

ESTRAZIONE DI “PETIT GRAIN” CON CO₂ IN FASE SUPERCRITICA

Donatella Ferri^a Nicola Franceschini^b

^a *ENEA Dip. Biotecnologie Ambiente e Salute Centro Ricerche Casaccia via Anguillarese, 301
00123 S.Maria di Galeria Roma*

^b *Università dell'Aquila-Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche-Via Vetoio-67100 L'Aquila Italy*

ABSTRACT

Scopo del presente lavoro è stato la messa a punto di tecniche estrazione mediante CO₂ in fase supercritica con l'obiettivo di ottenere un “petit-grain”(olio essenziale ottenuto dalle foglie di mandarino e arancio amaro) l'arricchito in composti ossigenati. Questa tecnica d'estrazione, avendo la CO₂ in stato supercritico un elevato potere solvente già a basse temperature, garantisce un olio privo di sottoprodotti di decomposizione termica che invece sono presenti nelle estrazioni classiche realizzate a temperature più elevate.

In particolare, sono state studiate le condizione ottimali di temperatura e pressione in grado di favorire l'estrazione di un petit-grain ricco di composti ossigenati, che conferiscono un particolare bouquet molto apprezzato dall'industria dei profumi, ed è stata, inoltre, determinata la resa quantitativa dell'estratto in funzione della quantità di CO₂ impiegata.

Sono stati, infine, confrontati gli estratti con CO₂ con estratti ottenuti per idrodistillazione e con etere etilico. Gli estratti con CO₂ presentavano un più elevato contenuto di acetato di linalile ossigenato caratteristico dell'arancio amaro.

SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION OF “PETIT GRAIN.

In the present work, the “petit grain” (an essential oil obtained from mandarin orange and bitter orange leaves) was extracted by supercritical CO₂, whose features as solvent allow to keep unchanged - even at low temperatures - the typical citrus flavour and fragrance while avoiding thermally degraded compounds. The extraction process parameters such as pressure, temperature, CO₂ inlet flow rate were optimised in order to promote in the petit grain the enrichment in oxygen compounds, major responsible for the fragrance of the petit-grain

In fact oxygenated compounds are the major responsible for the fragrance of the petit-grain, highly appreciated in the perfume industry. Moreover extraction runs according to conventional methods extraction –solvent and hydro-distillation were performed and the experimental results compared to those obtained by the supercritical CO₂-extraction. The analysis of the results indicated that “petit-grain” extracted by supercritical CO₂ showed the highest content of linolool-acetate, the characteristic oxygenated compound of bitter orange.

INTRODUZIONE

Gli oli essenziali, estratti dalle foglie di agrumi “petit-grain”, trovano applicazione nell’industria dei profumi per le loro caratteristiche di fragranza e di aroma.

La percentuale di “petit-grain” presente nelle diverse specie di agrumi è di circa lo 0.3%.

Chimicamente il “petit-grain” è costituito da terpeni, da sesquiterpeni e da composti ossigenati quali alcoli, chetoni, aldeidi ed esteri.

I terpeni e i sesquiterpeni presenti nelle varie specie del genere *Citrus* non contribuiscono alla fragranza e all’aroma dell’olio essenziale ed inoltre non sono “elemento distintivo” in quanto essi sono presenti in tutte le specie ed in quantità pressoché identiche.

Nel “petit-grain” i maggiori responsabili della fragranza e dell’aroma sono i composti ossigenati che caratterizzano anche le varie specie del genere *citrus*. In particolare gli ossigenati nel limone sono il citral e l’acetato di geranile, nel mandarino l’N-metil antralinato di metile e nell’arancio dolce, come nell’arancio amaro, l’acetato di linalile.

I processi di estrazione e separazione tradizionali del petit-grain sono la distillazione in corrente di vapore e estrazione con solventi organici. Gli svantaggi di queste tecniche estrattive sono rappresentati dalle alte temperature che portano alla degradazione termica dei composti termolabili (estrazione in corrente di vapore) e dalla presenza di tracce di solvente che, nonostante i cicli di depurazione, permangono inevitabilmente nel prodotto finito (estrazione con solvente).

L’estrazione con CO₂ in stato supercritico può essere un’alternativa ai processi tradizionali perché ha l’enorme vantaggio di sfruttare un agente solvente assolutamente innocuo in grado di essere separato completamente dall’olio dopo l’estrazione ed, inoltre, di estrarre a basse temperature evitando la perdita di composti volatili e mantenendo, in tal modo, alcune note olfattive del prodotto. A tale proposito va ricordato che i principali composti ossigenati del petit-grain di basso e medio peso molecolare sono solubili in CO₂ supercritica. La solubilità di questi composti, nell’ambito di una stessa famiglia, generalmente si riduce con l’aumentare del peso molecolare.

Poiché la clorofilla, i carotenoidi, gli zuccheri, gli amminoacidi e la maggior parte dei sali inorganici sono insolubili in CO₂ supercritica risulta evidente la possibilità di disporre, nel processo di estrazione, di una notevole selettività rispetto a composti che, non danno alcun contributo olfattivo e la cui presenza, nell’estratto aromatico, potrebbe essere controproducente,

L’obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di determinare sperimentalmente le migliori condizioni operative per ottenere un petit-grain ricco in composti ossigenati.

