



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**OBTENÇÃO DO EXTRATO VOLÁTIL DE SEMENTES DE *ANETHUM
GRAVEOLENS* L. POR DIFERENTES TÉCNICAS EXTRATIVAS**

JOSÉ JACQUES GARCEZ

ENGENHEIRO QUÍMICO

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Julho, 2016



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**OBTENÇÃO DO EXTRATO VOLÁTIL DE SEMENTES DE *ANETHUM
GRAVEOLENS* L. POR DIFERENTES TÉCNICAS EXTRATIVAS**

JOSÉ JACQUES GARCEZ

ENGENHEIRO QUÍMICO

ORIENTADOR: PROF. DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Julho, 2016**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

OBTENÇÃO DO EXTRATO VOLÁTIL DE SEMENTES DE ANETHUN GRAVEOLLENS L. POR DIFERENTES TÉCNICAS EXTRATIVAS

CANDIDATO: JOSÉ JACQUES GARCEZ

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Rubem Mário F. Vargas

DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - ORIENTADOR

Eduardo Cassel

DR. EDUARDO CASSEL - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

Gilsane Lino von Poser

DRA. GILSANE LINO VON POSER - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - UFRGS

Claudio Luis Crescente Frankenberg

**DR. CLAUDIO LUIS CRESCENTE FRANKENBERG - DA FACULDADE DE ENGENHARIA
- PUCRS**

Nara Regina de Souza Basso

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

*“A persistência é o caminho do
êxito.”*

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar neste caminho.

Agradeço aos meus pais Clayton e Iliane, e a minha irmã Nancy que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida e que, assim como várias outras, me proporcionaram esta conquista, sem eles nada seria possível. Agradeço também aos meus avós por sempre me incentivarem nesta caminhada.

Agradeço a minha namorada Angela que sempre me apoiou e confiou em minha capacidade, foi compreensiva e companheira em todos os momentos.

Agradeço muitíssimo e em especial ao meu orientador Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas por toda atenção e disponibilidade em me orientar.

Agradeço a todas as pessoas, sem citar nomes, pois o esquecimento de algum seria uma injustiça, integrantes do Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS, por todas as ajudas prestadas, idéias compartilhadas e pelas grandes amizades conquistadas durante todos estes anos de convivência e companheirismo no laboratório. Ao Prof. Dr. Eduardo Cassel pela co-orientação e todo o empenho em me ajudar no desenvolvimento deste e de tantos outros trabalhos.

Também agradeço a todos os outros professores que me guiaram e me passaram inúmeros conhecimentos durante todo o meu processo de graduação e pós-graduação.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	12
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Óleo essencial.....	20
3.2. Sementes de <i>Anethum graveolens</i> L. e seu óleo essencial.....	21
3.3. Planejamento de experimentos	23
3.3.1. Planejamento fatorial	23
3.3.2. Análise estatística de componentes principais.....	24
3.4. Métodos extrativos	25
3.4.1. Arraste a vapor	25
3.4.2. Hidrodestilação	27
3.4.3. Extração supercrítica	29
3.5. Métodos de análise antibacteriana.....	34
3.6. Modelagem matemática.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Preparo da amostra	39
4.2. Planejamento de experimentos	41
4.2.1. Planejamento fatorial	41
4.3. Extrações e determinação da porosidade	46
4.3.1. Arraste a vapor	46

4.3.2. Hidrodestilação	48
4.3.3. Extração supercrítica	49
4.3.1. Determinação da porosidade	52
4.4. Análise cromatográfica	53
4.4.1. Análise estatística de componentes principais.....	54
4.5. Determinação da atividade antibacteriana	55
4.6. Modelagem matemática.....	56
4.6.1. Modelo para o arraste a vapor	57
4.6.2. Modelo para a hidrodestilação	58
4.6.3. Modelo para a extração supercrítica.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. Rendimento das extrações	63
5.1.1. Testes t e qui-quadrado	63
5.1.2. Planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.....	65
5.2. Análise dos extratos obtidos	68
5.2.1. Análise de componentes principais.....	71
5.3. Modelagem matemática.....	76
5.3.1. Arraste a vapor	77
5.3.2. Hidrodestilação	78
5.3.3. Extração Supercrítica.....	80
5.4. Análise antibacteriana	81
6. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO A: CROMATOGRAMAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Sementes do endro (<i>Anethum graveolens</i> L.).....	22
Figura 3.2. Equipamento de arraste a vapor em escala laboratorial.	26
Figura 3.3. Equipamento de hidrodestilação em escala laboratorial.	28
Figura 3.4. Diagrama de fases dos fluidos.	30
Figura 3.5. Esquema simplificado de um extrator supercrítico.	32
Figura 4.3. Planejamento fatorial 2 ² com pontos centrais.	41
Figura 4.4. Unidade laboratorial de extração por arraste a vapor do LOPE.....	47
Figura 4.5. Equipamento de hidrodestilação do LOPE.....	49
Figura 4.6. Equipamento piloto de extração supercrítica do LOPE.	50
Figura 4.7. Fluxograma de engenharia da unidade piloto de extração supercrítica. .	51
Figura 5.1. Superfície de resposta para o rendimento de extrato final como função da pressão do sistema e do diâmetro médio de partícula.	67
Figura 5.2. Estrutura química dos componentes.	70
Figura 5.3. Comportamento de variação dos compostos.	73
Figura 5.4. Comportamento de variação entre os extratos.	74
Figura 5.5. Dendograma dos extratos.	75
Figura 5.6. Curva de rendimento da extração e modelo matemático para a extração por arraste a vapor com sementes de endro com diâmetro médio de 0,9 mm.	78
Figura 5.7. Curva de rendimento da extração e modelo matemático para a extração via hidrodestilação de sementes de endro com diâmetro médio de 0,9 mm.	79
Figura 5.8. Curva de rendimento da extração e modelo matemático para a extração supercrítica a 10.000 kPa de sementes de endro com diâmetro médio de 0,5 mm.	81

Figura 5.9. Análises bioautográficas.	82
Figura A.1. Cromatograma arraste a vapor P.....	96
Figura A.2. Cromatograma arraste a vapor M.....	96
Figura A.3. Cromatograma arraste a vapor G.	97
Figura A.4. Cromatograma hidrodestilação P.....	97
Figura A.5. Cromatograma hidrodestilação M.....	98
Figura A.6. Cromatograma hidrodestilação G.	98
Figura A.7. Cromatograma extração supercrítica 1.....	99
Figura A.8. Cromatograma extração supercrítica 2.....	99
Figura A.9. Cromatograma extração supercrítica 3.....	100
Figura A.10. Cromatograma extração supercrítica 4.....	100
Figura A.11. Cromatograma extração supercrítica 5.....	101
Figura A.12. Cromatograma extração supercrítica 6.....	101
Figura A.13. Cromatograma extração supercrítica 7.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Solventes utilizados em processos de extração supercrítica.	31
Tabela 4.1. Metodologia da análise da variância.	44
Tabela 5.1. Rendimentos das extrações por arraste a vapor.	63
Tabela 5.2. Rendimentos das extrações por hidrodestilação.	63
Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA)	66
Tabela 5.4. Resultados análise CG/EM para o arraste a vapor e a hidrodestilação.	68
Tabela 5.5. Resultados análise CG/EM para as extrações supercríticas.	69
Tabela 5.6. Autovetores associados aos componentes dos extratos.	72
Tabela 5.7. Escores associados aos extratos.	72
Tabela 5.8. Parâmetros de entrada necessários para a resolução das equações do modelo.	77
Tabela 5.9. Parâmetros estimados pelo modelo para o arraste a vapor.	78
Tabela 5.10. Parâmetros do modelo para a hidrodestilação	79
Tabela 5.11. Parâmetros de entrada para a resolução do modelo.	80
Tabela 5.12. Parâmetros do modelo para a extração supercrítica.	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Planejamento fatorial randomizado.	45
Quadro 5.1. Rendimentos das extrações supercríticas.	65
Quadro 5.2. Dados de porcentagem em área por componente para cada extrato testado.	71

LISTA DE SÍMBOLOS

a_s	Área específica entre as regiões das células quebradas e intactas	m^{-1}
C_1	Constante do modelo	
C_2	Constante do modelo	
c	Concentração de extrato no solvente	$kg.m^{-3}$
$d_{\text{óleo}}$	Massa específica do óleo	$g.mL^{-1}$
\bar{d}_p	Diâmetro médio de partícula	m
dp_i	Diâmetro da malha da peneira	m
e	Rendimento da extração	$kg.kg^{-1}$
f	Parâmetro do modelo	
H	Coordenada espacial ao longo do leito	m
K	Coeficiente de partição	
K_s	Coeficiente de transferência de massa na fase sólida	$m.s^{-1}$
K_{tm}	Coeficiente de transferência de massa	s^{-1}
k	Coeficiente de transferência de massa	$m.s^{-1}$
k_p	Coeficiente de equilíbrio do extrato	$m^3.kg^{-1}$
k_v	Coeficiente de partição líquido-vapor	
k_w	Coeficiente de partição líquido-células quebradas	
M_{cal}	Massa de extrato estimada pelo modelo matemático	kg
M_{exp}	Massa de extrato coletada experimentalmente	kg
$M_{\text{Extraída}}$	Massa de óleo extraída no supercrítico	kg
m_l	Massa de planta no leito	kg
$m_{\text{óleo}}$	Massa de óleo	kg
m_p	Massa de planta para o cálculo do volume real	kg
m_{planta}	Massa de planta utilizada na extração	kg
N	Massa de planta	kg
N_m	Carga de sólido insolúvel	kg
N_w	Massa de água	kg
P_c	Pressão crítica	kPa
Q	Vazão de vapor	$g.h^{-1}$

q	Quantidade relativa de solvente utilizada	kg.kg^{-1}
\dot{q}	Vazão mássica do solvente	kg.s^{-1}
q^*	Concentração junto da interface sólido-fluido	kg.kg^{-1}
q_0	Concentração inicial de soluto na fase sólida	kg.kg^{-1}
q_c	Quantidade relativa do solvente passado em transição	kg.kg^{-1}
q_e	Concentração de extrato no material vegetal	kg.kg^{-1}
r	Eficiência da moagem do material vegetal	
T_1	Constante de tempo do modelo	min
T_2	Constante de tempo do modelo	min
T_c	Temperatura crítica	$^{\circ}\text{C}$
t	Tempo de extração	s
u	Velocidade superficial do solvente	m.s^{-1}
V	Volume do vaso extrator	L
V_l	Volume total que a planta ocupa no leito	L
$V_{\text{óleo}}$	Volume de óleo	mL
V_r	Volume real	L
x_b	Concentração de soluto nas células quebradas	kg.kg^{-1}
x_i	Concentração de soluto nas células intactas	kg.kg^{-1}
x_i	Fração retida na peneira	
x_s	Concentração de soluto no líquido que volta para o vaso extrator	kg.kg^{-1}
x_t	Concentração de transição	kg.kg^{-1}
x_u	Concentração não extraída no sólido	kg.kg^{-1}
x_v	Concentração do soluto no vapor	kg.kg^{-1}
x_w	Concentração de soluto na água	kg.kg^{-1}
Y	Resposta do planejamento de experimentos	
Y	Rendimento de óleo essencial	
Y_{∞}	Rendimento total da extração	
y^*	Solubilidade estimada pelo modelo	
ρ_e	Massa específica do material vegetal	kg.m^{-3}
ρ_f	Massa específica do solvente	kg.m^{-3}
β_{ii}	Coeficientes do planejamento de experimentos	
γ	Relação entre a matriz vegetal e o solvente no leito	kg.kg^{-1}

ε Porosidade do leito
 λ Dimensão característica da partícula

RESUMO

GARCEZ, José Jacques. **Obtenção do extrato volátil de sementes de *Anethum graveolens* L. por diferentes técnicas extrativas.** Porto Alegre. 2016. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Este trabalho tem como objetivo o estudo sobre algumas diferentes técnicas de extração e a influência de diferentes granulometrias na maximização do rendimento do óleo essencial das sementes do endro, uma erva utilizada na culinária e na medicina popular tradicional e que possui uma ampla gama de propriedades atribuídas tais como atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante. As técnicas realizadas para a obtenção do óleo essencial foram: extração por arraste a vapor e hidrodestilação, onde diferentes tamanhos médios das partículas de sementes moídas do endro foram considerados, e extração com dióxido de carbono supercrítico, onde além da variação dos tamanhos médios das partículas, foram empregados diferentes valores de pressões. Para a extração supercrítica, foi então utilizado o método de superfície de respostas onde as variáveis, pressão e diâmetro médio de partículas foram investigados, também, um planejamento fatorial 2^2 foi aplicado para determinar a quantidade de experimentos necessários. As melhores condições nos três métodos extrativos foram encontradas, sendo maiores diâmetros de partículas para o arraste a vapor e a hidrodestilação e 10.000 kPa e menor diâmetro de partículas para a extração supercrítica. Além desta avaliação, foram realizadas modelagens matemáticas das curvas de rendimento *versus* tempo das melhores condições de extração referente a cada uma das técnicas. Os extratos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, após, os resultados passaram por uma análise estatística de componentes principais, onde foram divididos em três diferentes grupos de acordo com suas semelhantes composições. Por fim, suas ações antibacterianas foram testadas onde todos os extratos apresentaram atividade frente a *E. coli*.

Palavras-Chaves: *Anethum graveolens* L., extração supercrítica, hidrodestilação, arraste a vapor, modelagem matemática, análise antimicrobiana.

ABSTRACT

GARCEZ, José Jacques. **Obtaining volatile extract of *Anethum graveolens* L. by different extractive techniques.** Porto Alegre. 2016. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

This master thesis aimed the study of different extraction techniques and the influence of different particle sizes in maximizing the yield of essential oil from the seeds of dill, an herb widely used in cooking and in traditional folk medicine and has a wide range of properties conferred such as antimicrobial, antibacterial and antioxidant. The techniques used for obtaining the essential oil were extracted by steam distillation and hydrodistillation, where different average particle sizes of crushed seed and anise were considered, and extraction with supercritical carbon dioxide, where besides the variation of average particle sizes it was used different pressure values. For the supercritical extraction, it was then used the response surface method in which the variables pressure and average particle diameter were investigated, also a 2^2 factorial design was used to determine the number of experiments required. The best conditions for the three extractive methods were found, being larger diameters of particles to steam distillation and hydrodistillation, and 10,000 kPa and smaller diameter particles to the supercritical extraction. In this evaluation, it was performed mathematical modeling of the yield versus time curves of the best extraction conditions for each of the techniques. The extracts were analyzed in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, after, the results have undergone a statistical analysis of major components, which were divided into 3 different groups according to their similar compositions. Finally, its antibacterial activities were tested where all extracts showed activity against *E. coli*.

Key-words: *Anethum graveolens* L., supercritical extraction, hidrodestilation, steam destilation, mathematical modeling, antimicrobial activities.

1. INTRODUÇÃO

Anethum graveolens L., mais conhecido como endro ou dill, é uma planta originária do Mediterrâneo e da Ásia Ocidental conhecida inicialmente, devido suas propriedades aromáticas sendo assim muito utilizado na culinária. Na antiguidade era empregado pelos egípcios e gregos como uma planta medicinal devido seu grande poder de combate a problemas intestinais além de também ter significado religioso, sendo chamado de “erva-de-deus” era usado pelos antigos hebreus para o pagamento do dízimo (Fonseca, 2014). Sabe-se que a parte mais valorizada do endro são suas sementes, objeto de estudo desse trabalho, por possuírem uma grande quantidade de óleo essencial, ou extrato volátil, de excelente qualidade e de odor agradável e característico. As suas propriedades farmacológicas, antibacterianas e antifúngicas têm tido relatos em vários estudos (Tian et al., 2011), podendo ser utilizado nas indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica (Sintim et al., 2015; Stanojevic et al., 2015).

Fatores de ordem econômica delegaram às plantas medicinais, aromáticas e condimentares uma ocupação secundária nas pesquisas, entretanto a literatura atual vem demonstrando uma mudança desta condição. Elementos culturais ligados à saúde e relacionados com o uso de agrobiodiversidade estão revalorizando o “natural” dando com isso uma maior visibilidade industrial a estes compostos (Couto, 2006). Essa pesquisa busca determinar as melhores condições de extração em termos de rendimento do óleo essencial proveniente das sementes do endro mediante uso de três diferentes técnicas de extração: as tradicionais extrações por arraste a vapor e hidrodestilação, e a extração com dióxido de carbono supercrítico, uma tecnologia mais recente que as anteriormente citadas e que não gera resíduos tóxicos.

Para a determinação da melhor condição na extração supercrítica foi utilizado o método de superfícies de respostas onde as variáveis: pressão e diâmetro médio de partículas foram investigadas. Também foi realizado um planejamento fatorial para definir a quantidade de experimentos necessário neste processo e, para tanto, o método fatorial 2^2 foi utilizado. Para as outras extrações, por não haver mais que uma variável, não foi necessária a realização de planejamento de experimentos, sendo os melhores rendimentos obtidos diretamente a partir da observação experimental.

De posse destes resultados, de melhores condições, foram construídas as curvas de extração em triplicata e realizadas as modelagens matemáticas das mesmas visando estimar os parâmetros matemáticos desconhecidos no modelo da transferência de massa para cada uma das técnicas. Todos os óleos obtidos foram encaminhados para análises cromatográficas a fim de comparar as composições entre eles e com os dados encontrados na literatura. Com o resultado das análises foi realizado uma análise estatística de componentes principais com a finalidade de verificar diferenças significativas entre os óleos obtidos e, então, encaminhá-los para análises antibacterianas.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de diferentes técnicas de obtenção de extrato volátil de sementes de *Anethum graveolens* L. e comparar a composição e a atividade antibacteriana dos óleos obtidos. O estudo compreende três diferentes técnicas: extração por arraste a vapor, hidrodestilação e extração com dióxido de carbono supercrítico.

2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- determinar o rendimento das diferentes técnicas de extração e identificar a melhor condição;
- levantar a curva de extração rendimento *versus* tempo para todas as técnicas;
- modelar matematicamente as extrações com melhor rendimento em cada técnica, utilizando um modelo adequado para cada tipo de extração;
- realizar um estudo das variáveis pressão e diâmetro médio de partículas na extração com dióxido de carbono supercrítico por análise multivariada utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta;
- realizar análise dos óleos por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas;
- investigar a atividade antibacteriana nos óleos essenciais obtidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Óleo essencial

O óleo essencial possui diversas definições tanto do ponto de vista químico como botânico e até mesmo industrial. De uma forma geral, pode-se defini-lo como uma parte do metabolismo de um vegetal composto comumente por terpenos, na sua maioria volátil, que fornecem o odor característico das plantas. É armazenado em estruturas fisiológicas das plantas como idioblastos, cavidades e principalmente tricomas glandulares (Czepak e Bandoni, 2008; Wolffenbüttel, 2010).

Este composto de terpenos tem um papel de extrema importância na proteção das plantas devido ao seu odor característico, o qual pode ajudar a atrair polinizadores como também afastar predadores com suas propriedades já comprovadas, como inseticida e antimicrobiana. Ele também ajuda a regular a temperatura da planta evitando com isso uma perda excessiva de água. Pesquisas recentes relatam muitas outras atribuições ao óleo essencial, como atividades antifúngicas, antivirais, ação antibacteriana e capacidade de conservação através de sua ação antioxidante, despertando, com isso, interesse de indústrias de perfumaria e cosméticos, farmacêutica, de alimentos, de produtos de limpeza assim como na agricultura em geral (Sherwin, 1990; Bakkali et al., 2008; Bagheri; Manap; Solati, 2014).

A composição química dos extratos voláteis é muito diversificada e complexa. Fatores como o tipo de cultivo, tipo de solo, temperatura, disponibilidade de água, exposição ao sol e até mesmo o regime de ventos influenciam na composição podendo alterar com isso suas propriedades (Simões e Spitzer, 1999; Czepak e Bandoni, 2008). Eles são constituídos principalmente de hidrocarbonetos leves como os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, e compostos oxigenados como

os ésteres, alcoóis, fenóis, aldeídos, cetonas, lactonas entre outras substâncias de baixo peso molecular, possuem uma característica muito importante que é a volatilidade de seus constituintes, uma propriedade que favorece seu processo de obtenção (Souza et al., 2010). Outra constatação importante a ser destacada é que o óleo essencial varia de acordo com a parte da planta extraída, como por exemplo, o óleo da casca da canela é rico em aldeído cinâmico, o óleo das raízes é rico em cânfora e o das folhas em eugenol (Lucas, 2011).

3.2. Sementes de *Anethum graveolens* L. e seu óleo essencial

Anethum graveolens L., mais conhecido como dill ou endro, é um importante membro da família *Umbelliferae* nativo do Mediterrâneo e do sudeste da Europa, é amplamente utilizado para aromatizar alimentos e bebidas, devido ao seu agradável aroma picante. Cultivado desde a antiguidade, houve relatos de ser utilizado com fins alimentícios e medicinais pelas antigas civilizações gregas e egípcias, o endro é uma planta anual ou bienal muito resistente e pode se desenvolver em quase todos os ambientes. É uma planta que possui uma longa história como tempero de alimentos, mas também, durante a idade média, foi usada como uma arma mágica na defesa contra feitiçarias e como um excelente medicamento no combate a dor (Fatope et al., 2006; Orhan et al., 2013).

As suas sementes (Figura 3.1.) possuem um óleo essencial com um grande número de componentes em sua composição e com várias propriedades atribuídas a tais. Dentre os principais componentes estão o dilapiol, a carvona e o limoneno, nas porcentagens de 14,4%, 55,2% e 16,6%, respectivamente (Singh et al., 2005). Os principais países produtores de endro são a Índia e o Paquistão, já os principais produtores do seu óleo essencial são EUA, Canadá, Hungria e Bulgária (Orhan et al., 2013).



Figura 3.1. Sementes do endro (*Anethum graveolens* L.).

Diversas propriedades farmacológicas, tais como atividades antibacteriana, antiinflamatória, anti-diabética, anti-espasmódica e anti-hipercolesterolemica têm sido relatadas em pesquisas recentes (Rafii e Shahverdi, 2007; Tian et al., 2011; Orhan et al., 2013). Na medicina tradicional estudos relatam que o uso do endro aumenta a produção de leite e promove a menstruação em mulheres (Monsefi et al., 2006). Em outros estudos também foi comprovado que o extrato das sementes do endro possui uma boa atividade antioxidante e antimicrobiana as quais favorecem a conservação e proteção de alimentos contra o envelhecimento e microrganismos patogênicos, até antifúngica que suprime ou deteriora alguns tipos de fungos. Juntas estas propriedades podem dar uma gama muito grande de utilizações para o óleo do endro (Singh et al., 2005; Fatope et al., 2006).

Segundo estudo realizado em ratos por Hajhashemi e Abbasi (2008), o óleo essencial do endro também possui atividade hipolipemiante reduzindo com isso os níveis de triglicerídeos e de colesterol total no organismo, os principais causadores da aterosclerose, uma doença que causa o entupimento dos vasos sanguíneos do corpo humano. Sendo amplamente utilizado na Turquia para combate de problemas estomacais, também, há relatos de que a ingestão do endro junto aos alimentos reduz o risco de ocorrência de câncer (Orhan et al., 2013; Sintim et al., 2015; Naidu et al., 2016).

Devido essas diversas propriedades já comprovadas, o endro além de ser amplamente usado na culinária por seu aroma agradável e na medicina tradicional tem cada vez mais chamado à atenção das indústrias farmacêutica e alimentícia na

fabricação de medicamentos e na conservação e proteção de alimentos (Tian et al., 2011).

3.3. Planejamento de experimentos

A forma como uma experiência é conduzida está ligada profundamente à validade das conclusões de um experimento, tornando fundamental o papel da aplicação de um planejamento de experimentos para conduzir de maneira adequada a realização do mesmo, desde seu problema inicial até sua solução final (Montgomery e Runger, 2003).

