.0270	-0.0259	47.0000	0.000927
1	-0.0880	0.0273	-0.0262	46.5046	0.000824
2	-0.0880	0.0273	-0.0262	46.5091	0.000824

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000098
Object	0.000085
Objective	0.000824
Observations Read	8
Observations Used	8
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	9.7291	2.4323	1367.84	<.0001
Residual	4	0.000824	0.000206		
Uncorrected Total	8	9.7299			
Corrected Total	7	0.8462			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0880	0.0219	-0.1488	-0.0271
b1	0.0273	0.000677	0.0254	0.0292
b2	-0.0262	0.000696	-0.0281	-0.0242
knot1	46.5091	0.6908	44.5913	48.4269

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.8997354	0.3988241
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9718253	-0.6179261
b2	0.8997354	-0.9718253	1.0000000	0.4753636
knot1	0.3988241	-0.6179261	0.4753636	1.0000000

Ensaio SFE - *Curcuma longa* L. - 90% EtOH/IsoC3; período estático de 30 min.; 300bar/30°C

The REG Procedure
Dependent Variable: mext - Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.43033	0.21517	759.92	<.0001
Error	5	0.00142	0.00028314		
Corrected Total	7	0.43175			

Root MSE	0.01683	R-Square	0.9967
Dependent Mean	1.07326	Adj R-Sq	0.9954
Coeff Var	1.56782		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.07729	0.02905	2.66	0.0448
tmin	1	0.02865	0.00093126	30.77	<.0001
AL1	1	-0.02774	0.00102	-27.33	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	15	0.5159	0	0.50707	0.008830
2	30	0.9091	0	0.93685	-0.027752
3	45	1.1390	8	1.14472	-0.005720
4	60	1.1684	23	1.15841	0.009987
5	75	1.1854	38	1.17211	0.013294
6	90	1.1961	53	1.18580	0.010301
7	135	1.2299	98	1.22688	0.003023
8	165	1.2423	128	1.25426	-0.011963

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext
Grid Search

b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0.0773	0.0287	-0.0277	0	7.1910
0.0773	0.0287	-0.0277	37.0000	0.00142

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext - Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.0773	0.0287	-0.0277	37.0000	0.00142
1	0.1227	0.0262	-0.0254	38.9450	0.000519
2	0.1227	0.0262	-0.0254	39.1239	0.000395

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.004593
Object	0.238423
Objective	0.000395
Observations Read	8
Observations Used	8
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	9.6465	2.4116	1456.77	<.0001
Residual	4	0.000395	0.000099		
Uncorrected Total	8	9.6469			
Corrected Total	7	0.4317			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits
b0	0.1227	0.0222	0.0610 0.1844
b1	0.0262	0.000937	0.0236 0.0288
b2	-0.0254	0.000942	-0.0280 -0.0228
knot1	39.1239	0.7228	37.1170 41.1308

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9486833	0.9437120	0.6834726
b1	-0.9486833	1.0000000	-0.9947598	-0.8479655
b2	0.9437120	-0.9947598	1.0000000	0.8135723
knot1	0.6834726	-0.8479655	0.8135723	1.0000000

Ensaio SFE - *Lippia alba* M. – CO₂; 80bar/40°C

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT				Method: Gauss-Newton	
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.006129	0.000347	-0.000176	150.000000	0.000308
1	0.007414	0.000315	-0.000159	179.646916	0.000265
2	0.007510	0.000312	-0.000214	213.579683	0.000252
3	0.007492	0.000315	-0.000287	222.859140	0.000239
4	0.007492	0.000315	-0.000287	220.515977	0.000238

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.03537531774	0.00884382943
Residual	7	0.00023773226	0.00003396175
Uncorrected Total	11	0.03561305000	
(Corrected Total)	10	0.00711414000	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.0074917	0.003761746	-0.00140352	0.01638685
B1	0.0003152	0.000029974	0.00024432	0.00038608
B2	-0.0002869	0.000140592	-0.00061931	0.00004558
KNOT1	220.5159773	29.937751300	149.72387624	291.30807839

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.836660027	0.178376517	0.2059154012
B1	-0.836660027	1	-0.213200716	-0.40317569
B2	0.178376517	-0.213200716	1	-0.687302098
KNOT1	0.2059154012	-0.40317569	-0.687302098	1

Ensaio SFE - *Lippia alba* M. – CO₂; 80bar/50°C

Non-Linear Least Squares Iterative Phase						
Dependent Variable MEXT			Method: Gauss-Newton			
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares	
0	0.004207	0.0000751570	-0.0000441940	150.000000	0.0000409902	
1	0.003604	0.0000902452	-0.0000520970	94.562610	0.0000290142	
2	0.002767	0.000116	-0.0000755961	62.472840	0.0000270063	
3	0.001775	0.000157	-0.000118	49.105356	0.0000217802	
4	0.000888	0.000217	-0.000179	38.008130	0.0000188555	
5	1.2674323E-16	0.000277	-0.000240	38.294322	0.0000029510	
6	8.678748E-19	0.000277	-0.000240	38.221399	0.0000029482	

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.00238553178	0.00059638294
Residual	7	0.00000294822	0.00000042117
Uncorrected Total	11	0.00238848000	
(Corrected Total)	10	0.00033210182	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.00000000	0.0006489797	-0.001534605	0.001534605
B1	0.00027667	0.0000305932	0.000204325	0.000349009
B2	-0.00023989	0.0000307204	-0.000312532	-0.000167246
KNOT1	38.22139880	3.9958909961	28.772542185	47.670255406

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.707106781	0.7041787902	0.1855375351
B1	-0.707106781	1	-0.995859195	-0.741121551
B2	0.7041787902	-0.995859195	1	0.7005011116
KNOT1	0.1855375351	-0.741121551	0.7005011116	1

Ensaio SFE - *Lippia alba* M. – CO₂; 120bar/40°C

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT			Method: Gauss-Newton		
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.001720	0.000273	-0.000239	190.000000	0.0000801835
1	0.000968	0.000287	-0.000202	164.622435	0.0000518990
2	-0.000114	0.000308	-0.000229	150.452032	0.0000401821
3	-0.000114	0.000308	-0.000229	152.122347	0.0000394514
4	-0.000114	0.000308	-0.000229	152.122347	0.0000394514

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.01916653857	0.00479163464
Residual	7	0.00003945143	0.00000563592
Uncorrected Total	11	0.01920599000	
(Corrected Total)	10	0.00416918182	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0001143	0.001718182	-0.00417717	0.00394860
B1	0.0003082	0.000018917	0.00026346	0.00035292
B2	-0.0002289	0.000031370	-0.00030303	-0.00015468
KNOT1	152.1223471	13.131011403	121.07218979	183.17250435

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.825722824	0.4979295977	0.2189405824
B1	-0.825722824	1	-0.603022689	-0.485466935
B2	0.4979295977	-0.603022689	1	-0.291006019
KNOT1	0.2189405824	-0.485466935	-0.291006019	1

Ensaio SFE - *Lippia alba* M. – CO₂; 120bar/50°C

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.001133	0.000211	-0.000137	150.000000	0.0000532910
1	0.002040	0.000190	-0.000116	175.776851	0.0000321837
2	0.002010	0.000191	-0.000150	204.208221	0.0000238622
3	0.001571	0.000200	-0.000162	190.136774	0.0000176724
4	0.001571	0.000200	-0.000162	191.186142	0.0000175566

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.01076867343	0.00269216836
Residual	7	0.00001755657	0.00000250808
Uncorrected Total	11	0.01078623000	
(Corrected Total)	10	0.00232386545	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.0015714	0.001079104	-0.00098027	0.00412313
B1	0.0001995	0.000009976	0.00017593	0.00022311
B2	-0.0001622	0.000025630	-0.00022280	-0.00010159
KNOT1	191.1861421	12.746513752	161.04518459	221.32709961

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.832050294	0.3238751378	0.2456724434
B1	-0.832050294	1	-0.389249472	-0.488286631
B2	0.3238751378	-0.389249472	1	-0.481185548
KNOT1	0.2456724434	-0.488286631	-0.481185548	1

Ensaio SFE - *Lippia alba* M. – CO₂; 100bar/45°C

Non-Linear Least Squares Iterative Phase					
Dependent Variable MEXT					
Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.0000406000	0.000192	0.000129	180.000000	0.0000221393
1	0.000609	0.000185	0.000126	163.745155	0.0000175383
2	0.000609	0.000185	0.000126	163.377374	0.0000175276

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.01754176244	0.00438544061
Residual	8	0.00001752756	0.00000219095
Uncorrected Total	12	0.01755929000	
(Corrected Total)	11	0.00675328917	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.0006094	0.000867835	-0.00139188	0.00261063
B1	0.0001845	0.000010320	0.00016072	0.00020832
B2	0.0001261	0.000018707	0.00008301	0.00016928
KNOT1	163.3773741	14.238771288	130.54239183	196.21235632

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.764470787	0.4217411678	-0.234453228
B1	-0.764470787	1	-0.551677284	0.5693446202
B2	0.4217411678	-0.551677284	1	0.2410450888
KNOT1	-0.234453228	0.5693446202	0.2410450888	1

ANEXO II - Curva de calibração da curcumina

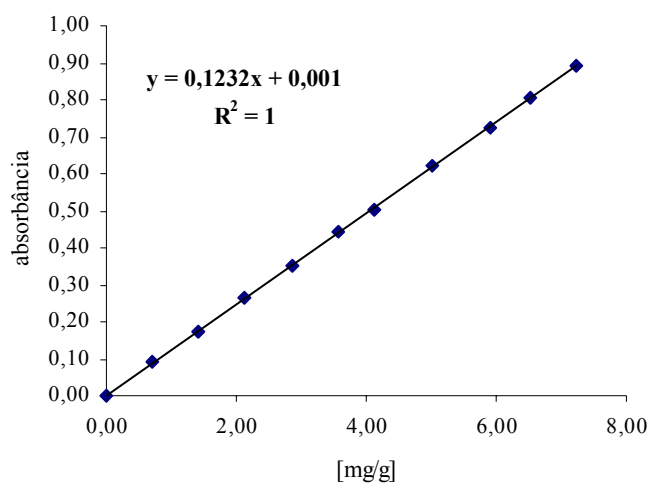


Figura 8.1 Curva Padrão de curcuminóides (90%, purificação Ital) realizada em triplicata.

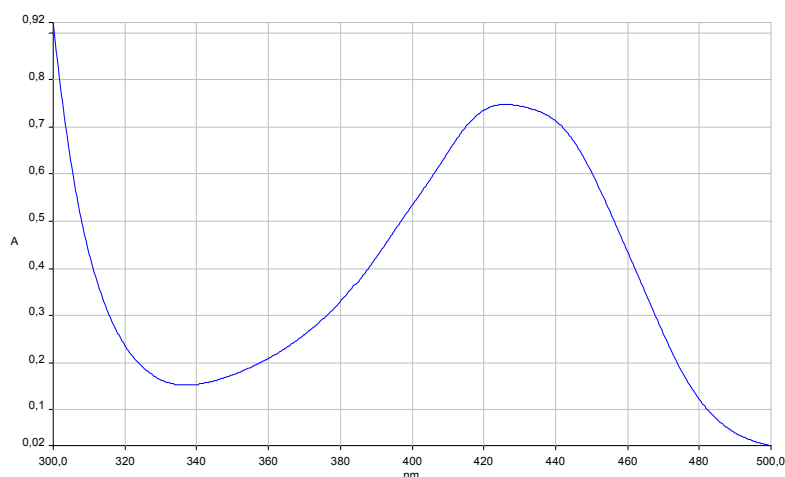


Figura 8.2 Scan do CC padrão a 90% de pureza para identificação do maior pico de absorção (427 nm).

Curva de calibração do padrão de curcumina. As soluções foram feitas com curcumina padrão (98%, lote S35083 205, Merck, Alemanha) e etanol (99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K31865683312, Alemanha) e construída com os valores médios obtidos.

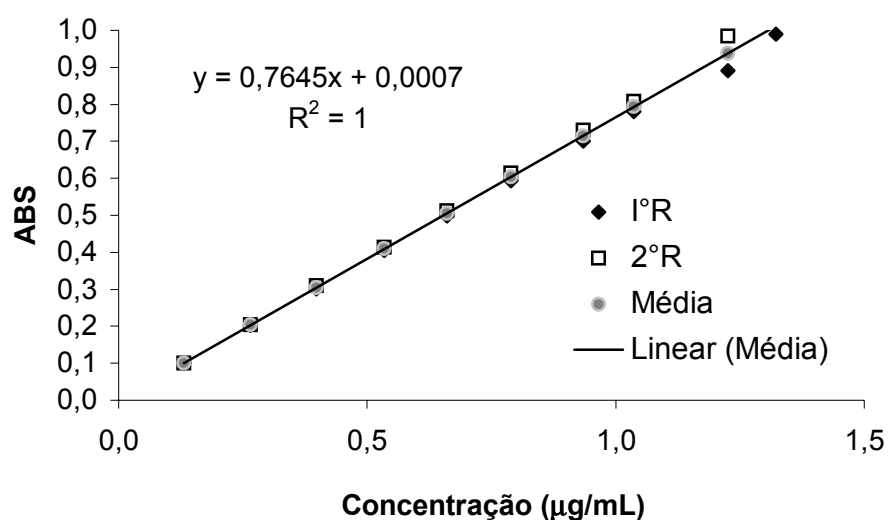


Figura 8.3 Curva padrão de curcumina (98%, lote S35083 205, Merck, Alemanha).

