مطالعهٔ آزمایشگاهی استخراج مواد با ارزش از گیاه خرنوب با استفاده از سیال فوق بحرانی با ترکیب امواج فراصوت

حسین اسفندیاری[1]، بیژن هنرور[2*]، نادیا اسفندیاری[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه مهندسی شیمی، واحدمرودشت، دانشگاه آزاداسلامی، مرودشت، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، واحدمرودشت، دانشگاه آزاداسلامی، مرودشت، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی شیمی، واحدمرودشت، دانشگاه آزاداسلامی، مرودشت، ایران

پیام‌نگار: Honarvar@miau.ac.ir

چکیده

در هرگونهٔ گیاهی صدها ترکیب شیمیایی با ترکیب درصدها و خواص متفاوت موجود است. جداسازی درست ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه و ایجاد ارتباط بین خواص دارویی گیاه با ترکیب مؤثر آن می‌تواند هم زمینهٔ تولید انبوه داروی مفید را فراهم سازد و هم از عوارض ناشی از مصرف مستقیم گیاه دارویی که گاهی از سایر ترکیبات مضر موجود در گیاه ناشی می‌شود، جلوگیری کند. در این تحقیق استخراج مواد مؤثره از گیاه خرنوب با استفاده از دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی با ترکیب امواج فراصوت بررسی شد. بازده استخراج با سیال فوق بحرانی با افزایش فشار و کاهش اندازهٔ ذرات افزایش یافت. استفاده از امواج فراصوت باعث افزایش میزان بازده استخراج شد. بهترین شرایط آزمایش در فشار ۲۱۰ بار ،دمای ۳۵ درجهٔ سلسیوس و اندازهٔ ذره ۰/۴ میلی متر و اندازهٔ بسامد ۳۷ کیلوهرتز به‌دست آمد. بازده استخراج در این شرایط مقدار ۳/۷۸۲۵ به‌دست آمد. عطرمایهٔ به‌دست آمده از روش کلونجر و استخراج با روش فوق بحرانی با روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی طیف‌سنج جرمی تجزیه شد. پس از تجزیه و تحلیل عطرمایهٔ استخراج شده، مادهٔ استامید، نرولیدول، پیرولیدین و استیگمست به‌عنوان مادهٔ مؤثره انتخاب شد. همچنین بازده استخراج با سیال فوق بحرانی (۳/۷۸۲۵) به‌مراتب بهتر از روش کلونجر (۱/۰۲) به‌دست آمد.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۴

شماره صفحات: ۳۷ تا ۴۹

کلیدواژه‌ها: استخراج با سیال فوق بحرانی، عصاره، گیاه خرنوب، بسامد امواج

۱. مقدمه

سیالات فوق بحرانی[1] به‌ویژه دی‌اکسید کربن[2] جایگزین خوبی برای حلال‌های آلی در فرآیند استخراج هستند. بیشتر سیالات فوق بحرانی مثل دی‌اکسیدکربن، پس از فرایند ضایعات مایع به‌جا نمی گذارند. روش‌های سنتی استخراج همانند استخراج با سوکسله و استخراج با امواج فراصوت است. در این‌روش ها میزان مصرف حلال و انرژی بسیار بالاست. استخراج با سیال فوق بحرانی- به‌علت نفوذپذیری بالای این سیال و همچنین خلوص محصول نهایی- بسیار مهم است و در چند دههٔ گذشته بدان توجه شده‌است[۱-۴].

* مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، گروه مهندسی شیمی

1. Supercritical Fluid
2. Carbon Dioxide

استخراج به‌وسیلهٔ سیال فوق بحرانی روشی جدید و قدرتمند در زمینهٔ جداسازی است که اساس آن توانایی بالای حلال فوق بحرانی است[۶و۵]. جرم حجمی و گران‌روی سیالات فوق بحرانی بین حالت گاز و مایع است. جرم حجمی سیال فوق بحرانی شبیه به مایعات و گران‌روی و ضریب نفوذ آن شبیه به گازها است[۸و۷]. خواص سیالات فوق بحرانی با شرایط عملیاتی دما و فشار قابل تغییر است[۹]. سیال فوق بحرانی که در بیشتر فرایندها استفاده می‌شود دی‌اکسید کربن است. علت استفاده از دی‌اکسید کربن وجود مؤلفه‌های دما و فشار بحرانی پایین، هزینهٔ کم، سمی k بودن، قابل اشتعال نبودن و در دسترس بودن است[۱۰].

در طول بیش از یکدههٔ گذشته عصارهٔ بیش از ۳۰۰ گونهٔ گیاهی با استفاده از استخراج سیال فوق بحرانی بررسی شده‌است. سهم عمده‌ای از تحقیقات استخراج با سیال فوق بحرانی را گونه‌های گیاهی اختصاص می‌دهد. امروزه استخراج با سیال فوق بحرانی یک جایگزین مهم برای روش‌های جداسازی سنتی است؛ زیرا از بسیاری از محدودیت‌ها می‌تواند جلوگیری کند[۱۱]. بایاودیاس و همکارانش[1] در سال ۲۰۱۶ بر روی تأثیر فراصوت بر استخراج ترکیبات فعال از نوعی فلفل قرمز با دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی، مطالعه کردند. آزمایش در فشارهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ مگاپاسکال، در دمای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجهٔ سلسیوس و در حضور امواج فراصوت با توان ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ وات در مدت زمان‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ دقیقه و با دبی دی‌اکسید کربن فوق بحرانی $۱/۷۵۶۹\times۱۰^{-۴}$ کیلوگرم بر ثانیه انجام شد و این آزمایش ثابت کرد که استفاده از فراصوت بازده استخراج با سیال فوق بحرانی را تا ۴۵ درصد افزایش می‌دهد[۱۲].

فیلیپه سانتوس و همکارانش[2] در سال ۲۰۱۶ مطالعهٔ خود را بر روی استخراج کاسپینائیدها از فلفل دلمه با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی به‌کمک فراصوت انجام دادند. آزمایش در شرایط عملیاتی با فشار ۱۵ مگاپاسکال و دمای ۴۰ درجهٔ سلسیوس و در مدت زمان ۶۰ دقیقه انجام شد. بازده استخراج با سیال فوق بحرانی در حضور امواج فراصوت تا ۷۷ درصد افزایش داشته است و بهترین شرایط استخراج در توان ۳۶۰ وات فراصوت بود[۱۳].

ویناتور و همکارانش[3] در سال ۲۰۱۷ مطالعهٔ خود را بر روی استخراج ترکیبات کاربردی از مواد گیاهی به‌وسیلهٔ امواج فراصوت و امواج ماکروویو پرداختند. آنها در این پژوهش به مطالعهٔ سازوکارهای استخراج به‌کمک امواج فراصوت و امواج ماکروویو پرداختند[۱۴].

اسکار بنتیو و همکارانش[4] در سال ۲۰۱۸ به مطالعهٔ استخراج روغن زیتون با استفاده از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و تأثیر مؤلفه‌های فرایندی در شرایط آزمایشگاهی دما ۴۰ تا ۶۰ درجهٔ سلسیوس، فشار ۲۰ تا ۴۰ مگاپاسکال و اندازهٔ ذرهٔ ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میکرومتر بر بازده استخراج پرداختند و به این نتیجه رسیدند که روغن استخراج شده به‌وسیلهٔ دی‌اکسید کربن فوق بحرانی دارای کیفیت بهتری نسبت به روغن استخراج شده با هگزان است[۱۵].

پریانکا و همکارانش[5] در سال ۲۰۱۸ به مطالعهٔ تأثیر مؤلفه‌های عملیاتی بر روی استخراج عطرمایه از ریشهٔ زردچوبه به‌وسیلهٔ سیال فوق بحرانی پرداختند، آزمایش در فشار ۲۰ تا ۴۰ مگاپاسکال، دمای ۴۰ تا ۶۰ درجهٔ سلسیوس، بده حلال ۵ تا ۱۵ گرم بر دقیقه با اندازهٔ ذرهٔ ۰ تا ۰/۸میلی‌متر انجام شد و نتیجه نشان داد که استخراج به‌وسیله سیال فوق بحرانی دارای بازدهی بیشتری نسبت به دیگر روش‌های استخراج است[۱۶].