In particolare sono state studiate le condizioni ottimali di temperatura e pressione in grado di favorire l'estrazione di composti ossigenati rispetto agli altri componenti della matrice da estrarre, ed è stata, inoltre, valutata la resa quantitativa dell'estratto in funzione della quantità totale di CO₂ impiegata rispetto alla quantità di matrice processata.

MATERIALI

Materiali utilizzati nella sperimentazione:

Anidride carbonica: CO₂ N45 al 99.995% di purezza.

Foglie di citrus: Le foglie di agrumi arancio amaro (*Citrus aurantium*), e di mandarino (*Citrus deliciosa*) state fornite dalla Stazione sperimentale per l'industria delle essenze e dei derivati dagli agrumi di Reggio Calabria. Il materiale è stato posto in un locale sufficientemente areato privo di luce diretta ad una temperatura di circa 20°C fino ad un valore di umidità residua non superiore al 10 %. Successivamente è stato macinato e setacciato fino ad ottenere particelle con dimensioni 0,3-0,4 mm.

PROCEDURA E STRUMENTAZIONE

Le prove sperimentali sono state condotte in due fasi successive:

1. utilizzando un strumento da banco (Dionex sfe 703) sono state eseguite prove preliminari per determinare le condizioni ottimali di estrazione: pressione, temperatura e resa dell'estratto;
2. determinate le condizioni ottimali, le prove sono state effettuate in un impianto sperimentale dove, inoltre, si è potuto procedere ad una purificazione dell'olio essenziale in quanto l'impianto possiede, oltre all'estrattore, due separatori che, mediante separazione frazionata, hanno permesso la rimozione delle cere cuticolari dall'olio essenziale.

ESTRAZIONE CON STRUMENTO DA BANCO.

Il Dionex sfe 703 è uno strumento automatizzato di estrazione a fluidi supercritici con otto celle di estrazione in parallelo. È dotato di un forno riscaldante che può raggiungere 150 °C e di un sistema di pompaggio in grado di comprimere la CO₂ fino a 680 atm. La figura 1 mostra lo schema di tale apparecchiatura sperimentale.