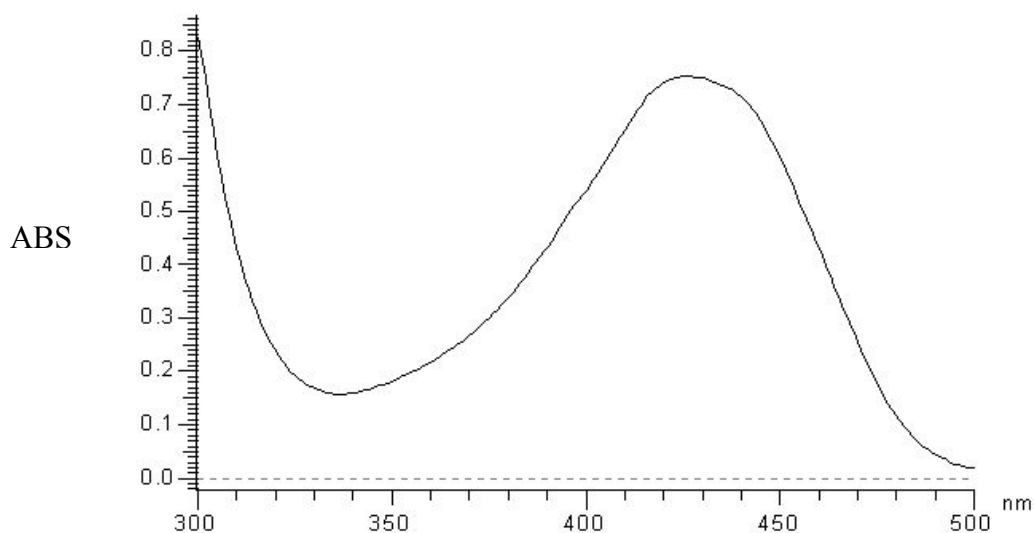


Figura 8.4 Varredura de comprimento de onda de absorção do padrão de curcumina 98% (Merck, lote S35083 205, Alemanha) em etanol 99,8 (Merck, lote K31865683312, Alemanha), na concentração de 1,44 µg/mL.

Pico	Início	Pico	Final (nm)	Altura (Abs)	Área (Abs×nm)	Vale (nm)	Vale (Abs)
1	500	426	300	0,7530	76,3866	300	0,8272

ANEXO III - Atividade Antimicobacteriana

A atividade antimicobacteriana para os extratos de *Curcuma longa* L. foi realizada no Instituto Adolf Lutz de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade da Dra. Daisy Sato.

Metodologia - Foram utilizados dois extratos produzidos a partir do lote M1 e S1. O óleo volátil foi obtido por hidrodestilação e os extratos por SFE com etanol e etanol/isopropanol (1:1) como co-solvente (10%), a 200 e 300 bar, a 30°C.

Foram utilizados cepas de micobactérias nas condições: a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi mantida em meio de Lowenstein-Jensen. As suspensões de micobactérias foram preparadas pelo subcultivo das colônias em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco) adicionado de 10% de suplemento OADC (BBLTM). Os tubos foram incubados a 37 °C por 7 a 10 dias até a obtenção de uma turvação com densidade ótica correspondente à turvação da escala McFarland 1. Esta suspensão corresponde a 10^7 (10 elevado à 7) micobactérias/mL que pode ser confirmado pelo plaqueamento em meio de cultura Middlebrook 7H10 para a realização da contagem de unidades formadoras de colônias/mL.

Atividade Antimicobacteriana - A atividade antimicobacteriana dos extratos de cúrcuma foi obtida pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC - 27294.

O método de MABA (Microplate Alamar blue Assay) foi utilizada como método padrão ouro, segundo metodologia preconizada por Collins & Franzblau (1997). Os extratos brutos foram diluídos em dimetilsulfóxido e subsequentemente diluídos em meio de Middlebrook 7H9 de maneira a obter-se diluições que variaram de 4000 a 62,5 microgramas/mL. A leitura visual da CIM foi definida como a menor concentração do extrato bruto capaz de

impedir a viragem da cor de azul para róseo. O método TEMA (Tetrazolium microplate assay) utiliza o brometo de tetrazóleo como visualizador de crescimento micobacteriano e a leitura visual de CIM foi definida como a menor concentração do extrato bruto capaz de impedir a viragem da cor de amarelo para púrpura (Caviedes et al., 2002).

Tabela 8.1 Determinação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extratos de *Curcuma longa* L. contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, usando os métodos MABA e TEMA, e teor de curcuminóides obtido por espectrofotometria (CC%).

Ensaio	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv - CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CC%
	MABA	TEMA	
Matéria-prima M1			
Fração volátil M1	32	32	-
Extrato (EtOH, 200 bar)	32	32	0,009
Extrato (EtOH, 300 bar)	32	32	0,013
Matéria-prima S1			
Fração volátil S1	64	32	-
Extrato EtOH/IsoC3 (13.8%)	128	64	0,88
Extrato EtOH/IsoC3 (6.9%)	32	32	0,72
Extrato EtOH/IsoC3 (13.6)	32	32	1,81
Extrato EtOH/IsoC3 (6.7%)	32	32	0,26
Isoniazida	0.06	$\leq 0,015$	

Os resultados apresentados na tabela 2, mostram dados de extratos obtidos a partir do lote S2 de cúrcuma, a 300 bar, 30 °C com etanol/isopropanol (1:1). Foram realizadas análises em todos os pontos coletados da cinética e do padrão de curcumina (Merck).

Tabela 8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ de extratos de *Curcuma longa* L. contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Rv), *Mycobacterium avium* (Ma) e *Mycobacterium kansasii* (Ma) usando o método TEMA:

Extratos	Micobactérias – CIM em $\mu\text{g/mL}$		
	Rv	Ma	Mk
1	500	4000	125
2	1000	>4000	500
3	1000	>4000	500
4	4000	>4000	2000
5	>4000	>4000	>4000
6	>4000	>4000	>4000
7	4000	>4000	2000
8	>4000	>4000	>4000
9*	*	*	*
Padrão curcumina	250	>4000	$\leq 62,5$

Referências Bibliográficas:

Caviedes, L.; Delgado, J.; Gilman, R.H. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 5, p. 1873-4, 2002.

Collins, L. A.; Franzblau, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, n. 5, p. 1004-9, 1997.

ANEXO IV - Atividade antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada em 9 linhagens originárias de tumores humanos: pulmão (NCI460), mama (MCF-7), mama (fenótipo de resistência à múltiplas drogas – NCI ADR), melanoma (UACC-62), ovário (OVCAR), cólon (HT29), próstata (PC03), rim (786), leucemia (K562). As linhagens foram cedidas pelo Nacional Cancer Institute (NCI) dos EUA. Os dados são mostrados nos gráficos a seguir:

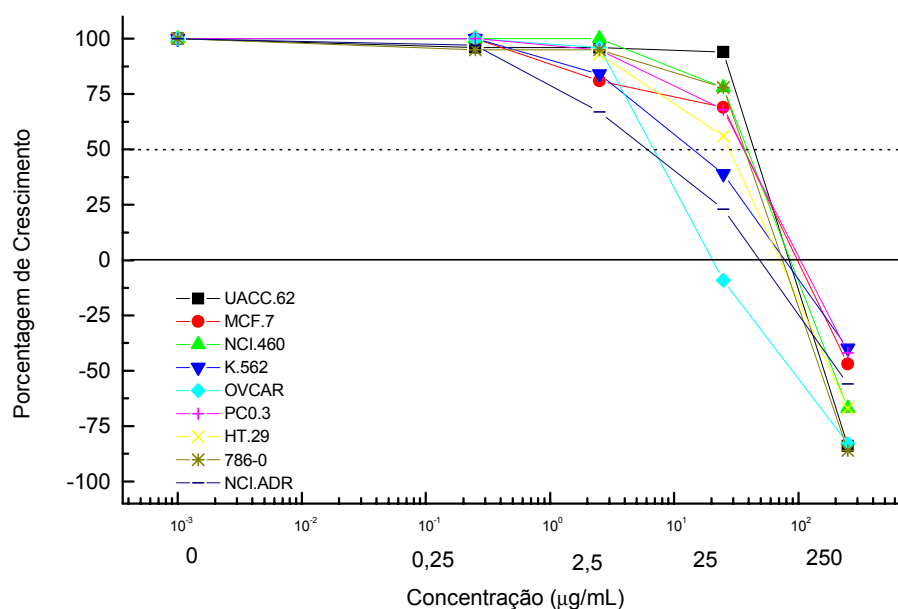


Figura 8.5 Atividade antiproliferativa do óleo essencial de *Curcuma longa*.

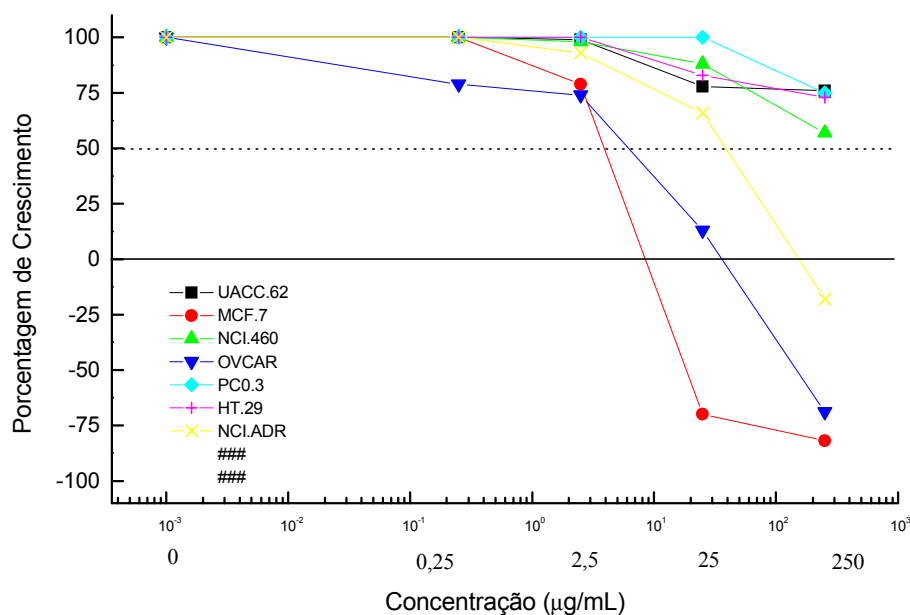


Figura 8.6 Atividade antiproliferativa do óleo essencial de *Curcuma longa*.

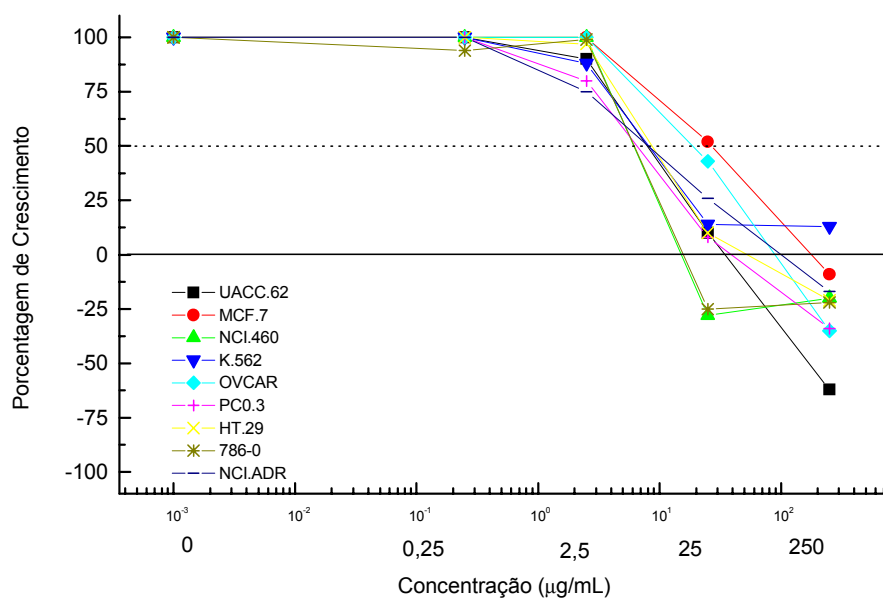


Figura 8.7 Atividade antiproliferativa do padrão de curcuminóides (90%, Ital) obtido a partir de *Curcuma longa*.

ANEXO V - Artigos Publicados

Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques

MARA E. M. BRAGA,[†] PATRÍCIA F. LEAL,[†] JOÃO E. CARVALHO,[‡] AND
M. ANGELA A. MEIRELES^{*,†}

LASEFI, DEA/FEA (College of Food Engineering), UNICAMP (State University of Campinas),
Caixa Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brazil, and CPQBA, Centro Pluridisciplinar de
Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Estrada PLN 393, 999 Vila Betel, Caixa Postal 6171,
13081-970 Paulínia, São Paulo, Brazil

Turmeric extracts were obtained from two lots of raw material (M and S) using various techniques: hydrodistillation, low pressure solvent extraction, Soxhlet, and supercritical extraction using carbon dioxide and cosolvents. The solvents and cosolvents tested were ethanol, isopropyl alcohol, and their mixture in equal proportions. The composition of the extracts was determined by gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID) and UV. The largest yield (27%, weight) was obtained in the Soxhlet extraction (turmeric (S), ethanol = 1:100); the lowest yield was detected in the hydrodistillation process (2.1%). For the supercritical extraction, the best cosolvent was a mixture of ethanol and isopropyl alcohol. Sixty percent of the light fraction of the extracts consisted of ar-turmerone, (Z)- γ -atlantone, and (E)- γ -atlantone, except for the Soxhlet extracts (1:100, ethanol), for which only ar-turmeronol and (Z)- α -atlantone were detected. The maximum amount of curcuminoids (8.43%) was obtained using Soxhlet extraction (ethanol/isopropyl alcohol). The Soxhlet and low pressure extract exhibited the strongest antioxidant activities.

KEYWORDS: *Curcuma longa* L.; antioxidant and anticancer activities; cosolvents; hydrodistillation; solvent extraction; supercritical extraction; turmeric

INTRODUCTION

The substances extracted from turmeric (*Curcuma longa* L.), paprika (*Capsicum annuum*), sassafras (*Sassafras albidum*), and other mineral dyes have been used for hundreds of years to impart color to foods and for medicinal preparations and related products. In the middle of the nineteenth century, organic dyes were developed, creating a large variety of coloring additives of economical importance, but it was the natural dyes or natural pigments that revolutionized the market (1).

Turmeric (*C. longa* L.) extract is an oleoresin consisting of a light (volatile oil) fraction and a heavy fraction of yellowish-brown color. The compounds responsible for the yellow color are the curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) and two curcuminoids, demethoxy-curcumin and bis-demethoxy-curcumin (2–5). The amount of oleoresin in the rhizomes varies from 3 to 6% (6), and it is predominantly formed of sesquiterpenic ketones (7) and 2–8% of curcuminoids (8). Curcuminoids have shown antimutagenic activities in different animal and cell cultures. One of the biochemical

mechanisms attributed to the anticarcinogenic activity of curcumin is related to its carbonyl group (9).