3.3.1. Planejamento fatorial

Quando há mais de um fator de interesse em um estudo de um experimento, se faz necessário a utilização de um planejamento com o objetivo de avaliar as interações entre estes fatores e o efeito conjunto que eles geram. A variação na resposta produzida pela mudança no nível do fator é o que define o efeito de um fator. Este efeito quando se refere aos fatores primários do estudo é chamado de efeito principal. Quando a diferença na resposta entre os níveis de um fator não é a mesma nos níveis dos outros fatores, significa que há uma interação entre eles (Montgomery e Runger, 2003).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em diversas técnicas matemáticas e estatísticas utilizadas na modelagem e na avaliação da influência de variáveis nas respostas de um experimento. Possui como objetivo principal a otimização desta resposta através do emprego de polinômios de ordens inferiores. A ordem do polinômio é definida pela forma dada pela resposta do problema, se uma função linear das variáveis independentes modelar bem essa resposta, a função de aproximação empregada será de primeira ordem, já se o sistema apresentar alguma curvatura, será necessário a utilização de um modelo de segunda ordem (Montgomery e Runger, 2003).

A relação entre as variáveis e a resposta é modelada com o auxílio do método dos mínimos quadrados ajustando-se os resultados experimentais através de

modelos polinomiais para a estimação dos parâmetros. As respostas geralmente são representadas em gráficos de superfície em espaços tridimensionais. Gráficos de contorno da resposta de superfície são bastante utilizados para facilitar esta visualização (Montgomery e Runger, 2003).

Utilizando estas ferramentas, é possível avaliar a influência de diversas variáveis em uma ou mais respostas com um reduzido número de experimentos, diminuindo com isso o tempo e o custo (Anderson-Cook; Borror; Montgomery, 2009). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada na literatura de engenharia de alimentos como uma forma de otimizar os processos (Liyana-Pathirana e Shahidi, 2005; Bas e Boyaci, 2007).

3.3.2. Análise estatística de componentes principais

A análise de componentes principais, do inglês *Principal Component Analysis* (PCA) é uma técnica estatística de análise multivariada que permite explicar a estrutura de variância de um conjunto de variáveis através de combinações lineares destas variáveis (Lucas, 2011). Esta técnica tem como objetivos verificar as diferenças entre os dados, assim como a redução e a verificação dos mesmos, e, através da capacidade de redução de variáveis, torna-se uma ferramenta muito utilizada na análise de grandes conjuntos de dados. Ela tem capacidade de revelar relações que não são previstas e, com isso, permitir algumas interpretações que somente com a análise dos dados originais não seriam possíveis. Em resumo esta é uma técnica estatística que permite a transformação de um número de variáveis correlacionadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas (Jhonson e Wichern, 2007).

Segundo Jackson (2003), o cálculo é feito baseado na álgebra matricial, utilizando-se de uma matriz simétrica, não singular, onde a matriz de covariância (S) pode ser reduzida a uma matriz (L) por pré-multiplicação e pós-multiplicação por uma matriz ortonormal denominada (U). As colunas desta matriz U são denominadas vetores característicos ou autovetores, já os elementos da diagonal da matriz L são chamados de raízes características ou autovalores.

A variância total da amostra é resultante da soma dos autovalores dos componentes principais, e, os autovetores, indicam a direção dos vetores no gráfico. Tratando-se geometricamente, este procedimento é uma rotação dos eixos originais sobre as suas médias, onde cada eixo é representado por uma variável (Jackson, 2003). No entanto, a análise de componentes principais que utiliza da matriz de covariância tem sensibilidade nas variâncias originais dos dados. Portanto, se uma coluna de dados tiver uma variância maior que as outras, a variância total é mais afetada por essa coluna e isso reflete nas cargas fatoriais obtidas pelo autovetor na decomposição. Para evitar essa limitação do método pode ser utilizada uma análise de componentes principais da matriz de correlação, com as variáveis tendo média zero e desvio-padrão unitário (Xavier, 2016).

3.4. Métodos extrativos

Existem diversos métodos para a obtenção de extratos voláteis, dentre eles se destacam os métodos de extração por arraste a vapor, hidrodestilação e extração supercrítica, os quais serão estudados no presente trabalho. Existem outras técnicas utilizadas, tais como extração por micro-ondas, prensagem e enfleurage. Cada técnica possui suas diferentes especificações e necessidades de uso, sendo que a definição do método de extração a ser utilizado é diretamente vinculada ao tipo de compostos que se desejam obter, a quantidade de extrato presente e a possível localização deste na planta. A prensagem, por exemplo, é uma técnica que visa obter o óleo essencial presente no epicarpo dos frutos, muito utilizada como um processo secundário da produção de sucos. Já a extração por arraste a vapor visa à obtenção de grandes quantidades de óleo que, preferencialmente, estão na superfície da amostra (Falcão, 2012).

3.4.1. Arraste a vapor

A extração por arraste a vapor é um método tradicional de obtenção de óleo essencial de plantas, sendo o mais utilizado industrialmente devido seu baixo custo e sua simplicidade tecnológica em comparação com outras técnicas mais avançadas como, por exemplo, a extração por meio de fluido supercrítico (Cassel e Vargas, 2006). Por se tratar de um processo onde o fluido extrator é o vapor, fundamenta-se

no princípio do mesmo possuir capacidade para romper a parede celular dos tricomas ou outros órgãos dos vegetais, onde geralmente ficam armazenados os óleos essenciais extraídos por esta técnica, e desta forma arrastar o óleo (Bakkali et al., 2008). Porém, este método possui várias desvantagens como, por exemplo, a perda de componentes altamente voláteis além da possível ocorrência de modificações químicas do óleo essencial devido à alta temperatura necessária no processo e, também, o contato do óleo com a água, que pode solubilizar alguns componentes (Khajeh; Yamini; Shariati, 2010).

O processo extrativo é constituído por um sistema simples, sendo este formado por uma caldeira, onde o vapor d'água é gerado, um ou mais vasos extratores, onde o material vegetal é depositado em um leito fixo, de forma bem distribuída a fim de evitar que o vapor tenha caminhos preferenciais pelo material, um condensador para liquefazer a mistura óleo-vapor d'água, e por último um sistema separador, onde o óleo e a água são separados, normalmente, por diferenças de densidades (Wolffenbüttel, 2010). Um esquema do processo de extração por arraste a vapor é mostrado na Figura 3.2, onde CA é a caldeira, neste caso um balão com uma resistência imersa, VE é o vaso de extração, CL o clewenger, nele estão às etapas de condensação e separação da mistura óleo-água, possuindo também um sistema de refluxo, e BT é o banho termostático que serve para resfriar o líquido utilizado no condensador localizado no clewenger.

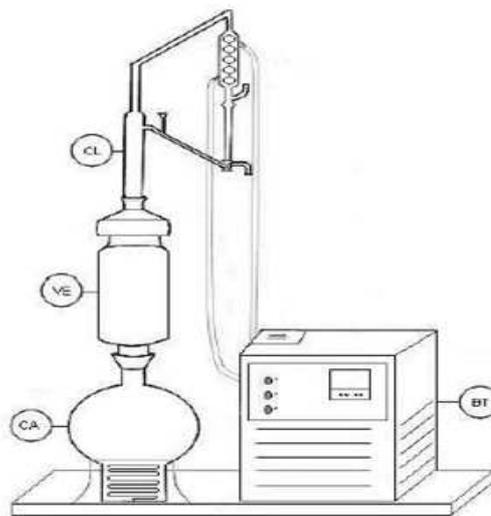


Figura 3.2. Equipamento de arraste a vapor em escala laboratorial.

Fonte: Lucas (2011).

Jianu et al. (2012) realizaram um estudo onde os óleos essenciais das inflorescências, caules e sementes, imaturas e maduras de endro, cultivados na Romênia ocidental, foram extraídos pela técnica de arraste a vapor. Suas composições foram analisadas por cromatografia gasosa e sua atividade antimicrobiana foi investigada. As extrações tiveram um tempo médio de duração de 4 horas e as sementes maduras de endro foram as que apresentaram um melhor rendimento de óleo, 2,91%, seguido por 0,91% das sementes imaturas, 0,67% das inflorescências e apenas 0,11% dos caules. Os compostos majoritários encontrados nas sementes maduras foram a carvona e o limoneno, e, a atividade antimicrobiana destas sementes frente à *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Clostridium perfringens* foi considerada de alta eficiência.

3.4.2. Hidrodestilação

A hidrodestilação também é um método muito utilizado, porém diferente do arraste a vapor no fato de a matéria-prima vegetal ser completamente imersa na água. Por esse motivo, a extração ocorre a uma temperatura inferior a 100°C o que pode evitar a perda de alguns compostos termosensíveis que seriam perdidos na técnica de extração por arraste a vapor, entretanto, pode também tornar a extração mais lenta, sofrer hidrólise, e perda de compostos polares por solubilização na água residual causando um menor rendimento no processo, além, também, de aumentar a extração de impurezas. Industrialmente, é considerado um processo obsoleto, até mesmo artesanal, mas que continua sendo praticado em diversos lugares, em especial em países menos industrializados, onde o acesso a caldeiras a vapor é mais difícil (Souza et al., 2010; Bagheri; Manap; Solati, 2014; Yani et al., 2014).

O equipamento necessário para a realização dessa técnica de extração é semelhante, porém mais simples que o arraste a vapor e consiste basicamente num recipiente, onde se possa colocar a matéria-prima e a água, o qual deve ser aquecido com fogo ou por uma manta elétrica; um condensador e um sistema de separação. A elevação da temperatura provoca o rompimento da parede celular dos tricomas do material-vegetal e inicia o processo de vaporização da água e do óleo

(Wolffenbüttel, 2010). Um esquema do equipamento de hidrodestilação é representado na Figura 3.3, onde MT é uma manta térmica necessária para o aquecimento do processo, BV é o balão volumétrico, recipiente onde é depositado o material vegetal juntamente com a água, CL é o clevenger, sistema composto por um condensador e um separador óleo-água, possuindo também um sistema de refluxo, e BT é o banho termostático que refrigera o líquido utilizado no condensador presente no clevenger.

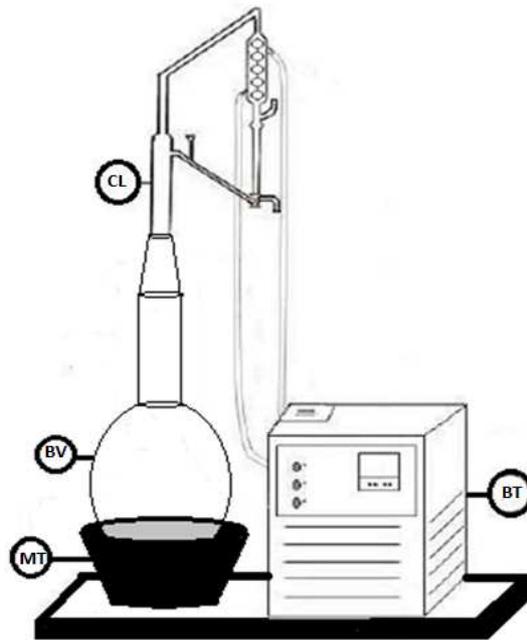


Figura 3.3. Equipamento de hidrodestilação em escala laboratorial.

Fonte: Adaptado de Lucas (2011).

Recentemente, Stanojevic et al. (2015) publicaram um estudo onde o objetivo foi analisar a influência da técnica de hidrodestilação na extração de óleo de sementes de endro, provenientes do sudeste da Sérvia, em termos de rendimento de óleo e qualidade de óleo. Os autores realizaram hidrodestilações em quatro diferentes condições onde variaram a quantidade de água utilizada por grama de planta. As condições foram: 1:10; 1:15; 1:20 e 1:25 (g/cm³); e foram realizadas em 5 corridas cada uma, quintuplicata, com um tempo total de extração variando de 120 a 180 minutos. A condição que apresentou melhor rendimento de óleo foi a de 1:20, sendo obtido 3,74 mililitros de óleo para cada 100 gramas de planta extraída. Todos os óleos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa e a composição química não variou com as diferentes condições, a quantia de componentes

principais teve alguma variação, porém em todos os óleos analisados o composto majoritário foi a carvona, compondo de 85,9 a 89,3% dos óleos obtidos.

Sintim et al. (2015) também realizou um estudo da obtenção de óleo essencial de sementes de endro a partir da hidrodestilação onde partiu da hipótese que os constituintes químicos do óleo são eluídos em momentos diferentes durante o processo resultando em óleos com diferentes composições e bioatividade. Foi realizada uma hidrodestilação com um tempo total de 195 minutos e os óleos foram recolhidos em diferentes intervalos, sendo estes: 2, 7, 15, 30, 45, 75, 105, 135, 165 e 195 (min). Nos intervalos iniciais, de 0-2 e 0-7, obtiveram-se o d-limoneno e o p-cimeno, A maioria das espécies, carvona e apiol como seus derivados, foi obtida no intervalo de 45-75. Também foi analisada a atividade antioxidante dos óleos, onde o óleo que apresentou maior atividade foi coletado em 2 minutos. Por fim, os autores desenvolveram um modelo de regressão onde se pode prever a composição do óleo das sementes de endro.

3.4.3. **Extração supercrítica**

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que se encontra acima de sua temperatura e pressão críticas. Os fluidos supercríticos apresentam algumas características dos gases e dos líquidos ao mesmo tempo, sendo viscosidade e difusividade semelhantes a dos gases e densidade semelhante à dos líquidos, possuindo também uma tensão superficial mínima, o que facilita a molhabilidade completa de substratos de geometrias complexas. Isto proporciona uma boa solubilização em matrizes sólidas tornando-o uma ótima ferramenta na área da extração de produtos naturais (Scopel, 2013). A condição de fluido supercrítico pode ser visualizada na Figura 3.4.

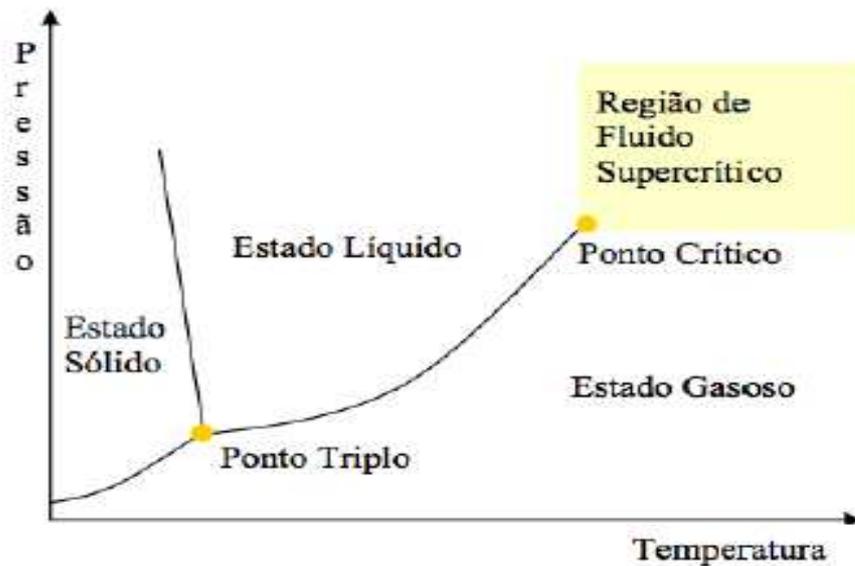


Figura 3.4. Diagrama de fases dos fluidos.

Fonte: Scopel (2013).

O emprego de fluidos supercríticos para extrações é justificado pelo seu grande poder de solvatação. Hannay e Hogarth em 1879 foram os primeiros a demonstrar esse poder dos fluidos supercríticos e, em 1936, Wilson, Keith e Haylett criaram um processo de desasfaltação com o objetivo de refinamento de óleos lubrificantes. Porém, o principal avanço na área de extração com fluido supercrítico ocorreu em 1970 quando Zosel reportou a descafeinização do café com CO_2 . Dos anos 80 em diante ocorreu um rápido desenvolvimento dos processos de extração por fluidos supercríticos, entre as técnicas desenvolvidas estão a extração de lúpulo, colesterol da manteiga, perfumes e aromatizantes, solventes e monômeros residuais de polímeros e ácidos graxos insaturados de óleos de peixe (Taylor, 1996). A Tabela 3.1 mostra os solventes utilizados na extração supercrítica e suas respectivas temperaturas e pressões críticas.

A extração supercrítica é um método que parte do princípio tradicional de extração, ou seja, a simples passagem de um fluido por um leito contendo o material a ser extraído. Neste processo, o solvente mais utilizado como fluido de arraste é o dióxido de carbono em meio supercrítico, que possui as vantagens de ser um produto inerte, não tóxico, não inflamável, não explosivo, incolor, inodoro, de baixo custo e gasoso em temperatura e pressão ambiente. Também, o fato de o CO_2 possuir uma baixa tensão superficial e uma alta viscosidade torna sua difusividade

de uma a duas ordens de grandeza maior que em comparação a outros fluidos, permitindo com isso uma transferência de massa rápida e resultando uma taxa de transferência maior que a obtida por outros métodos (Khajeh; Yamini; Shariati, 2010). Pode ser também considerado um grande benefício quando um método de extração não implica a necessidade de uma posterior etapa de separação e não gera resíduo (Cassel et al., 2010).

Tabela 3.1. Solventes utilizados em processos de extração supercrítica.

Solvente	T _c (°C)	P _c (kPa)
Xenônio	16,6	5.760,00
Trifluormetano	25,9	4.690,00
Clorotrifluormetano	29,0	3.870,00
Dióxido de Carbono	31,1	7.380,00
Monóxido de Nitrogênio	36,5	7.170,00
Sulfeto de Hexafluor	45,5	3.710,00
Clorodifluormetano	96,4	4.850,00
Propano	96,8	4.240,00
Amônia	132,4	11.130,00
Tricloro flúor metano	198,0	4.350,00
Água	374,0	21.770,00

Fonte: Taylor (1996).

Além disso, por mais que o CO₂ seja um solvente apolar e na condição que semelhante dissolve semelhante é atribuída ao CO₂ uma dificuldade em dissolver moléculas polares. Esta situação no processo de extração supercrítica pode ser manipulada, elevando a sua pressão, o que causa uma pequena deformação nas moléculas e com isso aumenta sua polaridade, ou, utilizando-se de pequenas quantidades de co-solventes, tais como água, etanol ou metanol (Cassel; Vargas; Brun, 2008). A extração supercrítica é considerada uma tecnologia limpa, apresentando diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais como a extração por arraste a vapor e a hidrodestilação (Reverchon, 1996).

Como o CO₂ possui pressão e temperatura crítica baixas, 7.380 kPa e 31,1°C, respectivamente, torna-se possível a extração de compostos sensíveis a altas temperaturas, somando também a sua não toxicidade, sua grande disponibilidade, seu baixo preço e a maior pureza conseguida no óleo essencial produzido, este método de extração com CO₂ supercrítico ganhou bastante visibilidade nas indústrias farmacêutica e de alimentos (Silva, 2014). Um esquema simplificado de um processo de extração supercrítica pode ser observado na Figura 3.5.

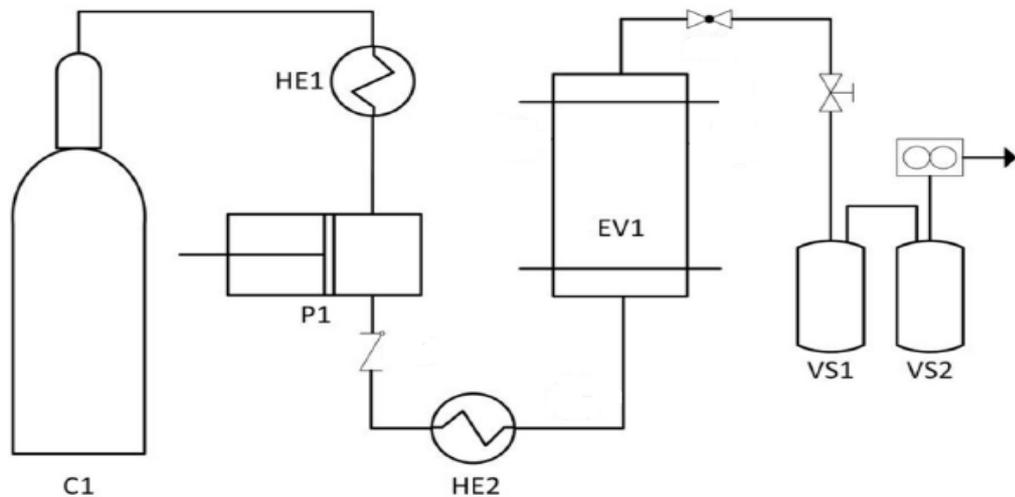


Figura 3.5. Esquema simplificado de um extrator supercrítico.

Fonte: Adaptado de Scopel et al. (2016).

Na Figura 3.5, C1 é o cilindro contendo o dióxido de carbono, HE1 é um pré-aquecedor, garantia para que o fluido chegue em estado líquido até a bomba P1, responsável pela pressurização do sistema. HE2 é o aquecedor no qual se ajusta a condição de temperatura do processo, EV1 é o vaso onde fica armazenado o material vegetal a ser extraído e por fim VS1 e VS2 são os frascos coletores do extrato resultante.

O uso da extração supercrítica para a obtenção de óleo essencial possui uma grande quantidade de trabalhos divulgados na literatura (Sovová et al., 1994; Ferreira e Meireles, 2002; Larkeche et al., 2015; Uquiche; Cirano; Millao, 2015; Sodeifian; Sajadian; Ardestani, 2016).

Scopel et al. (2016) publicaram um estudo onde utilizou-se da técnica de extração supercrítica para a obtenção de extrato volátil de *Illicium verum*, mais conhecido como anis, para determinação do equilíbrio de fases do componente principal do extrato, E-anetol, com o CO₂, e, também para a avaliação da composição e da atividade antioxidante do extrato. A extração supercrítica foi realizada neste trabalho com o intuito de minimizar os efeitos causados por resíduos de solventes orgânicos, excluir a influência hidrolítica da água, que pode causar a hidrólise e a solubilização de algumas fragrâncias, e, também devido à baixa

temperatura empregada no método que evita a degradação de alguns compostos voláteis. As extrações ocorreram a temperatura constante de 308,15 K, em duas diferentes vazões de CO₂, 750 e 1000 g/h, e em três diferentes pressões, 8.000, 9.000 e 10.000 kPa. O rendimento das extrações variou de 7,97-9,75% (g/g) e os resultados mostraram que para todas as condições o rendimento máximo é obtido em um tempo de 170 minutos, além disso, os melhores rendimentos foram encontrados conforme foi aumentada a pressão de operação e a vazão de CO₂ do processo, e, portanto, a melhor condição foi a de 10.000 kPa e 1500 g/h onde foi obtido um rendimento de 9,75% (g/g). Todos os extratos obtidos tiveram composição semelhante e apresentaram ação antioxidante, a qual, os autores atribuem, provavelmente, à sinergia do E-anetol com outros compostos.

No ano de 1997, Reverchon e Marrone, publicaram um estudo referente a obtenção do óleo essencial do cravo utilizando a técnica de extração com dióxido de carbono supercrítico. No experimento, os autores analisaram a influência de algumas variáveis do processo no rendimento final e na composição do óleo essencial obtido, e também realizaram modelagens matemáticas das curvas de extração visando à obtenção do modelo que representasse melhor os dados experimentais. As extrações foram realizadas a uma pressão e temperatura fixas de 9.000 kPa e 50°C, respectivamente. Estas condições foram fixadas, pois, segundo os autores, foram as determinadas como ótimas para um maior rendimento de óleo essencial de cravo. Para o estudo foi então variada a vazão de CO₂ no processo, sendo estas 0,6, 0,9 e 1,2 kg/h. Como o esperado a vazão que apresentou um melhor rendimento foi a de 1,2 kg/h, obtendo um rendimento de 20,8% de extrato. A análise dos compostos mostrou que a composição do óleo não variou conforme o tempo de extração, sendo constante em qualquer ponto, o que para os autores não é usual. As extrações tiveram tempos variados de duração sendo estes menores conforme se aumentou a vazão de CO₂ no processo. O tempo de duração da extração para a maior vazão de 1,2 kg/h foi de 600 minutos, já para a menor vazão de 0,6kg/h foi de mais de 1200 minutos. Os autores também analisaram o perfil de concentração de soluto na fase fluida conforme se variou a altura do leito de material vegetal. Foram testadas 4 alturas: L; 3L/4; L/2 e L/4, e o perfil de concentração mostrou-se completamente desenvolvido para a altura L/4. O modelo matemático que melhor ajustou os dados da extração foi o modelo onde o desvio em relação às

condições de equilíbrio é atribuído a uma pequena resistência à transferência de massa externa.