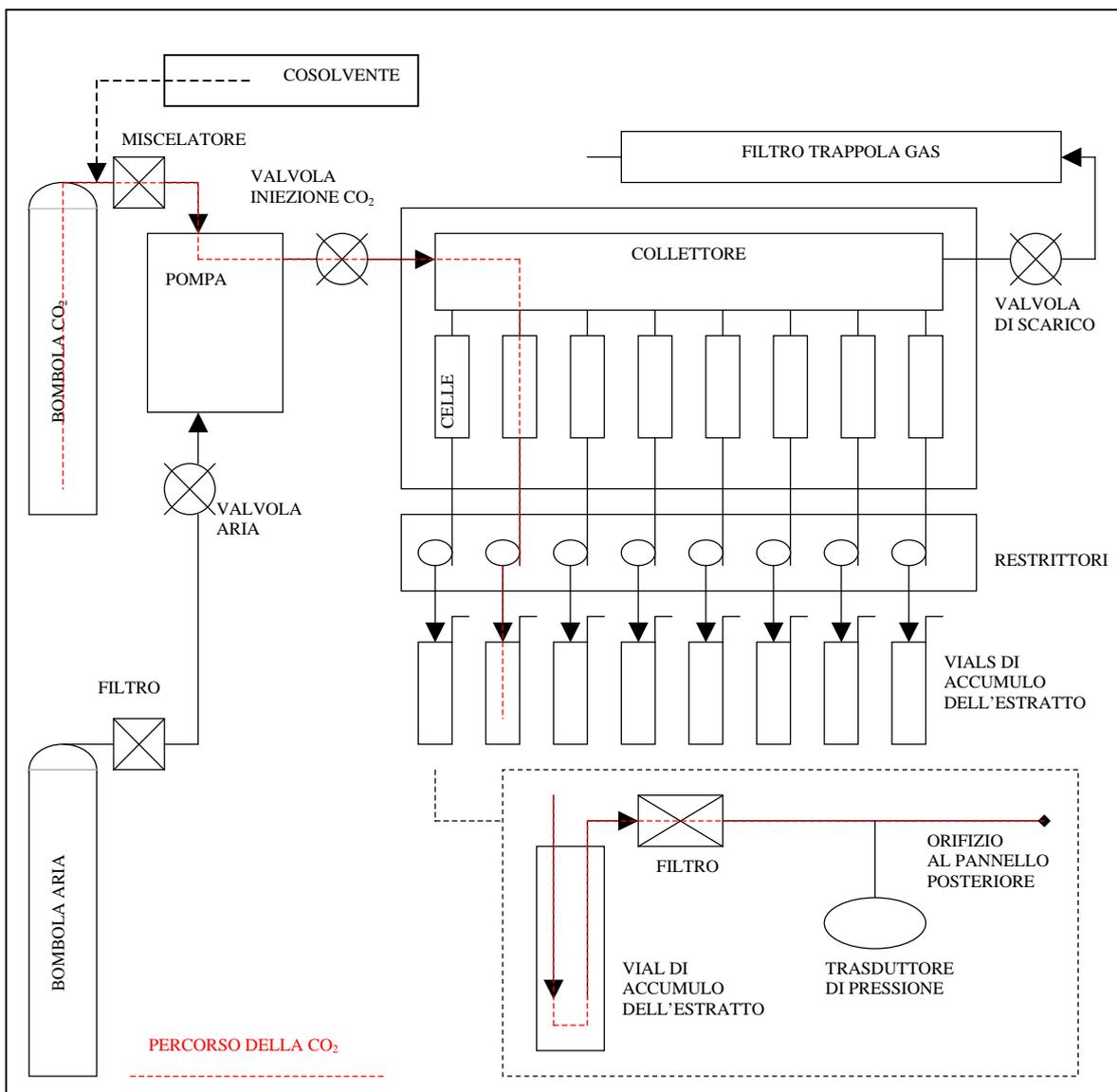


Figura 1 - Schema Dionex sfe 730

Un campione di 10 g foglie di mandarino, precedentemente macinato e setacciato fino ad ottenere particelle con dimensioni 0,3-0,4 mm, è stato immesso nella cella di estrazione. Ad esso è stata aggiunta una quantità di sfere di vetro come inerte in modo da riempire tutta la cella e consentire quindi un flusso più omogeneo della CO₂.

In tabella 3 sono riportate le condizioni operative: pressione, temperatura, densità e quantità di CO₂ fluita per grammi di foglie relative alle prove condotte per valutare le condizioni ottimali di estrazione.

Il tempo di estrazione, uguale per tutte le prove, è stato determinato considerando che per ogni grammo di foglie dovevano fluire 95 grammi di CO₂ alla portata massima consentita dallo strumento (2,4 g/min).

Successivamente si è valutata la quantità ottimale di CO₂ utilizzabile per grammo di foglie trattate. A tale proposito si è determinato il peso dell' estratto dopo aver fatto fluire una quantità di CO₂ pari a **25-60-95** g di CO₂/g matrice mantenendo un flusso costante di 2,4 g/min alle condizione di temperatura e pressione ottimali come valutate nelle estrazioni preliminari. Lo strumento da banco (Dionex) non permette la separazione delle cere cuticolari dall'olio essenziale e pertanto i campioni con esso estratti presentavano il tipico aspetto di concreta (Vedi foto -1).



Foto -1

ESTRAZIONE CON IMPIANTO SPERIMENTALE

L'impianto utilizzato per le prove è un impianto sperimentale i cui principali componenti sono:

- un estrattore E110 dalla capacità di 6 litri;
- due separatori S120 e S130: il primo con capacità di 3 litri ed il secondo con capacità di 1 litro;
- una pompa capace di comprimere la CO₂ fino a 250 bar;
- un contenitore di accumulo di CO₂ L200 con capacità 25 litri dotato di una serpentina interna di raffreddamento.

L'impianto sperimentale, schematizzato in figura 2, è stato utilizzato sia per ottenere un olio privo di cere che dati da utilizzare in un eventuale processo industriale.

Per eliminare le cere, l'impianto è dotato di un separatore che può raggiungere basse temperature (-15°C). In queste condizioni le cere non sono più solubili in CO₂ e, quindi, è possibile separarle dall'olio che rimane invece solubile.