Huang et al. (1991), cited by Araújo and Léon (10), showed that curcumin inhibited the epidermal metabolism of the arachnoidic acid via lipoxigenase and cyclooxygenase. This demonstrates its anticancer activity (AC), since the inhibition of these enzymes was dependent on the curcumin concentration (5–10 μ M). Gomes et al. (11) studied the antileishmanial activity of the curcuminoids; the curcumin was more effective than the reference compound, pentamidine isetionate, against *Leishmania amazonensis*. Curcumin has proven to be more potent against *Leishmania major* than pentamidine: 100% of cellular death was observed at 27 μ M curcumin (12). Mazumber et al. (1995), cited by Araújo and Léon (10), demonstrated that curcumin has antiviral activity: the HIV-1 integrase was inhibited by curcumin (IC_{50} = 40 μ M).

The extraction of turmeric volatile oil by supercritical fluid extraction (SFE) was studied by Began et al. (13); these authors used the surface response methodology to determine the best operating conditions with respect to the total yield. A temperature of 35 °C, a pressure of 225 bar, and a solvent flow rate of 4.72×10^{-5} kg/s were found to be optimal. They also observed that an increase in the temperature (35–55 °C) decreased the total yield at a constant solvent flow rate and that an increase

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 55 19 3788-4033. Fax: 55 19 3788-4027. E-mail: meireles@fea.unicamp.br.

[†] UNICAMP (State University of Campinas).

[‡] CPQBA, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.

in solvent flow rate, at constant temperature and pressure, increased the total yield; the turmeric extract composition was not affected by any of the process variables, in the range of conditions tested. Mendéz et al. (14) studied the use of ethanol to increase the amount of curcuminoids in the SFE extracts. Ethanol was added to turmeric before the SFE process. At 45 °C and 300 bar, the amount of curcuminoids solubilized was found to be significantly affected by the presence of ethanol.

The use of cosolvents to increase the extraction of a specific group of compounds has been reported in the literature. Chang et al. (15) used water and ethanol as cosolvents for the extraction of green tea volatile oil; the use of 95% ethanol as a cosolvent increased the yield four times, with respect to the use of water. Wang et al. (16) studied SFE from ginseng roots and proved that the use of cosolvent (6%, molar of ethanol) increased the yield.

Rónyai et al. (18) studied the extractions of corn germ with a carbon dioxide–ethyl alcohol mixture at 300 bar and 42 °C, varying the alcohol content from 0 to 10% in the solvent mixture. The alcohol content in the solvent had a strong influence on the rate of the extraction, and 10% of ethyl alcohol by weight was found to be the optimum; the data also showed that increasing the amount of alcohol in the fluid decreased the extraction time and the consumption of CO₂. The solubilities of the corn germ colorants in the alcohol plus CO₂ mixtures are different; using CO₂ + 2.5%, alcohol yielded straw yellow-colored oils, while CO₂ + 10% alcohol solvents produced orange-yellow extracts. Guan et al. (20) studied the solubility of stearic acid in CO₂ using the cosolvent mixture (1:1) of ethanol plus acetonitrile. Badalyan (17) studied the extraction of ginger oleoresin using ethanol as cosolvent; under subcritical conditions, an addition of 2% of ethanol increased the yield to approximately 10%. Nonetheless, at supercritical conditions, probably due to the retrograde phenomena, the yield at 35 °C was found to be much smaller than that at 25 °C. Zancan et al. (19) have determined that the addition of ethanol or isopropyl alcohol significantly affected the content of gingerols and shogaols in ginger SFE extracts.

The solubility of a solute (or a mixture of solute) in a supercritical solvent can be modified by the addition of a cosolvent, due to the strong interactions between the solute and the cosolvent and/or due to the variation of the density of the fluid phase, caused by the addition of the cosolvent. The solubility is found to be dependent on the properties and concentrations of the components of mixture, as well as on the system's temperature and pressure. Molecular associations become more complex when a cosolvent mixture (ethanol + isopropyl alcohol) is added to the system, i.e., the cosolvents can associate with the solvent or with the solute (that is, a mixture in the case of oleoresins) and can self-associate in some cases. The enhancement of the solubility is mainly caused by the formation of clusters of solvent–solute, cosolvent–solute, and solvent–cosolvent–solute (20).

The objectives of this work were to compare the extraction yields, chemical composition, and antioxidant activities of turmeric extracts, obtained by SFE, by low pressure solvent extraction (LPSE), by Soxhlet extraction (Soxhlet), and by hydrodistillation (HD). Because curcuminoids are only slightly soluble in carbon dioxide (13, 14), to increase their content in the SFE extracts, it is mandatory to add cosolvent. The use of cosolvent requires its removal from the extracts, thus adding another step to the entire process. Nevertheless, the amounts of cosolvent required are generally very small, as compared to the amounts used in any LPSE process. In a standard low pressure

extraction process, for instance, the ratio of solid to solvent easily reaches 1:10. For the SFE process, however, a considerably high amount of cosolvent, like ~16%, represents a solid to solvent ratio of only ~1:2. Because the intended use of the turmeric extracts is for the formulation of foods, only ethanol (EtOH) and isopropyl alcohol (IsoC3) were used because they are acceptable as an extraction solvent for food.

MATERIAL AND METHODS

Raw Material Characterization. Two lots of turmeric rhizomes were used. The first one (M) was obtained from the Experimental Unit of EPAMIG (Maria da Fé, Minas Gerais, Brazil), and the second (S) was obtained from Fazenda Experimental Lageado of Unesp (Botucatu, SP, Brazil). Turmeric M and S were cultivated without any specific fertilization; turmeric M was grown in a consortium with peach plantation. The rhizomes were manually collected, cleaned with water, and separated from the central stem before slicing (M) or triturating (S). Turmeric M was dried in an oven at 30 °C for 24 h. Turmeric S was dried using a continuous flow dryer assembled at the College of Agricultural Engineering/UNICAMP. The dryer capacity was 2 kg of humid ginger, the drying temperature was 35 °C, and the drying time was 8 h. The raw material moisture was determined using the Jacobs method (21); the contents of starch, protein, and total lipid soluble substances were determined by AOAC methods 32.2.05, 32.1.22, and 32.1.25 (22); ash and fibers were determined by AOAC methods 4.1.10 and 4.6.01 (23); the reducing sugars content was determined by the Somogyi–Nelson method (24). The sliced or triturated rhizomes were dried at 30 °C. The dried materials were accommodated in plastic bags and kept in a domestic freezer (Brastemp, model 7501, São Paulo, Brazil) at –5 °C avoiding any contact with light. Before the assays, the dried rhizomes were triturated using a knife mill (Stein Laboratory Mill, model L2, Germany) in portions of approximately 30 g for 10 s. The size distribution of the comminuted turmeric particles was determined using a standard testing sieve (series Tyler, Abrosinox, Caieiras, Brazil) under mechanical agitation (Produtest, model 3580, Santo Amaro, Brazil). Mesh sizes 24, 32, and 48 were selected for the assays. The particles' true density was determined by helium pycnometry (Micrometrics, model Multivolume pycnometer 1305) in the Analytical Chemistry Facilities of the Institute of Chemistry, IQ/UNICAMP. The apparent bed density was calculated using the mass of feed and the volume of the extractor's cell. The total porosity (bed + particles) was determined using the particles' true density and the bed apparent density. The mean particle diameter was estimated using the procedure recommended by ASAE (25).

Extraction Setup and Procedures. *Traditional Processes: HD, LPSE, and Soxhlet Extraction.* The HD extract (volatile oil) was obtained using ~0.050 kg of dried turmeric; the process took 3 h and 30 min, and the assay was duplicated. The LPSE extracts were obtained using 0.001 kg of turmeric with a refrigerated shaker (Incubadora Refrigerada Orbital, model MA 420, Marconi, Piracicaba, Brazil) at 30 °C and 168 rpm for 6 h. Ethanol (PA, Merck, lots K30916283 231 and K30655783 222) and isopropyl alcohol (PA, Merck, lot K30929034 229) were used, and two levels of solid to solvent ratios were employed, 1:10 and 1:100. The Soxhlet process was done using 0.005 kg of turmeric, ethanol (PA, Merck, lots K30916283 231 and K30655783 222), and isopropyl alcohol (PA, Merck, lot K 28514034 049); the system was kept under reflux for 2 h and 30 min. The yields were calculated as mass of volatile oil divided by mass of dry turmeric.

SFE Procedure. The experimental runs were conducted using a fixed bed SFE unit containing an extraction cell of approximately 221 × 10^{–6} m³ (length of 37.5 × 10^{–2} m and inside diameter of 2.74 × 10^{–2} m) and maximum allowable pressure of 400 bar, as described by Pasquel et al. (26). The fixed bed was formed inside the extraction cell with turmeric particles of mesh sizes 24, 32, and 48; equal amounts for each particle size were used. To obtain a homogeneous fixed bed with constant porosity of 0.60 ± 0.05, 0.126 ± 0.001 kg of turmeric particles was required. To avoid bed channeling, the particles were fed into the extraction cell in portions of ~1 g and accommodated with the help of a cylindrical rod. The extraction cell containing the raw

material was adapted into the SFE unit. The experimental procedure has been described by Zancan et al. (19). The thermostatic bath controlling the CO₂ inlet flow to the pump was set at -10 °C. After reaching thermal equilibrium, the system was slowly pressurized by opening the valve at the extractor's inlet and allowing CO₂ + cosolvent to flow across the extraction cell. Once the system reached and stabilized at the operating pressure, the valves from the extractor's outlet were opened and the extraction process began. The solvent flow continued for 6 h; the system depressurization required another 50–90 min. Samples were collected every 25 min, and the runs were terminated after 6 h. The cosolvent present in the extracts was eliminated using a vacuum oven (Napco, model 5831, 25 in Hg, Winchester, VA) for 24 h. Afterward, the extracts were kept in a dissector coupled to a vacuum pump (Tecnal, model TE-058, Piracicaba, Brazil) for an additional period of 16 or 40 h. The search for the best cosolvent was done using a 3 × 2 factorial design with replication at a predetermined solvent flow rate of $(4.2 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ kg/s, temperature of 30 °C, selected based on the results of Began et al. (13), and a fixed amount of cosolvent of $(6.4 \pm 0.6)\%$ (wt). Ethanol (PA, Merck, 99.8% purity), isopropyl alcohol (PA, EM Science, 99.8% purity), and their 50:50 mixture were used. Pressures of 200 and 300 bar were tested. Carbon dioxide 99.5% (food grade, White Martins Gases Industriais) was used. The overall extraction curves (OECs) were obtained using the cumulated mass of solute and corresponding time intervals. The samples collected during the decompression step were discharged to build the OECs, while the extract retained in the adsorbent column was considered in the total yield. To evaluate the effects of the solvent flow rate and of the amount of cosolvent, additional experiments were performed at 30 °C, 300 bar, and solvent flow rates of 0.8×10^{-5} to 4.0×10^{-5} kg/s, and the amount of cosolvent (ethanol plus isopropyl alcohol, 1:1 v/v) was varied from 6.7 to 16.1% (wt).

Characterization of the Turmeric Extracts. *Chromatographic Analysis.* The turmeric extracts (volatile oil or extract's light fraction) were analyzed in a gas chromatography–flame ionization (GC-FID) system (Shimadzu, GC-17A, Kyoto, Japan) equipped with a capillary column DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA). The carrier gas was helium (1.7 mL/min, 99.9% pure, White Martins Gases Industriais), and 1 μL of sample was injected. The sample split ratio was 1/35. The column was heated at 50 °C for 5 min, programmed at 5 °C/min to 280 °C, and held at 280 °C for 5 min. The temperatures of the injector and detector were 230 and 250 °C, respectively. The identification and quantification of the chemical constituents were based on the comparison of the substances' retention times with the data for the same system, previously obtained in our laboratory (27).

Thin-Layer Chromatography (TLC). The turmeric extracts were fractionated by TLC. The SFE extracts displacement was compared to that of the HD and Soxhlet extracts. The TLC was performed using silica plates (GF254, Merck 20 cm × 20 cm, 1 mm height, lot 940367895) and a mixture 80:20 of hexane (PA, Merck, lot K24252074732) and ethyl acetate (PA, Merck, lot K25488323837). The plates were revealed with a solution of anisaldehyde.

The quantification of the curcuminoids was done using a spectrophotometer (Hitachi, model 3000, UV–visible, Tokyo, Japan); the absorbance was read at 427 nm. The calibration curve was established using curcuminoids of 90% purity (ITAL, Campinas, Brazil) and the following procedure: 0.0053 g of curcuminoids was diluted to 100 mL with ethanol (99.8% PA, Merck, lot K28659183 104). Aliquots of 2.5 mL (0.25 mL apart) were diluted to 25 mL with ethanol.