3.5. Métodos de análise antibacteriana

Com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1929, iniciaram-se as investigações sobre a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais. Começaram estudos de investigação sobre os mecanismos de defesa das plantas para o combate, através de sua ecologia bioquímica, de fungos, bactérias, parasitas, insetos e outros animais (Yunes e Calixto, 2001).

Os métodos para avaliação da atividade antimicrobiana podem ser qualitativos ou quantitativos, dentre eles, os mais utilizados são classificados como de difusão, de diluição e bioautográficos (Yunes e Calixto, 2001). O método de difusão é considerado um ensaio qualitativo, pois apenas confirma a existência ou não de atividade antimicrobiana. Neste ensaio, o composto a ser testado é colocado em contato com um meio de cultura inoculado previamente com o micro-organismo e após um determinado tempo, se o micro-organismo for sensível ao produto aplicado, halos de inibição serão formados na região onde houve a difusão do composto estudado (Pereira, 2010).

No ensaio por diluição determina-se a concentração inibitória mínima (CIM) da amostra, ou seja, a menor concentração que inibe o crescimento do micro-organismo. Neste método, uma quantidade fixa da amostra a ser testada é dissolvida homogeneamente num meio de cultura e essa mistura, então, é diluída em diferentes concentrações e a cada diluição o mecanismo testado é inoculado. É um método que tem como grande vantagem ser quantitativo e que pode ser usado, tanto para amostras solúveis, quanto lipossolúveis (Yunes e Calixto, 2001).

Na técnica de bioautografia, o produto, óleo essencial (OE) ou extrato, é aplicado em uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD) e eluída com uma fase móvel adequada. Este método permite combinar a capacidade de separação da CCD com a determinação da atividade antimicrobiana dos componentes de uma mistura de compostos químicos (Franco, 2005). Os compostos

da amostra são separados de acordo com a sua polaridade em relação ao eluente e a placa cromatográfica. O micro-organismo a ser testado é então inoculado sobre a placa e após a incubação, halos de inibição são observados sobre o componente de extrato separado e identificado na CCD (Pereira, 2010).

Para análise qualitativa de óleos essenciais, o método de difusão não pode ser aplicado. Por possuírem compostos altamente voláteis e lipofílicos a interação com o meio de cultura, geralmente diluído em água, é irregular, formando diversas regiões com atividades antimicrobianas variáveis (Lucas, 2011). Por isto, técnicas variantes do método de difusão podem ser utilizadas, como a bioautografia indireta, a qual minimiza tais problemas pela aplicação do OE na placa de CCD com a posterior inoculação do micro-organismo sobre a placa. Para análise quantitativa, a Concentração Inibitória Mínima é utilizada.

3.6. Modelagem matemática

A modelagem matemática das curvas de extração é muito útil para os processos de *scale-up*, extrapolação dos dados laboratoriais para a escala industrial, e é uma ferramenta necessária na determinação de parâmetros do processo de extração, sendo com isso muito importante na determinação das condições ótimas das mesmas. Como as substâncias a serem extraídas do material vegetal podem estar absorvidas na parte externa da planta, dentro dos poros, distribuídas dentro das células das plantas ou na forma livre na superfície do material, vários modelos são propostos na literatura, dentre eles estão modelos empíricos, modelos baseados no balanço diferencial da transferência de massa no leito do extrator e também modelos que estabelecem uma analogia do fenômeno de extração com a transferência de calor (Reverchon, 1996). Alguns desses modelos serão brevemente comentados a seguir.

Sovová (1994), ao estudar a extração supercrítica, descreve um modelo onde o fenômeno físico do transporte é analisado como se o soluto estivesse disposto de duas diferentes maneiras na matriz, uma de fácil acesso em sua superfície e outra onde ele está disposto no interior da matriz vegetal sendo de difícil acesso. Esta hipótese surgiu da observação de que o óleo essencial se encontra em células dos

materiais-vegetais e durante o processo de moagem, as paredes celulares de algumas células seriam rompidas o que tornaria uma parte desse óleo de fácil acesso. Neste modelo a extração ocorreria em três diferentes etapas: na primeira é extraído o soluto que está facilmente acessível em todas as partículas do leito de extração, da entrada a saída do mesmo, na segunda etapa, o soluto de fácil acesso é extraído de forma gradual, e na terceira etapa apenas o soluto de difícil acesso é extraído. Este modelo apresenta uma solução analítica simples realizada através do balanço de massa das três etapas.

Em outro estudo, após observação de dados experimentais resultantes de extração supercrítica, Sovová et al. (2007), aperfeiçoaram o estudo realizado em 1994 e desenvolveram um modelo mais simplificado onde se prega que existem dois diferentes períodos significativos durante uma extração. Verificaram que em um primeiro momento o soluto livre que está nas cavidades abertas do material vegetal é extraído e a concentração de equilíbrio com a fase fluida corresponde à solubilidade do soluto puro no solvente, e, então, após o esgotamento do soluto de fácil acesso, há um segundo momento onde o soluto de difícil acesso é extraído, solubilizado pelo solvente na condição supercrítica, sendo nesta etapa a concentração de equilíbrio com a fase fluida é menor. Com essa observação de dois momentos foi então proposto um modelo que é composto por duas retas, onde cada uma representa uma fase da extração, tornando com isso o modelo mais simples e permitindo a estimação da concentração de equilíbrio na fase fluida pela declividade das retas geradas nos dois períodos.

No âmbito de modelos baseados no balanço diferencial da transferência de massa no leito do extrator, Reverchon (1996) descreve um modelo que considera o balanço de massa nas duas fases, introduzindo uma resistência interna de transferência de massa na fase sólida. Neste modelo, a geometria do vaso extrator não influencia na extração, a massa específica e a vazão do solvente são consideradas constantes ao longo do extrator, o óleo essencial é considerado como um único elemento e a dispersão axial é desconsiderada no balanço de massa da fase fluida. O autor também descreve a influência da geometria considerada para as partículas, relatando que a mesma pode alterar e causar desvios ao tentar reproduzir os dados experimentais. Este modelo origina uma equação diferencial parcial para a

fase fluida, que para ser solucionada, deve ser resolvida juntamente com a equação diferencial para a fase sólida e uma relação linear deve ser utilizada para descrever o equilíbrio sólido-líquido. O autor resolve o modelo numericamente e o aplica ao caso de extração de óleo de soja. Lucas et al. (2007) apresentaram uma solução analítica para este modelo e aplicaram para a extração supercrítica de gérmen de trigo fresco.

Reverchon (1997) sugere também modelos empíricos para representar de forma aproximada processos de extração onde não se tem disponíveis informações sobre o mecanismo de transferência de massa e relações de equilíbrio. Modelos difusivos deduzidos a partir da segunda lei de Fick são muito utilizados neste tipo de modelagem, no entanto, tais modelos consideram o balanço em uma única partícula como representativo do que ocorre em todo o leito de extração para um dado tempo, o que também se afasta muitas vezes da realidade ao se analisar a extração supercrítica e o arraste a vapor. Em contrapartida atende bastante aos pressupostos da hidrodestilação. Porém, como este tipo de modelo não expressa o fenômeno físico e limita a condições específicas de um processo torna-se pouco mais que uma técnica de interpolação para os dados experimentais.

Crank (1975) descreveu um modelo difusivo para soluções em volume limitado muito simples, onde se considera esferas liberando o soluto dentro de um volume limitado, e, conforme a extração ocorre, a concentração de soluto na solução vai aumentando. Como a concentração na solução depende apenas do tempo, a quantidade total de soluto no sistema, ou, a soma do soluto nas esferas e na solução, será constante durante todo o processo difusivo. Tal configuração se aproxima da transferência de massa na hidrodestilação.

Não se pode dizer que exista um modelo que possa ser utilizado de uma forma geral para todas as extrações, pois a curva de extração é variável de acordo com as condições de extração, o material vegetal utilizado, tipo de produto obtido, solvente utilizado e geometria do extrator. É importante ressaltar que quanto mais variáveis e mais informações da realidade se obtiver do processo para a determinação da modelagem, melhor e mais exata ela será, porém tornar-se-á um cálculo muito mais complexo e demorado o que pode ser desinteressante no uso

industrial, pois neste caso geralmente se faz necessária uma resposta rápida (Scopel, 2013).

Segundo Cassel et al. (2009), a modelagem matemática dos métodos de extração é uma etapa de extrema importância no processo, pois além dos modelos matemáticos serem utilizados para projetar plantas industriais, podem ser empregados na simulação do comportamento de um processo de extração dispensando com isso a realização de procedimentos experimentais. Esta aplicação é referente ao processo de extração de óleos essenciais por arraste a vapor, porém, também pode ser estendida aos processos de hidrodestilação e de extração por fluido supercrítico, por mais que no Brasil, esta última, não seja uma tecnologia utilizada em nível industrial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo da amostra

A matéria prima utilizada consiste unicamente de sementes de endro compradas em pacotes de 1 kg em ambiente comercial localizado na cidade de Porto Alegre (RS).

As sementes foram trituradas em moinho de facas (Figura 4.1) IKA MF10 da marca BIOVERA, localizado no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O equipamento possui um conjunto de 3 peneiras com diferentes diâmetros de malha que podem ser acopladas em seu bocal de saída e que permitem a resultante da moagem ter diferentes tamanhos de partículas. Estas peneiras podem ser classificadas como: grossa (maior diâmetro); intermediária (médio diâmetro); fina (menor diâmetro). O material foi então separado em três diferentes porções de acordo com a peneira em que foi passado. Após, o diâmetro médio das partículas de cada porção foi calculado através do procedimento de análise granulométrica realizada por meio de peneiramento em peneira vibratória fabricada pela empresa V5I AUTOMATION CO. LTD (Figura 4.2), com malhas variando de 0,002 a 0,000125 m de diâmetro.



Figura 4.1. Moinho de facas.



Figura 4.2. Conjunto peneiras vibratórias.

O procedimento de peneiramento foi realizado em triplicata e de forma aleatória, tendo em vista minimizar erros do processo, também, foi estipulado, de acordo com o descrito por Gomide (1983), um tempo de agitação e vibração de 5 minutos. Foi então calculado o diâmetro volumétrico médio superficial das partículas das três porções já separadas. Para este cálculo, a Equação 4.1 foi utilizada (Gomide, 1983):

$$\bar{d}_p = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{d_{p_i}}} \quad (4.1)$$

onde \bar{d}_p é o diâmetro médio de partículas, x_i é a fração retida na peneira e d_{p_i} é o diâmetro da malha da peneira.

Os três valores para o diâmetro médio das partículas foram: 0,5 mm; 0,7 mm e 0,9 mm, sendo para os de menor diâmetro, médio diâmetro e maior diâmetro, respectivamente. O efeito destes diferentes diâmetros foi a variável investigada nas extrações por arraste a vapor e hidrodestilação, e uma das variáveis investigadas no processo de extração supercrítica.

4.2. Planejamento de experimentos

Para as extrações por arraste a vapor e por hidrodestilação foi utilizado apenas o confronto do resultado do rendimento para as diferentes granulometrias, já para o caso da extração supercrítica, mais de um parâmetro foi utilizado na análise do processo e, portanto, foi necessária a realização de um planejamento fatorial.

Para a definição dos experimentos da extração supercrítica foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, e, para a comparação de médias de extração entre o arraste a vapor e a hidrodestilação foi utilizado um teste t. Também se utilizou do teste qui-quadrado para verificar se há dependência entre as técnicas utilizadas e o diâmetro de partícula.

4.2.1. Planejamento fatorial

O método estatístico fatorial 2^2 com ponto central é uma ferramenta que pode ser aplicada com a finalidade de se obter tendências para a melhor condição do processo. Este método foi aplicado aos dados da extração supercrítica, onde as variáveis desejadas no estudo eram pressão e diâmetro médio de partículas. O planejamento fatorial 2^2 codificado para este experimento é mostrado na Figura 4.3.

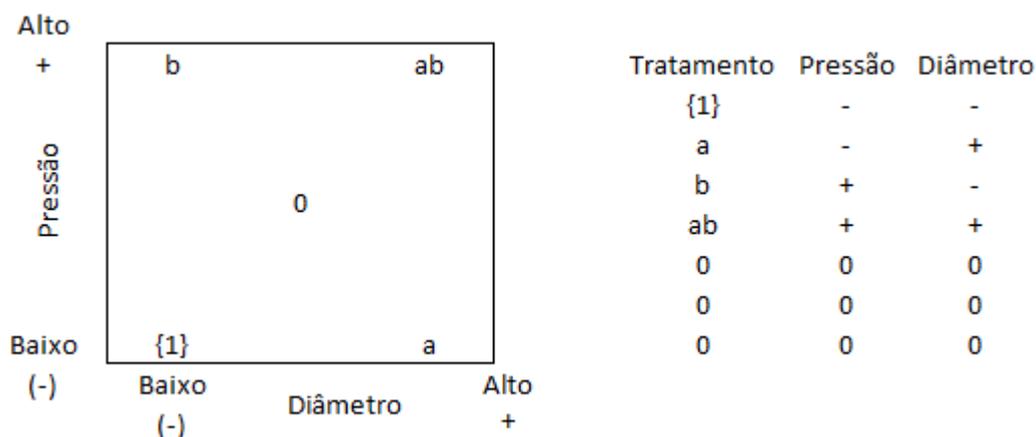


Figura 4.3. Planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais.

Os efeitos principais da pressão e do diâmetro médio de partículas, e o fator de segunda ordem “pressão x diâmetro” são os efeitos de interesse no planejamento

fatorial. E os termos {1}, a, b, ab e 0 são os resultados obtidos nestes pontos no planejamento.

Percebe-se a realização de 3 repetições no ponto central neste experimento. O uso de ponto central em planejamento fatorial com dois níveis é uma técnica utilizada para dar proteção contra a os efeitos da curvatura visto que, neste tipo de planejamento a suposição de linearidade perfeita não se é desejada sendo que o sistema 2² trabalha melhor quando a suposição de linearidade se mantiver apenas aproximadamente, ou seja, ajuda a confirmar a linearidade, se ela existir, ou ajuda a considera os efeitos da curvatura se for o caso. O ponto central também visa à minimização dos erros do experimento, ou seja, se é conseguida uma reprodutibilidade nos experimentos realizados no ponto central, significa que os outros resultados obtidos possuem uma confiabilidade experimental. Além disso, o ponto central não repercute nas estimativas usuais dos efeitos, sendo os fatores quantitativos. Portanto, a adição de pontos centrais em um experimento tornará mais confiável a sua resposta (Montgomery e Runger, 2003).

Para estimar o efeito principal da pressão, foi feita a medida dos resultados no topo do quadrado, b e ab, da Figura 4.3, e então, subtraído desse valor a média dos resultados na parte inferior, a e {1}. De forma parecida, para estimar o efeito principal do diâmetro de partícula, foi feita a medida dos resultados do lado direito do quadrado, a e ab, e subtraído deste valor a média das observações do lado esquerdo, b e {1}. As Equações 4.2 e 4.3 mostram esses cálculos, respectivamente (Montgomery e Runger, 2003).

$$\text{Efeitos da pressão} = \frac{b + ab}{2} - \frac{a + \{1\}}{2} \quad (4.2)$$

$$\text{Efeito do diâmetro} = \frac{a + ab}{2} - \frac{b + \{1\}}{2} \quad (4.3)$$

A interação entre os fatores, “pressão x diâmetro”, foi então estimada pela média das diagonais do quadrado. O cálculo convencional é apresentado pela Equação 4.4 (Montgomery e Runger, 2003).

$$\text{Interação} = \frac{ab + (1)}{2} - \frac{a + b}{2} \quad (4.4)$$

De posse destes resultados, foi realizada uma análise de regressão com o objetivo de construir um modelo matemático linear para prever as respostas. De forma geral, o modelo é apresentado pela Equação 4.5 (Montgomery e Runger, 2003):

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + E \quad (4.5)$$

onde, o diâmetro de partícula e a pressão são representados pelas variáveis x_1 e x_2 , respectivamente. Os níveis considerados nos experimentos como alto e baixo do diâmetro de partícula e da pressão são denotados, por + e -, também respectivamente, e o ponto central é representado pelo 0. O termo x_1x_2 do produto cruzado representa o efeito de interação entre essas duas variáveis. β_0 é o termo independente e é obtido pela média global das observações realizadas. O coeficiente β_1 neste caso é a metade da estimativa do efeito do diâmetro de partícula, tendo em vista que os coeficientes de regressão medem o efeito da variação unitária em x_1 , sendo a estimativa do efeito baseada na variação de duas unidades, + e -. O coeficiente β_2 , também neste caso, é a metade da estimativa do efeito da pressão e o coeficiente β_{12} , por conseguinte, é a metade do efeito da interação e E é a média dos erros entre os resultados obtidos pelo modelo e o obtidos experimentalmente (Montgomery e Runger, 2003).

Para determinar a significância dos efeitos principais e de interação, se fez necessária a realização de uma análise de variância (ANOVA). A metodologia de cálculo desta análise para um fatorial 2^2 com ponto central é mostrada na Tabela 4.1, onde a soma dos quadrados dos efeitos da pressão, do diâmetro e da interação são calculados utilizando as Equações 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente (Montgomery e Runger, 2003).

$$SQ_{\text{efeitos pressão}} = \frac{(b + ab - (1) - a)^2}{4r} \quad (4.6)$$

$$SQ_{\text{efeitos diâmetro}} = \frac{(a + ab - (1) - b)^2}{4r} \quad (4.7)$$

$$SQ_{\text{Int}} = \frac{(ab + (1) - b - a)^2}{4r} \quad (4.8)$$

Tabela 4.1. Metodologia da análise da variância.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios (QM)	F _{cal}	F _{tab}
Efeitos 1	$SQ_{\text{efeitos pressão}}$	$k - 1$	$\frac{SQ_{\text{efeitos pressão}}}{k - 1}$	$\frac{QM_{\text{efeitos pressão}}}{QM_{\text{Res}}}$	18,51
Efeitos 2	$SQ_{\text{efeitos diâmetro}}$	$k - 1$	$\frac{SQ_{\text{efeitos diâmetro}}}{k - 1}$	$\frac{QM_{\text{efeitos diâmetro}}}{QM_{\text{Res}}}$	18,51
Interação	SQ_{int}	$k - 1$	$\frac{SQ_{\text{int}}}{k - 1}$	$\frac{QM_{\text{int}}}{QM_{\text{Res}}}$	18,51
Resíduo	SQ_{Res}	$(kr - 1) - 3(k - 1)$	$\frac{SQ_{\text{Res}}}{(kr - 1) - 3(k - 1)}$	-	
Total	SQ_{Tot}	$kr - 1$	-	-	

Fonte: Montgomery e Runger (2003).

Na Tabela 4.1, r é o número de repetições no ponto central, o k é o nível dos fatores e o F_{tab} é com 95% de confiança e é estipulado utilizando a combinação dos graus de liberdade dos efeitos e dos graus de liberdade do resíduo.

Então, através das Equações 4.9 e 4.10, se obtém a soma dos quadrados totais e residuais, respectivamente.

$$SQ_{\text{Tot}} = \sum_{ij} y_{ij}^2 - n\bar{y}^2 \quad (4.9)$$

Onde y é o resultado obtido no experimento e n é o número de experimentos realizados.

$$SQ_{Res} = SQ_{Tot} - SQ_{efeitos_{press\tilde{a}o}} - SQ_{efeitos_{di\tilde{a}metro}} - SQ_{Int} \quad (4.10)$$

Por fim, a qualidade do ajuste da reta de regressão com os dados experimentais é determinada pela Equação 4.11.

$$R^2\% = \left(\frac{SQ_{efeitos_{press\tilde{a}o}} + SQ_{efeitos_{di\tilde{a}metro}} + SQ_{Int}}{SQ_{Tot}} \right) \times 100 \quad (4.11)$$

Para a realização deste planejamento fatorial, foi utilizado o *software* Minitab[®], onde os dados foram aleatorizados, diminuindo os erros de variáveis não controláveis ao longo do experimento tornando com isso possível a análise estatística. A matriz de delineamento dos experimentos com os níveis de cada fator, bem como suas combinações conforme designadas pelo planejamento fatorial, é representada no Quadro 4.1 mostrando os valores das variáveis em nível randomizado.

Quadro 4.1. Planejamento fatorial randomizado.

Ordem padrão	Ordem randomizada	Pressão (kPa)	Diâmetro de partícula (mm)
6	1	10.000	0,9
4	2	9.000	0,7
5	3	9.000	0,7
1	4	8.000	0,9
7	5	10.000	0,5
3	6	8.000	0,5
2	7	9.000	0,7

A otimização das extrações foi realizada em função do melhor rendimento de óleo extraído em cada condição.

4.3. Extrações e determinação da porosidade

Os três métodos de extração utilizados no presente trabalho foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS, sendo utilizados equipamentos laboratoriais para os experimentos de arraste a vapor e hidrodestilação, e uma planta piloto para o experimento de extração supercrítica utilizando CO₂ como solvente.

4.3.1. Arraste a vapor

O experimento de arraste a vapor foi realizado em uma planta laboratorial, composta por uma caldeira, um vaso extrator, um clevenger e um banho termostático. O método utilizado difere um pouco do método tradicional devido ao material extraído ser sementes moídas. Portanto, para a realização, foi necessária a utilização de uma camada de algodão para dar suporte ao leito do material vegetal, pois por se tratar de grãos com pequeno diâmetro de partícula, apenas a utilização de uma tela para segurar o leito, tradicionalmente utilizado na extração de folhas e galhos, não se torna possível. A Figura 4.4 mostra o equipamento utilizado durante o processo.

A caldeira é constituída por um balão de 5 L onde a geração de vapor é feita através de uma resistência elétrica imersa na água. O vaso extrator, onde ocorre o contato do vapor com a matriz vegetal, tem capacidade de 1,5 L, sendo preenchido com 100 g de sementes moídas de endro, foi utilizado algodão para dar base ao leito de sementes moídas e evitar que as mesmas caíssem na caldeira. O clevenger é compreendido por um sistema de condensação da mistura óleo-vapor e separação por diferença de densidades da mistura óleo-água, e recirculação da água, retornando-a para o sistema de aquecimento, diminuindo assim a quantidade de água requerida para a realização da extração. O banho termostático tem finalidade de refrigerar uma mistura água-álcool que é o fluido refrigerante utilizado no condensador do clevenger.

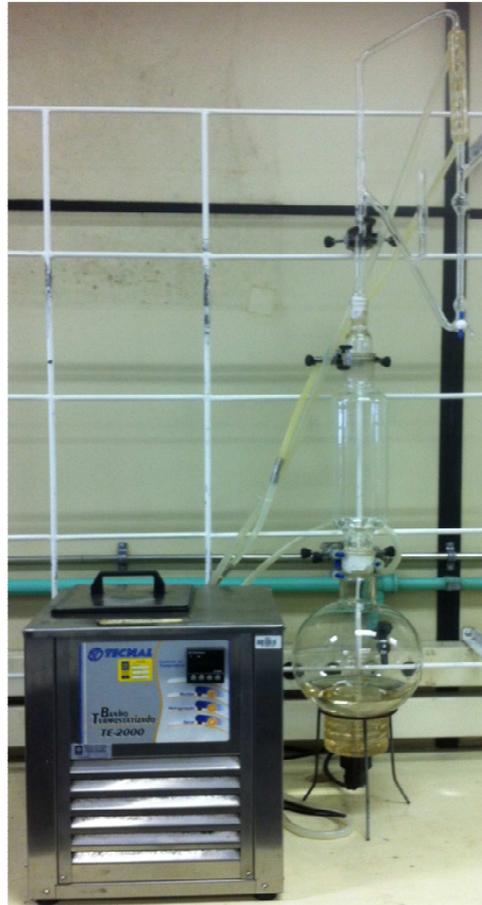


Figura 4.4. Unidade laboratorial de extração por arraste a vapor do LOPE.