خرنوب[6] با نام علمی *سراتونیا سیلیکوا*[7] یک‌گونه داروگیاه از خانوادهٔ بقولات[8]، از نوع گیاهان گل‌دهنده، به‌صورت درختچه‌ای و همیشه سبز است. برگ‌های آن ۱۰ تا ۱۲ سانتی‌متر طول دارند. تاج درخت گسترده و نیم‌کروی است؛ تنهٔ آن محکم و رنگ آن قهوه‌ای تیره و جنس آن خشن و زبر است. بخش‌های مورد استفادهٔ این گیاه میوه و دانه است. رنگ میوه‌های آن قهوه‌ای شفاف و سطح خارجی آن مسطح و قوسی شکل و دارای طعم شیرینی است. در داخل آن ۱۲ تا ۱۶ دانهٔ بسیار سخت شبیه به عدس دیده می‌شود. در برابر کم آبی و شوری خاک مقاوم است. سرعت رشد بالا و امکان کاشت آن به‌صورت دیم از ویژگی بارز این گیاه است. گیاهی است که در ۱۵ سال اول زندگی‌اش هیچ میوه‌ای نمی‌دهد. ارتفاع خرنوب به ۸ تا ۱۰ متر می‌رسد و دارای شاخه‌های گره‌دار و برگ‌هایی مرکب از ۸ تا ۱۰ برگچه است. گل‌های آن عاری از گلبرگ و مجتمع به صورت خوشه است؛ میوه اش نیام و ناشکوفا به‌طول متفاوت ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر به عرض ۲ تا ۳ سانتی‌متر و دارای وضع آویخته و کاملاً مشخص برروی شاخه ها است. رنگ میوه قهوه‌ای شفاف و

1. Baiao Dias et al.
2. Philipe Santos et al.
3. Vinator et al.
4. Oscar Benito et al.
5. Priyanka et al.
6. Carob
7. Ceratonia Siliqua
8. Fabaceqe

سطح خارجی آن مسطح و قوسی شکل است. نزدیک به ۳۵ درصد از مواد موجود در خرنوب، کربوهیدرات‌هایی با ساختار مولکول ساده است و نزدیک به ۴۰ درصد آن از نشاسته با ساختار مولکولی پیچیده تشکیل شده‌است. این گیاه همچنین دارای انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی مانند املاح کلسیم، سدیم، پتاسیم و ویتامین ای و انواع ویتامین‌های گروه ب به‌ویژه ب۱، اسید گالیک و برخی انواع اسید آمینه است. خرنوب دارای مقادیر زیادی فیبر و سرشار از آنتی‌اکسیدان است. کمتر از یک درصد قند و چربی دارد. فاقد کافئین و گلوتن است. دو برابر کاکائو، کلسیم دارد و استفاده از آن برای بسیاری از بیماری‌ها مفید است. مهمترین خاصیت گیاه خرنوب استفاده از آن به‌منظور تقویت قوای جنسی و حل مشکلات ناباروری به‌ویژه مشکلاتی از قبیل کاهش تعداد و کاهش تحرک اسپرم در مردان است. از دیگر خواص آن خاصیت خلط‌آور بودن است و به‌همین دلیل به درمان سرفه و مشکلات دستگاه تنفسی کمک می‌کند. این گیاه برای درمان تنگی نفس و تورم ریه نیز مفید است. گیاه دارویی خرنوب برای پیشگیری از خطر بیماری‌های قلبی عروقی مفید است، چراکه مصرف آن باعث کاهش کلسترول بد خون و افزایش کلسترول خوب خون می‌شود. استفاده از خرنوب برای درمان اسهال نیز مفید است. مصرف آن با شیر و عسل برای افزایش اشتها نیز مفید است. از موارد دیگر مصرف آن استفاده برای کاهش استرس استاست[۱۷].

عصاره‌های مؤثر دارویی به‌دست آمده از این گیاه شامل مادهٔ استامید[1][۱۸]، نرولیدول[2][۱۹]، پیرولیدین[3][۲۰] و استیگمست[4][۲۱] است که طبق آزمایش‌های انجام‌شده به‌ترتیب استامید به‌عنوان ماده‌ای برای درمان زخم معده، نرولیدول برای فعالیت‌های ضد انگلی، پیرولیدین به‌عنوان عامل قوی شیمی درمانی برای سرطان حنجره و استیگمست به‌عنوان عامل قوی ضد دیابت معرفی شده‌است.

از برتری‌های روش استخراج با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی می‌توان به مواردی مانند نداشتن حلال‌های سمی در عصاره، نداشتن تغییر نامطلوب در ترکیب استخراج به‌دلیل درجهٔ حرارت پایین استخراج، صرفه‌جویی در مصرف انرژی، بازیابی حلال، کاهش زمان استخراج اشاره کرد. از معایب آن می‌توان به درصد استخراج پایین، تأمین فشار بحرانی و نگهداشتن فشار و دمای بحرانی در نقطهٔ بحرانی اشاره کرد. از برتری‌های استخراج با دستگاه کلونجر می‌توان دستگاه ارزان و در دسترس و بازدهی نسبتاً بالای آن را نام برد. از معایب آن می‌توان به استفاده از دمای بالا اشاره کرد که باعث از بین رفتن مواد حساس به دما و ترکیبات دارویی می‌شود. در این‌مقاله از روش استخراج با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و کلونجر برای استخراج مواد مؤثر گیاه خرنوب استفاده شد. سپس درصد عصاره‌های مؤثر دارویی استخراج شده با این دو روش مقایسه شد.

۲. بخش تجربی

۲-۱ مواد

مخزن دی‌اکسید کربن زیر فشار ۵۵ مگا پاسکال دارای درجهٔ خلوص ۹۹/۹۵ درصد از شرکت گازهای صنعتی ابوقداره واقع در بلوار امیرکبیر شیراز تهیه شد. گیاه خرنوب از استان خوزستان، در فصل پاییز و در ماه آبان جمع‌آوری شد. دی کلرومتان به‌عنوان کمک حلال مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲ پیش‌نیازها و روش انجام آزمایش

طرحوارهٔ پیش‌نیازهای استفاده شده برای استخراج با سیال فوق بحرانی در شکل (۱) آمده است. ابتدا گاز دی‌اکسید کربن با خلوص ۹۹ درصد وارد سرد کننده شد. دمای آن تا ۲۰- درجهٔ سلسیوس کاهش یافت تا به حالت مایع درآید و با دبی ۶ میلی‌لیتر بر دقیقه وارد سل استخراج شد. در هربار آزمایش با استفاده از ترازو مقدار ۸ گرم از گیاه خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب شد. توری استخراج از گیاه الک شده پر شد. در ابتدا و انتها توری استخراج و مابین ذره‌های گیاه چند عدد سنگ جوش ریخته‌شد تا از تراکم گیاه درون توری استخراج جلوگیری شود، سپس توری استخراج درون سل استخراج به ارتفاع ۲۳ سانتی‌متر، قطر داخلی ۲/۸ سانتی‌متر و قطر بیرونی ۳/۵ سانتی‌متر قرار گرفت. بعد از این مرحله دما و فشار مورد نظر تنظیم شد. دستگاه فراصوت تا قسمتی مشخص، از آب پر شد و سل استخراج درون آن قرار گرفت. سپس دستگاه فراصوت روشن و اندازهٔ بسامد مورد نظر انتخاب شد. هنگامی که دما و فشار به‌اندازهٔ مورد نظر رسید، تمام شیرهای خروجی را بسته، شیر ورودی

1. Acetamide
2. Nerolidol
3. Pyrrolidine
4. Stigmast

را باز کرده، در همین‌حالت به‌مدت ۳۰ دقیقه سیال فوق بحرانی در تماس با مادۀ مورد نظر قرار گرفت تا به تعادل برسد. پس از پایان این‌مرحله لولۀ یو شکل را که حاوی دی کلرومتان با خلوص ۹۹درصد و سنگ جوش است درون ظرفی از یخ قرار داده‌می‌شود تا از بخار شدن نمونه جلوگیری کند. حلال دی کلرومتان عطرمایه را جذب و سیال را آزاد می‌کند. بعد از انجام این مراحل به‌دلیل فرار بودن حلال دی کلرومتان، عطرمایه در ته ظرف باقی می‌ماند که این عطرمایه در ظرف تیره‌رنگ در بسته جمع آوری و بعد به‌وسیلۀ دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنج جرمی، مواد موجود در آن و همچنین درصد این مواد تجزیه می‌شود.