Functional Properties of the Turmeric Extracts. To assess the effect of the process on the functional properties of the turmeric extracts, the antioxidant activity (AA) and AC of the extracts were determined. (i) The AA was evaluated using the coupled oxidation of linolenic acid and β-carotene. The methodology of Hammerschmidt and Pratt (28) was used with the required modifications for the SFE extracts (27). The reaction substrate was prepared using 10 mg of β-carotene (99%, Acros, lot B0070834, Pittsburgh, PA), 10 mL of chloroform (99.0% PA, Ecibra, lot 13017, Santo Amaro, Brazil), 60 mg of linolenic acid (99%, Sigma Chemical Co., lot U-59A-D4-G, St. Louis, MO), and 200 mg of Tween 80 (Synth, PA, Diadema, Brazil). The oxidation reaction was conducted using the following procedure: to 1 mL of substrate

Table 1. Composition of Dehydrated Turmeric^a Used in the Present Work: M (Maria da Fé, MG), S (Botucatu, SP); R-S Is the Turmeric Bagasse of Raw Material S

wt %	M	S	R-S
ashes	8.50 ± 0.03	5.915 ± 0.003	7.35 ± 0.03
fibers	3 ± 1	1.6 ± 0.4	2.0 ± 0.3
lipid soluble matter	5.1 ± 0.2	3.4 ± 0.5	0.23 ± 0.05
starch	19 ± 4	34 ± 1	41 ± 3
protein	10.74 ± 0.03	12.2 ± 0.2	14.65 ± 0.05
reducing sugars	7.008 ± 0.003	3.21 ± 0.01	3.20 ± 0.01
moisture (dehydrated turmeric)	8.00 ± 0.02	9.30 ± 0.01	
oleoresin, volatile oil	7.3	7.3	
oleoresin, heavy fraction	1.4	1.4	
not analyzed	30	15	

^a The moisture contents of turmeric M and S in natura were 85.2 and 66.7% (wt, wet basis), respectively.

was added 2 mL of bidistilled water and 0.05 mL of extract diluted in ethanol (99.8% PA, Merck, lot 1216046030, Rio de Janeiro, Brazil) (0.02 g of extract in 1 mL of ethanol). The mixture was set into a water bath (Tecnal, model TE 159) at 40 °C, and the reaction product was monitored using a spectrophotometer (Hitachi, U-3010) at 0, 1, 2, and 3 h of reaction, by taking absorbance readings at 470 nm. (ii) Briefly, the AC was determined as follows (27): Experiments were performed using the following human cancer cell lines: K562 (leukemia), MCF7 (breast), NCIADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI460 (lung), UACC62 (melanoma), OVCAR (ovary), HT29 (colon), PCO3 (prostate), and 786 (kidney). The National Cancer Institute, Frederick, MD (NCI), kindly donated these cell lines, and stock cultures were kept in liquid nitrogen. Cells were cultured in 25 mL flasks (Nunc Brand Products, Roskilde, Denmark) containing 5 mL of RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, São Paulo, Brazil) with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Life Technologies). The sulforodamine B (SRB) assay was performed according to the method of Skehan (29). The cells were fixed by means of protein precipitation with 50% trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Chemical Co.) at 4 °C (50 μL/well, final concentration = 10%) for 1 h. The supernatant was then discarded, and the plates were washed five times with tap water. The cells were stained for 30 min with 0.4% of the SRB (Sigma Chemical Co.) dissolved in 1% acetic acid (50 μL/well) (Sigma Chemical Co.) and subsequently washed four times with 1% acetic acid to remove unbound stain. The plates were air-dried, and bound protein stain was solubilized with 150 μL of 10 mM Trizma buffer (Sigma Chemical Co.). The optical density was read on an automated spectrophotometer plate reader at 540 nm. The assays were performed in triplicate. For cells growing in suspension (e.g., leukemia), the same method was employed, but the TCA concentration was 80%, to fix the cells to the bottom.

Calculation Procedure. Using the experimental data, the OECs were fitted to a spline using two straight lines. The first line was identified with the constant extraction rate period (CER). From the spline, as described by Rodrigues et al. (30), the duration of the CER period (*t*_{CER}) was determined as the time corresponding to the interception of the two straight lines. The slope of the first line was identified as the extraction rate for the CER period (*M*_{CER}). Using *t*_{CER} and *M*_{CER}, the mass ratio of solute (or oleoresin) in the supercritical fluid phase (*Y*_{CER}) at the extractor's outlet and the yield corresponding to the CER period (*R*_{CER}) were calculated. The spline fitting was done using the procedures PROC REG and PROC NLIN of SAS 6.12 (31). The analysis of variance (ANOVA) was also done with SAS 6.12.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Table 1 shows the compositions of the two lots of turmeric used in this work; the compositions of the turmeric bagasses obtained in the SFE are also in the table. Despite being cultivated under different edaphoclimatic conditions, the turmeric compositions were similar, except for the content of starch and moisture.

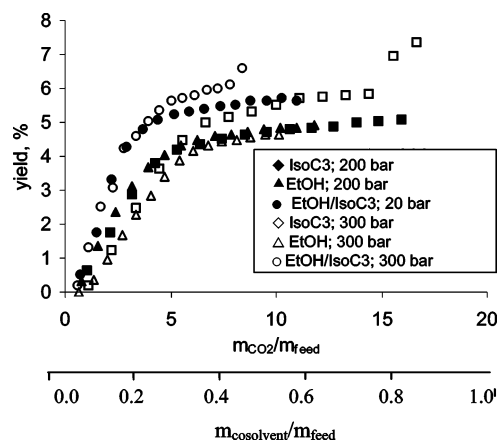


Figure 1. OECs for SFE performed at 30 °C and $6.4 \pm 0.6\%$ (v/v) of cosolvent.

The “not analyzed fraction” in **Table 1** contains starch degradation products formed during the drying process, such as oligosaccharides that were not analyzed. The high contents of starch and protein in the turmeric bagasse indicate that this residue can find an application in food processing. One of the possibilities is to hydrolyze the starch using subcritical water and supercritical CO₂, to obtain oligosaccharides and other glucose derivatives and a novel application that has been successfully used for ginger bagasse (32).

The turmeric particles' true densities were 1301.1 and 1207.0 kg/m³ for turmeric M and S, respectively. The porosity of the bed was kept constant at 0.603 ± 0.005 using a mean particle diameter of 0.690 ± 0.003 mm.

The spline fitting to the OECs (**Figure 1**), as previously described in the literature (19), quantitatively described the experimental data. Therefore, the effects of the pressure and of the type of cosolvents can be assessed using the kinetic parameters shown in **Table 2**. The total yield or yield at the end of the extraction process (R_{TOTAL}) and the content of curcuminoids (CC) are also shown in **Table 2**. At 200 bar, the kinetic parameters (M_{CER} , Y_{CER} , t_{CER} , and R_{CER}), as well as the total yield and the content of curcuminoids, were larger for the EtOH/IsoC3 cosolvent mixture; intermediate values were observed for IsoC3, while the smaller values were obtained for EtOH. Nonetheless, the largest values for the kinetic parameters were obtained at 300 bar using IsoC3, followed by the EtOH/IsoC3 mixture and EtOH. This behavior indicates that the retrograde phenomenon was observed at the conditions used in this study. The solubility of a solute in a supercritical solvent and the global yield (R_{TOTAL}) are influenced by two phenomena: (i) the solute vapor pressure and (ii) the solvent density. The presence of a cosolvent will contribute to a more complex behavior of the system. Thus, at 200 bar, the interactions of

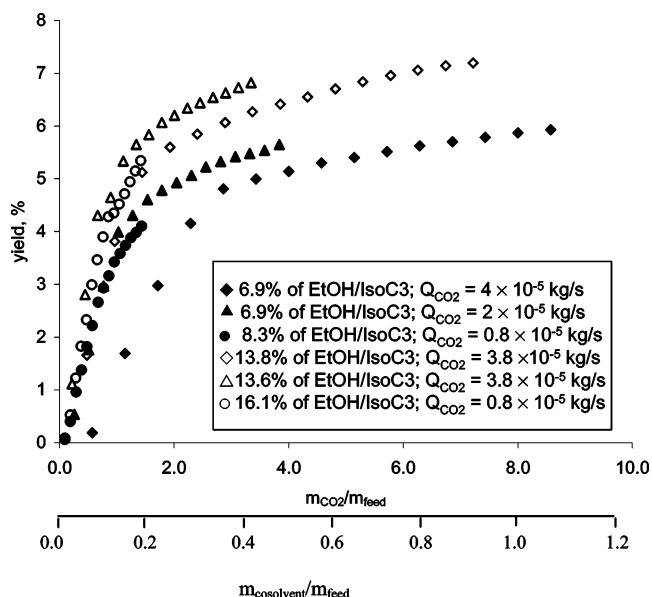


Figure 2. OECs for several operating conditions; SFE done at 300 bar and 30 °C.

the type solute/CO₂/IsoC3 were stronger than that of the type solute/CO₂/EtOH and predominated even for the cosolvent mixture EtOH/IsoC3. At 300 bar, the interactions of the type solute/CO₂/EtOH are probably responsible for the decrease in the kinetic parameters, but it positively affected the total yield and the curcuminoids content.

An ANOVA done for data in **Table 2** demonstrated the effects that the type of cosolvent significantly affected ($p_{value} < 0.10$) all kinetic parameters, except the total yield (R_{TOTAL} , in **Table 2**). The effects of pressure on the kinetic parameters were not significant ($p_{value} > 0.10$) except for R_{CER} ($p_{value} = 0.06$).

On the basis of the results of **Table 2**, a new set of experiments were done using the cosolvent mixture that maximized the global yield (R_{TOTAL}) and the content of curcuminoids (CC). The OECs are in **Figure 2**, and the kinetic parameters are in **Table 3**. Comparing the first two data arrays in **Table 3**, it is observed that doubling the amount of cosolvent increased the yield from 4.9 to 5.9% (wt) (increase of ~20%) and the curcuminoids content from 0.003 to 0.04% (13-fold increase). Doubling the solvent flow rate and keeping the amount of cosolvent approximately constant (the second and third data arrays of **Table 3**) produced a huge increase in the content of curcuminoids, a result consistent with the total amount of solvent mixture (6.6×10^{-3} kg of CO₂ + 29.25×10^{-3} kg of EtOH/IsoC3). Increasing the solvent flow rate even further, but keeping the amount of cosolvent constant, negatively affected the content

Table 2. Operational Conditions and Kinetic Parameters for SFE Assays Using Turmeric M^a

ϵ	$Q \times 10^5$ (kg/s)	cosolvent	$M_{CER} \times 10^7$ (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^7$ (kg/s)	$t_{CER}/60$ (s)	R_{CER} (%)	R_{TOTAL} (%)	CC (%)
pressure of 200 bar $\rho_{CO_2} = 890.7$ kg/m ^{3b}								
0.66	4.7	EtOH	5.2	1.8	135	4.1	5.8	0.0005
0.63	4.2	IsoC3	7.6 ± 0.3	3.0 ± 0.1	105 ± 8	4.3 ± 0.5	5.7 ± 0.3	0.0007
0.67	4.4	EtOH/IsoC3	7.8	3	111	4.5	5.9	0.0083
pressure of 300 bar $\rho_{CO_2} = 948.3$ kg/m ^{3b}								
0.66	4.1	EtOH	3.6	1.4	210	4.3	5.8	0.0006
0.57	4.2	IsoC3	7.7 ± 0.6	3.5 ± 0.4	131 ± 26	4.8 ± 0.2	8.0 ± 0.4	0.0041
0.65	3.5	EtOH/IsoC3	6.3	3.0	138	4.8	7.8	0.0152

^a Raw material = M; mean particle diameter = 0.7 mm; 30 °C; $Q_{CO_2} = (4.2 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ kg/s; 1300 kg/m³ (true density); $(6.4 \pm 0.6)\%$ (v/v) of cosolvent. ^b Carbon dioxide density.

Table 3. Kinetics Parameters for the Assays Performed with Raw Material S at Various Solvent Flow Rates and Amounts of Cosolvent^a

$Q \times 10^5$ (kg/s)	$m_{CO_2} (t_{CER}) \times 10^3$ (kg)	cosolvent (%)	$M_{CER} \times 10^7$ (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^7$ (kg/s)	$t_{CER}/60$ (s)	R_{CER} (%)	R_{TOTAL} (%)	CC (%)
0.8	83	8.3	3.	6.6	192	2.8	4.9	0.003
0.8	82	16.1	3.7	8.6	200	3.9	5.9	0.04
1.9	88	13.6	11	10.2	88	4.6	7.9	0.12
2.0	119	6.7	7.6	6.7	108	4.1	6.3	0.01
3.8	160	13.8	11.8	5.6	81	5.2	7.8	0.06
4.0	254	6.9	8.7	3.7	112	4.5	6.3	0.04

^a Raw material = S; $T = 30$ °C; $P = 300$ bar; cosolvent = 1:1 (v/v) EtOH/IsoC3; 1210 kg/m^3 (true density); $\epsilon = 0.54$; average particle diameter of 0.69 mm.

Table 4. Yields and Curcuminoids Content Obtained by HD and Soxhlet for Turmeric and Turmeric Bagasse^a

solvent	yields (dry basis) (%)					curcuminoids content (dry basis) (%)				
	EtOH/IsoC3				EtOH	EtOH/IsoC3				EtOH
	LPSE		Soxhlet			LPSE		Soxhlet		
raw material	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
M	9 ± 1	8.15 ± 0.02	21 ± 1	17 ± 2	21 ± 1	2.1 ± 0.5	0.34 ± 0.04	4.38 ± 0.02	5 ± 1	0.42
S	13 ± 2	7.5 ± 0.4	16 ± 1	15 ± 5	27 ± 2	3.1 ± 0.2	0.50 ± 0.01	8.43 ± 0.16	6.3 ± 0.7	0.38
R-M ^a			9.4 ± 0.1		26 ± 5			3.7 ± 0.4		1.4 ± 0.2
R-S ^a			10.3 ± 0.2		31 ± 12			3.9 ± 0.5		6.0 ± 0.8

^a R-M and R-S mean turmeric bagasse from raw materials M and S, respectively, which resulted from the SFE performed using CO_2 and the cosolvent mixture of EtOH/IsoC3; solvent flow rates were 4.4×10^{-5} and 3.5×10^{-5} kg/s for raw materials M and S, respectively.

of curcuminoids (compare the third and the fifth data array of **Table 3**), although the total yield was approximately constant. This trend can be explained by considering that as the flow rate increased, the residence time of the solvent inside the extraction cell decreased, thus the time allowed for the interactions of the type solute/solvent decreased. Therefore, if diffusive phenomena are associated with the extraction of curcuminoids, which can happen depending on the location of curcuminoids rich cells, then the solvent flow rate should be carefully selected.

Table 4 shows the yields and the CC content obtained by the conventional processes of LPSE and Soxhlet extraction. The HD yields were 2.1 ± 0.5 (wt, dry basis) and $3.1 \pm 0.5\%$ (wt %, dry basis), for turmeric M and S, respectively; only traces of curcuminoids were detected in the HD extracts ($\sim 2 \times 10^{-4}\%$ [wt, dry basis]). The data in **Tables 2–4** show that the largest yield was obtained for turmeric S using the Soxhlet, EtOH, and feed to solvent ratio of 1:100. The smallest yield was determined for the raw material M in the HD process. Soxhlet extraction from turmeric S bagasse resulted in a yield of 31% (wt). Because of the low CC% in the SFE extracts, the CC% was considerably high in the turmeric bagasse Soxhlet extract. Nevertheless, increasing the feed to cosolvent ratio increased both the yields (R_{TOTAL} in **Table 3**) and the CC content; yet, the amount of cosolvent used was 10–100 times smaller than the amount of solvent used in the Soxhlet and LPSE processes. This explains the low CC content in the SFE extracts, despite the comparable yields of the SFE and LPSE_{1:10} extracts.