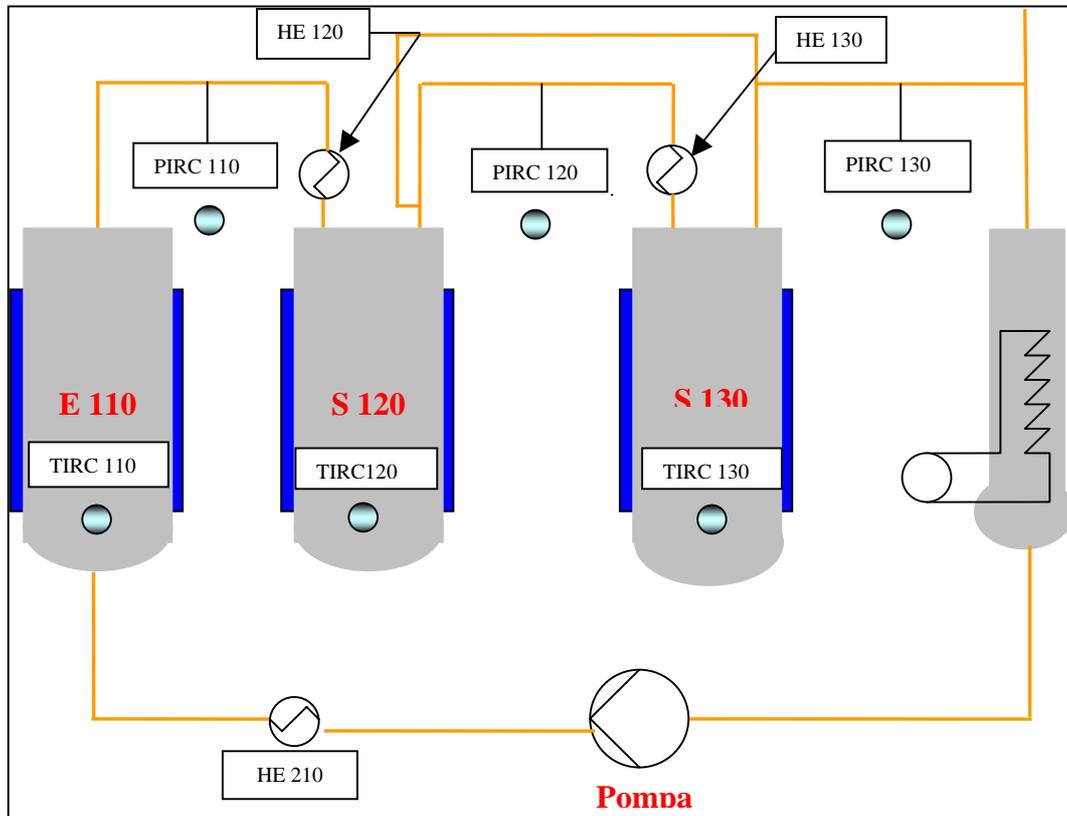


Figura 2 - Schema a blocchi dell'impianto

Un campione di 1096 g di foglie di arancio amaro, precedentemente essiccato e tritato, è stato posto nel separatore E110. Successivamente sono state impostate le seguenti condizioni operative:

estrattore E110	120 bar, 40°C
separatore S120	60 bar, -5°C (separazione cere)
separatore S130	60 bar, 30°C (CO ₂ allo stato gassoso)
flusso di CO ₂	25Kg/h.

Il tempo di estrazione è stato di 60 minuti in modo da garantire 25 grammi di CO₂ per grammo di foglie. Completata l'estrazione, nel separatore S120 sono state raccolte le cere e nel separatore S130 il petit-grain.(vedi foto2-3).



Foto2



Foto3

ESTRAZIONI CLASSICHE

In concomitanza con estrazione con CO₂ supercritica si è proceduto alle estrazioni classiche sia per idrodistillazione che con solvente. L'apparecchiatura utilizzata per l'estrazione in corrente di vapore o idrodistillazione è l'apparecchiatura Clevenger.

L'estrazione con solvente etere etilico a freddo è stata eseguita in un recipiente chiuso avendo cura di agitare la soluzione.

STRUMENTAZIONE ANALITICA

Per l'analisi strumentale si è usato un gascromatografo Perkin Elmer mod. 8420 attrezzato con FID e sistema di iniezione split/splitless alle condizioni riportate in tabella 2

Colonna:	DB5, 25mx0.33mm (diametro interno)
Temperatura programmata	60°C t- 140°C a(2,5 °C/min), 140°C (10 min), 180° C(13 min).
Temperatura blocco introduzione e detector	230 °C
Gas di trasporto	Elio (10,5 psi)
Rapporto flusso	1:100

Tabella 2 - Condizioni sperimentali per la determinazione della composizione del petit-grain.

Per l'identificazione e determinazione dei campioni si è utilizzato un sistema GC/MS (Fision GC 8000/Trio 1000, Electron impact : 70 eV) con le seguenti caratteristiche:

Colonna: DB-5, 30 m x 0.32mm i.d.(spessore del film:0,5 μ)
Gas di trasporto: Elio
Sistema di iniezione: Splitless (0.2 μ)

RISULTATI E DISCUSSIONE

ESTRAZIONE CON DIONEX SFE 703

Il petit-grain estratto con il Dionex sfe 703 ci ha permesso di definire le condizioni ottimali di temperatura e pressione. Nella tabella 3 sono riportate le condizioni di temperatura e pressione alle quali sono state estratti i vari campioni.

Campioni	Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Densità(g/ml)
1	40	110	0,68
2	40	120	0,72
3	40	130	0,75
4	40	150	0,79
5	40	180	0,82
6	50	110	0,5
7	50	130	0,6
8	50	145	0,68
9	50	160	0,72
10	50	180	0,75
11	50	205	0,79

Tabella 3 - Condizioni di temperatura e pressione alle quali sono state estratti i vari campioni.

I risultati delle analisi gascromatografiche dei campioni eseguite presso la Stazione sperimentale per l'industria delle essenze e dei derivati dagli agrumi di Reggio Calabria sono riportati nelle tabelle 4-6.

Dalla loro analisi si può dedurre che:

- l'aumento della densità in condizioni di isotermità non corrisponde ad un estratto più ricco in composti ossigenati che qualifica il petit-grain;
- a parità di densità non si nota un' apprezzabile variazione della qualità dell'estratto operando a 50°C anziché a 40°C;
- si notano in tutti i cromatogrammi picchi ad alti tempi di ritenzione che fanno supporre la presenza di cere;

- dall'analisi % dei singoli componenti si può dedurre che dal punto di vista qualitativo l'estrazione ottenuta a 120 bar e 40°C (densità di CO₂ 0.72 g/ml) risulta la migliore;
- l'estratto a condizioni 120 bar e 40°C è stato considerato il migliore anche dal punto di vista olfattivo: cioè quello con un miglior bouquet.