۲-۳ طراحی آزمایش

طراحی این آزمایش به روش تاگوچی با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب - ۱۶ انجام شد. در این‌تحقیق به‌دلیل استخراج با ترکیب امواج فراصوت علاوه‌بر مؤلفه‌های مؤثر، دما، فشار و اندازۀ ذره، مؤلفۀ دیگری به نام اندازۀ بسامد اضافه می‌شود و در آزمایش‌های تکمیلی زمان ایستایی هم به مؤلفه‌های موجود اضافه شد. طراحی آزمایش و تغییرات مؤلفه‌ها در جدول (۱) آورده شده‌است.

شکل ۱. طرحوارۀ دستگاه استخراج به‌وسیلۀ دی‌اکسید کربن فوق بحرانی با ترکیب امواج فراصوت

۱- کپسول دی‌اکسید کربن ۲- شیر ۳- سرد کننده ۴- پمپ ۵- مخزن دی‌اکسید کربن ۶- دستگاه فراصوت ۷- لولۀ یو شکل

۳. نتیجه‌ها و بحث

در این‌بخش نتایج آزمایشگاهی استخراج عطرمایه از گیاه خرنوب با استفاده از دستگاه کلونجر و سیال فوق بحرانی دی‌اکسید کربن با ترکیب امواج فراصوت گزارش شده‌است.

جدول ۱. طرح آزمایش برای استخراج با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی با ترکیب امواج فراصوت.

شمارۀ آزمایش	فشار (بار)	دما (سلسیوس)	اندازۀ ذره (میلی متر)	اندازۀ بسامد (کیلوهرتز)	بازده
۱	۱۵۰	۳۵	۰/۱	۰	۱/۵۲۵۴
۲	۱۵۰	۴۵	۰/۲	۳۷	۱/۹۵۲۳
۳	۱۵۰	۵۵	۰/۴	۸۰	۱/۳۸۱۱
۴	۱۸۰	۳۵	۰/۲	۸۰	۲/۰۸۱۰
۵	۱۸۰	۴۵	۰/۴	۰	۲/۷۳۲۰
۶	۱۸۰	۵۵	۰/۱	۳۷	۲/۹۱۵۳
۷	۲۱۰	۳۵	۰/۴	۳۷	۳/۷۸۲۵
۸	۲۱۰	۴۵	۰/۱	۸۰	۳/۰۱۸۶
۹	۲۱۰	۵۵	۰/۲	۰	۳/۴۵۳۸

۳-۱ شناسایی ترکیبات گیاه خرنوب به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی جرمی

برای عطرمایه‌گیری با کلونجر، ابتدا نمونه خشک و آسیاب شد. در بالون ژوژه ریخته و پس از آن تا دو سوم حجم بالون از آب مقطر پر شد. ورودی آب به لولهٔ پایین مبرد متصل و خروجی آب به لولهٔ بالایی وصل و به سینک ظرفشویی هدایت شد. یک لولهٔ کوتاه آزاد نیز بعد از مبرد قرار دارد که برای تنظیم و جلوگیری از افزایش فشار تعبیه شده‌است، که بهتر است به‌وسیلهٔ چوب‌پنبه پوشانده شود. شیر انتهایی کلونجر بسته است، همچنین مقداری بالاتر از سطح شیر با آب مقطر پر شده است. این کار برای آن است تا عطرمایهٔ جمع‌آوری‌شده به دیواره کلونجر نچسبد و هدر نرود. در آغاز کار منبع حرارت روشن و زمان شروع آزمایش ثبت شد. زمان جوشیدن و نیز خروج اولین قطرهٔ عطرمایه یادداشت شد. وزن ظرف دوباره اندازه‌گیری شد و پس از کم‌کردن ظرف خالی از پر، مقدار عطرمایه به‌دست آمد. عطرمایهٔ به‌دست‌آمده ممکن است دارای آب باشد که از سولفات سدیم برای جذب آب استفاده می‌شود. در انتهای کار با داشتن وزن مادهٔ خشک گیاه و وزن عطرمایه، از راه تناسب بازده عطرمایه به‌صورت درصد مشخص می‌شود. سپس عطرمایهٔ به‌دست آمده از این روش به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی گازی تجزیه شد. نتایج تجزیهٔ به‌دست آمده در جدول (۲)، آورده شده است. بازده عطرمایه با استفاده از روش کلونجر ۱/۰۲ درصد به‌دست آمد.

جدول ۲. ترکیبات موجود در گیاه خرنوب به روش کلونجرتجزیه شده با کروماتوگرافی گازی.

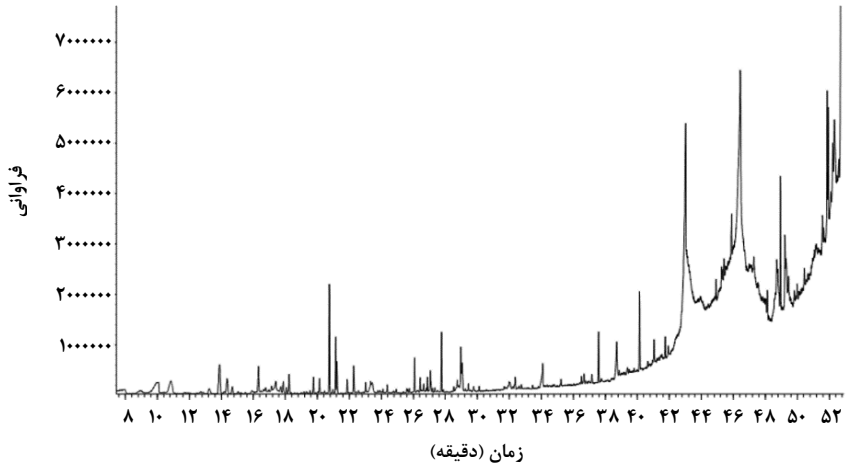
Qual	ترکیب شیمیایی	درصد سطح	زمان بازداری	پیک
۸۵	سیکلوپروپان کربوکسیلیک	۰/۰۸ D	۹۶۷/۷	۱
۸۶	اتانون	۰/۰۲ D	۷۴۹/۱۱	۲
۹۱	۲- هپتانون	۰/۰۳ D	۸۸/۱۳	۳
۸۶	بنزالدهید	۰/۰۴ D	۶۵۷/۱۶	۴
۸۵	آستامید	۰/۰۴ D	۱۴۰/۱۷	۵
۸۹	۲- دیون	۰/۰۵ D	۷۱۳/۱۷	۶
۸۵	پیرولیدین	۰/۰۳ D	۰۷۵/۱۸	۷
۹۲	۲، ۴- هپتادینتال	۰/۱۳ D	۲۳۱/۱۸	۸
۹۱	۲- نونانون	۰/۴۸ D	۷۵۴/۲۰	۹
۸۶	۲- نونانول	۰/۲۳ D	۱۴۱/۲۱	۱۰
۸۶	دی سولفید متیل	۰/۱۶ D	۲۷۲/۲۲	۱۱
۹۳	اکتانویک اسید	۰/۱۲ D	۴۳۳/۲۳	۱۲
۹۳	۲- آندیکنون	۰/۰۶ D	۸۹۱/۲۶	۱۳
۹۰	۲، ۴- دکادینال	۰/۲۴ D	۷۶۶/۲۷	۱۴
۸۵	پیرولیدین	۰/۰۳ D	۴۸۵/۲۷	۱۵
۸۹	دی- لیمونینی	۰/۰۳ D	۵۳۳/۲۸	۱۶
۹۵	دیکنویک اسید	۰/۲۳ D	۰۷۳/۲۹	۱۷
۹۴	پنتادی کن	۰/۰۷ D	۳۶۸/۳۲	۱۸
۸۹	سیس،سیس،۷،۱۰- هگزادی کادینال	۰/۰۳ D	۵۰۶/۳۶	۱۹
۹۹	مایستریک اسید	۰/۴۰ D	۷۱۰/۳۸	۲۰
۹۷	نئوفیتادین	۰/۳۳ D	۱۴۲/۴۰	۲۱
۹۰	نرولیدول	۰/۱۰ D	۷۵۱/۴۱	۲۲
۹۳	۹- اکتادی کنویک اسید	۳/۱۰ D	۴۳۵/۴۶	۲۳
۸۹	سیکلوهگزیل متیل	۰/۵۳ D	۷۱۴/۴۸	۲۴
۹۵	۹، ۱۲- اکتادی کادینویل کلرید	۰/۵۴ D	۸۶۴/۵۱	۲۵
۹۱	استیگمست	۳/۷۸ D	۱۵۲/۵۷	۲۶
۹۱	گاما- سیتوسترول	۳/۷۸ D	۱۵۲/۵۷	۲۷
۹۰	اوراسیل	۳/۲۸ D	۴۰۶/۵۷	۲۸