TLC of the extracts showed that the Soxhlet extracts contained high molecular weight compounds as compared to the SFE extracts. **Table 5** shows the composition of the SFE, HD, LPSE, and Soxhlet extracts. The composition of the Soxhlet (1:100) was entirely different from the other extracts. The compositions of the HD and LPSE extracts were similar in chemical composition to the SFE extracts. For the SFE extracts, the relative proportions of ar-turmerone, (Z)- γ -atlantone, and (E)- γ -atlantone, the three major compounds detected in the turmeric volatile oil, represented $\sim 60\%$ (area %) of the extracts. This remained approximately constant for all conditions tested.

However, the relative proportions of these three compounds varied within each condition. For SFE using EtOH, the relative proportions of the three compounds varied from 28 (ar-turmerone) to 20% (E)- γ -atlantone). For the extracts obtained with IsoC3, the relative proportion of (Z)- γ -atlantone reached 39.5% at 300 bar, and the relative proportions of the other two compounds (ar-turmerone and (E)- γ -atlantone) were approximately constant (15–18%). For the other substances, a small increase in the relative proportions with pressure was observed; the largest relative proportion of (Z)- γ -atlantone was detected at 300 bar. The behavior of the SFE extracts obtained using the EtOH/IsoC3 mixture was similar to that of the CO_2 /IsoC3. The relative proportion of (Z)- γ -atlantone in the HD extract was 1–2 times larger than that of the SFE extracts.

The effects of the extraction kinetics (solvent flow rate) and the cosolvent amount on the composition of the SFE extracts are presented in **Table 6**. As expected, the solvent flow rate did not affect the composition of the SFE extracts. Data in **Tables 2–4** show that the amount of cosolvent or solvent (LPSE and Soxhlet) affected appreciably the yields and the CC content, but the same trend was not observed for the light fraction in the SFE extracts (the fraction that contains the compounds quantified by GC-FID).

The AAs of the turmeric extracts, expressed as % of inhibition of oxidation, are in **Table 7**. The SFE conditions slightly affected the AA, which varied from 15 to 25% of inhibition of oxidation for the first hour of reaction, increasing up to 28 and 43% after 3 h of oxidation reaction. Despite the absence of curcuminoids in the HD extracts, their AAs were considerably elevated as compared to the SFE extracts, but their AAs decreased over long reaction periods. The Soxhlet_{1:100} extracts were very effective (elevated AA) for short reaction periods, and the AA slightly decreased for long reaction periods. The LPSE_{1:100} extracts were the most effective antioxidant, since their AAs were larger than 60% of inhibition of oxidation and increased up to 70% after 3 h of reaction. However, the ratio of solid to solvent used was too high (1:100) for commercial utilization. A comparison of the AAs for the Soxhlet_{1:100} and the LPSE_{1:100} with the data in **Tables 4** and **5** shows that a

Table 5. Composition of the Turmeric Extracts (Volatile Fraction) Obtained by SFE, HD, Soxhlet, and LPSE^a

substances	process						HD	Soxhlet (1:100)	LPSE
	SFE								
	EtOH		IsoC3		EtOH/IsoC3				
	pressure (bar)								
	200	300	200	300	200	300			
relative proportion (area %)									
α -pinene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	2.7		
1,8-cineole	tr	tr	0.18	tr	tr	tr	1.4		
<i>trans</i> -caryophyllene	tr	tr	0.3	0.4	0.5	0.4	tr		tr
Ar-curcumene	2.3	2.0	0.8	1.0	0.9	0.9	1.0		1.5
α -zingiberene	1.6	1.9	2.0	2.4	2.1	2.2	2.4		2.5
β -bisabolene	tr	0.5	0.3	0.4	0.5	0.4	tr		0.7
β -sesquiphellandrene	2.4	2.6	1.7	2.0	1.9	1.9	1.9		2.9
Ar-turmerol	1.2	1.0	0.7	0.8	0.8	0.7	1.1	6.5	tr
Ar-turmerol isomer	1.3	1.1	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7		tr
Ar-turmerone	28.1	26.9	15.4	15.1	15.6	15.0	18.0		21.6
(<i>Z</i>)- γ -atlantone	24.2	24.7	35.4	39.5	35.1	36.2	44.0		33.4
(<i>E</i>)- γ -atlantone	20.3	19.8	16.9	18.0	17.2	17.1	18.3		18.7
dihydro-Ar-turmerone	tr	tr	0.4	0.4	tr	0.4	tr		tr
1-epi-cubenol	tr	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6		tr
6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> -bisabolone	1.18	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6		0.8
(<i>Z</i>)- α -atlantone	tr	0.5	0.5	0.4	0.5	1.7	0.6	17.0	0.8
(<i>E</i>)- α -atlantone	tr	tr	0.6	0.7	0.6	0.9	0.6		0.3
ni <	14.8	15.6	21.9	16.1	21.2	19.3	4.9	76.5	16.8

^a tr = % < 0.34; ni = nonidentified.**Table 6.** Composition of the Turmeric Extract as a Function of Flow Rate and Cosolvent Percent Obtained by SFE at 30 °C, 300 Bar, and Different Conditions of Process^a

solvent flow rate (kg/s)	relative proportion (area %) at					
	3.8×10^{-5}	4.0×10^{-5}	1.9×10^{-5}	2.0×10^{-5}	0.8×10^{-5}	0.8×10^{-5}
cosolvent (%)	13.78	6.95	13.59	6.66	16.11	8.32
substances						
α -pinene	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	0.91	tr	tr	tr	tr	tr
<i>trans</i> -caryophyllene	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumen	1.04	1.09	1.01	0.91	0.99	1.02
α -zingiberene	2.11	1.88	2.22	2.04	2.25	2.34
β -bisabolene	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β -sesquiphellandrene	2.01	1.82	1.97	1.93	2.12	2.19
Ar-turmerol	1.21	1.00	tr	1.03	1.00	0.99
Ar-turmerol isomer	tr	tr	tr	0.68	tr	tr
Ar-turmerone	20.17	18.25	19.32	17.703	17.91	17.68
(<i>Z</i>)- γ -atlantone	44.50	41.53	44.16	41.52	42.59	42.95
(<i>E</i>)- γ -atlantone	22.13	20.97	22.13	20.68	21.02	21.02
dihydro-Ar-turmerone	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> -bisabolone	1.04	1.07	1.07	1.09	1.03	0.98
(<i>Z</i>)- α -atlantone	0.92	tr	tr	tr	tr	tr
(<i>E</i>)- α -atlantone	1.47	tr	tr	0.64	tr	tr
ni <	3.49	12.39	8.12	11.77	11.09	10.83

^a tr = % < 0.64; ni = nonidentified.

similar AA was detected despite the differences in CC content and volatile fraction composition. Therefore, the AAs of these extracts may be related to other compounds that were not detected by the analytical tools used (CG-FID and UV) in the present work to analyze the extracts.

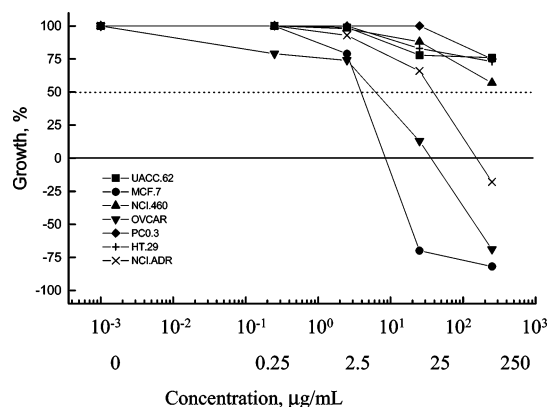
Turmeric extracts have AC that begins at 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and exhibits cytostatic and cytolytic effects (27); the concentration at which the cytolytic effect began was specific for each cell line. **Figure 3** shows the results for the anticancer tests performed with the turmeric volatile oil (HD). Because the extract is considered to be active if its inhibition of growth is >50%, a dashed line was placed in the figure. As can be observed, the cytolytic effect of the HD extract started at 25 $\mu\text{g/mL}$ for the breast (MCF-7) and ovary (OVACAR); for the

breast expressing the multidrug resistance phenotype (NCIADR), the cytolytic effect started at an extract concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, the turmeric volatile oil AC was lower than that of the SFE extracts (27); nonetheless, it was selective. The ACs of the curcuminoids mixture used as standard were not specific and started at 25 $\mu\text{g/mL}$, except for the lung cell (NCI.460), for which the cytolytic effect was observed at this concentration.

From these results, it is seen that a selection of the process to obtain turmeric extracts is dependent on the proposed use of the turmeric extracts. Despite the larger yields detected for the Soxhlet process, the light fraction was lost during processing (**Table 5**). On the other hand, the LPSE and the SFE processes produced extracts of similar composition, but LPSE was shown

Table 7. AA of *C. longa* Extracts Obtained with Different Methods

extract identification	inhibition of oxidation (%) at		
	1 h	2 h	3 h
raw material M			
SFE: cosolvent/pressure (bar)			
EtOH 200 bar	20	28	32
EtOH 300 bar	20	27	30
IsoC3 200 bar	23	34	39
IsoC3 300 bar	24	35	41
EtOH/IsoC3 200 bar	23	37	43
EtOH/IsoC3 300 bar	25	38	43
HD	43	31	25
Soxhlet EtOH/IsoC3 (1:100)	60	56	53
CC (standard)	43	39	39
LPSE EtOH/IsoC3 (1:100)	65	69	70
raw material S			
SFE: solvent flow rate (kg/s), % EtOH/IsoC3			
0.8×10^{-5} , 8.32	15	23	28
0.8×10^{-5} , 16.11	19	29	35
2.0×10^{-5} , 6.66	19	28	33
1.9×10^{-5} , 13.59	18	29	35
4.0×10^{-5} , 6.95	17	27	33
3.8×10^{-5} , 13.78	19	32	39
HD	44	33	28
Soxhlet, EtOH/IsoC3 (1:100)	56	50	47

**Figure 3.** AC as a function of cancerous cellular ancestries for turmeric essential oil: UACC.62 (melanoma), MCF.7 (breast), NCI.460 (lung), OVCAR (ovary), PC0.3 (prostate), HT.29 (colon), and NCI.ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype).

to be in advantage with respect to the SFE process with respect to the yield of the CC%. Nevertheless, the LPSE and Soxhlet processes will require more solvent, and so, the SFE process is advantageous compared to them, when the costs of elimination of the cosolvent or of the solvent are considered. At this point, none of the studied processes should be abandoned. However, a cost of manufacturing analysis would be required in order to select the appropriate and economical process.

ACKNOWLEDGMENT

M.E.M.B. is presently working for her Ph.D. in Food Engineering. We are grateful to L. K. Kohn and M. A. Antônio for the help with the anticancer tests.

LITERATURE CITED

- Hallagan, J. B. The use of certified food color additives in the United States. *Cereal Foods World* **1991**, 36, 945–946.
- Govindarajan, V. S. Turmeric-Chemistry, Technology, and Quality. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; Furia, T. C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1980; Vol. 12, No. 3, p 102.

- Taylor, S. J.; McDowell, I. J. Determination of the Curcuminoids Pigments in Turmeric (*Curcuma domentica* Val.) by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cromatographia* **1992**, 34, 73–87.
- Priyadarsini, K. I. Free Radical Reactions of Curcumin in Membrane Models. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 23, 838–843.
- Srinivasan, K. R. Chromatographic study of the curcuminoids in *Curcuma longa* L. *J. Pharm. Pharmacol.* **1953**, 5, 448–457.
- Mathai, C. K. The pattern of rhizome yield and their accumulation of commercially important chemical constituents in Turmeric during growth and development. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* **1979**, 36, 215–219.
- Kelkhar, N. C.; RAO, B. S. Studies in Indian essential oils from rhizomes of *Curcuma longa* Linn. *J. Indian Inst. Sci.* **1934**, 17A, 7–24.
- Montaldo, A. *Cultivo de Raíces y Tubérculos Tropicales*; Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA: Lima, Peru, 1972; p 257.
- Chun, K.; Sohn, Y.; Kim, H.; Kim, O.; Park, K.; Lee, J.; Lee, J.; Lee, J.; Moon, A.; Lee, S.; Surh, Y. Antitumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. *Mutat. Res.* **1999**, 428 (1), 49–57.
- Araújo C. A. C.; Leon, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2001**, 96, 723–728.
- Gomes, D. C.; Alegrio, L. V.; De Lima, M. E.; Leon, L. L.; Araujo, C. A. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittelforschung* **2002**, 52, 120–124.
- Saleheen, D.; Ali, S. A.; Ashfaq, K.; Siddiqui, A. A.; Agha, A.; Yasinzai, M. M. Latent activity of curcumin against *Leishmaniasis in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 386–389.
- Began, G.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T. Response Surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int.* **2000**, 33, 341–345.
- Méndez, A. L. C.; Machado, N. T.; Araújo, M. E.; Maia, J. G. S.; Meireles, M. A. A. Supercritical CO₂ Extraction of Curcumin and Essential Oil from the Rhizomes of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, 4729–4733.
- Chang, C. J.; Chiu, K.; Chen, Y.; Chang, C. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. *Food Chem.* **2000**, 68, 109–113.
- Wang, H.; Chen, C.; Chang, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. *Food Chem.* **2001**, 72, 505–509.
- Badalyan, A. G.; Wilkinson, G. T.; Chun, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol enter-tainer. *J. Supercrit. Fluids* **1998**, 13, 319–324.
- Rónyai, E.; Simándi, B.; Tömösközi, S.; Deák, A.; Vigh, L.; Weinbrenner, Zs. Supercritical fluid extraction of corn germ with carbon dioxide-ethyl alcohol mixture. *J. Supercrit. Fluids* **1998**, 14, 75–81.
- Zancan, K. C.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and cosolvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *J. Supercrit. Fluids* **2002**, 24, 57–76.
- Guan, B.; Han, B.; Yan, H. Effect of acetic acid + acetonitrile and ethanol + acetonitrile mixed cosolvents on the solubility of stearic acid in supercritical CO₂. *Fluid Phase Equilib.* **1998**, 149, 277–286.
- Jacobs, M. B. *The Chemical Analysis of Food and Food Products*, 3rd ed.; Robert Krieger Publishing: New York, 1973.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., 3rd rev.; Cunniff, P., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MA, 1997; Vol. 2, pp 9, 12, 25.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., 3rd rev.; Cunniff, P., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MA, 1997; Vol. 1, pp 4A, 18.