A única variável testada foi o diâmetro médio das partículas, tendo em vista que, por se tratar de uma unidade laboratorial simples, não há a possibilidade de considerar outras variáveis como, por exemplo, pressão e temperatura. Os diâmetros médios testados foram os especificados no tópico de preparo da amostra: 0,5; 0,7 e 0,9 mm.

As extrações foram realizadas em triplicata, obtendo com isso um total de nove extratos. Em todas as extrações foi mensurada a quantidade de óleo extraído, de 5 em 5 minutos, a partir da percepção da primeira gota de condensado até o momento em que não houve mais variação significativa de volume de óleo essencial extraído, e com isso, foram levantadas as curvas de extração rendimento *versus* tempo. As extrações tiveram tempos totais variados.

Como o rendimento do óleo essencial é definido através da razão entre a massa total de óleo extraído e a massa de material vegetal utilizada (Equação 4.12), se faz necessária a determinação da massa específica de cada óleo essencial obtido, transformando com isso, o volume de óleo em massa. O cálculo da massa específica é feito pesando um determinado volume de óleo, como mostra a Equação 4.13.

$$\text{Rendimento} = \frac{V_{\text{óleo}} \times d_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \quad (4.12)$$

$$\text{Massa específica}(d_{\text{óleo}}) = \frac{m_{\text{óleo}}}{V_{\text{óleo}}} \quad (4.13)$$

4.3.2. Hidrodestilação

Assim como a extração por arraste a vapor, a hidrodestilação também foi realizada com um aparato laboratorial. Este era composto por um balão volumétrico de 1 L, um sistema clewenger, idêntico ao utilizado no experimento anterior, e uma manta térmica. O método difere da extração por arraste a vapor pelo fato de não existir um leito do material vegetal, que por sua vez é adicionado no balão volumétrico junto com certa quantidade de água, ocorrendo o contato direto entre os dois. A Figura 4.5 mostra o equipamento laboratorial utilizado.

Os experimentos foram realizados de forma idêntica ao arraste a vapor, em triplicata e utilizando como variável somente os três diferentes diâmetros médios de partículas, sendo totalizados também nove experimentos. A quantidade de óleo foi medida de 5 em 5 minutos, referentes ao volume de óleo extraído, iniciando a

medição a partir da percepção da primeira gota de condensado e encerrando quando não houve mais percepção de aumento de volume de óleo essencial extraído, decretando com isso o final da extração. As curvas de rendimento *versus* tempo também foram construídas e a determinação do rendimento foi realizada igual ao método por arraste a vapor, calculando-se a massa específica dos óleos essenciais e então transformando o volume obtido em massa.

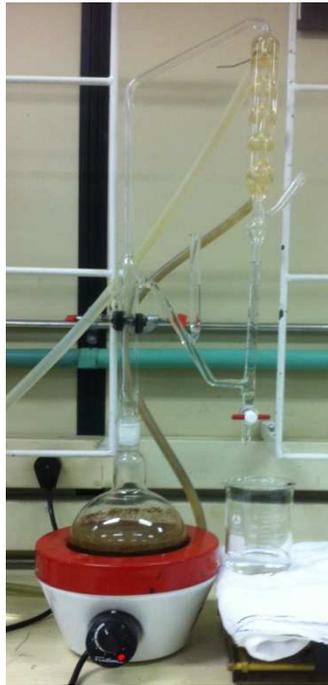


Figura 4.5. Equipamento de hidrodestilação do LOPE.

Foram utilizados 500 mL de água e 100 g de endro moído para cada experimento e os tempos de extração foram variados de acordo com o tamanho médio das partículas extraídas.

4.3.3. Extração supercrítica

Na técnica de extração supercrítica com CO₂ supercrítico, diferente das outras duas técnicas, foi utilizada uma planta piloto de extração, Figura 4.6.

O equipamento possui dois cilindros de armazenagem de dióxido de carbono supercrítico com 99,9% de pureza, fornecido pela *Air Products*; uma bomba de alta pressão; uma bomba de co-solvente; um condensador; dois pré-aquecedores; três

vasos de extração com capacidade para 0,1, 0,5 e 1 L; dois sistemas de coleta de extratos; um sistema de medição de vazão mássica; dois *softwares* de monitoramento e um sistema de controle automatizado. A Figura 4.7 representa o fluxograma de engenharia do equipamento de extração supercrítica do LOPE.



Figura 4.6. Equipamento piloto de extração supercrítica do LOPE.

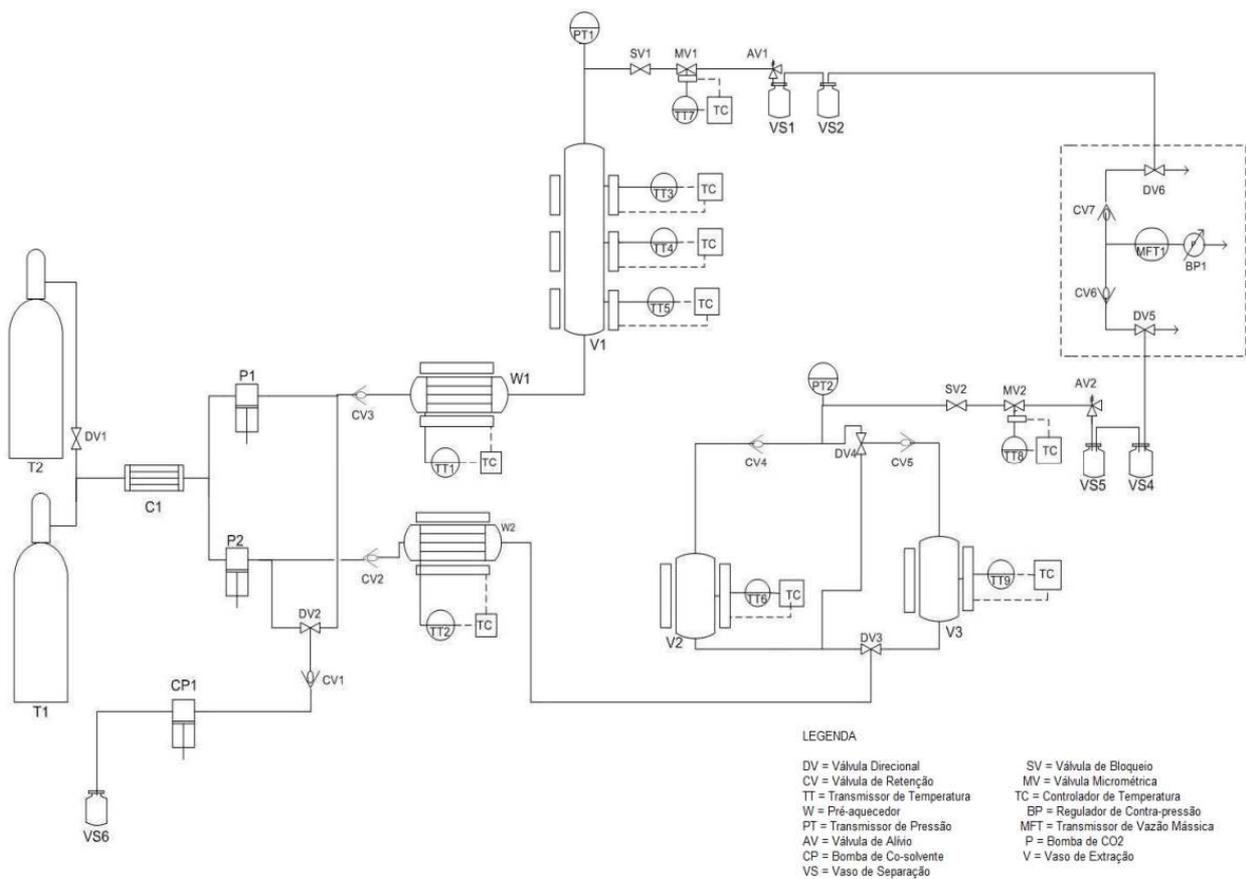


Figura 4.7. Fluxograma de engenharia da unidade piloto de extração supercrítica.

Fonte: Cassel; Bedinot; Vargas, (2011).

O vaso utilizado nos experimentos foi o de 0,5 L e as condições variadas foram apenas o diâmetro médio das partículas e a pressão, tendo em vista que uma temperatura e uma vazão ótimas já haviam sido determinadas em trabalhos recentes (Garcez, 2015). As pressões utilizadas foram 8.000, 9.000 e 10.000 kPa e as diferentes médias de diâmetros de partículas foram 0,5, 0,7 e 0,9 mm, a temperatura fixada foi de 35°C e a vazão de 1000 g de CO₂/h. Os experimentos foram realizados aleatoriamente, como já mostrados no tópico anterior de planejamento de experimentos. No processo de coleta do óleo, após passar pelo primeiro frasco de coleta, o fluxo restante de CO₂ foi borbulhado em ciclo-hexano com o objetivo de solubilizar os compostos mais leves extraídos que poderiam estar sendo arrastados para a atmosfera junto com o CO₂. A massa de sementes moídas utilizadas para cada experimento foi de 100 g e o rendimento mássico foi calculado de acordo com a Equação 4.14:

$$\%Rend = \frac{m_{Extraída}}{m_{Planta}} \times 100 \quad (4.14)$$

onde $m_{Extraída}$ é a massa coletada no final do processo de extração; m_{Planta} é a massa de planta adicionada inicialmente no vaso extrator e $\%Rend$ é o rendimento da extração em porcentagem.

A condição de melhor rendimento foi então repetida em triplicata e foram levantadas as curvas das extrações para a realização da modelagem matemática do processo. As curvas foram feitas medindo-se a massa de extrato obtida a cada 10 minutos de extração, sendo estas medidas realizadas desde o momento em que se abriu a válvula para o início do processo, início da extração, até a percepção de não mais variação da massa de extrato, apontando com isso o final da extração.

Todos os extratos obtidos nos processos de extração foram devidamente armazenados em frascos vedados, para evitar a perda de compostos voláteis, e encaminhados, juntamente com o ciclo-hexano onde foi borbulhada a corrente final de CO₂, para análise de componentes em um cromatógrafo a gás acoplado a um detector por espectrômetro de massas (CG/EM).

4.3.1. Determinação da porosidade

Para a realização da posterior etapa de modelagem matemática, se fez necessário a determinação da porosidade dos leitos de extração. Para o cálculo da porosidade, primeiramente é preciso determinar o volume real da planta e para tanto é necessária a determinação da massa específica da planta.

O volume real das amostras de diâmetros médios iguais a 0,5 mm, 0,7 mm e 0,9 mm, foi determinado a partir da utilização da técnica de picnometria a gás (Ruggieri et al., 2009) com o uso de multipicnômetro (Quantachrome). Para esta determinação o gás utilizado foi o nitrogênio.

De posse do volume real, a massa específica da amostra foi então calculada pela Equação 4.15:

$$\rho_e = \frac{m_p}{V_r} \quad (4.15)$$

onde ρ_e é a massa específica da planta; m_p é a massa de planta utilizada para o cálculo do volume real e V_r é o volume real determinado pela técnica de picnometria a gás.

Com a massa específica do material vegetal determinada, o cálculo da porosidade do leito é feito pela Equação 4.16:

$$\varepsilon = 1 - \frac{m_l}{\rho_e * V_l} \quad (4.16)$$

onde ε é a porosidade do leito; m_l é a massa de planta no leito e V_l é o volume total que a planta ocupa no leito (Gomide, 1983).

4.4. Análise cromatográfica

Após as extrações, os óleos essenciais foram desidratados, utilizando sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), diluídos em ciclo-hexano (Merk P.A.) na proporção 1:10 e submetidos à análise por CG/EM com o objetivo de identificar e quantificar os compostos presentes nos óleos. O ciclo-hexano resultante do borbulhamento na extração supercrítica também foi analisado, visto que compostos mais leves arrastados pelo CO_2 poderiam estar solubilizados nele, podendo complementar com isso os resultados das análises cromatográficas dos extratos obtidos.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás da marca Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas da marca Agilent 5975C que se encontra no Laboratório de Processos Ambientais (LAPA) da PUCRS. No procedimento, a coluna utilizada foi uma HP-5MS, 30 m de comprimento x 250 μm de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25 μm . O gás de arraste utilizado foi Hélio ultrapuro com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do injetor 250°C, volume de injeção 0,2 μL , no modo split, razão de split 1:55. O método de análise inicia a uma

temperatura de 60°C, que se mantém durante 08min, aumentando a uma razão de 3°C/min até 180°C mantém esta temperatura por 1 min, volta a aumentar a uma razão de 20°C/min até 250°C e mantém essa temperatura por 10 min. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e espectrômetro de massa (EM) foi de 230°C, a voltagem de ionização por impacto de elétrons foi 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u.

Os componentes da amostra foram identificados por comparação de seus índices de retenção determinados a partir de uma série homóloga de n-alcenos com os de padrões puros reportados na literatura (Adams, 2007). Também foi realizada a comparação pelos espectros de massas na confirmação da identidade dos compostos.

4.4.1. **Análise estatística de componentes principais**

A análise estatística da composição química dos óleos essenciais foi feita pelo método do PCA com o objetivo de comparar estatisticamente a diferença entre os óleos das sementes do endro extraídos pelas diferentes técnicas empregadas: arraste a vapor, hidrodestilação e supercrítica. Foram comparados os óleos obtidos, nos diferentes diâmetros empregados, para o arraste a vapor e para a hidrodestilação, e, na extração supercrítica, foi considerado apenas o extrato obtido no melhor rendimento por este ser o único ponto em que foi possível a coleta do volume necessário de extrato para as análises. Obtiveram-se então 7 diferentes condições de extração, ou seja, 7 óleos essenciais potencialmente diferentes.

O *software* utilizado na realização desta análise foi o *STATISTIC 7.1*, onde os dados foram inseridos em forma de matriz, com as linhas desta matriz sendo compostas pelas 7 diferentes condições de extração, totalizando com isso 7 linhas, e as colunas pelos compostos identificados em cada óleo essencial destas 7 diferentes extrações. Adicionando estes valores em percentual em área, o programa calcula a matriz da covariância e, logo após, calcula as novas variáveis, ou, componentes principais.

Pela definição do método do PCA, o total das novas variáveis será o número de linhas utilizadas menos um. No caso analisado se obteve um resultado de 6 novas variáveis, pois se tem 7 linhas menos um, e, estas 6 novas variáveis representam a variância total das variáveis originais e cada um tem seu percentual representativo. O último é o que possui o menor percentual, ou seja, é o menos representativo da variação dos dados, partindo dele, esse valor percentual vai subindo até totalizar 100% da variância, sendo o primeiro, que possui o percentual mais representativo da variação dos dados.

Os resultados desta análise estatística foram de grande importância para a posterior etapa realizada de determinação da atividade antibacteriana, contribuindo para a definição dos extratos que foram testados, de acordo com suas significantes diferenças composicionais.

4.5. Determinação da atividade antibacteriana

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos, duas técnicas foram utilizadas: bioautografia indireta como método qualitativo e concentração inibitória mínima (CIM), como método quantitativo.

A bioautografia indireta possui três etapas: a cromatografia em camada delgada (CCD), a preparação do meio de cultura inoculado com o micro-organismo e a bioautografia em si.

A primeira etapa realizada foi a CCD, na qual foram utilizadas placas de sílica gel GF₂₅₄ onde foram aplicados os óleos essenciais utilizando tolueno e acetato de etila (93:7) como fase móvel para separação dos compostos. Após a separação foi aplicado, pontualmente, 1,2 µL do óleo em uma área da placa onde não existia amostra, com a finalidade de verificar a atividade do óleo sem a separação pela cromatografia (Pereira, 2010).

O meio de cultura utilizado foi o ágar Mueller-Hinton, o qual foi inoculado com os micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli*

(ATCC 25922), os quais foram escolhidos por serem, respectivamente, gram-positiva e gram-negativa, e, portanto, abrangem um amplo espectro de bactérias. Estes micro-organismos foram padronizados pelo tubo 1 da escala McFarland e, para cada 100mL de ágar Mueller-Hinton foram inoculados 1 mL de solução padronizada de cada micro-organismo (Pereira, 2010).

Após as etapas de CCD e preparo do meio inoculado, a bioautografia foi realizada utilizando placas de petri, nas quais foi adicionada uma camada base do ágar inoculado com os micro-organismos, e então foram sobrepostas as placas cromatográficas. Posteriormente foi acrescentada mais uma camada do meio de cultura inoculado. Após 24 horas a 37°C as placas foram cobertas com uma solução contendo sal de tetrazólio, que apresenta uma coloração avermelhada quando há atividade biológica. A partir daí, pode-se visualizar halos de inibição ao redor dos compostos que possuem atividade contra os micro-organismos testados (Falcão, 2012).

Para a determinação da CIM foi utilizada a metodologia de diluição seriada em microplacas, ou, micro diluição seriada. Foram adicionados 100 µL de inóculo dos mesmos microrganismos testados anteriormente em cada poço da microplaca em caldo Mueller-Hilton, e, então, adicionados 100 µL de óleo essencial solubilizado em Tween 20 e água, nas concentrações finais de 450, 225, 112,5, 56,25, 28,125 e 14,06 µL/mL. As microplacas foram então incubadas por 24 horas a 37°C e, após o tempo de crescimento foi possível observar, através da análise de turbidez, se houve crescimento bacteriano nos poços. Os poços em que visualmente não houve a observação de crescimento microbiano foram semeados em ágar Mueller-Hilton para a confirmação da inibição (Pereira, 2010).

Estas análises antibacterianas foram realizadas em uma extensão do LOPE situada na Faculdade de Farmácia da PUCRS.

4.6. Modelagem matemática

Após levantar as curvas de extração e definir as melhores condições para a obtenção do melhor rendimento, estas melhores condições foram refeitas em

triplicata para cada uma das três técnicas investigadas. Conseqüentemente, três diferentes modelos matemáticos foram utilizados para descrever os dados experimentais dos processos extrativos. Cada modelo foi determinado de acordo com o tipo de extração utilizada e com as características da curva experimental gerada por estas extrações. Para a extração por arraste a vapor, o modelo escolhido foi o descrito por Reverchon (1996). Na modelagem da hidrodestilação, o modelo que melhor representaria os dados experimentais e, portanto, escolhido, foi o modelo descrito por Sovová e Aleksovski (2006). E, para a extração supercrítica, foi escolhido o modelo desenvolvido por Sovová (2005), sendo um modelo que descreve muito bem o comportamento das curvas de extração por meio supercrítico de óleos essenciais onde se considera a interação do soluto com a matriz sólida.

4.6.1. Modelo para o arraste a vapor

Com base no descrito por Reverchon (1996), ao utilizar as hipóteses de não dispersão axial, óleo essencial como um único elemento, massa específica e taxa de escoamento do solvente constantes, e sendo a transferência de massa controlada pela resistência interna, o balanço de massa em um elemento infinitesimal do leito gera equações diferenciais parciais que descrevem o processo. Este modelo foi desenvolvido para o estudo da extração supercrítica, mas por se tratar de um balanço de massa em um leito fixo, é possível ser estendido ao processo de extração por arraste a vapor. As Equações 4.17 e 4.18 descrevem o processo de transferência de massa nas fases fluida e sólida, respectivamente. As partículas do material vegetal foram consideradas geometricamente esféricas.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -u \frac{\partial c}{\partial h} - \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \rho_e \frac{\partial q_e}{\partial t} = 0 \quad (4.17)$$

Na Equação 4.17 c é a concentração do extrato no solvente, u é a velocidade superficial do solvente, h é a coordenada espacial ao longo do leito, ε é a porosidade

do leito, ρ_e é a massa específica do material vegetal, t é o tempo de extração e q_e é a concentração de extrato no material vegetal.

$$\frac{\partial q_e}{\partial t} = -K_{tm}(q_e - q^*) \quad (4.18)$$

K_{tm} , na Equação 4.18, é o coeficiente de transferência de massa e q^* é a concentração junto à interface sólido-fluido, a qual se encontra em equilíbrio com a fase fluida, de acordo com o modelo de resistência interna controladora.

As condições iniciais e de contorno são, respectivamente: em $t = 0$, $c(h, 0) = 0$, $q_e(h, 0) = q_0$ e em $h = 0$, $c(0, t) = 0$, onde q_0 é a concentração inicial do soluto na fase sólida.

Para solucionar o balanço de massa, uma relação de equilíbrio para descrever o fenômeno de interação sólido-fluido $q^*(q_e)$ deve ser conhecida. Devido à falta de dados experimentais, uma relação linear, Equação 4.19, presente na literatura é comumente assumida:

$$c = k_p q^* \quad (4.19)$$

sendo k_p o coeficiente de partição (Almeida et al., 2013).

4.6.2. Modelo para a hidrodestilação

Este modelo foi desenvolvido especialmente para o processo de hidrodestilação (Sovová e Aleksovski, 2006) e segue o princípio de células quebradas e células intactas dentro do leito de extração, sendo com isso, dois diferentes períodos contabilizados: um primeiro onde o soluto presente nas células quebradas é rapidamente extraído, governado pelo equilíbrio de fases; e um segundo onde o soluto das células intactas difunde lentamente para a superfície do material vegetal, regido pela difusão interna.

Para tanto, diversas considerações são feitas:

- o óleo essencial é considerado um pseudo-componente de propriedades constantes durante todo o processo;
- as partículas da planta são iguais em tamanho, forma e teor de óleo inicial;
- o termo r representa o óleo essencial presente nas células quebradas, de fácil acesso, e a fração $1 - r$ representa o óleo contido nas células intactas, de difícil acesso;
- a água fervendo, as bolhas de vapor e as partículas de material vegetal são consideradas como um leito fluidizado perfeitamente misturado;
- a concentração inicial no núcleo de partículas de células intactas é igual a concentração na matriz.
- a resistência à transferência de massa nas células quebradas, água fervente e fase de vapor é considerada insignificante, sendo assim o equilíbrio é estabelecido instantaneamente entre as fases (Equação 4.23):

$$x_v = k_v x_w = k_v k_w x_b \quad (4.23)$$

onde x_v é a concentração do soluto no vapor; k_v é o coeficiente de partição líquido-vapor; x_w é concentração de soluto na água; k_w é o coeficiente de partição líquido-células quebradas e x_b é a concentração de soluto nas células quebradas.

Assumindo estas considerações, o balanço de massa para o óleo essencial no vaso extrator é mostrado pela Equação 4.24:

$$(1 - r)N \frac{dx_i}{dt} + rN \frac{dx_b}{dt} + N_w \frac{dx_w}{dt} + Q(x_v - x_s) = 0 \quad (4.24)$$

onde N é a massa de planta; x_i é a concentração de soluto nas células intactas; N_w é a massa de água; Q é a vazão de vapor; x_s é a concentração de soluto no líquido que volta para o vaso extrator após o processo de separação.

O Balanço de massa apenas na fase sólida pode ser representado pela Equação 4.25:

$$-\frac{dx_i}{dt} = \frac{k}{\lambda}(x_i - x_b) \quad (4.25)$$

onde k é o coeficiente de transferência de massa e λ é a dimensão característica da partícula.