پس از تحقیق و بررسی دربارهٔ ترکیبات به‌دست آمده از نتایج تجزیه، چهار ماده استامید، پیرولیدین، استیگمست و نرولیدول به‌عنوان مواد مؤثرهٔ گیاه خرنوب انتخاب شدند؛ چون فواید این ترکیبات به‌وسیلهٔ بعضی از محققانی که این ترکیبات را آزمایش و بررسی کرده بودند مشخص شده‌است.

مطابق جدول (۲) و (۳)، ترکیبات به‌دست آمده از تجزیهٔ عصارهٔ گیاه خرنوب به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی گازی حاصل از استخراج فوق بحرانی بیشتر از استخراج با دستگاه کلونجر است. همچنین در روش استخراج با سیال فوق بحرانی، درصد ترکیبات به‌دست آمده به‌ویژه چهار مادهٔ مؤثر مورد نظر شامل استامید، استیگمست، نرولیدول و پیرولیدین نسبت‌به روش کلونجر بیشتر است که این امر بیانگر این موضوع است که استخراج با سیال فوق بحرانی نسبت به استخراج با دستگاه کلونجر دارای بازدهی بیشتری است و همچنین نشان می‌دهد که ممکن است بعضی از ترکیبات حساس به دما در روش استخراج به‌وسیلهٔ کلونجر از بین رفته باشند.

جدول ۳. ترکیبات موجود در گیاه خرنوب با استفاده از سیال فوق بحرانی و دستگاه فراصوت تجزیه شده با کروماتوگرافی گازی.

Qual	ترکیب شیمیایی	درصد سطح	زمان بازداری	پیک
۸۶	سیکلوپروپان کربوکسیلیک	۰/۰۸ D	۱۵۹/۵	۱
۹۱	دیکنویک اسید	۰/۰۵D	۶/۴۲۵	۲
۸۳	فوران	۰/۱۰D	۷/۱۷۳	۳
۸۰	اکتانال	۰/۳۳D	۸/۸۵۲	۴
۹۴	دیکنویک اسید	۰/۲۰D	۹/۲۳۸	۵
۸۶	اتانون	۰/۰۲ D	۵۸۲/۱۰	۶
۹۳	۲- هپتانون	۰/۰۳ D	۵۶۰/۱۱	۷
۸۵	پنتادی کن	۰/۰۵D	۱۲/۴۸۹	۸
۸۰	آزیریدین	۰/۰۹D	۱۴/۲۴۵	۹
۸۰	اکسیرین	۰/۰۳D	۱۵/۰۴۹	۱۰
۸۸	بنزالدهید	۰/۰۴ D	۵۰۰/۱۵	۱۱
۹۱	آستامید	۰/۰۴ D	۲۵۰/۱۶	۱۲
۸۵	پولیگن	۰/۱۰D	۱۷/۵۸۹	۱۳
۸۹	۲- دیون	۰/۰۵ D	۵۵۰/۱۸	۱۴
۹۰	پیرولیدین	۰/۰۳ D	۴۷۸/۱۹	۱۵
۹۰	۲، ۴- هپتادینتال	۰/۱۳ D	۲۳۱/۲۰	۱۶
۸۶	نوناکوسان	۰/۰۵D	۲۱/۳۱۲	۱۷
۸۹	۲- نونانون	۰/۴۸ D	۴۵۶/۲۲	۱۸
۹۰	۲- نونانول	۰/۲۳ D	۱۵۸/۲۳	۱۹
۸۸	دی سولفید متیل	۰/۱۶ D	۵۶۹/۲۴	۲۰
۹۴	اکتانویک اسید	۰/۱۲ D	۴۵۶/۲۵	۲۱
۹۵	۲- آندیکنون	۰/۰۶ D	۵۶۰/۳۰	۲۲
۹۵	۲، ۴- دی کادینال	۰/۲۴ D	۵۰۰/۳۰	۲۳
۸۵	نئوفیتادین	۰/۰۳D	۳۵/۴۸۹	۲۴
۸۰	پیرازین	۰/۰۹D	۳۸/۰۴۱	۲۵
۹۱	پیرولیدین	۰/۰۳ D	۴۸۵/۳۹	۲۶
۹۸	مایستریک اسید	۰/۴۰ D	۸۵۰/۴۰	۲۷
۹۹	نئوفیتادین	۰/۳۳ D	۵۶۰/۴۲	۲۸
۸۹	پالمیتیک اسید استر	۰/۲۵D	۵۰/۰۵۰	۲۹
۹۲	نرولیدول	۰/۱۰ D	۷۸۹/۵۸	۳۰
۹۵	۹- اکتادی کنویک اسید	۳/۱۰ D	۶۵۸/۵۸	۳۱
۹۳	استیگمست	۳/۷۸ D	۱۲۲/۵۹	۳۲
۹۳	گاما-سیتوسترول	۳/۷۸ D	۸۵۹/۵۹	۳۳
۹۵	اوراسیل	۳/۲۸ D	۶۵۲/۵۹	۳۴

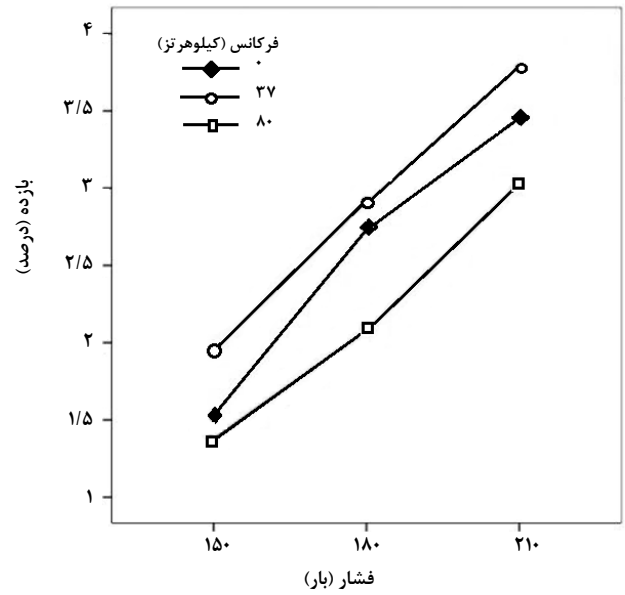


شکل ۲. نتیجهٔ کروماتوگرافی جرمی گیاه خرنوب به‌روش کلونجر.

۳-۲ بررسی تأثیر فشار

افزایش فشار می‌تواند باعث افزایش جرم حجمی حلال شود که این امر به نوبهٔ خود باعث افزایش حلالیت دی‌اکسید کربن می‌شود. در تحقیقی که سالگین و همکارانش بر روی استخراج روغن گل آفتابگردان با استفاده از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی انجام دادند به این نتیجه رسیدند که با افزایش فشار از ۲۰ به ۶۰ مگاپاسکال میزان استخراج نیز افزایش یافته است و دلیل این افزایش را افزایش جرم حجمی ذکر کرده‌اند[۲۲].