Terpeni							
Campioni	α -pinene	sabinene	myrcene	β -cimene	α -limonene	γ -terpinene	Σ Terpeni
1	0,9	0,4	0,1	1,85	3,4	9,59	16,3
2	0,25	0,4	0,1	1,24	2,77	6,4	11,2
3	0,13	0,5	0,1	1,25	2,7	7,97	12,7
4	0,37	0,5	0,1	1,41	3,08	8,67	14,1
5	0,18	0,4	0,1	1,18	2,28	7,07	11,3
6	0,17	0,6	0,2	2,21	3,71	11,96	18,9
7	0,21	0,4	0,1	1,71	2,51	9,17	14,1
8	0,05	0,5	0,2	1,63	5,69	9,82	17,9
9	0,1	0,6	0,2	1,89	3,12	9,27	15,2
10	0,3	0,6	0,2	2,05	3,66	11,45	18,3
11	0	0,3	0,0	2,13	2,72	8,08	13,3

Tabella 4– Composizione percentuale dei Terpeni presenti nei campioni.

Ossigenati					
Campioni	linalolo	α -terpineolo	aldeide-c10	N-metilantranilato di metile	Σ Composti ossigenati
1	0,27	0,01	0	82,7	82,98
2	0,71	0,07	0,08	86,87	87,73
3	0,2	0,016	0,04	83,9	84,16
4	0,29	0,03	0,01	83,8	84,13
5	0,14	0	0	86,1	86,24
6	0,37	0	0	75,62	75,99
7	0,24	0,01	0	81,43	81,68
8	0,31	0	0	81	81,31
9	0,31	0,02	0	82,5	82,83
10	0,2	0,01	0,01	80	80,22
11	0,25	0	0	83,11	83,36

Tabella 5– Valori percentuali degli Ossigenati presenti nei campioni.

Sesquiterpeni			
campioni	cariofillene	bergamottene	Σ sesquiterpeni
1	0,35	0,31	0,66
2	0,3	0,7	1
3	0,11	0,08	0,19
4	0,56	0,31	0,87
5	0,31	0,37	0,68
6	0,4	0,33	0,73
7	0,48	0,79	1,27
8	0,47	0,34	0,81
9	0,41	0,37	0,78
10	0,59	0,8	1,39
11	0,28	0,28	0,56

Tabella 6 – Valori percentuali dei Sesquiterpeni presenti nei campioni.

Le percentuali dei diversi ossigenati e le percentuali dei terpeni e dei sesquiterpeni presenti nei diversi campioni sono riportati nelle figure 3 e 4 rispettivamente.

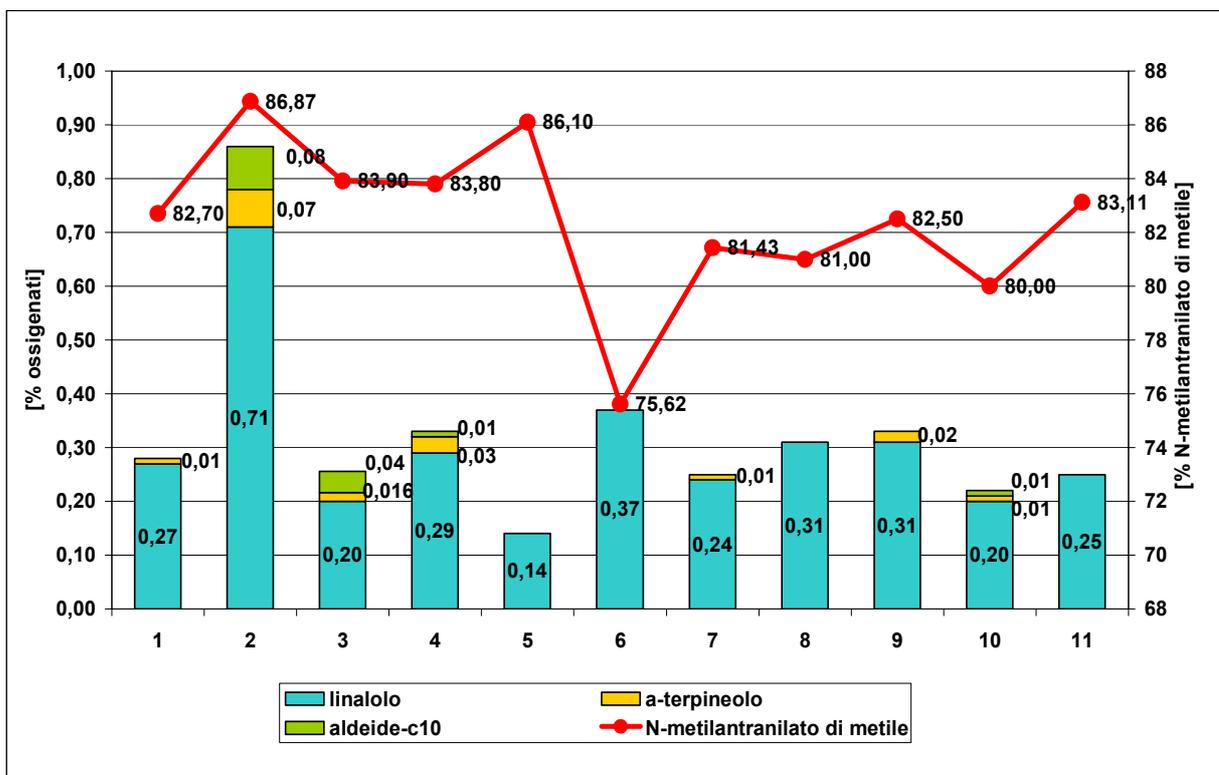


Figura 3 - Percentuale dei diversi ossigenati presenti nei campioni.