As equações 4.23 e 4.24 foram combinadas e as variáveis x_b e x_w foram eliminadas utilizando a equação 4.25. Esta equação então passou por uma adimensionalização e foi resolvida por transformada de Laplace (Sovová e Aleksovski, 2006) gerando a Equação 4.26:

$$Y = Y_\infty \left[1 - f \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) - (1 - f) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \right], \quad T_2 > T_1 \quad (4.26)$$

onde Y é o rendimento de óleo essencial; Y_∞ é o rendimento total da extração; f é a proporção relativa de células quebradas com o número total de células; e T_1 e T_2 são constantes de tempo do modelo.

4.6.3. Modelo para a extração supercrítica

Este modelo descrito por Sovová (2005) é semelhante ao modelo publicado pela mesma autora em 1994, onde parte-se do princípio da existência de células quebradas e células intactas dentro do leito do extrator, simulando basicamente dois períodos da extração, o primeiro governado pelo equilíbrio de fases e o segundo regido pela difusão interna na partícula do material vegetal. Sendo seu principal destaque a descrição detalhada do primeiro período. O modelo é desenvolvido adequadamente para a utilização em extração de óleos essenciais que tem por

característica ser encontrado em pequenas quantidades na matriz vegetal, conduzindo com isso a interação matriz vegetal-soluto ser a controladora do processo de equilíbrio.

Assumindo que a resistência à transferência de massa no interior do fluido é nula e que a quantidade inicial de soluto livre não é o suficiente para saturar o solvente, utilizam-se das Equações 4.27 e 4.28 para modelar o fenômeno de transferência de massa:

$$e = q \frac{Kx_u}{1 + K(\gamma/r)} \quad \text{para } 0 \leq q \leq q_c \quad (4.27)$$

$$e = x_u[1 - C_1 \exp(-C_2q)] \quad \text{para } q > q_c \quad (4.28)$$

onde e é o rendimento da extração, q é a quantidade relativa de solvente que foi utilizada, $K(y^*/x_t)$ é o coeficiente de partição, sendo y^* a solubilidade estimada pelo modelo e x_t é a concentração de transição determinada através da curva de extração, x_u é a concentração não extraída no sólido.

A relação entre a matriz vegetal e o solvente no leito do extrator é representada por γ , mostrada na Equação 4.29, r é a eficiência da moagem do material vegetal, Equação 4.30, q_c é a quantidade relativa do solvente vinculada à posição onde se encontra a transição da região de extração de células com soluto de fácil acesso para a região onde a extração passa a ser realizada das células intactas e, C_1 e C_2 são as constantes do modelo.

$$\gamma = \rho_f \varepsilon / [\rho_e (1 - \varepsilon)] \quad (4.29)$$

Sendo, nesta equação, ρ_f e ρ_e as massas específicas do solvente e do material vegetal, respectivamente, sendo ε a porosidade do leito.

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2q_c) \quad (4.30)$$

Para a estimativa dos coeficientes de transferência de massa na fase sólida a Equação 4.31 pode ser utilizada:

$$K_s a_s = \frac{(1-r)(1-\varepsilon)\dot{q}C_2}{N_m\{1 - [(1-r)C_2/K]\}} \quad (4.31)$$

onde K_s é o coeficiente de transferência de massa na fase sólida, a_s é a área específica entre as regiões de células intactas e quebradas, \dot{q} é a vazão mássica do solvente e N_m é a carga de sólido insolúvel (Scopel et al., 2016).

Todos os modelos foram ajustados pelo método do simplex (Lagarias et al., 1998), e a eficiência dos modelos em descrever os dados experimentais das extrações foi determinada pelos métodos de determinação dos desvios relativos médios absolutos (DRMA), Equação 4.32, e as raízes das médias dos erros quadrados (RMEQ), Equação 4.33:

$$DRMA = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{M_{exp} - M_{cal}}{M_{exp}} \right| \times 100 \quad (4.32)$$

$$RMEQ = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(M_{exp} - M_{cal})^2}{n}} \quad (4.33)$$

onde M_{exp} é a massa de extrato coletada experimentalmente para um dado tempo de extração, M_{cal} é a massa de extrato estimada pelo modelo matemático e n é o número de dados experimentais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento das extrações

Duas diferentes técnicas matemáticas foram utilizadas para as análises dos resultados obtidos. Para as extrações por arraste a vapor e hidrodestilação, devido suas semelhanças e por apenas haver uma variável testada, um teste t de comparação de médias foi realizado para a comparação do rendimento dos extratos e um teste qui-quadrado para verificar se há dependência entre as técnicas e o diâmetro de partícula. Já, para a extração supercrítica, um planejamento fatorial com metodologia de superfície de respostas foi realizado visando à avaliação da influência das variáveis pressão e diâmetro de partículas no rendimento de extrato.

5.1.1. Testes t e qui-quadrado

Os resultados dos rendimentos das duas técnicas estão representados nas Tabelas 5.1 e 5.2 para a extração por arraste a vapor e hidrodestilação, respectivamente.

Tabela 5.1. Rendimentos das extrações por arraste a vapor.

Variável (Diâmetro de Partícula)	Rendimento (% m/m)
0,5 mm	0,86
0,7 mm	1,05
0,9 mm	1,19

Tabela 5.2. Rendimentos das extrações por hidrodestilação.

Variável (Diâmetro de Partícula)	Rendimento (% m/m)
0,5 mm	0,84
0,7 mm	0,92
0,9 mm	1,14

Ao realizar

o teste t de variação entre os dados das Tabelas 5.1 e 5.2, com uma significância de 95%, chegou-se a conclusão de que se aceita a hipótese nula, ou seja, não existe diferença significativa entre as médias das duas extrações, obteve-se um valor para p maior que 0,05 ($p=0,64$).

Na realização do teste qui-quadrado para os mesmos dados, também com significância de 95%, chegou-se a conclusão que se aceita a hipótese nula, ou seja, não existe dependência entre as técnicas testadas e o diâmetro, o que pode ser atribuído ao fato de terem sido testados apenas três diferentes diâmetros. O qui-quadrado tabelado foi de 5,99147 e o calculado de 0,00322.

Esta grande semelhança entre os resultados em rendimento das duas técnicas era algo já esperado devido à proximidade experimental de ambas, porém, segue como descrito na literatura, por mais que em mínima variação, o maior rendimento nas extrações por arraste a vapor, o que se dá devido à perda de alguns compostos por meio de solubilização na água durante a técnica de hidrodestilação.

No entanto, houve a ocorrência de um resultado não esperado, o fato de o melhor rendimento ter sido obtido nas porções de sementes com maior diâmetro médio de partícula, visto que quanto menor for este diâmetro, maior é a área de contato do fluido extrator com a matriz vegetal e, portanto, é esperada uma maior transferência de massa e conseqüentemente um maior rendimento nestas porções. O ocorrido pode ser justificado por dois motivos: primeiro pela grande volatilidade dos compostos presentes nas sementes, sendo que as mesmas passaram por um processo de moagem que, além do próprio aquecimento do processo poder ter volatilizado alguns compostos, expondo-os para a atmosfera, fato que foi muito maior para as partículas com menor diâmetro médio determinando uma maior chance de volatilização deles nestas porções; e um segundo motivo associado à técnica de arraste a vapor, foi a ocorrência de uma maior compactação do leito de planta para as porções com menores diâmetros médios de partículas, o que faz com que o vapor percorra caminhos preferenciais dentro do leito e desta forma diminuindo seu contato com as partículas, e com isso o rendimento final da extração

se torna menor. É importante lembrar que a extração com fluido supercrítico utilizou o mesmo processo de moagem das sementes, entretanto por ser uma técnica distinta das anteriores possui acesso a outros tipos de solutos durante a extração, podendo com isso, não sofrer influência em seu rendimento pelos motivos citados acima.

Os tempos de extração determinados no momento em que não houve mais a percepção de aumento de volume do óleo obtido foram muito semelhantes, ficando em torno de 160 minutos para ambas as técnicas extrativas.

5.1.2. Planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta

Para a técnica de extração supercrítica, diferentemente das outras duas técnicas, mais de uma variável do processo foi investigada, então, um planejamento fatorial 2^2 com ponto central foi realizado, com as finalidades de: determinação das condições dos experimentos que foram realizados; entendimento da influência destas variáveis e a interação entre elas no rendimento de extrato obtido. Os resultados dos rendimentos obtidos nos pontos experimentais fornecidos pelo planejamento variaram entre 0,81% no experimento 4 e 3,08% (m/m) no experimento 5 e estão apresentados no Quadro 5.1 com as variáveis em formato codificado.

Quadro 5.1. Rendimentos das extrações supercríticas.

Experimentos	Pressão	Diâmetro	Rendimento (% m/m)
1	1	1	1,97
2	0	0	2,05
3	0	0	2,10
4	-1	1	0,81
5	1	-1	3,08
6	-1	-1	1,44
7	0	0	2,25

Os dados do Quadro 5.1 foram inseridos no *software* estatístico Minitab[®], onde foi realizada a análise de variância (ANOVA). A Tabela 5.3 apresenta os resultados desta análise.

De acordo com os dados da ANOVA, levando em consideração uma significância de 95%, ou seja, $\alpha=0,05$, percebe-se que apenas as variáveis independentes, pressão, P, e diâmetro médio de partícula, D, são estatisticamente significativas, pois os valores de p, nestes casos, foram menores de 0,05, já a interação destes fatores não foi significativa, $p=0,405$.

Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA)

Fatores	gl	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regressão	3	2,774	2,774	0,925	15,03	0,026
Linear	2	2,717	2,717	1,358	22,07	0,016
P	1	1,960	1,960	1,960	31,85	0,011
D	1	0,757	0,757	0,757	12,30	0,039
Interação	1	0,058	0,058	0,058	0,94	0,405
P*D	1	0,058	0,058	0,058	0,94	0,405
Falta de ajuste	1	0,163	0,163	0,163	15,04	0,061
Erro residual	3	0,185	0,185	0,062	-	-
Erro puro	2	0,022	0,022	0,011	-	-
Total	6	2,959	-	-	-	-

A regressão se mostrou significativa, $p=0,026$, permitindo com isso a aplicação do modelo de regressão linear para descrever a variação do rendimento de extrato em função das variáveis estudadas. Para tanto, os coeficientes de regressão linear foram estimados e então um modelo para a descrição dos resultados foi gerado. Este modelo representou de forma muito boa os dados, sendo seu coeficiente de determinação R^2 de 0,9376. A Equação 5.1 representa o modelo linear ajustado para as variáveis codificadas, ou seja, de -1 a 1. Esta equação só é válida para o intervalo analisado de 8.000 a 10.000 kPa para a pressão e de 0,5 a 0,9 mm para o diâmetro médio de partícula.

$$RE\% = 1,95714 + 0,7 * x_1 - 0,435 * x_2 \quad (5.1)$$

Onde $RE\%$ é o rendimento de extrato final obtido; x_1 é a pressão do sistema e x_2 é o diâmetro médio da partícula e são calculados de acordo com as Equações 5.2 e 5.3:

$$x_1 = \frac{P - 8000}{1000} - 1 \quad (5.2)$$

$$x_2 = \frac{D - 0,5}{0,2} - 1 \quad (5.3)$$

sendo P e D em kPa e mm, respectivamente.

Inserindo as Equações 5.3 e 5.2 na equação 5.1 também se pode gerar a equação para o rendimento em função diretamente da pressão e do diâmetro médio de partículas, Equação 5.4.

$$RE\% = -2,82036 + 7 * 10^{-4} * P - 2,175 * D \quad (5.1)$$

A Figura 5.1 apresenta a superfície de resposta em relação ao rendimento percentual de extrato $RE\%$ para $x_1 \times x_2$.

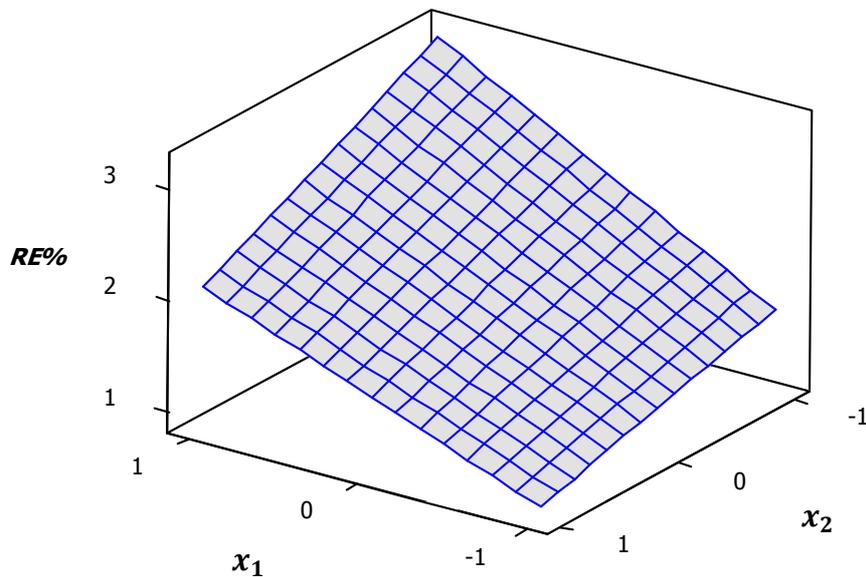


Figura 5.1. Superfície de resposta para o rendimento de extrato final como função da pressão do sistema e do diâmetro médio de partícula.

Mediante observação da Figura 5.1, torna-se fácil a percepção de que o melhor rendimento de extração dirige-se para os extremos das variáveis. Este procedimento permite observar que o melhor rendimento (3,08%) é obtido para a pressão de 10.000 kPa e diâmetro médio de partícula de 0,5 mm. Também é possível perceber que quanto mais se partir para estes extremos, maior será o rendimento, algo que pode ser testado, em trabalhos futuros, no âmbito do diâmetro médio de partículas, porém a extrapolação do limite de pressão é inviável pelo fato do extrato, que virá a ser obtido com esta extrapolação, possuirá diferente composição química.

5.2. Análise dos extratos obtidos

Todos os extratos obtidos nas 3 diferentes técnicas de extração foram submetidos a uma análise por CG/EM para determinação e quantificação dos seus compostos principais. A Tabela 5.4 mostra os componentes detectados e suas porcentagens em área para os óleos obtidos por arraste a vapor e hidrodestilação nas 3 diferentes condições de diâmetro médio de partícula: grande, médio e pequeno. Já a Tabela 5.5 mostra os componentes e suas porcentagens em área para as extrações supercríticas.

Tabela 5.4. Resultados análise CG/EM para o arraste a vapor e a hidrodestilação.

Componentes	IR	Arraste a vapor (%A)			Hidrodestilação (%A)		
		G	M	P	G	M	P
Limoneno	1028	2,38	1,07	0,44	3,63	1,44	1,78
Cis-dihidro carvona	1196	7,07	6,73	5,80	6,91	7,30	6,62
Trans-dihidro carvona	1203	3,83	3,18	1,65	3,89	3,54	1,85
Carvona	1246	23,85	22,58	22,46	23,25	23,78	22,89
E-anetol	1285	0,56	0,59	3,06	0,40	0,63	3,05
Miristicina	1522	0,56	0,43	0,79	0,50	0,45	0,71
Dilapiol	1633	61,75	65,43	65,79	61,42	62,86	63,11

Onde: IR é o índice de retenção; G são as partículas de diâmetro médio grande; M são as partículas de diâmetro médio médio e P são as partículas de diâmetro médio pequeno.

Tabela 5.5. Resultados análise CG/EM para as extrações supercríticas

Componentes	IR	%A						
		1	2	3	4	5	6	7
Cis-dihidro carvona	1196	1,72	3,35	3,18	1,46	2,61	2,14	2,81
Trans-dihidro carvona	1203	0,78	1,23	1,14	-	-	-	1,06
Carvona	1246	8,16	11,83	11,41	6,67	10,95	9,23	10,49
E-anetol	1285	-	0,48	-	-	1,87	1,63	-
Miristicina	1522	-	0,46	-	-	-	-	-
Elemicina	1559	-	0,42	-	-	-	-	-
Dilapiol	1633	89,34	82,22	84,26	91,88	84,58	87,00	85,64

Os extratos exibidos na Tabela 5.5 estão enumerados de acordo com os experimentos do Quadro 5.1.

Analisando os resultados do CG/EM percebe-se que os componentes majoritários dos extratos obtidos por todas as técnicas são os mesmos, carvona e dilapiol (Figura 5.2), porém eles diferem em quantidades. Para o arraste a vapor e a hidrodestilação estes dois componentes somados compõem em torno de 85% dos extratos, já para a extração supercrítica esses dois componentes resultam em cerca de 95% dos extratos. Outro elemento interessante é o limoneno que é encontrado, em pequena quantidade, em todos os óleos obtidos pelas técnicas de arraste a vapor e hidrodestilação, porém não aparece em nenhum dos extratos obtidos por extração supercrítica. Este resultado pode ser atribuído ao fato de o CO₂ arrastar alguns componentes mais leves presentes nos extratos.

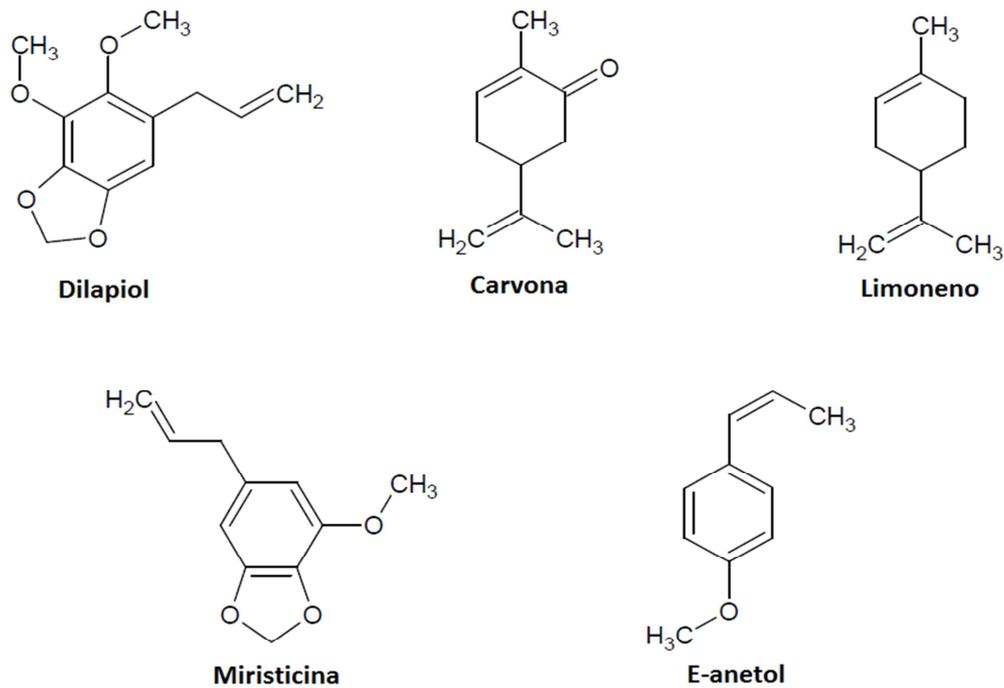


Figura 5.2. Estrutura química dos componentes.

Fonte: ChemSketch.

O ciclohexano em que foi borbulhada a extração supercrítica não apresentou nenhum resultado na análise cromatográfica.

Estes dados vão ao encontro dos dados de alguns artigos encontrados na literatura e citados anteriormente em questão de componentes do óleo essencial de *Anethum graveolens* (Singh et al., 2005; Orhan et al., 2013; Sintim et al., 2015), porém, nenhum artigo apresenta semelhanças entre as proporções de seus compostos, comprovando a grande influência do local de produção, do tipo do cultivo da planta e da técnica de extração na composição do seu óleo essencial.

Para uma melhor comparação destes extratos e posterior encaminhamento a análises de atividade antibacteriana, foi realizada uma análise estatística de componentes principais destes dados obtidos por CG/EM.

5.2.1. Análise de componentes principais

Por não ter sido possível a coleta de extrato suficiente para a análise antibacteriana nos casos de extração supercrítica exceto na condição de melhor rendimento, experimento 5, a qual foi repetida em triplicata, a análise foi realizada para os componentes dos 6 diferentes óleos das extrações por arraste a vapor e hidrodestilação e o extrato de melhor rendimento da extração supercrítica. Utilizou-se do *software* STATISTIC 7.1 para a realização desta análise e a Quadro 5.2 mostra como esses dados foram inseridos no *software*.

O *software* enumerou os extratos de 1 a 7, sendo 1 o extrato obtido pelo arraste a vapor com as partículas de maior granulometria, e 7 o extrato obtido na condição de melhor rendimento da extração supercrítica. A ordem segue como a apresentada no Quadro 5.2, de cima para baixo.

Foi realizada uma análise de componentes principais utilizando a matriz de correlação, tendo em vista que ao analisar os dados de forma crua, é perceptível que algumas colunas de componentes possuem uma variância dos dados muito maior que outras, o que afetaria os resultados se a análise fosse feita utilizando a matriz de covariância, pois esta não leva em consideração esta variação. A Tabela 5.6 mostra os resultados dos autovetores associados aos componentes dos extratos voláteis analisados onde cada coluna de fator possui uma porcentagem de representatividade dos dados e a Tabela 5.7 mostra os resultados dos escores de cada extrato.

Quadro 5.2. Dados de porcentagem em área por componente para cada extrato testado.

Compostos:		Limoneno	Cis-dihidro carvona	Trans-dihidro carvona	Carvona	E-anetol	Miristicina	Dilapiol
Arraste	G	2,38	7,07	3,83	23,85	0,56	0,56	61,75
	M	1,07	6,73	3,18	22,57	0,59	0,43	65,43
	P	0,44	5,80	1,65	22,46	3,06	0,79	65,79
Hidro	G	3,63	6,91	3,89	23,25	0,40	0,50	61,42
	M	1,44	7,30	3,54	23,78	0,63	0,45	62,86
	P	1,77	6,62	1,85	22,89	3,05	0,71	63,11
SC		0,00	2,61	0,00	10,95	1,87	0,00	84,58

Tabela 5.6. Autovetores associados aos componentes dos extratos.

Componentes	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Limoneno	-0,7776	0,3372	0,5306	0,0039	-0,0045	-0,0001
Cis-dihidro-carvona	-0,9795	-0,0321	-0,1654	0,1069	-0,0292	0,0001
Trans-dihidro-carvona	-0,9147	0,3807	-0,1202	-0,0625	0,0106	0,0009
Carvona	-0,9606	-0,2613	-0,0814	0,0428	0,0249	-0,0005
E-anetol	0,3845	-0,9040	0,1749	0,0665	0,0048	0,0007
Miristicina	-0,7012	-0,6968	0,0013	-0,1505	-0,0134	-0,0002
Dilapiol	0,9808	0,1907	-0,0039	-0,0401	-0,0099	0,0000

A proporção de variabilidade explicada de cada fator foi muito significativa para os dois primeiros fatores, onde o primeiro fator representa 70,35% e o segundo 23,81% da variabilidade total dos dados, enquanto os fatores restantes representam uma proporção com menor expressão. Portanto, é mais que plausível assumir que nesse conjunto de componentes, a utilização da quantidade de dois fatores para a análise dos dados é o mais indicado, uma vez que a redução de variabilidade explicada após a adição do terceiro fator não reduz substancialmente a proporção explicada, sendo que a decomposição dos 7 componentes em apenas dois fatores já explica 94,16% da variabilidade total dos dados.

Tabela 5.7. Escores associados aos extratos.

Componentes	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Limoneno	-1,5383	0,6133	-0,0002	-0,1613	0,0291	0,0023
Cis-dihidro-carvona	-0,2666	0,6402	-0,7364	-0,0055	-0,0802	0,0000
Trans-dihidro-carvona	0,3919	-2,0489	-0,2456	-0,2944	0,0136	-0,0008
Carvona	-1,7876	1,1370	0,8987	-0,1008	-0,0107	-0,0013
E-anetol	-1,0431	0,5530	-0,6594	0,2306	0,0577	-0,0010
Miristicina	-0,4925	-1,6759	0,5165	0,3145	-0,0200	0,0007
Dilapiol	4,7361	0,7814	0,2264	0,0170	0,0104	0,0001

Tendo em vista a grande representatividade destes dois primeiros fatores com a variabilidade total dos dados, suas cargas fatoriais podem ser analisadas graficamente e tornar mais fácil o entendimento do comportamento de variação dos compostos em relação aos extratos (Figura 5.3). Também é possível gerar os

gráficos dos escores de todos os extratos, identificando o padrão das cargas fatoriais geradas (Figura 5.4).