- (24) Nelson, N. A. A photometric adaptation for Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **1994**, *153*, 375–380.
- (25) American Society of Agricultural Engineers (ASAE). *Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving*; ASAE Standard S319.2, 40th ed.; American Society of Agricultural Engineers Standard: St. Joseph, MI, 1993; pp 447–448.
- (26) Pasquel, A.; Meireles, M. A. A.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J. Extraction of stevia glycosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol, and CO₂ + water + ethanol. *Braz. J. Chem. Eng.* **2000**, *17*, 271–279.
- (27) Leal, P. F.; Braga, M. E. M.; Sato, D. N.; Carvalho, J. E.; Marques, M. O. M.; Meireles, M. A. A. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2520–2525.
- (28) Hammerschmidt, P. A.; Pratt, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 556–559.
- (29) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 1107–1118.
- (30) Rodrigues, V. M.; Rosa, P. T. V.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L.) using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 1518–1523.
- (31) Freud, R. J.; Little, R. C. SAS System for Regression. *SAS Series in Statistical Applications*, 2nd ed.; SAS Institute: Cary, NC, 1995; p 211.
- (32) Moreschi, S. R. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. Hydrolysis of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Starch: search for process conditions using the surface response methodology. In *Proceedings of the 6th Symposium on Supercritical Fluids*, 2003, Versailles, France, Tome 1, pp 213–218.

Received for review May 27, 2003. Revised manuscript received August 11, 2003. Accepted August 17, 2003. M.E.M.B. thanks FAPESP for the M.S. and Ph.D. assistantships (99/11798-4 and 02/01608-8), and P.F.L. thanks FAPESP for the M.S. assistantship (02/12001-7). Financial support for this work came from FAPESP (1999/01962-1).

JF0345550

Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition

Mara E.M. Braga^a, Polyana A.D. Ehlert^b, Lin C. Ming^b, M. Angela A. Meireles^{a,*}

^a LASEFI-DEA/FEA (College of Food Engineering), UNICAMP (State University of Campinas), Cx. Postal 6121, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

^b Plant Production Department, Agronomy Science College, São Paulo State University (UNESP), Cx. Postal 237, 18603-970 Botucatu, São Paulo, Brazil

Abstract

In this work, experimental data for the system *Lippia alba* + CO₂ is presented. The major constituents of the *L. alba* volatile oil are limonene and carvone. Thus, literature data for the systems limonene + CO₂ and carvone + CO₂, and the Peng–Robinson equation of state (PR-EOS) were used to select the operating temperature and pressure, which maximize the global yield in *L. alba* extract. Global yields were determined at 80, 100, and 120 bar and 40, 45, and 50 °C. *L. alba* extracts were also obtained by conventional processes (hydrodistillation, low-pressure ethanol extraction and Soxhlet (ethanol)). The chemical compositions of the extracts were determined by gas and thin layer chromatography (TLC). The secretor structures of *L. alba* were observed by scanning electron microscopy (SEM) before and after supercritical extraction. The largest yield (~7%, mass of extract/mass of dry solid) of the CO₂-extract was obtained at 318 K and 100 bar. The chemical compositions of the CO₂-extracts were different from those of the extracts obtained by Soxhlet and low-pressure solvent extraction (LPSE) because of the co-extraction of heavy substances by ethanol. The operating conditions that maximized the carvone and limonene yields were 80 bar and 323 K (80 mass%) and 120 bar and 323 K (17 mass%), respectively.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carvone; Extraction kinetics; Phase equilibrium; Limonene; *Lippia alba*; Supercritical fluid extraction

1. Introduction

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown belongs to the Verbenaceae family; it is used in medicine of Central and South America and tropical Africa for treatment of gastrointestinal disorders, because of its antiulcerogenic activity. The species of the genus *Lippia* are mainly distributed throughout South and Central America countries, and tropical Africa territories. This genus includes approximately 200 species of herbs, shrubs and small trees [1]. There are few published studies about the chemical composition and pharmacological aspects of the genus *Lippia*.

Few pharmacological studies have been done on the genus *Lippia*. Among these, the studies on the species *Lippia multiflora* Moldenke and *L. alba* (Mill.) N.E. Brown [2] are included. The leaves or aerial parts and the flowers were used; the extracts were prepared by infusion or decoction,

and administered orally. The species *L. alba* is employed in Guatemala, Venezuela, and Brazil as a remedy for colds, grippe, bronchitis, coughs and asthma [3], stomach ache and indigestion [4]. It can act as a carminative [5], and in Central America and Brazilian Amazon, it is employed to treat hepatic diseases [6], syphilis [7], diarrhea and dysentery [8].

Anticonvulsant and cytostatic effects were reported (López et al. 1979, cited by Pascual et al. [2]). The behavioral effects (anxiolytic, locomotor activity, myorelaxant) of the volatile oil from *L. alba* (Mill.) N.E. Brown in mice were studied [9]. The antiulcerogenic activity of *L. alba* was studied by oral administration of infusion: *L. alba* was found to be effective in preventing gastric ulceration induced by indomethacin [10]. *L. alba* was also studied for the development of drugs for the treatment of the cognitive deficits of Alzheimer's disease (a neurodegenerative disease characterized by cognitive impairment and personality changes). The leaves extract (2.1 mg of extract/mL of ethanol) inhibited 12% of the activity of acetylcholinesterase by Ellmann's microplate assay [11].

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 4033; fax: +55 19 3788 4027.
E-mail address: meireles@fea.unicamp.br (M.A.A. Meireles).

The two major compounds found in *L. alba* extracts are limonene and carvone [12]. The most important technical application of carvone is its use as a reversible suppressant of sprouting in stored potatoes or flowers bulb [13], but carvone has potential uses for inhibiting the growth of the bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* [14] and antifungal activity [15] at concentrations above 1 nM [13]. The antioxidant activity from *L. alba* volatile oil (20 g of extract/L buffer) obtained by hydrodistillation was 78.5%. This activity is similar to that of Vitamin E (75.5%) [12].

Carvone and limonene were extracted from caraway seed (*Carum carvi* L.) with supercritical CO₂. The process conditions have been optimized with respect to pressure, temperature, CO₂ flow rate, and extraction time. The highest yields in carvone and limonene were obtained at 125 bar, 305 K, CO₂ flow rate of 4 kg/s, and extraction time above 45 min [16].

Stashenko et al. [12] analyzed *L. alba* extracts obtained by different techniques at 60 L/L of CH₂Cl₂ by GC, and the results showed that the content of carvone and limonene varied according to the technique used: hydrodistillation (51 and 32.6% area, respectively), microwave-assisted hydrodistillation (57.2 and 29.6% area, respectively), simultaneous distillation solvent extraction (45.1 and 36.9% area, respectively) and supercritical fluid extraction (SFE) (40 and 23.9% area).

Kim and Hong [17] studied the phase behavior of the binary systems: L-carvone–CO₂ and L-limonene–CO₂ at 312 and 322 K with pressure ranging from 60 to 100 bar. The solubilities of the substances in CO₂ increased as the pressure increased and the temperature decreased.

The objectives of this work were to investigate the influence of temperature and pressure in the supercritical fluid extraction of *L. alba*, in order to detect the operating conditions that maximize the global yield, to search for operating conditions that maximize the extraction of the target components carvone and limonene, and to compare the SFE extract's chemical composition with the chemical composition of extracts obtained by hydrodistillation and low-pressure ethanol extraction.

2. Materials and methods

2.1. Raw material characterization

The raw material was cultivated at the Experimental Farm of Lageado (Plant Production Department, Agronomy Science College/UNESP, Botucatu, Brazil). The harvested plants were classified according to the biomass production and volatile (essential) oil content. The plants producing the largest amount of biomass and containing the largest amount of volatile oil and carvone and limonene were selected for this work. The productivity of *L. alba* was 0.7 tonnes/ha; the leaves were 205 days old when harvested. The content of volatile oil (hydrodistillation) was 0.5%; its contents of carvone and limonene were 49.3 and 27.5%, respectively. The

L. alba was dried up to an humidity of 8.6% (wet basis) determined by the xylol distillation method [18]. The material was comminuted in a knife mill (Tecnal, model TE-631, Piracicaba, Brazil) and the particle size distribution of the solid was determined using an agitator (Bertel, model 1868, Caieiras, Brazil), for 10 min, containing sieves of the Tyler series meshes 24, 32, and 48.

2.1.1. Microscopy procedure

The secretor structures were observed by scanning electronic microscopy (SEM) (Jeol, model SM 5800 LV, Tokyo, Japan) at accelerating potential of 15 kV. The samples were fixed above the aluminum stubs with adhesive tape and covered by gold. The analyses were done at Laboratory of Electronic Microscopy of the Biology Institute, UNICAMP. The samples were observed before and after the SFE process, in order to examine the influence of pressure on the secretor structures.

2.2. Extraction methodologies

L. alba extracts were obtained by SFE, low-pressure solvent extraction (LPSE), Soxhlet, and hydrodistillation.

2.2.1. Supercritical fluid extraction

The SFE assays were done using a unit containing an extraction cell of approximately $221 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ (length of $37.5 \times 10^{-2} \text{ m}$, internal diameter of $2.74 \times 10^{-2} \text{ m}$) and maximum allowable pressure of 400 bar, similar to the apparatus described by Braga et al. [20]. The bed was formed with 0.003 kg of particle of meshes 24–48 inside a nylon basket (mesh 80); the apparent bed density was kept constant at 318.4 kg/m^3 . To fill the extraction vessel completely, its remaining empty space was filled with glass beads of meshes 8–10. The solvent was CO₂ 99.5% (Gama Gases Especiais, Campinas, Brazil). The extractions were exhaustive and continued for 300 min. The solute/solvent separation system consisted of a micrometering valve, a separation tank (10 mL glass flasks), and a glass column packed with Porapak Q (80/100 mesh, Supelco Park, Bellefonte, USA); the adsorption or capture column was used to prevent losses of extract in the solvent stream. The tubing line after the extraction column was washed with ethanol to recover the extract deposited on it. The solvent was separated from the extract using a rotovap (Laborota, model 4001, Viertrieb, Germany) with vacuum control (Heidolph Instruments GMBH, model Rotovac control, Viertrieb, Germany). The total extract mass was determined by the sum of the extract obtained during the extraction, the extract retained in the adsorption column, the extract recovered in the cleaning and depressurization processes. The global yield, that is, the total amount of extractable solute was calculated as the ratio between the total extract mass and the mass of feed (dry basis).

Considering that limonene and carvone are the major compounds of *L. alba* and that it is interesting to work at or near the temperature and pressure of maximum solubility to improve

extraction, in order to choose the operating temperature and pressure, phase equilibrium diagrams were calculated for the binary systems limonene–CO₂ and carvone–CO₂. The binary interaction parameters of the Peng–Robinson equation of state (PR-EOS) were determined using the experimental data of Gamse and Marr [19] at 303 K; the data were fitted using the software Edeflash v 1.0 and the critical properties of the pure substances were calculated by the Joback's method using the software Termofis v 1.0. Both softwares were developed in LASEFI-DEA/FEA, UNICAMP. Based on the phase equilibrium information, the assays were done accordingly with a factorial design with two levels of temperature (313 and 323 K), two levels of pressure (80 and 120 bar) and a central point at 318 K and 100 bar; the assays were replicated at the central point.

2.2.2. Conventional extraction procedures

The low-pressure solvent extraction was done using *L. alba* particles of meshes 24–48 at ambient temperature (298 K) and pressure (0.935 bar) in a fixed bed extractor (glass column of length of 30×10^{-2} m and internal diameter of 2.8×10^{-2} m). The fixed bed was formed inside a nylon basket (mesh 80). The solvent flow was controlled by a Masterflex Pump Controller (Cole Parmer Instrument Co., Chicago, USA); ethanol 96% (Merck, São Paulo, Brazil) was used, and the employed solid to solvent ratio was 1:10. The system was kept under operation for 180 min. The ethanol was removed from the extract using a rotavap (Laborota, model 4001, Viertrieb, Germany) with vacuum control (Heidolph Instruments GMBH, model Rotavac control, Viertrieb, Germany).

The oleoresin (ethanolic extract) was obtained in a Soxhlet apparatus as follows: 0.003 kg of *L. alba* of meshes 24–48 and 150 mL of ethanol (96%, Merck, São Paulo, Brazil) were placed inside a Soxhlet apparatus and kept under reflux for 180 min. The ethanol was removed from the extract using a rotavap (Laborota, model 4001, Viertrieb, Germany), with vacuum control (Heidolph Instruments GMBH, model Rotavac control, Viertrieb, Germany).

The volatile oil (essential) was obtained by hydrodistillation using 0.003 kg of *L. alba* of meshes 24–48; the extraction continued for 120 min. The AOAC 962.17 method [21] was used.

2.3. Characterization of the extract: chemical composition

The extracts were fractionated by thin layer chromatography (TLC) performed using silica gel plates (2 cm × 20 cm, 1 mm of height, Merck, lot 940378601, USA) and a mixture 80:20 of hexane (96% purity, PA, Merck, lot K28659183 104, USA) and ethyl acetate (99.5% purity, PA, Merck, lot K225488323 837, Germany) as the mobile phase. The plates were revealed with anisaldehyde solution (0.5 mL of anisaldehyde, 10 mL of acetic acid glacial, 85 mL of methanol and 5 mL of sulfuric acid).

The chemical compositions of the extracts were evaluated using a gas chromatographer with a flame ionization detector (GC/FID, Shimadzu, model 17A, Kyoto, Japan), equipped with a capillary column of fused silica DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, USA). The carrier gas was helium (1.7 mL/min, 99.99% purity, White Martins Gases Industriais, Campinas, Brazil). The injector and detector temperatures were 523 and 503 K, respectively. The temperature programming was 323, 50–553 K at 5 K/min, and kept at 553 K for 5 min. The sample split ratio was 1:30. Samples of 1 mL of extract diluted in ethyl acetate (5×10^{-6} kg of extract diluted in 1×10^{-3} kg ethyl acetate; chromatographic grade, EM Science, lot 3903991, USA) were injected. The identification of the substances was based on comparison of the extract's chromatogram to *L. alba* chromatogram from the literature [22]. Limonene and carvone were quantified using the standards (R)-(–)-carvone (Aldrich, 98% lot 24627PI-303) and (R)-(+)-limonene (Aldrich, 97%, lot 03818JB-343) diluted in ethyl acetate (EM Science, lot 3903991).