برای به‌دست آوردن تأثیر فشار در روند آزمایش‌ها، آزمایش‌ها در سه فشار ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ بار انجام شد. در آزمایش با افزایش فشار تا ۲۱۰ بار به‌دلیل افزایش جرم حجمی دی‌اکسید کربن، کاهش فاصله میان مولکول‌ها و افزایش بر هم‌کنش‌های مولکولی میان حلال و عصاره، قدرت حلالیت سیال فوق بحرانی و میزان بازیابی نمونه را افزایش می‌دهد. در آزمایش زمانی که امواج فراصوت هم حضور دارد، با اعمال فشار و عبور سیال فوق بحرانی از روی مادهٔ مورد نظر باعث تشکیل حباب‌های حفره‌زدایی درون گیاه می‌شود. ترکیدن حباب‌ها باعث ایجاد موج ضربتی در حلال می‌شود و سرعت اختلاط را بالا می‌بردکه این امر برای فرایندهای استخراج مفید است. در شکل (۳) تأثیر فشار بر روی درصد بازده مشخص شده‌است.



شکل ۳. تأثیر فشار بر روی درصد بازده

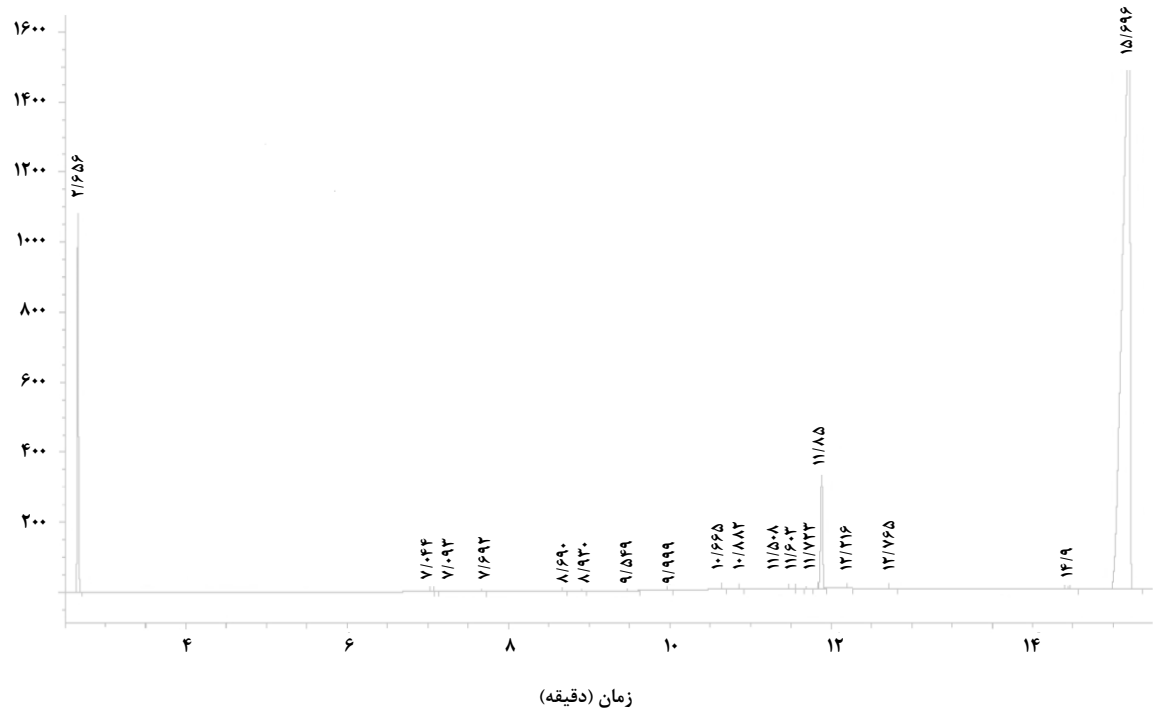
شکل (۴)، کروماتوگرافی به‌دست‌آمده از انجام آزمایش در فشار ۱۵۰ بار، دما ۳۵ درجهٔ سلسیوس، اندازهٔ ذره ۰/۱ میلی‌متر است که جداسازی ترکیبات نشان داده شده‌است.

۳-۳ بررسی تأثیر دما

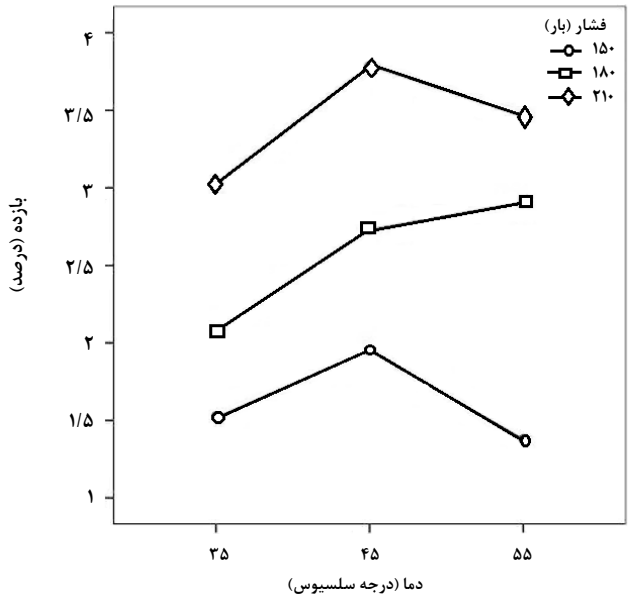
افزایش دما سبب افزایش فشار بخار و کاهش حلالیت می‌شود؛ به‌دلیل کاهش جرم حجمی و کاهش قدرت حلالیت سیال فوق بحرانی سبب کاهش میزان بازیابی می‌شود. درفشار بالا، دما دارای تأثیر نسبتاً کمی بر بازده استخراج است. تغییرات درجهٔ حرارت در فشار بالا به‌طور چشمگیری بر چگالی مایعات تأثیر نمی‌گذارد. در بررسی سالگین برای استخراج روغن دانهٔ جوجوبا با استفاده از سیال فوق بحرانی، به این نتیجه رسید که بازده استخراج با افزایش دما در فشارهای پایین کاهش می‌یابد. افزایش دما در فشار ثابت موجب کاهش جرم حجمی دی‌اکسید کربن و همچنین افزایش فشار حل شونده می‌شود[۲۳].

کاهش جرم حجمی در فشار حوالی فشار بحرانی محسوس‌تر و قابل توجه‌تر است و موجب کاهش حلالیت می‌شود. این در حالی است که افزایش دما در فشارهای بالاتر کاهش جرم حجمی کمتری را به همراه دارد که البته این کاهش به‌وسیلهٔ افزایش فشار بخار تعدیل می‌شود و نتیجهٔ آن افزایش حلالیت است. برای مشخص‌شدن تأثیر دما در انجام آزمایش‌ها، دما مقادیر ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجهٔ سلسیوس در نظر گرفته شد. از مقایسهٔ آزمایش‌های انجام‌شده در شرایط دمای ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجهٔ سلسیوس مشاهده شد که افزایش دما تا محدودهٔ خاصی، باعث بهبود بازده می‌شود. در شکل (۵) تأثیر دما بر روی بازده مشخص شده است.