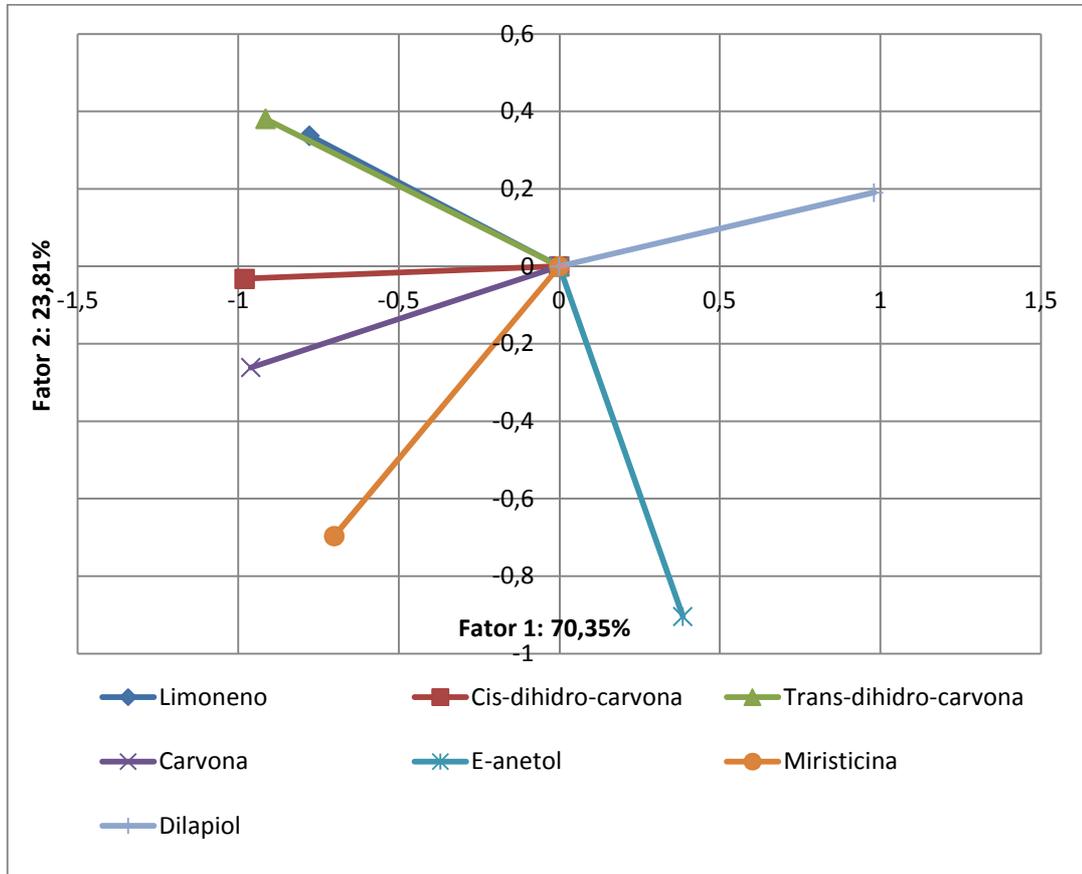


Figura 5.3. Comportamento de variação dos compostos.

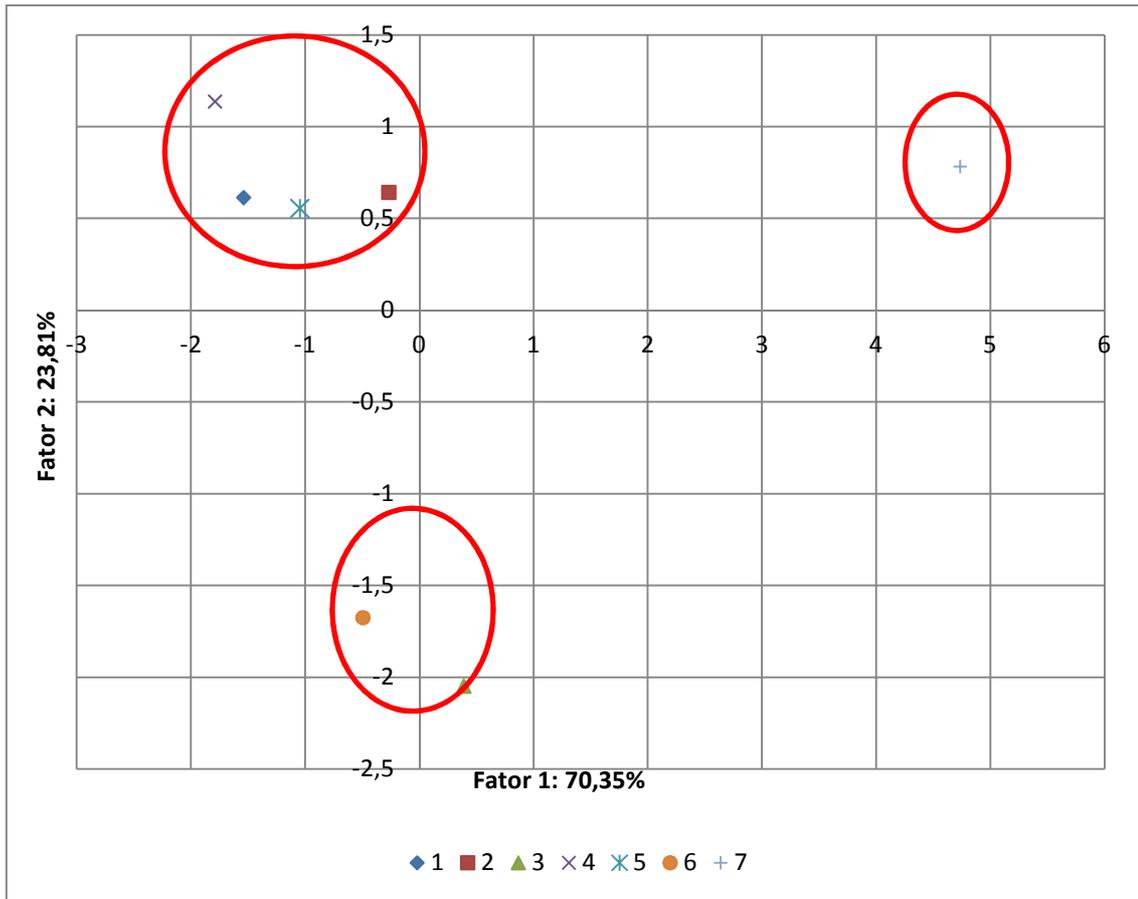


Figura 5.4. Comportamento de variação entre os extratos.

Nestes dois gráficos, podem ser analisadas diversas características da decomposição final gerada. Porém, o objetivo deste trabalho é a diferenciação dos extratos obtidos, e analisando ambos os gráficos em conjunto é clara a percepção de 3 grupos distintos: um primeiro comandado pela maior quantia de dilapiol e menor de carvona, mais representativo pelo fator 1, horizontal, devido sua majoritariedade dentre os compostos, e é representado pelo ponto 7, extração supercrítica; um segundo conjunto comandado pelo maior teor de E-anetol e miristicina com maior representatividade pelo fator 2, devido sua minoritariedade dentre os compostos, e é representado pelos pontos 3 e 6, arraste a vapor e hidrodestilação P; e por fim um terceiro grupo, representativo por ambos os fatores, que são comandados pela semelhança no teor de todos os compostos, representado pelos pontos 1, 2, 4 e 5.

Esta divisão em três grupos também pode ser muito bem visualizada no formato de um dendograma (Figura 5.5). O dendograma é um tipo de análise gráfica que agrupa os eventos similares e correlaciona com os demais, sendo que quanto

maior o bloco, mais distante está os valores das variáveis. Os grupos são formados a partir de duas amostras com menor variação, aumentando o número de componentes nos grupos conforme aumenta a variação entre as amostras. As distâncias entre os grupos são medidas através do cálculo da Distância Euclidiana (Equação 5.4) (Lapponi, 2005).

$$d_{i,j} = \left\{ \sum_{k=1}^p (x_{i,k} - x_{j,k})^2 \right\} \quad (5.4)$$

Neste diagrama o eixo x é composto pelos 7 diferentes extratos e o eixo y é o valor calculado pela Distância Euclidiana, considerando a mesma unidade das variáveis. Nele é perceptível a grande diferença do composto 7, extração supercrítica, em relação aos outros, e, também, a formação dos dois grupos dentro das extrações por arraste a vapor e hidrodestilação, onde as extrações realizadas com as partículas com diâmetro médio P apresentaram uma certa variação em relação as com diâmetros médios M e G, mostrando com isso a influência da granulometria das partículas na composição dos extratos obtidos nestas extrações e comprovando ainda mais as respostas da análise de componentes principais.

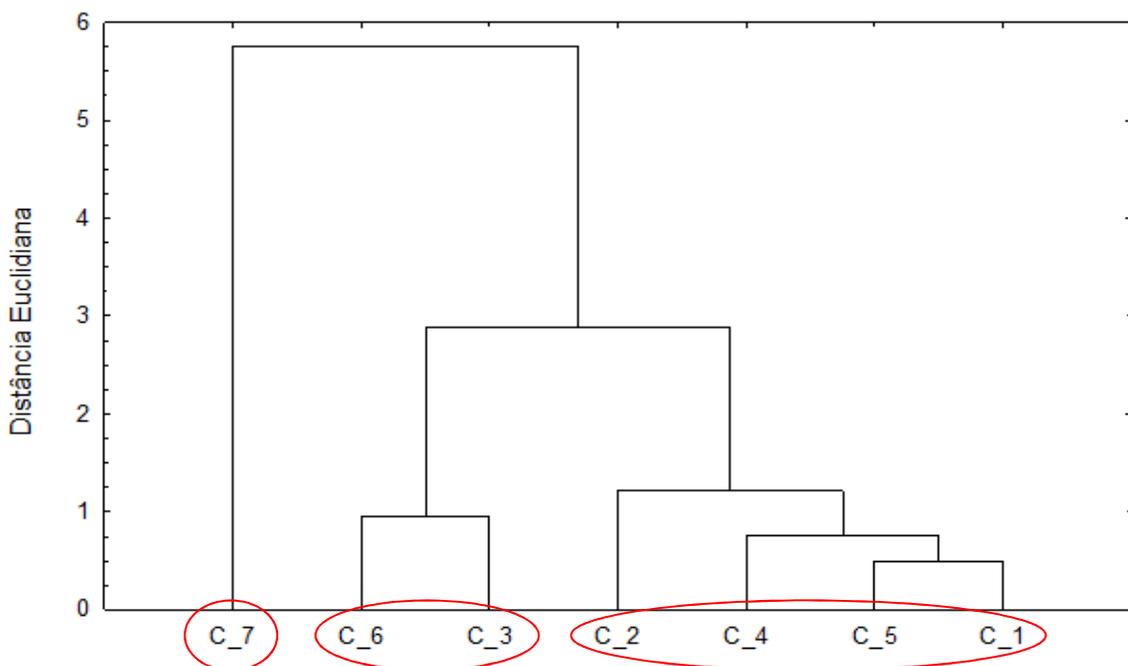


Figura 5.5. Dendrograma dos extratos.

É importante ressaltar que o dendograma foi realizado a partir dos escores resultantes dos dois primeiros fatores da análise de componentes principais, visto que, esta técnica, assim como a análise por covariância, não leva em consideração a variabilidade dos dados de uma coluna apenas, não permitindo com isso a realização desta análise nos dados crus de porcentagem em área de cada componente.

A utilização desta técnica serviu também como base para a solução de um posterior problema, a falta de óleo essencial para a realização das análises antibacterianas. Como os óleos obtidos pelas técnicas de arraste a vapor e hidrodestilação possuem densidades muito próximas à da água, foi muito difícil o processo de coleta destes óleos devido ao método de separação utilizado, ser por diferença de densidade. Com isso, não foi possível coletar uma quantidade suficiente de óleo para cada condição ser analisada independentemente, portanto, seguindo a separação em grupos dada pelo PCA, foi feita a mistura dos óleos em cada grupo, formando então três grupos de extrato: o extrato com granulometria média e grande (GM); com granulometria pequena (P); e o extrato supercrítico (SC). A partir destes agrupamentos, tornou-se possível realizar as análises antibacterianas.

5.3. Modelagem matemática

A modelagem foi realizada apenas para as condições de extração que obtiveram os melhores rendimentos de extrato e é uma ferramenta utilizada para a estimação de parâmetros do fenômeno de transferência de massa do processo extrativo, tendo por objetivo simular o processo sem a necessidade de novos experimentos. Para o arraste a vapor, a condição com melhor rendimento foi a realizada com partículas com maior granulometria, ou seja, partículas com diâmetro médio igual a 0,9 mm, e o modelo utilizado foi o de Reverchon (1996), onde os parâmetros estimados foram: o coeficiente de difusão e a constante de equilíbrio. Para a hidrodestilação, a condição com melhor rendimento também foi a com partículas com diâmetro médio grande, e o modelo utilizado foi o de Sovová e Aleksovski (2006), onde os parâmetros estimados foram: a fração, f , associada a proporção relativa de células quebradas e intactas com relação ao número total de

células e as constantes de tempo dos processos de difusão. E, para a extração supercrítica, a melhor condição com melhor rendimento foi a de 10.000 kPa de pressão e 0,5 mm de diâmetro médio de partícula, e o modelo utilizado foi o de Sovová (2005), onde os parâmetros estimados foram: a eficiência da moagem; o coeficiente de transferência de massa; a solubilidade e a concentração de transição.

5.3.1. Arraste a vapor

O modelo de Reverchon (1996) foi implementado em um simulador orientado a equações (EMSO) (Soares e Secchi, 2003). O sistema de equações foi resolvido por um integrador de passos múltiplos, otimizado por meio de poliedros flexíveis (Nelder-Mead), e as equações foram resolvidas considerando o leito dividido em 100 estágios. Para a resolução das equações do modelo foi necessária, além da curva de extração rendimento vs tempo, a inserção de alguns parâmetros relacionados, tais como: altura (H) e diâmetro (D) do leito de extração; massa específica da planta (ρ_e); vazão de vapor do processo (Q_v) e a massa específica do vapor (ρ_v). Estes valores estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Parâmetros de entrada necessários para a resolução das equações do modelo.

Parâmetros	Valores
H (m)	0,034
D (m)	0,048
ρ_e (kg.m ⁻³)	1,26
Q_v (g.h ⁻¹)	13,4
ρ_v (kg.m ⁻³)	0,58

A altura e o diâmetro do leito foram obtidos diretamente pelo experimento, já a massa específica da planta foi determinada pela Equação 4.15. Com estes valores, foi possível, então, calcular a porosidade do leito ($\varepsilon = 0,62$) pela Equação 4.16. A vazão de vapor foi calculada a partir da potência da resistência imersa na caldeira e a massa específica do vapor foi determinada através da equação de estado de Peng-Robinson (Peng e Robinson, 1976). Estes dados foram utilizados para o cálculo da velocidade superficial do solvente (u).

Com isso, os valores do coeficiente de difusão (K_{tm}) e a constante de equilíbrio (k_p) foram estimados pelo método dos mínimos quadrados (Hornbeck, 1982). Os valores dos parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Parâmetros estimados pelo modelo para o arraste a vapor.

Parâmetro	Valor
k_p ($m^3.kg^{-1}$)	0,009712
K_{tm} (s^{-1})	0,000326

O gráfico rendimento vs tempo da extração e simulado pelo modelo é apresentado na Figura 5.6.

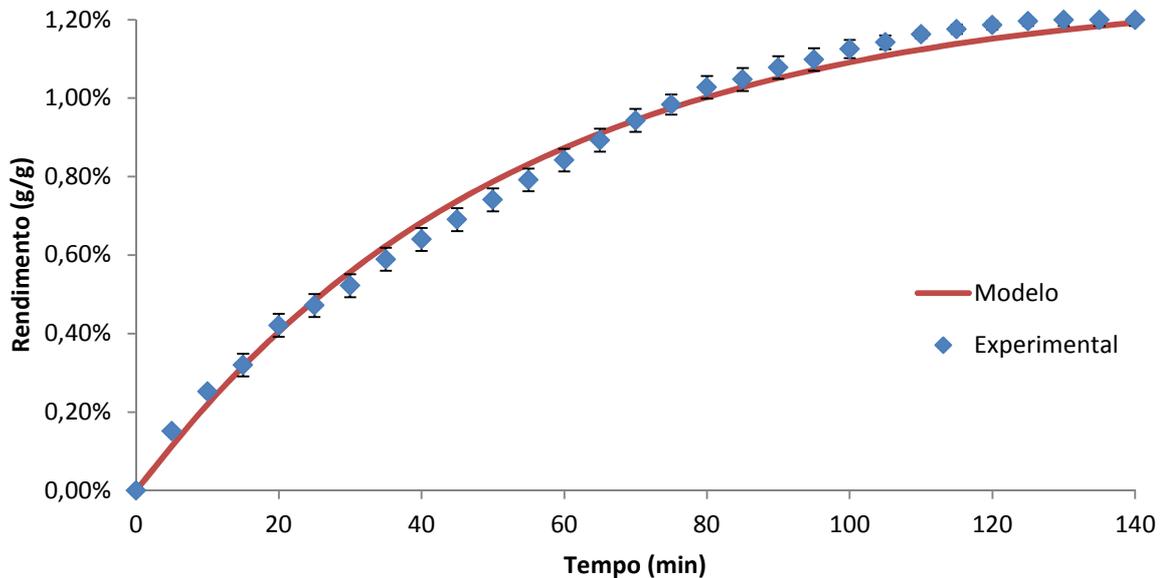


Figura 5.6. Curva de rendimento da extração e modelo matemático para a extração por arraste a vapor com sementes de endro com diâmetro médio de 0,9 mm.

Como pode ser observado no gráfico, o modelo representou bem os dados experimentais e seu coeficiente de determinação (R^2) é de 0,9934.

5.3.2. Hidrodestilação

Este modelo, Sovová e Aleksovski (2006), foi resolvido no *software* Matlab® onde os parâmetros são otimizados pela minimização da soma dos erros

quadráticos entre os dados experimentais e os dados calculados, através do método de Nelder-Mead simplex (Lagarias et al., 1998).

Nesta modelagem, apenas os dados da curva experimental, rendimento vs tempo, da extração foram necessários para a reprodução do modelo. Nele os valores do parâmetro do modelo (f), que representa a proporção relativa de células quebradas e intactas com relação ao número total de células, e das constantes de tempo para os dois processos paralelos de difusão através da partícula, (T_1) que representa o tempo para as partículas quebradas e (T_2) que representa o tempo para as partículas intactas, foram estimados e estão apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Parâmetros do modelo para a hidrodestilação

Parâmetros	Valores
f	0,0199
T_1 (min)	2,171
T_2 (min)	79,138

A Figura 5.7 mostra o gráfico rendimento vs tempo do modelo sobre os pontos da extração. O coeficiente de determinação deste modelo foi de 0,9986, apresentando uma aderência muito boa aos pontos experimentais.

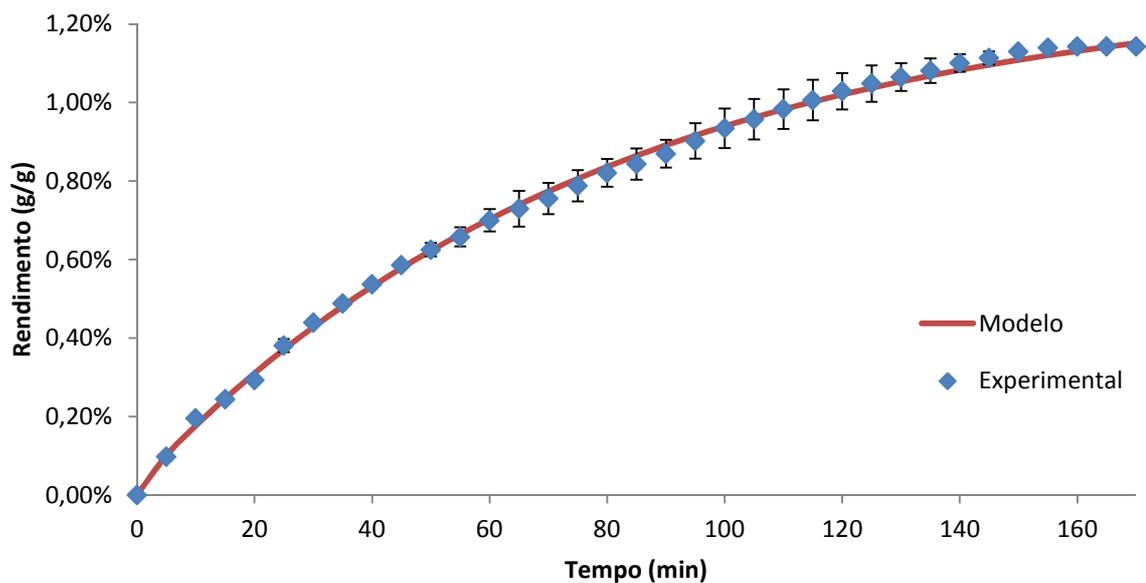


Figura 5.7. Curva de rendimento da extração e modelo matemático para a extração via hidrodestilação de sementes de endro com diâmetro médio de 0,9 mm.

5.3.3. Extração Supercrítica

Para a resolução das equações da modelagem matemática da curva de extração supercrítica, Sovová (2005), foi necessária a inserção de alguns parâmetros de entrada (Tabela 5.11).

A vazão de CO₂, altura e o diâmetro do leito foram obtidos diretamente pelo experimento, já a massa específica da planta foi determinada pela Equação 4.15. Com estes valores, foi possível então calcular a porosidade do leito ($\varepsilon = 0,62$) pela Equação 4.16. A massa específica do CO₂ foi calculada pela equação de estado de Peng-Robinson, e, a a_s foi calculada pela Equação 5.5, onde a área superficial a_0 da partícula é estimada pela Equação 5.6 sendo $\bar{d}_p=0,5$ mm.

Tabela 5.11. Parâmetros de entrada para a resolução do modelo.

Parâmetros	Valores
H (m)	0,11
D (m)	0,02
ρ_e (kg.m ⁻³)	1,24
\dot{q} (g.h ⁻¹)	1000
ρ_f (kg.m ⁻³)	650,49
a_s (m ⁻¹)	5147,9

$$a_s = (1 - r) * a_0 \quad (5.5)$$

$$a_0 = \frac{6}{\bar{d}_p} \quad (5.6)$$

Este modelo também foi resolvido no *software* Matlab[®] onde quatro parâmetros foram estimados: a eficiência da moagem (r); a solubilidade (Y^*); o coeficiente de transferência de massa (K_s) e a concentração de transição (x_t) (Tabela 5.12).

Tabela 5.12. Parâmetros do modelo para a extração supercrítica.

Parâmetros	Valores
r	0,571
Y^* (kg _{soluto} /kg _{solvente})	$8,5 \times 10^{-4}$
K_s (m.s ⁻¹)	$2,27 \times 10^{-8}$
x_t	0,0143

As curvas rendimento vs tempo da extração e da modelagem estão apresentadas na Figura 5.8. O modelo apresentou um ajuste muito bom, com R^2 de 0,9985, que pode ser justificado pela sua maior complexidade.