2.4. Calculation procedures

The overall extraction curves (OEC) were constructed using the cumulated mass of extract collected at a given extraction time interval; therefore, the masses collected in the adsorption column as well as the ones collected in the cleaning and depressurization processes were not used. The OECs were fitted to a spline using two straight lines. The first line was identified with the constant extraction rate period (CER). From the spline, the extraction rate for the CER period (M_{CER}) was computed, as well as the length of the CER period (t_{CER}), or the time corresponding to the interception of the two lines using the procedure described by Rodrigues et al. [23]. The spline fit was done using the procedures PROC REG and PROC NLIN of SAS 6.12 [24]. The mass ratio of solute in the supercritical phase at the measuring-cell outlet (Y_{CER}) was obtained dividing M_{CER} by the mean solvent flow rate (Q_{CO_2}) for the CER period. The effects of temperature and pressure on the global yield were evaluated by an analysis of variance (ANOVA) performed using the software Minitab 12.

3. Results and discussions

Raeissi and Peters [25] studied the phenomenon of double retrograde vaporization in the binary system ethane–limonene. These authors reported bubble, dew, and critical point data for the binary system at five different compositions ranging from 99.50 to 99.93 mol% of ethane, and temperatures of 280–330 K and pressure of 30–60 bar. The system exhibited triple- and quadruple-valued dew points at certain concentrations; the binary system also showed the phenomenon of double retrograde vaporization. The authors' explanation was that: double retrograde vaporization occurs

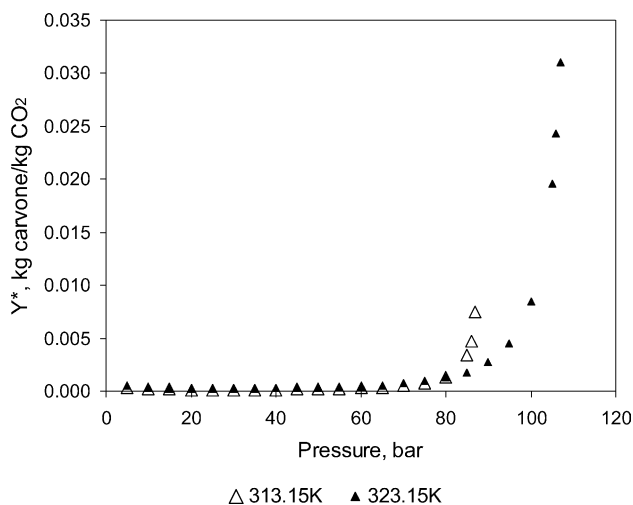


Fig. 1. Solubility of carvone in CO₂ calculated by the PR-EOS.

within very limited ranges of composition and temperature, and very close to the critical point of the more volatile component; it is the result of the continuous phase transition from the critical point of a pure volatile component to the critical point of the mixture, very highly concentrated with the more volatile component. The authors [25] believe that this is a normal behavior, which always occurs in binary mixtures in which the two components differ largely in molecular size; accordingly with the authors, because the region that it occurs is so small, it is easily missed experimentally. Their results indicated that a very minor change in the concentration can vary the shape of the dew point curve significantly; they showed quantitatively how small the temperature range for double retrograde vaporization is. The knowledge of the phase equilibrium behavior of the major compounds of *L. alba* extracts can provide useful information to avoid operating the SFE system at regions near the double retrograde vaporization and to identify the conditions in which solubility is expected to be at the maximum. The calculated phase equilibria for the systems carvone + CO₂ and limonene + CO₂, plotted as pressure–solubility graphics are shown in Figs. 1 and 2. Figs. 1 and 2 indicate that temperatures in the range of 313 and 323 K (higher temperatures can volatilize the compounds) and relatively low pressures (around 80 and 100 bar) should be used. Souza et al [26] showed that a two liquid phase split occurred for the system clove oil + CO₂ at narrow range of operating conditions. Indeed, the operating conditions used by Rodrigues et al. [27] for the system clove buds + CO₂ were just inside the two liquid phase region determined by Souza et al. [26]. The behavior of the system the *L. alba* + CO₂ can be expected to be similar to that of clove buds + CO₂.

The global yields, X_0 (Table 1) remained approximately constant at 80 bar as the temperature increased from 313 to 323 K and the CO₂ density decreased from 292 to 221 kg/m³. At 120 bar, the global yield at 313 K ($\rho_{\text{CO}_2} = 654 \text{ kg/m}^3$) was 2.5 times larger than the global yield at 323 K ($\rho_{\text{CO}_2} = 478 \text{ kg/m}^3$), evidencing the predom-

Table 1
SFE operating conditions and extraction yields of *L. alba*

SFE operating conditions		X_0 (mass%)	$Q_{\text{CO}_2} \times 10^4$ (kg/s)	Superficial velocity $\times 10^5$ (m/s)	$M_{\text{CER}} \times 10^9$ (kg/s)	$Y_{\text{CER}} \times 10^5$ (kg/s)	t_{CER} (s/60)	R_{CER} (%)	Content of target components (mass%)	
Pressure (bar)	Temperature (K)								Limonene	Carvone
80	313	4.1	0.85	4.9	—	—	—	—	15.3	50.2
80	323	4.3	1.06	8.1	—	—	—	—	1.2	80
120	313	5.6	1.07	2.8	5.1	4.8	152.1	1.5	2	64
120	323	2.2	1.05	3.7	3.3	3.5	191.2	1.3	17	53.0
100	318	7 $\pm$ 2	1.09	3.8	3.1	2.8	163.4	5.0	0.5	32.1
Ethanol at 0.96 bar at 360 min (LPSE)		17 $\pm$ 2	—	—	—	—	—	—	—	tr
Ethanol at 0.96 bar at 180 min (Soxhlet)		21 $\pm$ 2	—	—	—	—	—	—	—	0.1
Hydrodistillation at 0.96 bar at 120 min		0.8 $\pm$ 0.1	—	—	—	—	—	—	24	13.4

X_0 , global yield (kg-extract/kg-feed); M_{CER} , mass-transfer rate for the constant extraction rate period; Y_{CER} , mass ratio of solute in solvent phase at the measuring-cell outlet (kg-extract/kg-CO₂); t_{CER} , length of the constant extraction rate period; R_{CER} , yield of extract in the constant extraction rate period.

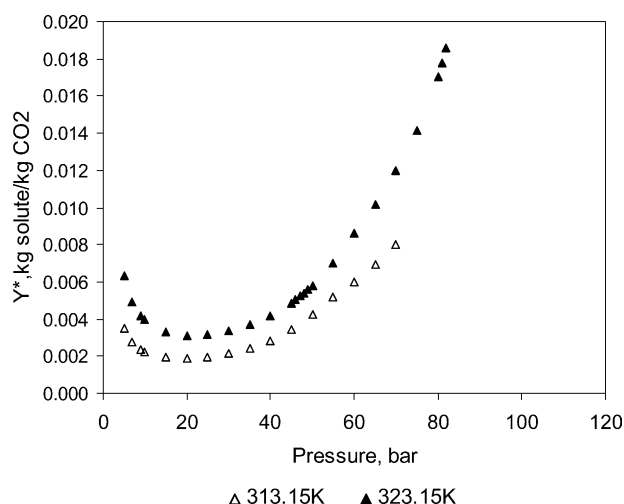


Fig. 2. Solubility of limonene in CO₂ calculated by the PR-EOS.

inance of the solvent density effect on the solubility, thus, on the global yield over the solute vapor pressure effect. At 100 bar and 318 K ($\rho_{\text{CO}_2} = 481 \text{ kg/m}^3$), the global yield was 1.25 times the global yield measured at 120 bar and 323 K ($\rho_{\text{CO}_2} = 478 \text{ kg/m}^3$), thus as the densities are very closed at the lower pressure, the solute vapor pressure effect on the solubility has predominated over the density effect. Then, a retrograde region should be expected in the vicinity of these conditions. The analysis of variance done using the data of Table 1 detected that the effects of temperature and pressure were significant, and the effect of pressure was more important ($p_{\text{value}} = 0.018$) than that of temperature ($p_{\text{value}} = 0.098$).

Fig. 3 shows that the OECs at 100 and 120 bar had the expected shape exhibiting the constant extraction rate period, the falling rate period (FER) and the diffusion controlled rate

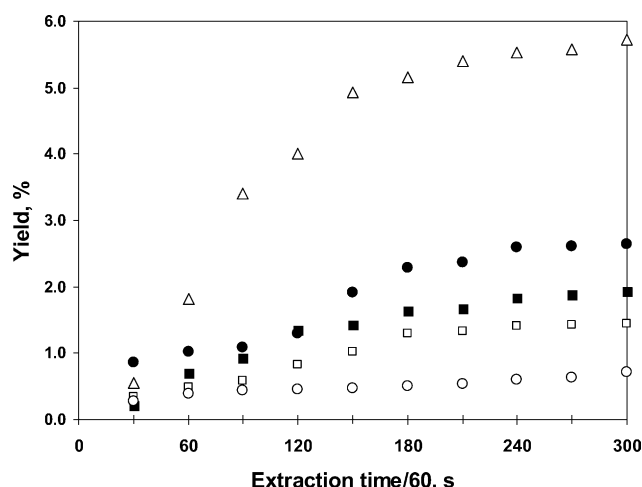


Fig. 3. OEC for the system *L. alba* + CO₂: (Δ) 100 bar/318 K, ($\blacksquare$) 120 bar/313 K, ($\square$) 120 bar/323 K, ($\bullet$) 80 bar/313 K, ($\circ$) 80 bar/323 K.

period (DC). Therefore, the kinetic parameters (Table 1) were estimated for the OECs obtained at 100 and 120 bar, but not at 80 bar. In spite of using virtually the same solvent flow rate in all assays, the changes in solvent density impart important variations on the superficial velocities. This associated with the kinetic parameters (Table 1) can help to understand the effects of the operating variables in the mass-transfer kinetics: the mass-transfer rates at 120 bar decreased from 5.1×10^{-8} to $3.3 \times 10^{-8} \text{ kg/s}$ as the temperature increased from 313 to 323 K. At the same time, the superficial velocity increased from 2.8×10^{-5} to $3.7 \times 10^{-5} \text{ m/s}$. Thus, the increase in solvent density at 120 bar and 313 K compensated the smaller velocity used. The yield for the CER period represented approximately 50% of the total yield and the highest R_{CER} was obtained at 100 bar and 318 K with 163 min of process.

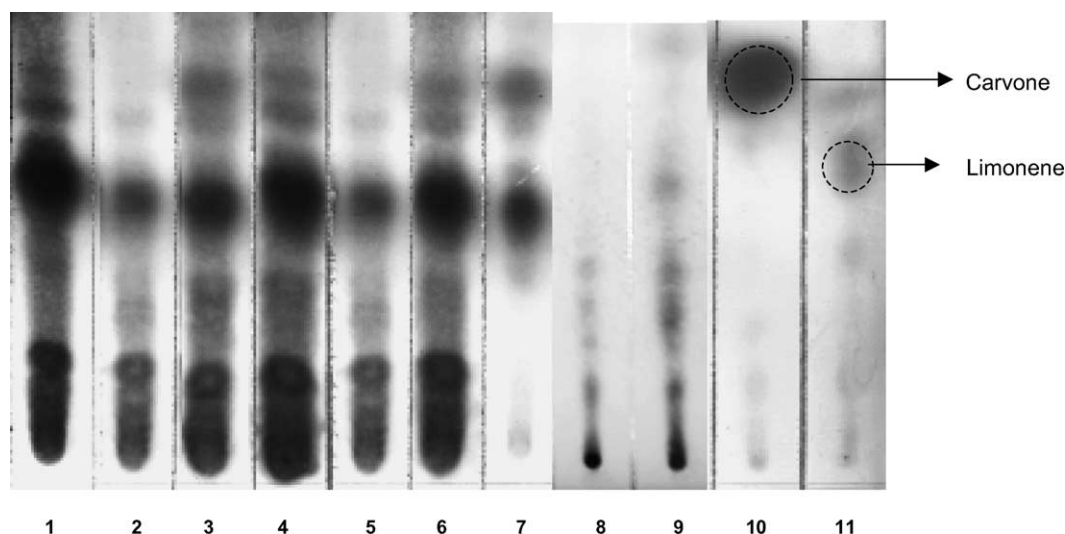


Fig. 4. TLC of *L. alba* extracts. (1) 80 bar/313 K, (2) 80 bar/323 K, (3) and (4) 100 bar/318 K, (5) 120 bar/313 K, (6) 120 bar/323 K, (7) volatile oil, (8) LPSE, (9) Soxhlet, (10) carvone standard, and (11) limonene standard (all samples were injected using the following dilution: 20 μL of the solution:6 mg of extract or standard/mL of ethyl acetate).

The global yields for the conventional processes (LPSE, Soxhlet, and hydrodistillation) were 17, 21 and 0.8% (dry basis, d.b.).

Fig. 4 shows a TLC plate of the various *L. alba* extracts. Columns 1–6 show the variations in the composition of the SFE extracts. In columns 10 and 11 are shown the standards carvone and limonene, respectively. Columns 7–9 demonstrate that the hydrodistilled (volatile oil), LPSE, and Soxhlet extracts had compositions quite different from the SFE extracts. This behavior is due to the co-extraction of substances of different polarities by the various techniques used. At 80 bar and 313 or 323 K, it was expected that the SFE extract chemical composition would be very similar to that of the volatile oil, but this was not observed. Thus, even at intermediate conditions of temperature and pressure, SFE extracts can be very different from extracts obtained by other techniques including hydrodistillation. The contents of carvone and limonene in the extracts obtained by SFE, LPSE, Soxhlet, and hydrodistillation shows that, as expected, the volatile oil (hydrodistillation) contained large amounts of limonene and carvone while these substances were not detected or only traces of them were detected in the ethanolic extracts.