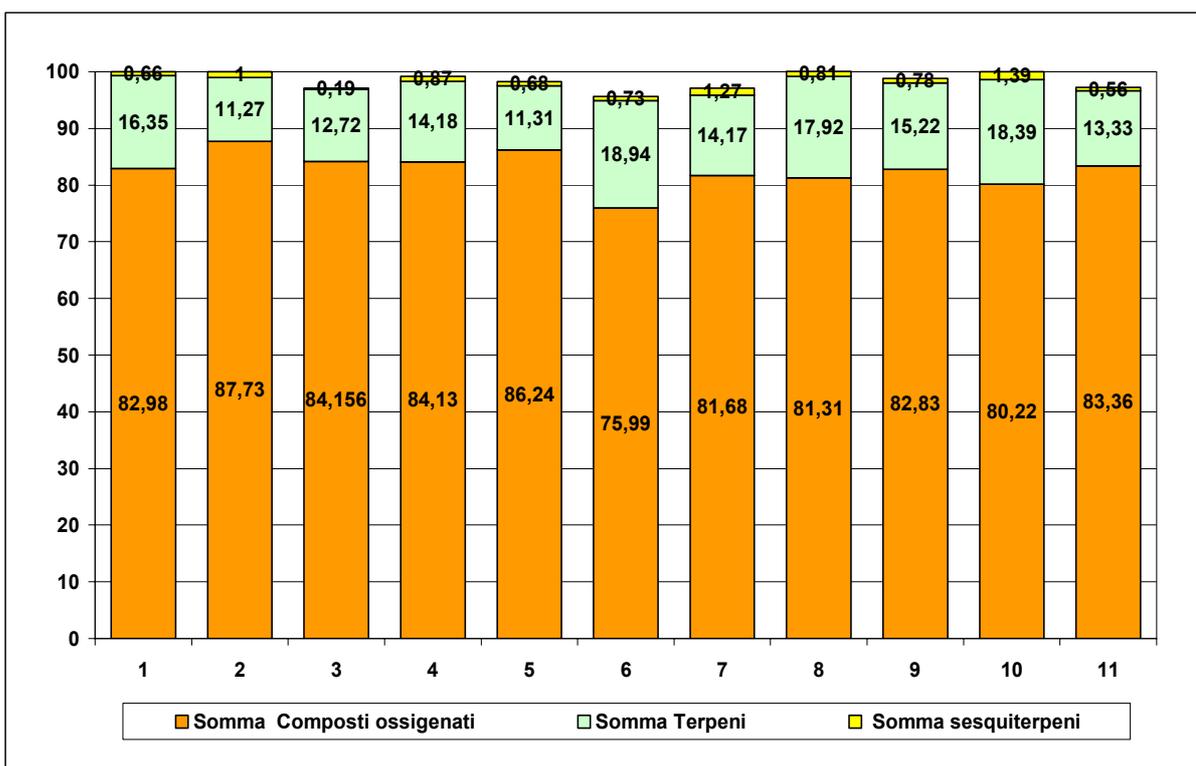


Figura 4 – Percentuale degli ossigenati, dei terpeni e dei sesquiterpeni presenti nei diversi campioni.

Nella tabella 7 è riportata la quantità di estratto per grammo di foglie in funzione della quantità di CO₂ utilizzata in modo da poter valutare l'efficienza di estrazione della CO₂. Nella figura 5 è riportata la percentuale dell'estratto ponendo pari al 100% l'estratto ottenuto facendo fluire 95 grammi di CO₂ per grammo di foglie.

CO ₂ fluita (g di CO ₂ /g di matrice)	Quantità estratta (mg)	Percentuale dell'estratto
25	2,36	84%
60	2,72	97%
95	2,82	100%