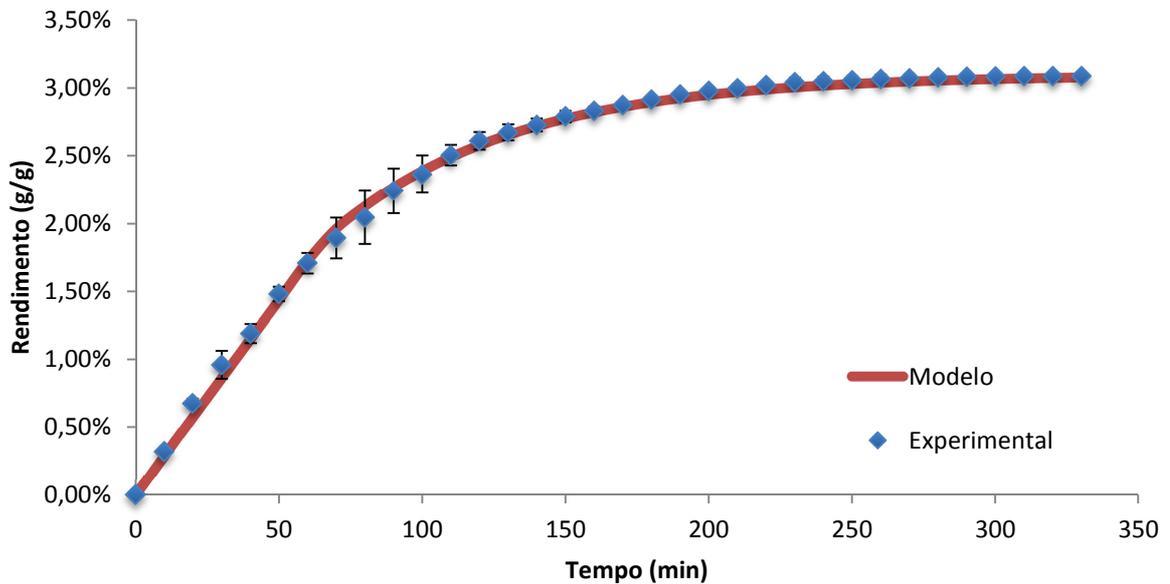


Figura 5.8. Curva de rendimento da extração e modelo matemático para a extração supercrítica a 10.000 kPa de sementes de endro com diâmetro médio de 0,5 mm.

5.4. Análise antibacteriana

As análises antibacterianas foram realizadas em duas etapas: primeiro foi feita a bioautografia como técnica qualitativa e depois, com a confirmação dos resultados, foi realizada a CIM como técnica quantitativa.

Na bioautografia, todos os extratos apresentaram ação inibitória frente à *E. coli* e apenas o óleo essencial do grupo GM apresentou ação frente à *S. aureus*. Os resultados desta análise podem ser visualizados na Figura 5.9.

A CIM confirmou os resultados da análise bioautográfica, onde o óleo GM apresentou ação na concentração de 450 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para as duas bactérias, o óleo P apenas apresentou ação em concentrações acima de 450 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e o extrato SC apresentou ação na concentração de 450 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para a *E. coli* e apenas acima disto para o *S. aureus*. Estes resultados de 450 $\mu\text{L}/\text{mL}$ são considerados como uma forte inibição frente às bactérias (Duarte et al., 2005).

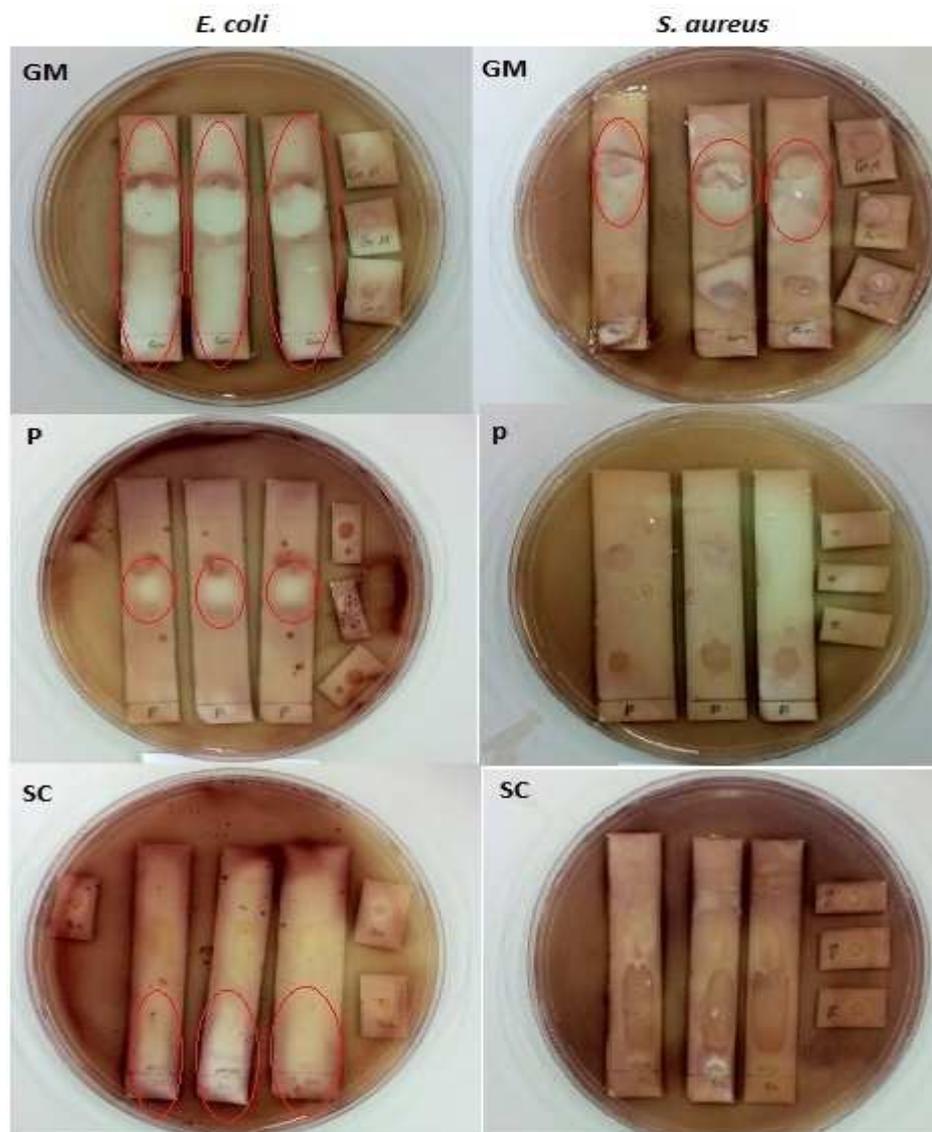


Figura 5.9. Análises bioautográficas.

Na Figura 5.9 os círculos em vermelho mostram a localização dos halos de inibição nas placas. Vale ressaltar que a visualização das placas a olho nu torna mais clara a localização destes halos do que na figura.

Apesar de todos os extratos possuírem dilapiol como composto majoritário, as ações apresentadas podem ser justificadas pela presença de compostos como carvona, limoneno, miristicina e E-anetol, previamente citados na literatura como compostos que possuem atividade antibacteriana (Delaquis et al., 2002; Freire et al., 2010; Ferreira, 2015). Isto porque já foi relatado na literatura a fraca/nula ação do dilapiol frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, através da análise de extratos que possuíam dilapiol como majoritário e de frações onde este composto foi isolado (Ferreira, 2015). Além disso, foi observada ação frente à *E. coli* de todos os extratos considerados, cumpre destacar que todos apresentam E-anetol em sua composição e este composto é apontado na literatura como agente antibacteriano com relação a *E. coli* (De et al., 2002). Os óleos essenciais obtidos pelas diferentes técnicas apresentaram atividade antimicrobiana e esta é atribuída ao sinergismo (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009) entre os componentes, pois não foi possível com o estudo realizado individualizar a ação apresentada com relação às bactérias testadas.

6. CONCLUSÃO

Após a finalização dos experimentos, foi possível observar que o diâmetro médio de partícula é uma variável que têm interferência nos resultados das extrações, tanto em questão de rendimento quanto na composição dos extratos, e sempre deve ser levada em consideração neste tipo de estudo.

A extração supercrítica foi a técnica extrativa que apresentou o melhor rendimento de extrato entre todas as técnicas testadas, e, o planejamento fatorial juntamente com a metodologia de superfície de resposta mostrou-se uma ferramenta excelente ao ser aplicada aos experimentos desta técnica de extração, visto que: permitiu a redução da quantidade de experimentos realizados para a análise; indicou a melhor condição para a obtenção de um maior rendimento de extrato, $P=10.000$ kPa e $\bar{d}_p=0,5$ mm. A equação gerada pelo modelo de superfície de respostas representou de forma aceitável os dados experimentais e mostrou a não interferência da interação entre as variáveis, pressão e diâmetro médio de partícula, no rendimento dos extratos por mais que ambas, individualmente, interfiram neste resultado.

Pelas técnicas de arraste a vapor e hidrodestilação, foi possível determinar, de forma direta, que o diâmetro médio de partícula que resulta em um melhor resultado de rendimento de extrato foi o de 0,9 mm para ambas, resultado controverso, porém explicado pela possível perda de alguns compostos mais voláteis para a atmosfera durante o processo de moagem das sementes, e pela maior compactação do leito de extração nos experimentos com menor diâmetro médio de partícula e um possível aquecimento provocado durante o processo de moagem que acaba volatilizando parte do produto volátil.

Todas as modelagens matemáticas realizadas visando à simulação do processo experimental geraram bons resultados, ajustando-se bem aos dados experimentais, fornecendo valores de parâmetros que podem possibilitar a previsão em outras condições de processo sem a necessidade de realização de novos experimentos.

Através da análise por CG/EM, foi observada a majoritariedade de dois compostos para todos os extratos, o dilapiol e a carvona, sendo estes responsáveis pela composição de cerca de 85% dos extratos obtidos por hidrodestilação e arraste a vapor, e 95% dos obtidos por extração supercrítica. Para estes resultados, uma análise de componentes principais foi realizada, onde foi possível a separação destes extratos em três diferentes grupos: GM; P; e SC. Onde o grupo GM é caracterizado pela maior semelhança no teor entre todos os compostos, o grupo P é caracterizado pela maior quantidade de E-anetol e miristicina, e o grupo SC, que é o mais diferente de todos os extratos, é caracterizado pela maior quantidade de dilapiol, menor de carvona e também pela ausência de limoneno.

Por fim, as análises antibacterianas realizadas foram bem sucedidas, onde todos os extratos apresentaram ação contra as bactérias testadas. O extrato GM apresentou a maior atividade, pois teve ação frente a *E. coli* e *S. aureus*. O extrato provindo do arraste a vapor e hidrodestilação das partículas com menor diâmetro apresentou uma maior concentração inibitória mínima frente à *E. coli* quando comparado aos grupos GM e SC. O extrato da SC apresentou atividade frente à bactéria *E. coli* com CIM igual a 450 µL/mL.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4. ed. Illinois: Allure. 804p. 2007.

ALMEIDA, R. N.; NETO, R. G.; BARROS, F. M. C.; CASSEL, E.; VON POSER, G. L.; VARGAS, R. M. F. Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol+water as co-solvent. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 70, p. 95–102, 2013.

ANDERSON-COOK, C. M.; BORROR, C. M.; MONTGOMERY, D. C. Response surface design evaluation and comparison. **Journal of Statistical Planning and Inference**, v. 139, n. 2, p. 629–641, 2009.

BADAR, N.; ARSHAD, M.; FAROOQ, U. Characteristics of *Anethum graveolens* (*Umbelliferae*) seed oil: Extraction, composition and antimicrobial activity. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 3, p. 329–332, 2008.

BAGHERI, H.; MANAP, A. M. Y. B.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v. 121, p. 220–228, 2014.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 46, n.2, p. 446-475. 2008.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a

biochemical reaction. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 846–854, 2007.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 50, n. 3, p. 126-129, 2006.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W. Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais. In: Eduardo Cassel; Leandro Machado Rocha. (Org.). **Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapéuticos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 213-228. 2008.

CASSEL, E.; VARGAS, R.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 171 – 176, 2009.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E., COGOI, L., FERRARO, G., FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 656-661, 2010.

CASSEL, E.; BEDINOT, C.; VARGAS, R. M. F. Unidade Piloto de Extração Supercrítica. Brasil. **Patente: Privilégio de Inovação**. Número do registro: PROV020110081175, data de depósito: 03/08/2011, título: "Unidade Piloto de Extração Supercrítica". Instituição(ões) financiadora(s): PUCRS. 2011.

COUTO, M. E. O. Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares, Pelotas, 91p. 2006

CRANK, J. The Mathematics of Diffusion, 2. ed. **Oxford Science Publications UK**, 414p. 1975.

CZEPAK, M. P.; BANDONI, A. Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: Seu Aproveitamento Para a Produção de Aromas e Sabores. Vitória: EDUFES, 624 p. 2008.

DALTON

DE, M.; DE, A. K.; SEN, P.; BANERJEE, A. B. Antimicrobial properties of star Anise (*Illicium verum* Hook f). **Phytotherapy Research**. v. 95, n. July 2000, p. 94–95, 2002.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 101–109, 2002.

FALCÃO, M. A. **Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim limão e suas frações para produtos de higiene pessoal**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre, 2012.

FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; ONIFADE, A. K.; OCHEI, J. E., & AL MAHROQI, Y. K. S. C-13 NMR Analysis and antifungal and insecticidal activities of Oman dill herb oil. **Pharmaceutical Biology**, 44, 44-49. 2006.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 0260, p. 263–269, 2002.

FERREIRA, R. G. **Ação Antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* e dilapiol em infecções de pele**. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará. Brasil. Belém, 2015.

FONSECA, Z.A. Plantas e ervas medicinais e fitoterápicos. Disponível em: <http://floresdoareal.blogspot.com.br/2014/01/anethum-graveolens-l-syn-peucedanum.html>. Acessado em: 28/03/2016.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v. Muell. Ex.Benth., Myrtaceae**. Dissertação

de mestrado. Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Brasil. Curitiba, 2005.

FREIRE, J. M.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; ANDRADE, M. A. Óleos essenciais de *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. e *Cinnamomum zeylanicum* Blume: Caracterização química e antimicrobiana. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 209–214, 2011.

GARCEZ, J. J. **Estudo da obtenção do estrato volátil das sementes de *Anethum graveolens* L. utilizando CO₂ em meio supercrítico**. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre, 2015.

GOMIDE, R. Operações unitárias. São Paulo. 293p. 1983.

HAJHASHEMI, V.; ABBASI, N. Hypolipidemic Activity of *Anethum graveolens* in Rats. **Phytotherapy Research**, v22, 10.1003/ptr.2329, 2008.

HORNBECK, R.W. Numerical methods. Nova York. Quantum Publishers Inc. 310p. 1975.

JACKSON, J.E. A user's guide to principal components. Nova Jersey: Wiley, 569p. 2003.

JIANU, C.; MISCA, C.; POP, G.; RUSU, L. C.; ARDELEAN, L.; GRUIA, A. T. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from dill (*Anethum graveolens* L.) grown in western Romania. **Revista de Chimie**. p. 641–645, 2012.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. Applied multivariate statistical analysis. 6. ed., Nova Jersey: Pearson, 773p. 2007.

KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Comparison of essential oils compositions of *Nepeta persica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam

distillation methods. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2-3, p. 227–232, 2010.

LAGARIAS, J.C.; REEDS, J.A.; WRIGHT, M.H.; WRIGHT P.E. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. **SIAM Journal of Optimization**, v. 9, p. 112-147, 1998.

LAPPONI, J.C. Estatística usando o Excel. 4. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 476p. 2005.

LARKECHE, O.; ZERMANE, A.; MENIAI, A. H.; CRAMPON, C.; BADENS, E. Supercritical extraction of essential oil from *Juniperus communis* L. needles: Application of response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 8–14, 2015.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47–56, 2005.

LUCAS, S.; CALVO, M. P.; GARCÍA-SERNA, J.; PALENCIA, C.; COCERO, M. J. Two-parameter model for mass transfer processes between solid matrixes and supercritical fluids: Analytical solution. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 2, p. 257–266, 2007.

LUCAS, A. M. **Estudo comparativo de extratos voláteis de eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados**. Dissertação de Mestrado em Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre, 2011.

MONSEFI, M.; GHASEMI, M.; BAHAOODINI, A. The effects of *Anethum graveolens* L. on female reproductive system. *Phytotherapy Research*, 20, 865e868, 2006.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

NAIDU, M. M.; VEDASHREE, P.; SATAPATHY, P.; KHANUM, H.; RAMSAMY, R.; HEBBAR, H. U. Effect of drying methods on the quality characteristics of dill (*Anethum graveolens*) greens. **Food Chemistry**, v. 192, p. 849–856, 2016.

ORHAN, E. I.; SENOL, F. S.; OZTURK, N.; CELIK, S. A.; PULUR, A.; KAN, Y. Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *Anethum graveolens* L. (dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 96–103, 2013

PENG, D. Y.; ROBINSON, D. B. A new two-constant equation of state. **Ind. Eng. Chem. Fundamen.**, v. 15, p. 59-64, 1976.

PEREIRA, M. A. A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre (RS), 2010.

RAFII, F.; e SHAHVERDI, A. R. Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against enterobacteria. **Chemotherapy**, 53, 21e25, 2007.

REVERCHON, E. Mathematical Modeling of Supercritical Extration of Sage Oil. **AIChE Journal**, 42, 1765, 1996.

REVERCHON, E. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Essential Oils and Related Products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p.1-37, 1997.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: Isolation and mathematical modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 20, p. 3421–3428, 1997.

RUGGIERI, L.; GEA, T.; ARTOLA, A.; SÁNCHEZ, A. Bioresource Technology Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process : A review and a correlation analysis. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 10, p. 2655–2666, 2009.

SCOPEL, R. **Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica**. Dissertação de Mestrado em Engenharia, Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 84p. 2013.

SCOPEL, R.; SILVA, C. F.; LUCAS, A. M.; GARCEZ, J. J.; ESPIRITO SANTO, A. T.; ALMEIDA, R. N.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Fluid phase equilibria and mass transfer studies applied to supercritical fluid extraction of *Illicium verum* volatile oil. **Fluid Phase Equilibria**, v. 417, p. 203–211, 2016.

SHERWIN, E.R. **Antioxidants in Food additives**. Eds. Branen A. L.; Davidson, P. M. e Salminen S. Marcel Dekker Inc., New York: 145 p. 1990.

SILVA, G. F. Extração Supercrítica de *Lycopodium clavatum* L. Dissertação de Mestrado em Engenharia, **Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 82p. 2014.

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. Óleos voláteis. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 415 p. 1999.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; PANDEY, S. K.; SINGH, U. K.; SINGH, R. K. Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 680–682, 2002.

SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52. **Journal of Food Science**, 70, 208e215, 2005.

SINTIM, H. Y.; BURKHARDT, A.; GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; OBOUR, A. E.; ZHELJAZKOV, V. D.; SCHLEGEL, V. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 190–196, 2015.

SOARES, R. DE P.; SECCHI, A. R. European Symposium on Computer Aided Process Engineering-13, 36th European Symposium of the Working Party on Computer Aided Process Engineering. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 14, p. 947–952, 2003.

SODEIFIAN, G.; SAJADIAN, S. A.; ARDESTANI, N. S. Optimization of essential oil extraction from *Launaea acanthodes* Boiss: Utilization of supercritical carbon dioxide and cosolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 46–56, 2016.

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 10, p. 1–10, 2010.

SOVOVÁ, H. Rate of vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H.; KOMERS, R.; KUCERA, J.; JEZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 49, n. 15, p. 2499–2505, 1994.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **The Journal of Supercritical Fluid**, v. 33, n.1, p. 35-52, 2005.

SOVOVÁ, H.; ALEKSOVSKI, S. A. Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 881-889, 2006.

SOVOVÁ, H.; OPLETAL L.; BÁRTLOVÁ, M.; SAJFRTOVÁ, M.; KŘENKOVÁ, M. Supercritical fluid extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, n.1, p. 88-95, 2007.

STANOJEVIĆ, L. P.; RADULOVIĆ, N. S.; DJOKIĆ, T. M.; STANKOVIĆ, B. M.; ILIĆ, D. P.; CAKIĆ, M. D.; NIKOLIĆ, V. D. The yield, composition and hydrodistillation kinetics of the essential oil of dill seeds (*Anethi fructus*) obtained by different hydrodistillation techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 429–436, 2015.

TAYLOR, L.T. Supercritical fluid extraction. New York, NY: J. Wiley, p. 1-3, 45-47. 1996.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HUANG, B.; HE, J.; WANG, Y. In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v.22, p. 1992 – 1999, 2011.

UQUICHE, E.; CIRANO, N.; MILLAO, S. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 307–314, 2015.

XAVIER, R. Investigação de padrões criminais e de indicadores de segurança para os municípios do Rio Grande do Sul, por meio de técnicas estatísticas multivariadas. **Textos Para Discussão FEE**, nº 143, 21p, 2016.

YANI, S.; GAO, X.; GRAYLING, P.; WU, H. Steam distillation of mallee leaf: Extraction of 1,8-cineole and changes in the fuel properties of spent biomass. **Fuel**, v. 133, p. 341–349, 2014.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. **ARGOS: Editora Universitária**, Chapecó; 2001.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 16, n. 2, p. 97-110, Mar. 2009.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Base da Química dos Óleos Essenciais e Aromaterapia: Abordagem Técnica e Científica. 1 ed. São Paulo: Roca, 292p. 2010.

ANEXO A: CROMATOGRAMAS

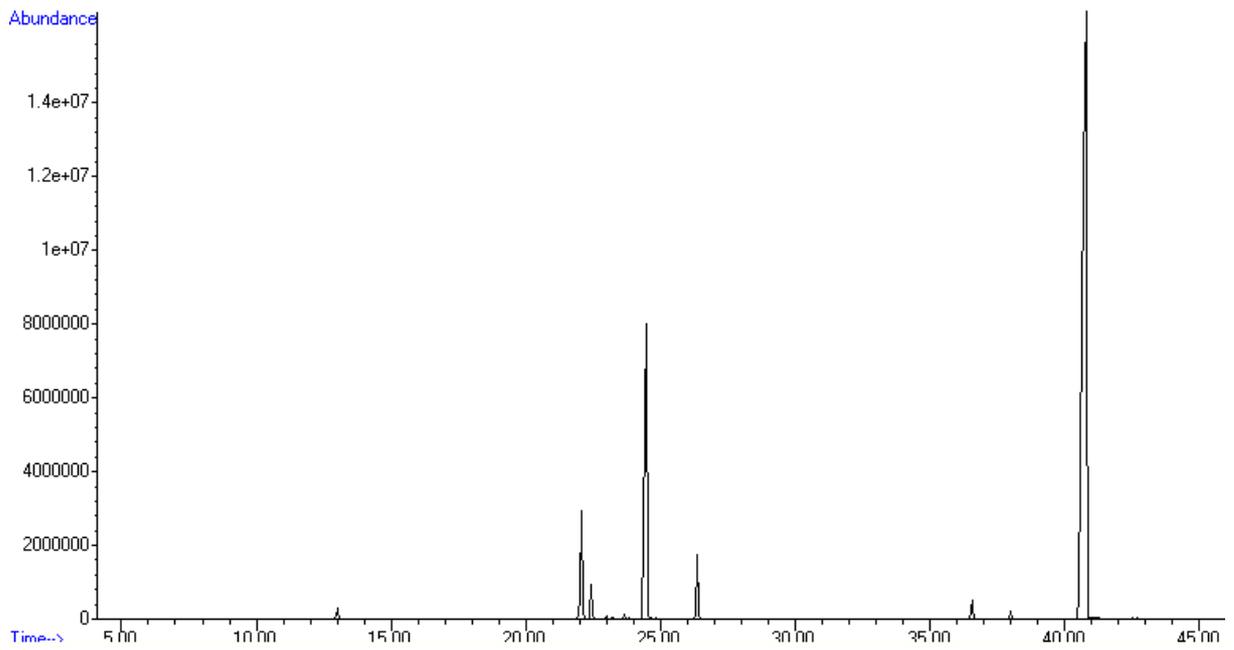


Figura A.1. Cromatograma arraste a vapor P.