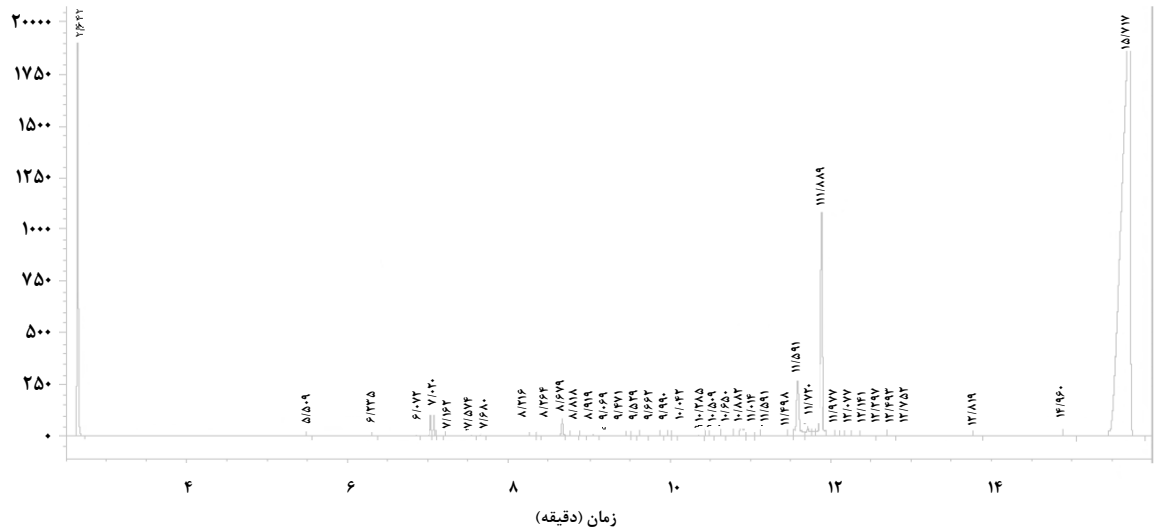
شکل (۶)، کروماتوگرافی به‌دست‌آمده از انجام آزمایش در فشار ۱۸۰ بار، دما ۳۵ درجهٔ سلسیوس، اندازهٔ ذرهٔ ۰/۲ میلی‌متر و اندازهٔ بسامد ۸۰ کیلوهرتز است، که جداسازی ترکیبات نشان داده شده است.



شکل ۴. کروماتوگرافی عطرمایه در فشار ۱۵۰ بار، دما ۳۵ درجهٔ سلسیوس و اندازهٔ ذرهٔ ۰/۱ میلی‌متر.



شکل ۵. تأثیر دما بر روی درصد بازده.



شکل ۶. کروماتوگرافی عطرمایه در فشار ۱۸۰ بار، دما ۳۵ درجهٔ سلسیوس، اندازهٔ ذره ۰/۲ میلی‌متر و اندازهٔ بسامد ۸۰ کیلوهرتز.

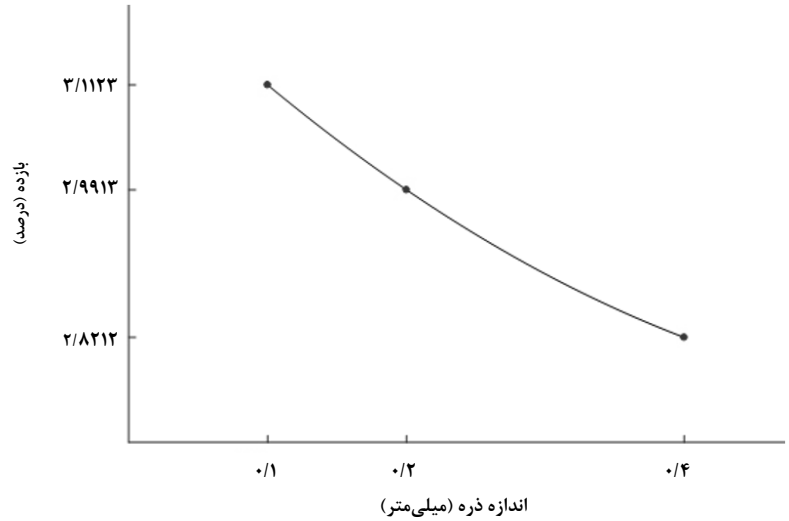
۳-۴ بررسی تأثیر اندازهٔ ذره

هرچه اندازهٔ ذرات نمونه کوچکتر باشد درصد بازیابی بیشتر می‌شود؛ اما معمولاً باید یک حد بهینه را در نظر گرفت. افزایش اندازهٔ ذره باعث تأثیر معکوس در میزان بازده استخراج می‌شود یا به زبان ساده‌تر کاهش اندازهٔ هسته باعث افزایش میزان بازده استخراج می‌شود. همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود با افزایش اندازهٔ ذره میزان بازده کاهش می‌یابد یا به‌عبارتی بازده استخراج با اندازهٔ ذره نسبت عکس دارد. تعدادی از محققان در مورد افزایش میزان بازده با کاهش اندازهٔ ذره نظرهایی ارائه‌کرده‌اند. سالگین و همکارانش به این نتیجه رسیدند که اثرات نفوذ درون هسته‌ای در ذرات بزرگتر به مراتب بیشتر از ذرات با اندازهٔ کوچک است و درنتیجه مقاومهای موجود در ذرات بزرگتر را به‌مراتب بزرگتر دانسته‌اند و این را دلیل اصلی کاهش بازده استخراج در ذرات بزرگتر دانسته‌اند[۲۲].

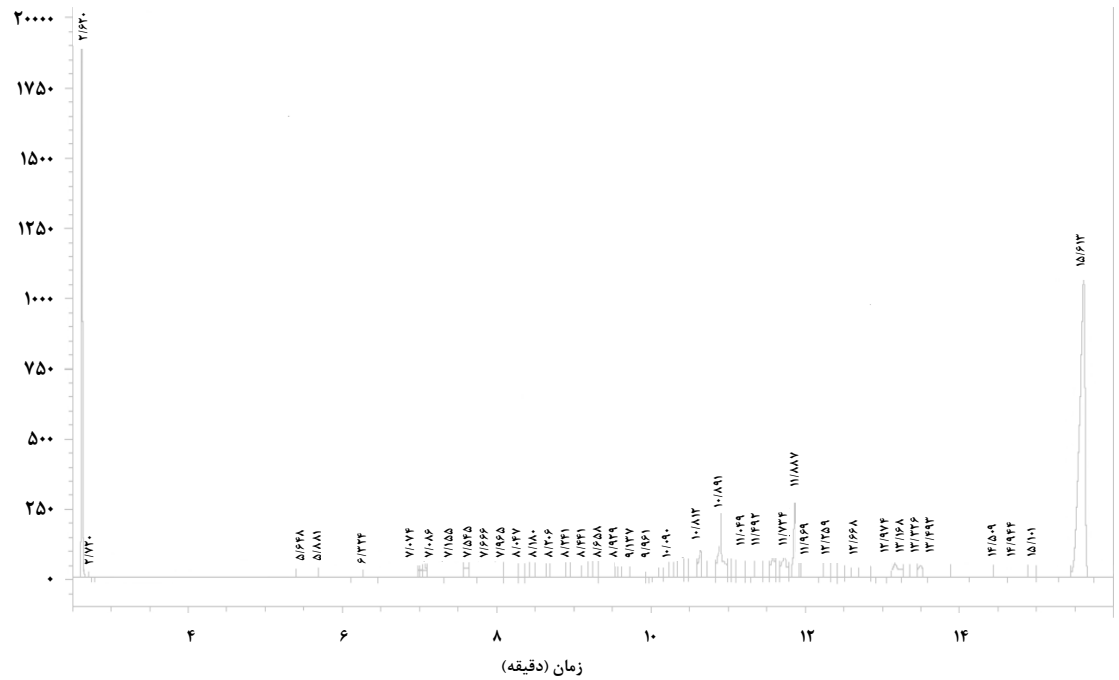
برای مشخص‌شدن تأثیر اندازهٔ ذره در انجام آزمایش‌ها، از سه اندازهٔ

۰/۲،۰/۱ و ۰/۴ میلی‌متر استفاده شد. از مقایسهٔ سه آزمایش انجام شده در اندازهٔ ذره‌های ۰/۲،۰/۱ و ۰/۴ میلی‌متر در فشار ثابت ۱۵۰ بار، در شکل (۷) مشاهده می‌شود که افزایش اندازهٔ ذره باعث می‌شود که ذرات کمتر شکسته شده، مواد مؤثر گیاه به سختی روی سطح بیایند و ذرات به‌صورت نامناسب در توری استخراج قرار بگیرند و دی‌اکسید کربن به‌طور کامل با تمام ذرات تماس پیدا نکند و در نتیجه درصد بازده به‌دست آمده کاهش یابد.