Tabella 7-Quantità di estratto per grammi di CO₂

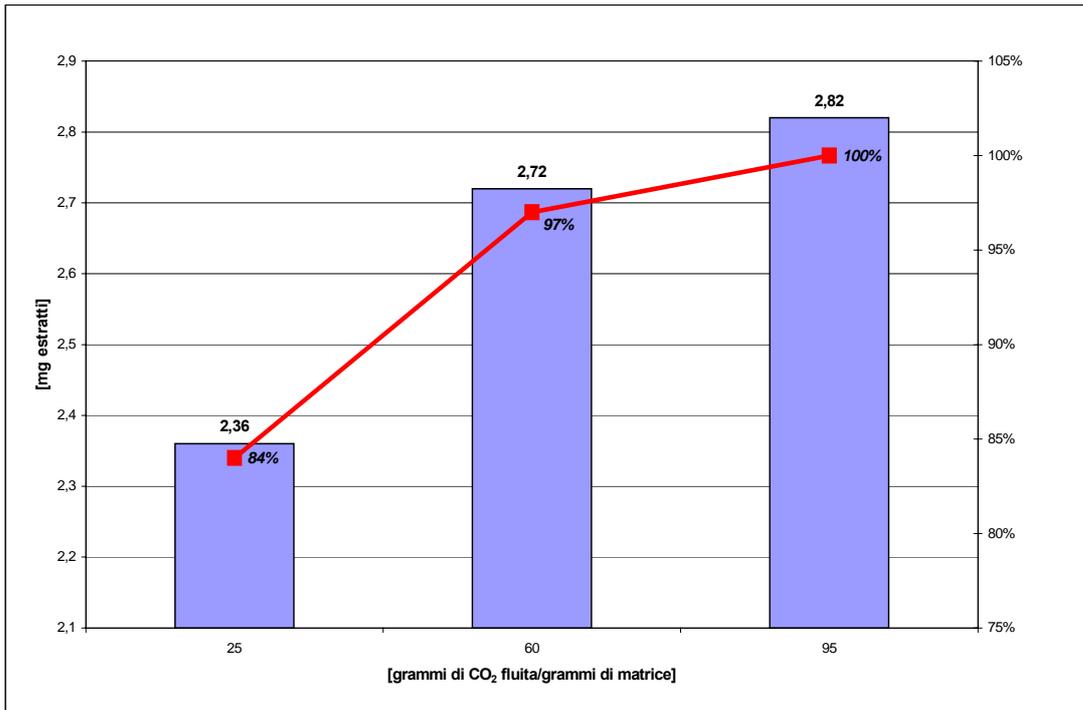


Figura 5- La percentuale dell'estratto per grammo di CO₂

Come si può osservare la resa percentuale dell' olio già a 25 grammi di CO₂ per grammo di matrice è pari all' 84%: per raggiungere il massimo sarebbe necessario quadruplicare la quantità di CO₂ per grammo di matrice con tempi di estrazione troppo lunghi per un processo industriale.

RISULTATI OTTENUTI CON L'IMPIANTO SPERIMENTALE E CONFRONTO CON LE ALTRE METODICHE D'ESTRAZIONE.

Nella figura 6 sono riportati i risultati ottenuti impiegando le tre metodiche citate: CO₂, idrodistillazione e con solvente.