The solute/solvent separating system provided some information on the fractionation of *L. alba* extracts. Fig. 5 shows that the extract collected online as well as that retained in the apparatus tubing have similar composition. The extract retained in the adsorption of column contained large amounts of hydrophobic substances (large spot at the top of row and the collection flask has acted as an equilibrium stage, row 3 in Fig. 5); in the extract obtained during the depressurization step predominated hydrophilic substances (large spot at the bottom of row 2). The extract mass recovered in the adsorbent column was 7, 14% of the total extract mass. The extract mass recovered in the depressurization represented 8, 73% of the total mass. The differences in the composition of the four fractions of the SFE extracts demonstrate that a simple frac-

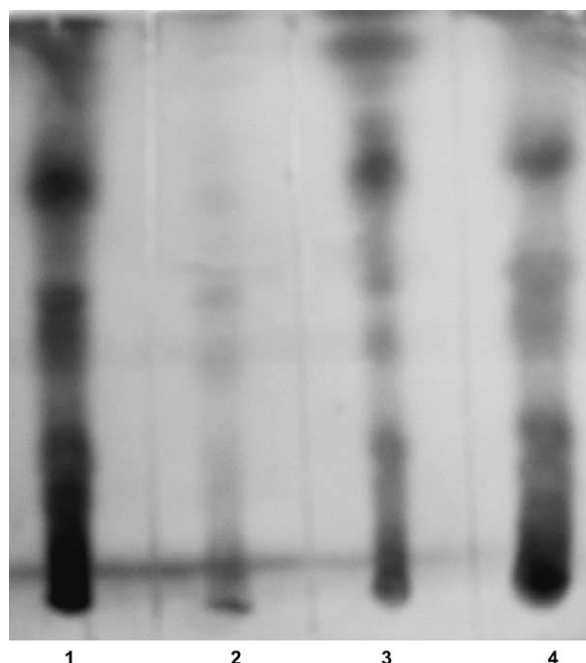


Fig. 5. SFE extracts obtained at 100 bar/318 K: (1) extract collected on line, (2) extract collected in the depressurizing step, (3) extract collected in the adsorption column, and (4) extract collected during the cleaning step.

tional extraction process can be developed to obtain *L. alba* extracts with different compositions.

The gas chromatography analysis (Tables 2 and 3) confirmed the results shown in the TLC. Table 2 shows the relative proportion (area) for the various substances for all *L. alba* extracts.

Carvone and limonene are usually considered to be the target components to extract from *L. alba*; nonetheless, the results of Tables 2 and 3 show that *L. alba* can be a source of other substances such as guaiol and bulnesol, for instance. These substances are reported as possessing anti-inflammatory

Table 2

Chemical composition of the *Lippia alba* extracts (fractions detectable by GC) obtained by different extraction techniques

Substances	SFE					Volatile oil	LPSE	Soxhlet
	80 bar/313 K	80 bar/323 K	120 bar/313 K	120 bar/323 K	100 bar/318 K			
Limonene	0.5	–	–	–	1.3	24.5	–	–
<i>t</i> -Carvyl	–	–	–	–	tr	–	–	–
Carvone	6.0	6.3	6.0	1.8	5.6	55.9	–	0.9
β -Bourbonene	–	–	–	–	1.5	–	–	0.3
<i>cis</i> -Caryophyllene	–	–	–	–	1.2	–	–	–
<i>t</i> -Caryophyllene	–	–	–	–	tr	–	0.9	–
γ -Muurolene	0.6	0.9	–	–	5.0	–	–	0.5
γ -Cadinene	0.7	–	–	1.0	2.0	–	–	–
Elemol	4.8	1.0	8.8	7.2	10.2	–	–	–
Geranyl butyrate	–	–	–	–	2.6	–	–	–
<i>t</i> -Nerolidol	1.0	–	–	1.4	2.6	–	–	–
Germacrene D-4-ol	–	9.1	–	–	2.7	–	–	–
Guaiol	1.1	0.8	1.9	1.3	2.7	–	–	–
Bulnesol	1.7	1.5	–	1.0	1.4	–	0.0	–
Khusimol	3.8	–	–	–	3.7	–	–	–
n.i.	79.9	79.6	83.3	86.4	60.0	19.5	40.0	28.8

n.i., Non-identified.

Table 3

Composition of the SFE extracts recovered in the adsorption column (A), in the depressurizing (D) and cleaning (C) steps

Substances	80 bar/313 K			80 bar/323 K			120 bar/313 K			20 bar/323 K			100 bar/318 K		
	A	D	C	A	D	C	A	D	C	A	D	C	A	D	C
Triciclene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	tr	–	–
α -Pinene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	tr	–	–
Sabinene	tr	–	–	tr	–	–	tr	–	–	0.9	–	–	–	–	–
Mircene	tr	–	–	tr	–	–	tr	–	–	0.4	–	–	–	–	–
Limonene	13.2	18.6	–	0.6	–	–	2.1	–	–	20.1	–	–	0.4	–	0.6
<i>t</i> -Ocimene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	0.0	–	–
γ -Terpinene	0.7	–	–	–	–	–	0.5	–	–	0.8	–	–	0.5	–	–
Terpinolene	0.4	–	–	–	–	–	0.3	–	–	0.5	–	–	0.4	–	–
Linalol	0.9	–	–	0.6	–	–	0.9	–	–	1.0	–	–	1.1	–	–
<i>t</i> -Carvyl	0.3	–	–	–	–	–	0.5	–	–	0.4	–	–	0.5	–	–
Carvone	45.4	–	–	59.0	–	–	68.1	–	–	51.0	–	–	59.1	–	1.4
Piperitone	0.5	–	–	0.7	–	–	0.8	–	–	0.5	–	–	0.7	–	–
β -Bourbonene	1.1	–	–	1.5	–	–	1.5	–	3.2	1.2	1.7	–	1.3	–	–
β -Cubebene	0.8	–	–	0.6	–	–	0.6	–	–	0.5	–	–	0.5	–	0.8
<i>cis</i> -Caryophyllene	0.6	–	1.0	0.7	–	–	0.7	–	–	0.6	–	–	0.8	–	–
<i>t</i> -Caryophyllene	–	–	1.0	0.6	–	–	0.7	–	–	0.6	–	–	0.6	–	0.7
γ -Muurolene	9.1	–	3.8	10.8	–	–	7.7	–	5.3	9.3	5.5	–	11.1	–	1.3
γ -Cadinene	0.6	–	–	0.7	–	–	0.7	0.8	–	0.4	0.0	–	0.9	–	0.8
Elemol	2.0	–	3.3	3.4	–	–	2.5	8.8	3.2	1.6	5.6	–	3.6	–	5.1
<i>t</i> -Nerolidol	0.6	–	–	0.9	–	–	0.7	1.8	6.1	0.4	–	–	1.0	–	1.0
Germacrene D-4-ol	0.4	–	–	0.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8
Guaiol	–	–	5.8	0.9	–	10.1	0.6	2.1	–	0.3	7.5	–	0.9	6.7	0.9
Bulnesol	0.3	–	1.1	0.5	20.8	–	1.0	2.2	–	–	–	–	0.6	–	2.3
Khusimol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8.8
Total	76.8	18.6	16.0	81.8	20.8	10.1	89.9	15.8	17.8	90.9	20.3	–	83.9	6.7	24.4
n.i.	23.2	81.4	84.0	18.2	79.2	89.9	10.1	84.2	82.2	9.1	79.7	–	16.1	93.3	75.6

n.i., Non-identified.

and antimicrobial activities, besides being inhibitors of the acetylcholinesterase.

Fig. 6 shows the secretor structures of *L. alba* observed by SEM. Some peltate trichomes are visible with measurements

around of 50 μ at 1400 $\times$. Fig. 6 (A) shows the intact and broken structures (due to the comminuting process) before SFE while Fig. 6 (B and C) shows the intact (B) and the broken (C) structures after SFE. The results showed that SFE

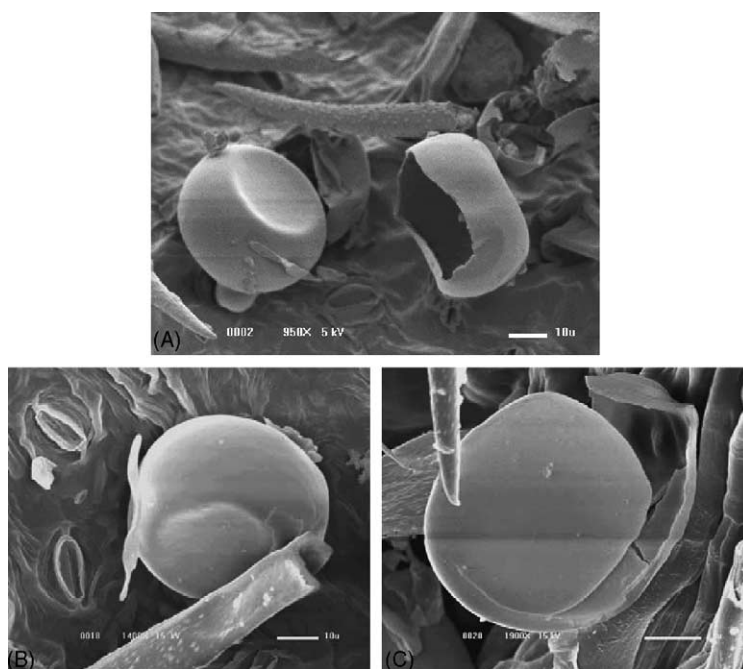


Fig. 6. The secretor structures of *L. alba* observed by scanning electronic microscopy, 15 kV. (A) Intact (left) and broken (right) before SFE, (B) intact structure after SFE, and (C) broken structure after SFE.

did not significantly affect the *L. alba* secretor structures as the comminuting process did.

4. Conclusions

The chemical compositions of the extracts were different for the studied processes; co-extraction of heavy and/or hydrophobic substances occurred for the LPSE and Soxhlet process. The SFE operating conditions that maximized the carvone (80%) and limonene (17%) yield were 80 bar/323 K and 120 bar/323 K, respectively. The largest mass-transfer rates were obtained at the lowest superficial velocities, corresponding to largest solvent density. Approximately 50% of the extract global yield is obtained during the CER period. *L. alba* extracts can be a source of other substances such as gualiol and bulnesol. The results showed that SFE did not significantly affect the *L. alba* secretor structures as the comminuting process did.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP (1999/01692-1) for the financial support. M.E.M. Braga and P.A.D. Ehlert thank FAPESP (02/01608-8 and 00/06848-1) for the Ph.D. assistantships.

References

- [1] F.C. Terblanché, G. Kornelius, Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)—a literature review, *J. Essent. Oil Res.* 8 (1996) 471.
- [2] M.E. Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata, A. Villar, *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 201.
- [3] T.L.G. Lemos, F.J.Q. Monte, F.J.A. Matos, J.W. Alencar, A. Craveiro, R.C.S.B. Barbosa, E.O. Lima, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants, *Fitoterapia* 63 (1992) 266.
- [4] M. Ballero, F. Poli, M. Santus, Plants used in folk medicine of Monteleone (Northern Sardinia), *Fitoterapia* 69 (1998) 52.
- [5] M. Heinrich, H. Rimpler, N.A. Barrera, Indigenous phytoterapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixed community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation, *J. Ethnopharmacol.* 36 (1992) 63.
- [6] L.C. Di Stasi, C.A. Hiruma, E.M. Guimarães, C.M. Santos, Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon, *Fitoterapia* 65 (1994) 529.
- [7] M.C. Zamora-Martínez, C. Nieto De Pascual, Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico, *J. Ethnopharmacol.* 35 (1992) 229.
- [8] A. Cáceres, L. Fletes, L. Aguilar, O. Ramírez, L. Figueroa, A.M. Taracena, B. Sama Yoa, Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants, *J. Ethnopharmacol.* 38 (1993) 31.
- [9] T.G. Vale, F.J.A. Matos, T.C.M. De Lima, G.S.B. Viana, Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes, *J. Ethnopharmacol.* 176 (1999) 127.
- [10] M.E. Pascual, K. Slowing, M.E. Carretero, A. Villar, Anticarcinogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), *Il Pharmacol.* 56 (2001) 501.
- [11] M.T.S. Trevisan, F.V.V. Mecado, Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer, *Quim. Nova* 26 (2003) 301.
- [12] E.E. Stashenko, B.E. Jaramillo, J.R. Martínez, Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 93.
- [13] K. Oosterhaven, B. Poolman, E.J. Smid, *S*-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound, *Ind. Crop Prod.* 4 (1995) 23.
- [14] I.M. Helander, H. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E.J. Smid, L.G.M. Gorris, A. Wright, Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3590.
- [15] E.J. Smid, Y. Witte, L.G.M. Gorris, Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs, *Postharvest Biol. Technol.* 6 (1995) 303.
- [16] T. Baysal, D.A.J. Starmans, Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed, *J. Supercrit. Fluid* 14 (1999) 225.
- [17] K.H. Kim, J. Hong, Equilibrium solubilities of spearmint oil components in supercritical carbon dioxide, *Fluid Phase Equilib.* 164 (1999) 107.
- [18] M.B. Jacobs, In: *The Chemical Analysis of Food and Food Products*, third ed., Robert Krieger Publishing, New York, 1973.
- [19] T. Gamse, R. Marr, High-pressure equilibria of the binary systems carvone–carbon dioxide and limonene–carbon dioxide at 30, 40 and 50 °C, *Fluid Phase Equilib.* 171 (2000) 165.
- [20] M.E.M. Braga, P.F. Leal, J.E. Carvalho, M.A.A. Meireles, Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6604.
- [21] Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, p. 1053.
- [22] P.A.D. Ehlert, L.C. Ming, M.O.M. Marques, *Horticultura Bras.* 20 (Suppl. 2) (2002).
- [23] V.M. Rodrigues, P.T.V. Rosa, M.O.M. Marques, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles, Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L.) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1518.
- [24] R.J. Freund, R.C. Littell, SAS System for Regressions SAS Series in Statistical Applications, second ed., SAS Institute Inc., Cary, NC, 1995, p. 211.
- [25] S. Raciassi, C.J. Peters, On the phenomenon of double retrograde vaporization: multi-dew point behavior in the binary system ethane + limonene, *Fluid Phase Equilib.* 191 (2001) 33.
- [26] A.T. Souza, M.L. Corazza, L. Cardozo-Filho, R. Guirardello, M.A.A. Meireles, Phase equilibrium measurements for the system clove (*Eugenia caryophyllus*) oil + CO₂, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 352.
- [27] V.M. Rodrigues, E.M.B.D. Sousa, A.R. Monteiro, O. Chiavone-Filho, M.O.M. Marques, M.A.A. Meireles, Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent, *J. Supercrit. Fluids* 22 (2002) 21.