شکل (۸)، کروماتوگرافی به‌دست‌آمده از انجام آزمایش در اندازهٔ ذرهٔ ۰/۴میلی‌متر، فشار ۱۸۰ بار، دما ۵۵ درجهٔ سلسیوس و اندازهٔ بسامد ۸۰ کیلوهرتز است.



شکل ۷. تأثیر اندازهٔ ذره بر میزان استخراج



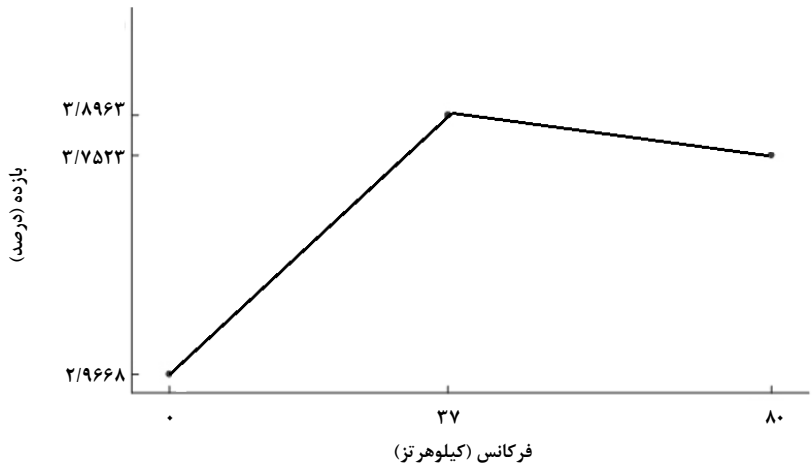
شکل ۸. کروماتوگرافی عطرمایه در فشار ۱۵۰ بار، دما ۵۵ درجهٔ سلسیوس، اندازهٔ ذره ۰/۴ میلی‌متر و اندازه بسامد ۸۰کیلوهرتز.

۳-۵ بررسی تأثیر اندازهٔ بسامد

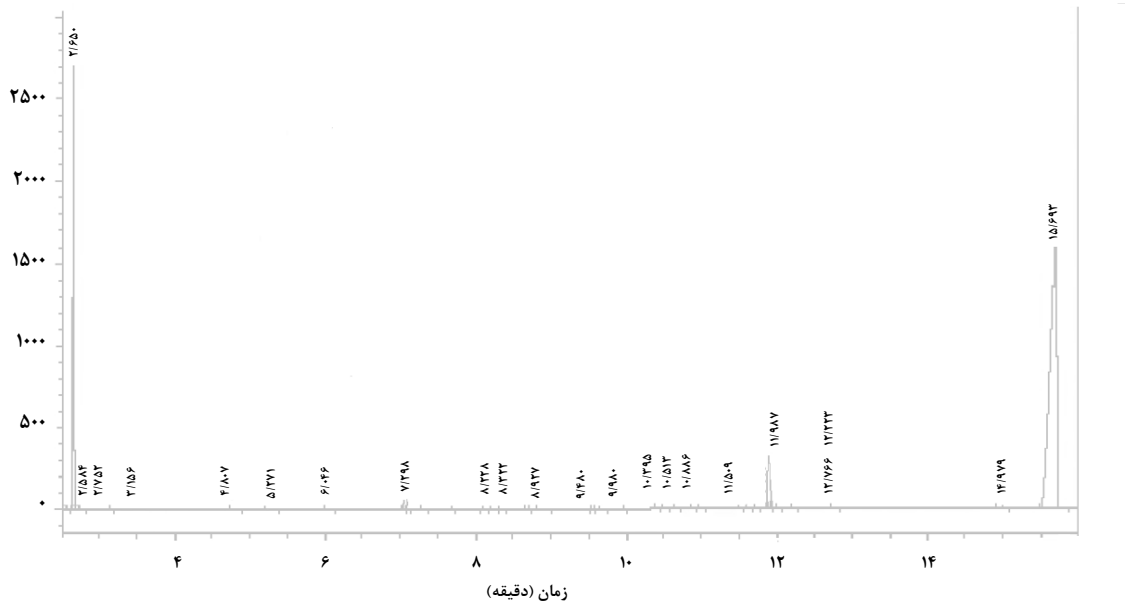
افزایش بازده استخراج ترکیبات آلی به‌وسیلهٔ امواج فراصوت به پدیدهٔ تشکیل حباب که با عبور موج فراصوت از میان حلال ایجاد شده است، نسبت داده می‌شود. در طی به‌کارگیری امواج فراصوت، حباب‌هایی ایجاد و فشرده می‌شوند. افزایش فشار و دما منجربه ترکیدن و متلاشی‌شدن حباب‌ها می‌شود. ترکیدن حباب‌ها که باعث ایجاد موج ضربتی در حلال می‌شود سرعت اختلاط را افزایش می‌دهد. هرچه بسامد پایین‌تر باشد، حباب‌ها بزرگ‌تر خواهند بود. بنابراین در بسامدهای پایین‌تر، امواج قدرتمند فراصوت (در حدود ۳۷ کیلوهرتز) به‌شدت بیشتری، به ترکیدگی حباب می‌انجامد و درنتیجه برای فرایندهای استخراج کارامدتر هستند. تا زمانی‌که سامانهٔ استخراجی دارای محیطی ناهمگن و پیچیدهٔ پرخلل و فرج باشد، تأثیر اندازهٔ حباب‌ها که بر کارایی استخراج وجود دارد، باید مد نظر قرار گیرد. تأثیر بسامد ممکن است نه‌تنها در ارتباط با اندازهٔ حباب‌های حفره‌زایی باشد، بلکه همچنین ممکن است در ارتباط با تأثیر آن بر مقاومت داخلی و خارجی انتقال توده باشد. با این‌که این مسأله در مطالعات مرتبط با استخراج بررسی نشده‌است، در زمینه‌های مرتبط با خشک‌سازی این کار انجام شده است. در آن فرایند، ساختار جامد نقش اصلی را در اثرات به‌دست‌آمده از بهره‌گیری از امواج فراصوت ایفا می‌کند. فراصوت همچنین یک اثر مکانیکی را اعمال می‌کند و اجازه می‌دهد تا حلال به مقدار بیشتری در بافت نمونه نفوذ کنده و باعث افزایش سطح تماس بین فاز جامد و مایع شود. این عمل همراه با افزایش انتقال جرم و تخریب سلولی چشمگیر با ترکیدن حباب‌ها منجربه آزادشدن ترکیب از درون سلول به حلال می‌شود. استفاده از دمای بالاتر در روش فراصوت منجربه افزایش تعداد ترکیدگی حباب‌ها و افزایش بازده استخراج می‌شود. از طرفی هرچه توان فراصوت بالاتر باشد، ارتعاشات قوی‌تری به‌وجود خواهند آمد. بنابراین بازده نیز افزایش خواهدیافت. در شرایط فوق بحرانی، فشار ایستایی در بالای نوک ردیاب فراصوت، معمولاً بسیار بالاست. در چنین سامانه‌ای، بخشی از توان فراصوت برای غلبه بر فشار ایستایی مصرف می‌شود. فقط در زمانی‌که توان فراصوت به اندازهٔ کافی بالا باشد، ارتعاشات آشفته که یکی از پدیده‌های فراصوتِ به‌خوبی شناخته شده است، به‌وجود می‌آیند.

برای مشخص‌شدن تأثیر اندازهٔ بسامد در آزمایش‌ها ، از بسامدهای ۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز و یک آزمایش بدون بسامد امواج استفاده‌شد. از مقایسهٔ سه آزمایش انجام شده در بسامدهای ۰ ، ۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز در اندازهٔ ذره و دمای ثابت و فشار ثابت ۱۵۰ بار در شکل (۹) مشاهده می‌شود که اندازهٔ بسامد ۳۷ کیلوهرتز در مقایسه با بسامد ۸۰ کیلوهرتز و زمانی‌که اندازهٔ بسامد دخیل نیست، دارای بیشترین بازده است. شکل (۱۰)، کروماتوگرافی به‌دست‌آمده از انجام آزمایش در فشار ۱۵۰ بار، دما ۵۵ درجهٔ سلسیوس و اندازهٔ ذره ۰/۱ میلی‌متر و اندازهٔ بسامد ۳۷ کیلوهرتز است.