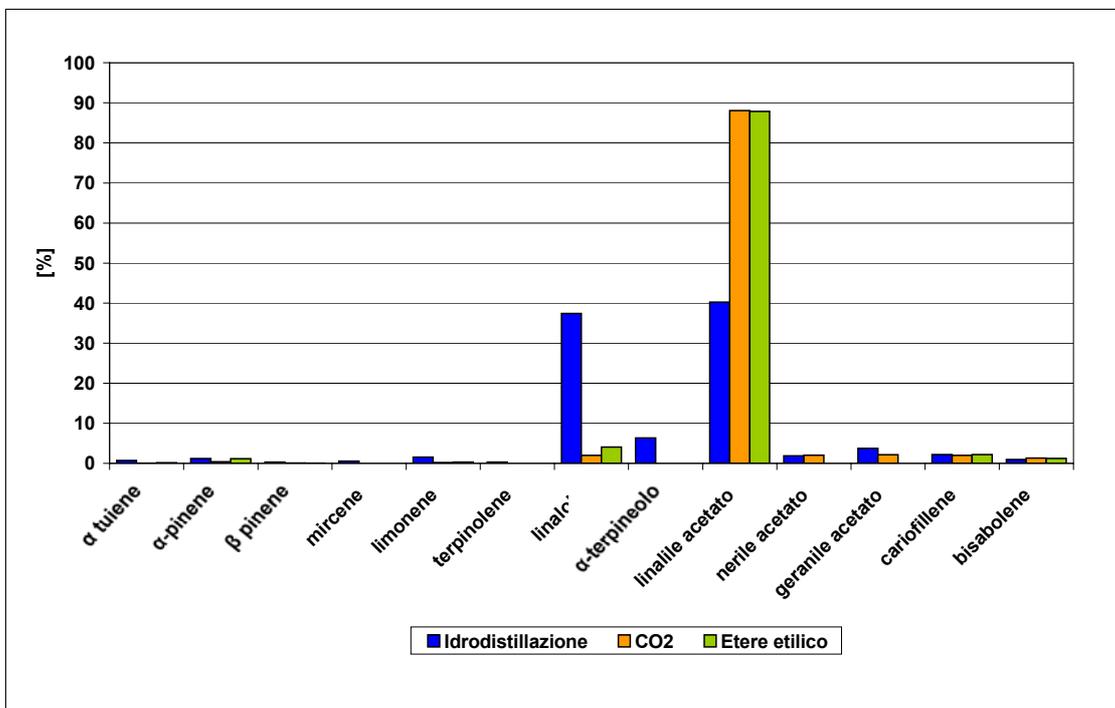


Figura 6- Risultati delle tre tecniche estrattive. Valori percentuali

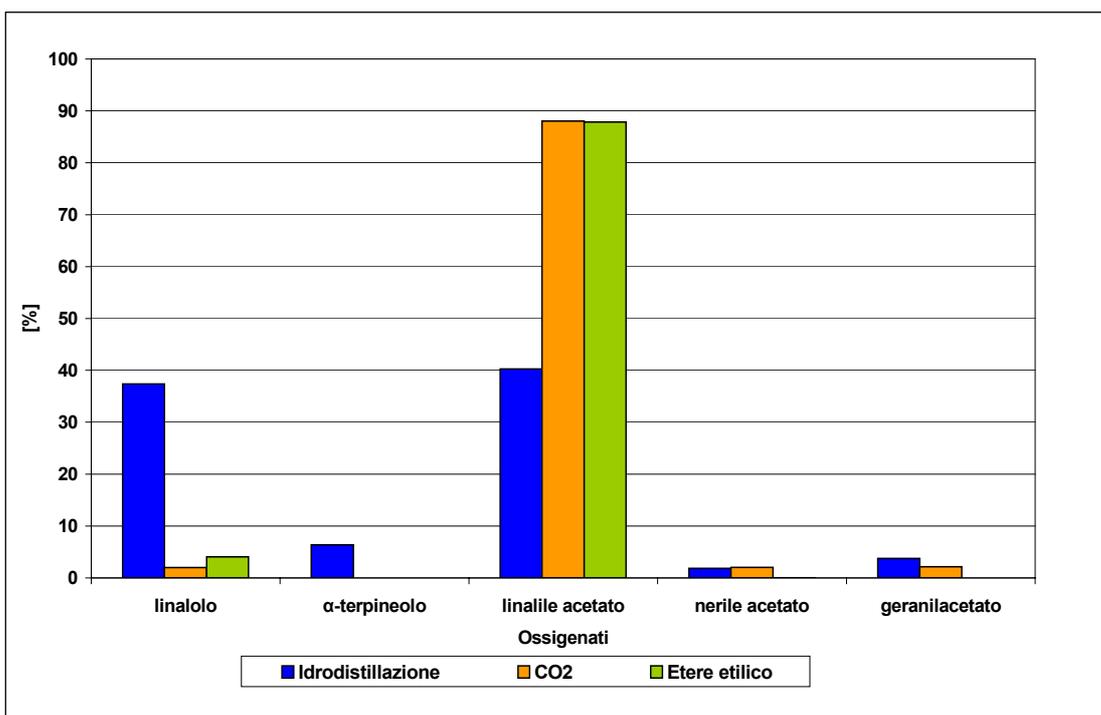


Figura 7- Risultati delle tre tecniche estrattive. Valori percentuali dei composti ossigenati.

Nell'estrazione con CO₂ si osserva (vedi figura7):

- un elevato contenuto di acetato di linalile (88,05%) ossigenato caratteristico dell'arancio amaro. La quantità è molto vicina a quella del prodotto ottenuto a freddo (con solvente). Nel prodotto ottenuto per idrodistillazione si è invece avuta una notevole perdita del contenuto di acetato di linalile per decomposizione dell'estere e formazione dell'alcol corrispondente, (linalolo 37.7%);
- una quantità e una qualità maggiore degli altri ossigenati rispetto a quelli ottenuti nell'estrazione a freddo, paragonabili all'estrazione per idrodistillazione.

L'estrazione con CO₂ unisce i vantaggi di un'estrazione a freddo, garantendo un estratto privo di prodotti di decomposizione termica, a quelli di una idrodistillazione perché estrae anche gli altri ossigenati che invece non sono presenti nella estrazione a freddo. Le condizioni ottimali di estrazione replicate nell'impianto sperimentale hanno dimostrato la fattibilità industriale del processo che ha, vista l'alta efficienza della CO₂, tempi d'estrazione molto bassi.

Un altro aspetto, che assume importanza sempre crescente nella scelta dei processi industriali, è che l'estrazione con CO₂ ha impatto ambientale pressoché nullo in quanto la CO₂ viene riciclata ad ogni ciclo di estrazione ed il processo produce residui di lavorazione privi di tracce di solventi.

BIBLIOGRAFIA

- Reissi S, J Cor, Peter J. *supercritical fluids*, 35, **2005**,10-17;
- Diaz S., S. Espinosa, E.A. Brignole, Peter. J. *supercritical fluids*, 35, **2005**,49-61;
- Bach E., A. Schmidt, E. Cleve, E. Schollmeyer. *Proc. of the 6th Int Symp on Supercritical fluid*, **2003**, 3, 2095-2100.
- Iversen S.B., T. Larsen, O. Henriken, K. Felsvang. *Proc. of the 6th Int Symp on Supercritical fluid*, **2003**, 445-450.
- de Lucas A., E. Martinez de la ossa, J. Rincon, M.A. Blanco, I. Gracia, J. *supercritical fluids*, 22, **2001**,221-228;
- Turner C., J .W King, Mathiasson L., *J. Agric. Food Chem*, **2001**, 49, 553-558
- Jung J., M. Perrut, *J. supercritical fluids*, **2001**, 20, 179-274;
- Rudzinski W.E., Aminabihavi T.M., *Energy & Fuels*, **2000**, 14, 464-475;
- Bruna J.M., *Rev. Plast. Mod*,69, **1995**, 448-451;
- Poiano M., Sicari V, Micione B, Crispo F. *Essenze Deriv. Agrumari*, **1997** 67 27-41;
- Micione B., Di Giacomo, Lezzi M.,Grispo F., Poiana M., Stagno D'Alcontres. *Essenze Deriv. Agrumari* **1992**, 62 28-38;
- Gotz W. *Cosmesi Dermatologica* **1988** 19 42-54;
- Clevenger J.F. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, **1928** 17 346.