بایاودیاس و همکارانش به مطالعهٔ تأثیر فراصوت بر استخراج ترکیبات فعال از نوعی فلفل قرمز به‌وسیلهٔ دی‌اکسید کربن فوق بحرانی پرداختند. در این مقاله استفاده از فراصوت بازده استخراج را تا ۴۵ درصد افزایش داده است[۲۴].



شکل ۹. تأثیر اندازهٔ بسامد بر درصد بازده.



شکل ۱۰. کروماتوگرافی عطرمایه در فشار ۱۵۰ بار، اندازهٔ ذرهٔ ۰/۱ میلی متر، دما ۵۵ درجهٔ سلسیوس واندازهٔ بسامد ۳۷ کیلوهرتز.

۴. نتیجه‌گیری کلی

در ایـن تحقیقـات اسـتخراج بـا دسـتگاه کلـونجر و اسـتخراج دی‌اکسید کربن فوق بحرانی به‌همـراه دسـتگاه فراصـوت در شـرایط مختلف بررسی شد و نتایج نشان داد که افزایش فشـار باعـث بهبـود فرایند استخراج شده و تأثیر مثبـت و قابـل تـوجهی بـر روی بـازده استخراج دارد و تا ۳۰ درصد بازده را بهبود می‌بخشد. نتایج افـزایش دما سبب افزایش بخار عطرمایه و همچنین سبب کـاهش گـران‌روی می‌شود، که این دو مؤلفه باعث بهبود بازده استخراج می‌شود و آن را تا ۱۵ درصد افزایش می‌دهد و همچنین در مورد تأثیر انـدازهٔ ذرات؛ نتایج نشان داد که کاهش اندازهٔ ذرات باعث بهبـود بـازده اسـتخراج می‌شود و بازده را به اندازهٔ ۱۰درصد بهبـود مـی‌بخشـد. اسـتفاده از بسامد امواج فراصوت نیز بر بازده استخراج تأثیر چشمگیری داشت و تا ۴۵ درصد باعث بهبود بازده شده‌است.

مراجع

[۱] اسفندیاری، ن.، قریشی، س. م.، "استخراج و تولید نانوذرات با استفاده از سیال فوق بحرانی"، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، چاپ اول، (۱۳۹۴)

[2] Raul, N. C., Lucinewton, S. M., Paulo, T. V., Angela, A. M., "Supercritical fluid extraction from rosemary (rosemarinus officinalis)" , Journal of Supercritical Fluids, 35(3), pp. 197-204 (2005).

[3] Ghasemi, E., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkoh, F., "Comparative analysis of the oil and supercritical CO_2 extract of Artemisia siberi", Journal of Food Engineering, 79(1), pp. 306-311 (2005).

[4] Zhiyi, L., Xuewu, L., Shuhua, C., Xiaodong, Zh., Yuanjing, X., Yong, W., Feng, X., "An experimental and simulating study of supercritical CO_2 extraction for pepper oil", Journal of Chemical Engineering and processing: Process Intensification, 45(4), pp. 264-267 (2006).

[5] Goodarznia, I., Eikani, M. H., "Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils: Modeling and simulation," Journal of Chemical Engineering Science, 53, pp. 87-95 (2012).

[6] Ghasemi, E., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkoh, F., "Comparative analysis of the oil and supercritical CO_2 extract of Artemisia siberi", Journal of Food Engineering, pp. 306-311 (2007).

[7] Hasan, N., Bakhtier, F., "Mass transfer enhancement in supercritical fluid extraction by acoustic waves", Journal of Supercritical Fluids,80, pp. 60-70 (2013).

[8] Wengiang, G., Shufen, Li., Ruixiang, Y., Shaokun, T., "comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical Carbon dioxide and other three traditional extraction methods", Journal of Food Chemistry, 101(4), pp. 1558-1564 (2007).

[9] Berna, A., Tarrega, A., Blasco, M., Subirats, S., "Supercritical extraction of essential oil from orange peel: effect of the height of the bed", Journal of Supercritical Fluids, 18, pp. 227-237 (2000).

[10] Esfandiari, N., "Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide", Journal of Supercritical Fluid, 100, pp. 129-141 (2015).

[11] Sampatrao, D. M., Kabir, D., "Supercritical fluids in separation and purification: A review", Materials for Energy Technologies, 2, pp. 463-484 (2019).

[12] Baiao Dias, A., Scarelli Arroio Sergio, C., Santos, Ph., Fernandez, G., Rezende, C., Martinez, J., "Effect of ultrasound on the supercritical CO_2 extraction of bioactive compounds from dedo de moca pepper (Capsicum baccatum L. Var. pendulum) ", Journal of Ultrasonic Sonochemistry, 31, pp. 284-294 (2016).

[13] Santos, Ph., Aguiar, A., Barbero, G., Rezende, C., Martinez, J., "Supercritical Carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (Capsicum frutescens L.) Assisted by ultrasound", Journal of Ultrasonic Sonochemistry, 22, pp. 78-88 (2016).

[14] Minatory, M., Mason, T. J., Calinescu, I., "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assiste extraction (MAE) of functional compounds from plant materials", Journal of Ultrasonic Sonochemistry, 97, pp. 159-178 (2017).

[15] Benito, O., Rodríguez, M., Teresa, M., Beltrán, S.,"Supercritical carbon dioxide extraction of quinoa oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality", Journal of Supercritical Fluids, 139, pp. 62-71 (2018).

[16] Priyanka Shabina, Kh. ," Influence of operating parameters on supercritical fluid extraction of essential oil from turmeric root", Journal of Cleaner Production, 188, pp. 816-824 (2018).

[۱۷] ثابتی، ح.، "جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران"، تهران، دانشنامه رشد، مدخل خرنوب، (۱۳۵۵).

[18] Fatmah, A. S., Amani, S., Awaad Ahmed, M., "Novel quinazoline and Acetamide derivatives as safe anti-ulcerogenic agent and anti-ulcerative coalitis activity", Journal of Saudi Pharmaceutical, 26(1), pp. 138-143 (2018).

[19] Marcos, P. S., Rosimeive, N., Deoliveria, A., Mengarda, C., Daniel, B., "Anti-parasitic activity of nerolidol in mouse model of schistosomiasis", Journal of Antimicrobial, 48(6), pp. 641-646 (2017).

[20] Hany, A., Dana, Z., Srinivasulu, V., Hersi, F., "Design, Synthesis and biological evaluation of new pyrrolidine carboxamide analogus as potential chemothera peutic agents for hepatocellular carcinoma", Journal of Medicinal Chemistry, 139, pp. 804 - 814 (2017).

[21] Sujatha, S., Anand, S., Sangeetha, K. N., Balakrishnan, A., Lakshmi, B. S., "Biological evaluation of 3β-STIGMAST-5-EN-3-OL as potent anti-diabetic agent in regulating glucose transport using in vitro model", International Journal of Diabetes Mellitus, 2, pp. 101-109 (2010).

[22] Salgin, U., Doker, O., Calimi, A., "Extraction of sunflower oil with supercritical CO_2: experiments and modeling " ,Journal of Supercritical Fluids, 38(3), pp. 326-331 (2006).

[23] Salgin, U., "Effect of jojoba seed oil using supercritical CO_2 + ethanol mixture in green and high – tech separation process", Journal of Supercritical Fluids, 39(3), pp. 330-337 (2007).

[24] Baiao Dias, A., Scarelli Arroio Sergio, C., Santos, Ph., Fernandez, G., Rezende, C., Martinez, J., "Effect of ultrasound on the supercritical CO_2 extraction of bioactive compounds from dedo de moca pepper (Capsicum baccatum L. Var. pendulum)", Journal of Ultrasonic Sonochemistry, 31, pp. 284-294 (2016).