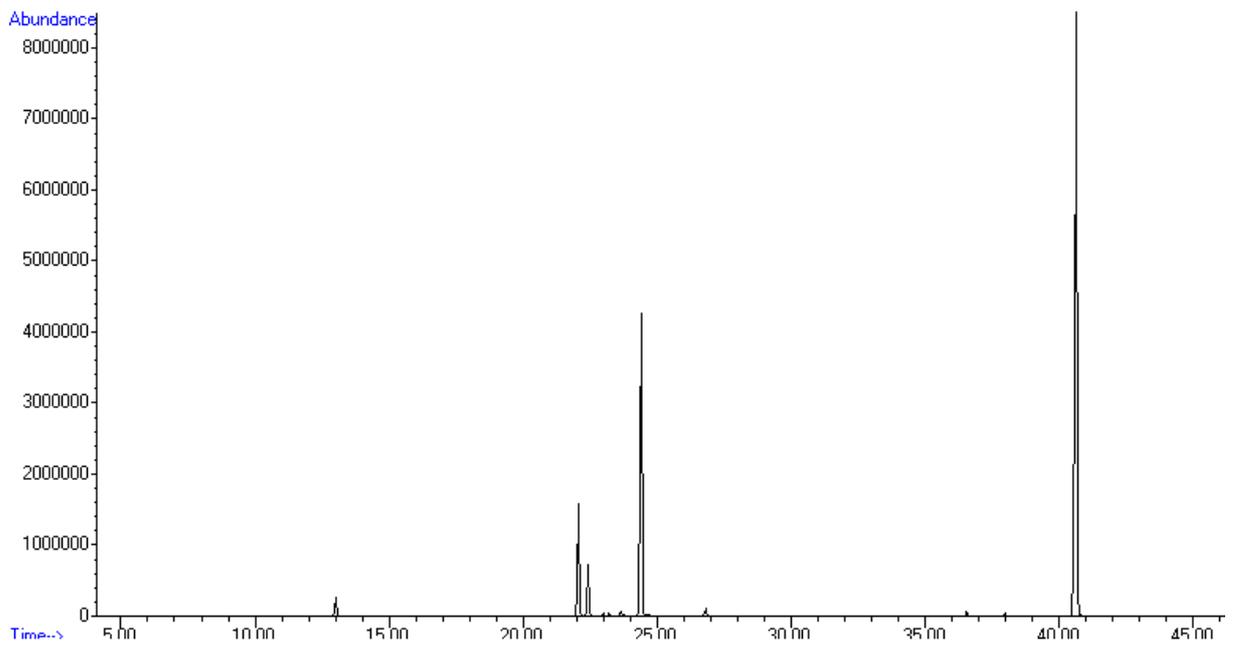


Figura A.2. Cromatograma arraste a vapor M.

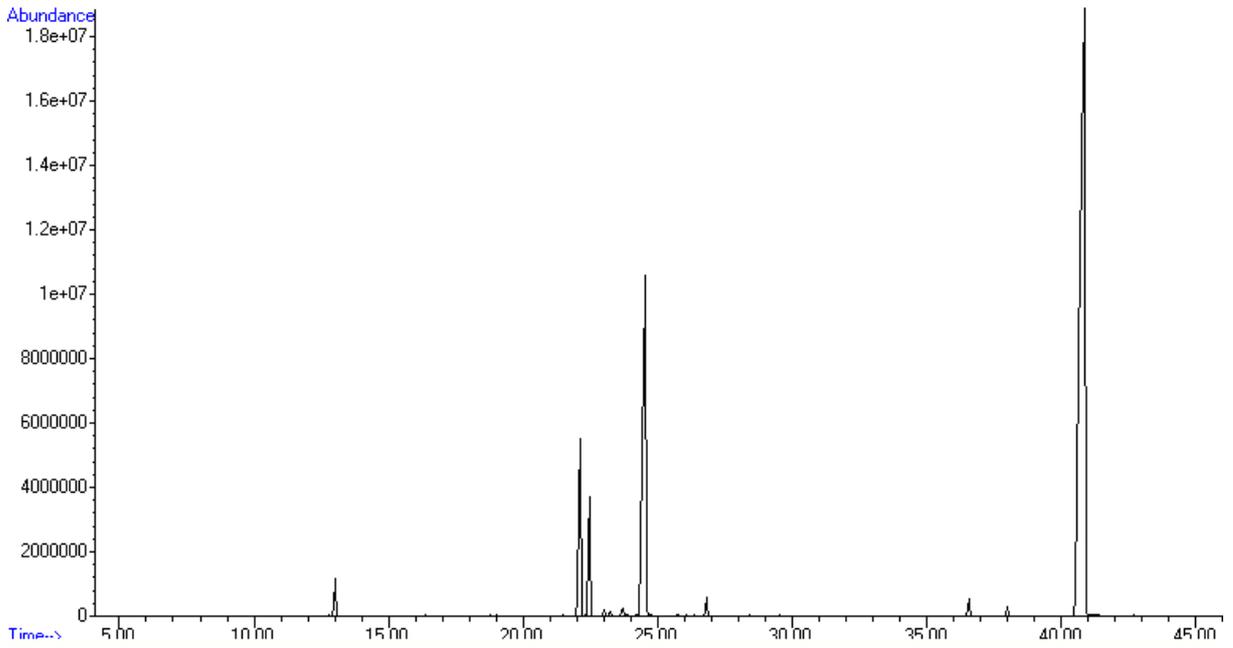


Figura A.3. Cromatograma arraste a vapor G.

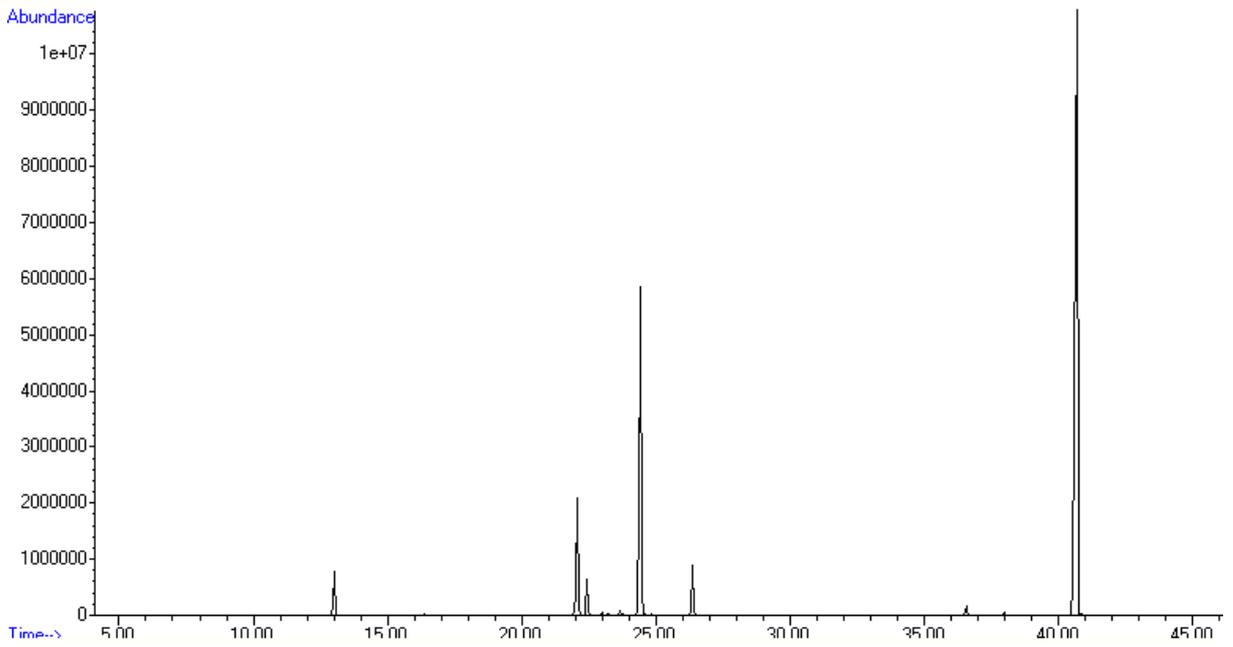


Figura A.4. Cromatograma hidrodestilação P.

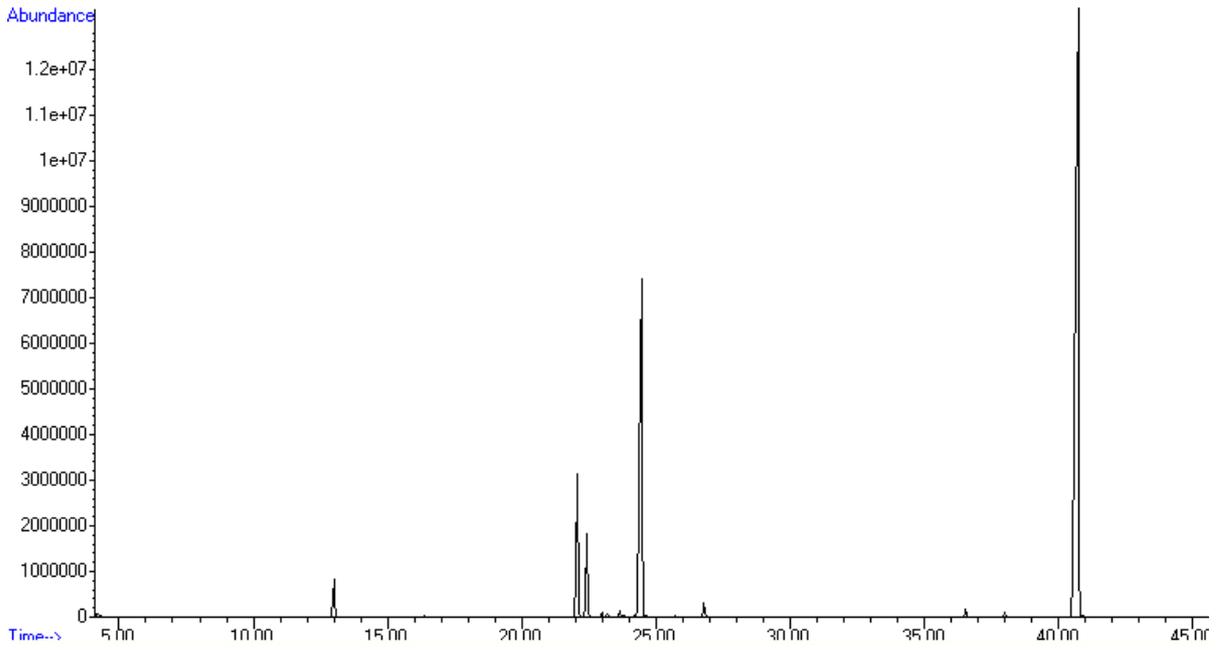


Figura A.5. Cromatograma hidrodestilação M.

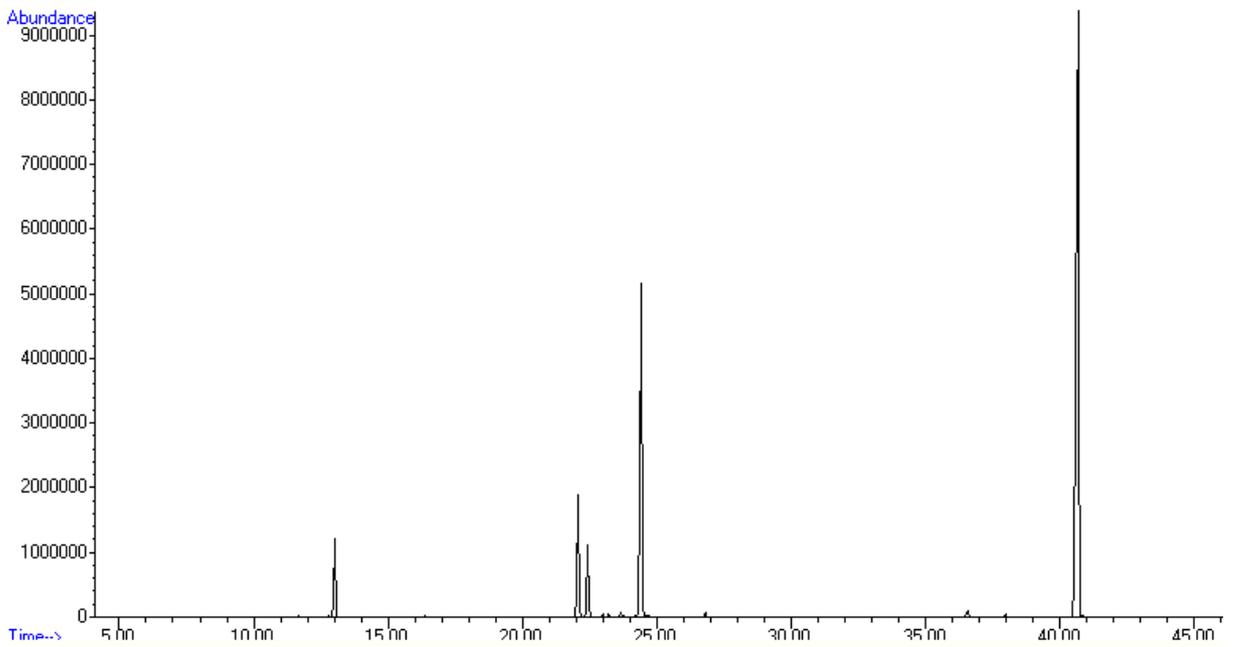


Figura A.6. Cromatograma hidrodestilação G.

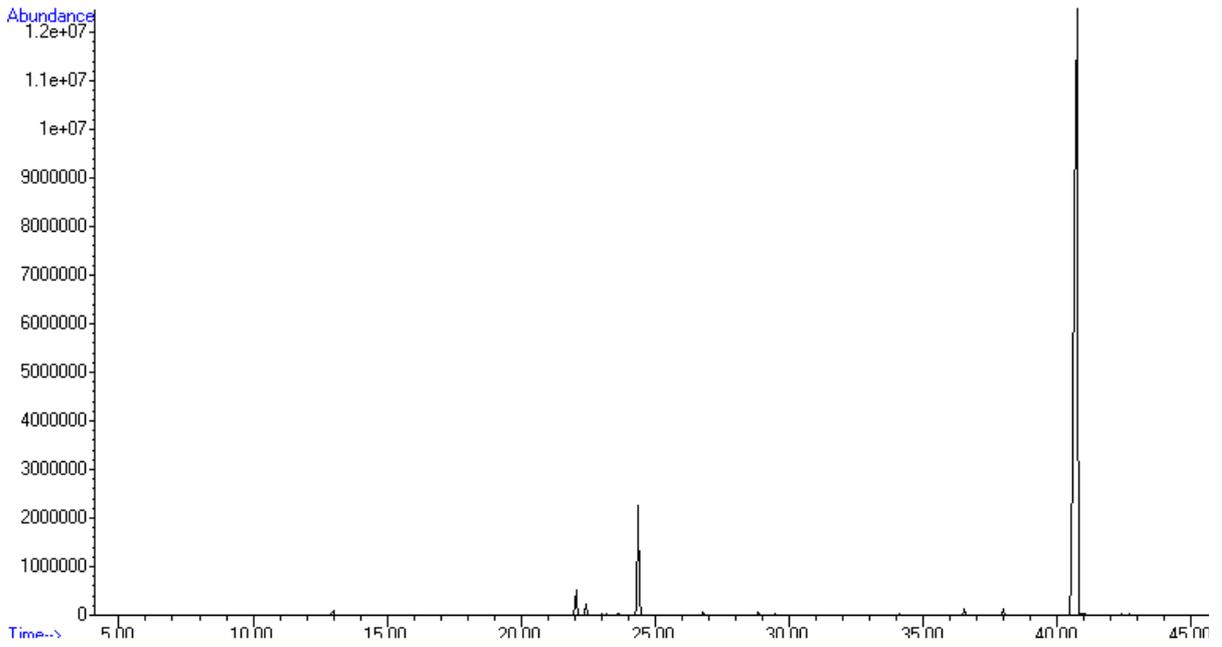


Figura A.7. Cromatograma extração supercrítica 1.

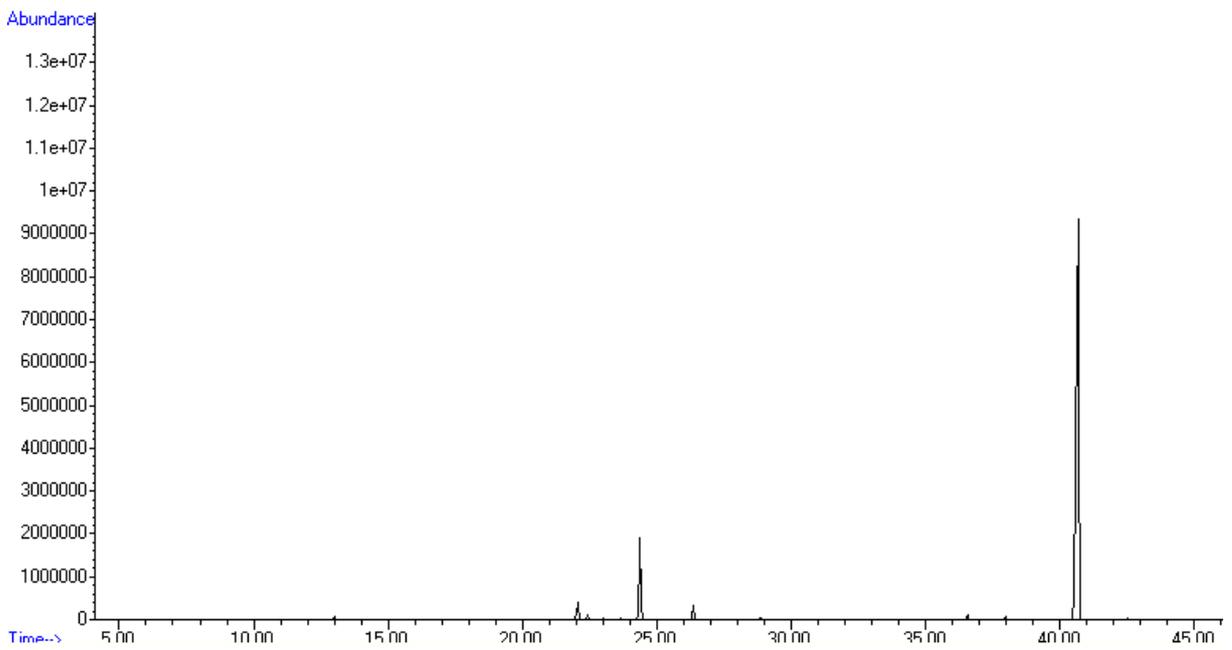


Figura A.8. Cromatograma extração supercrítica 2.

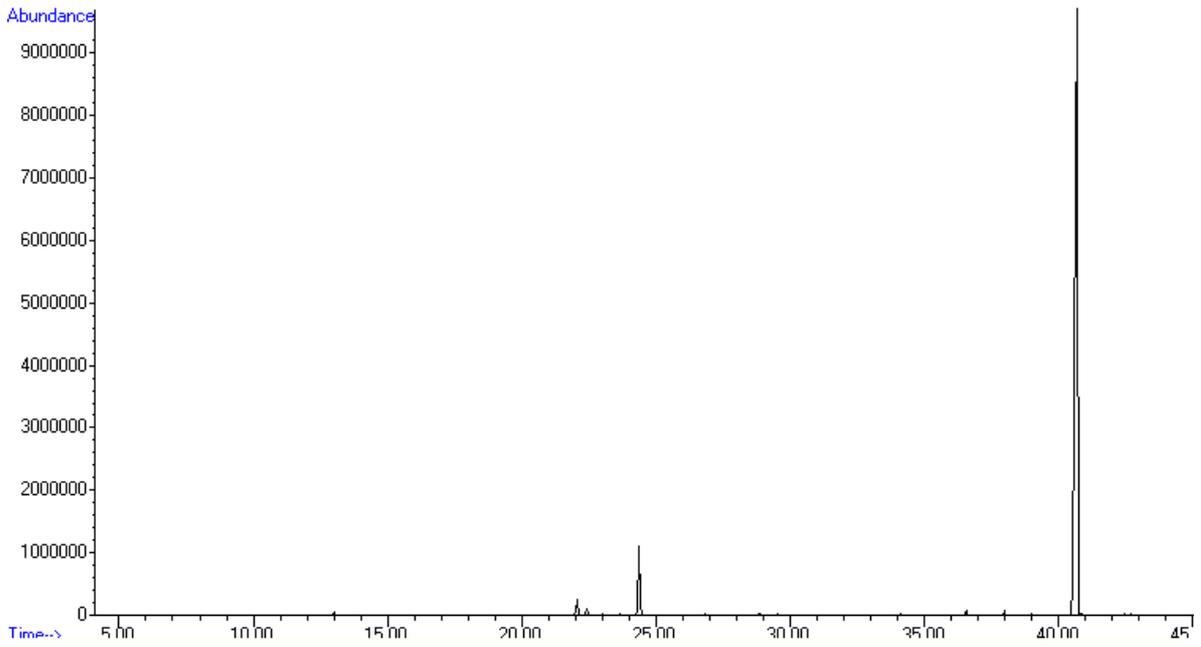


Figura A.9. Cromatograma extração supercrítica 3.

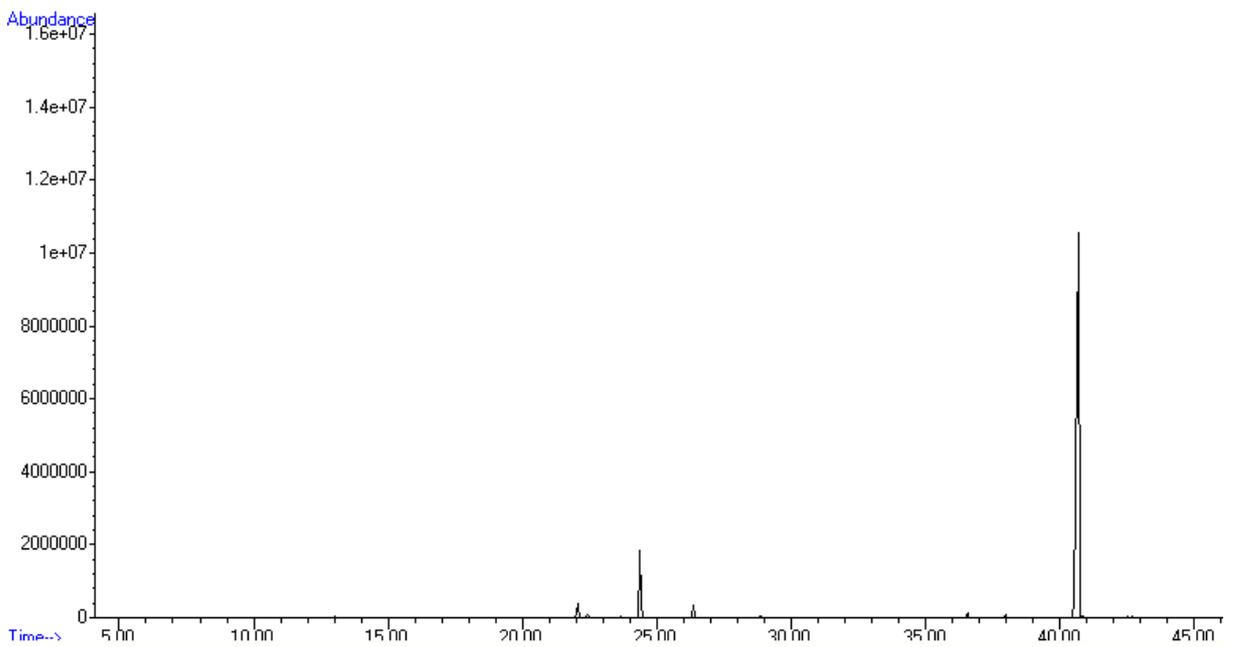


Figura A.10. Cromatograma extração supercrítica 4.

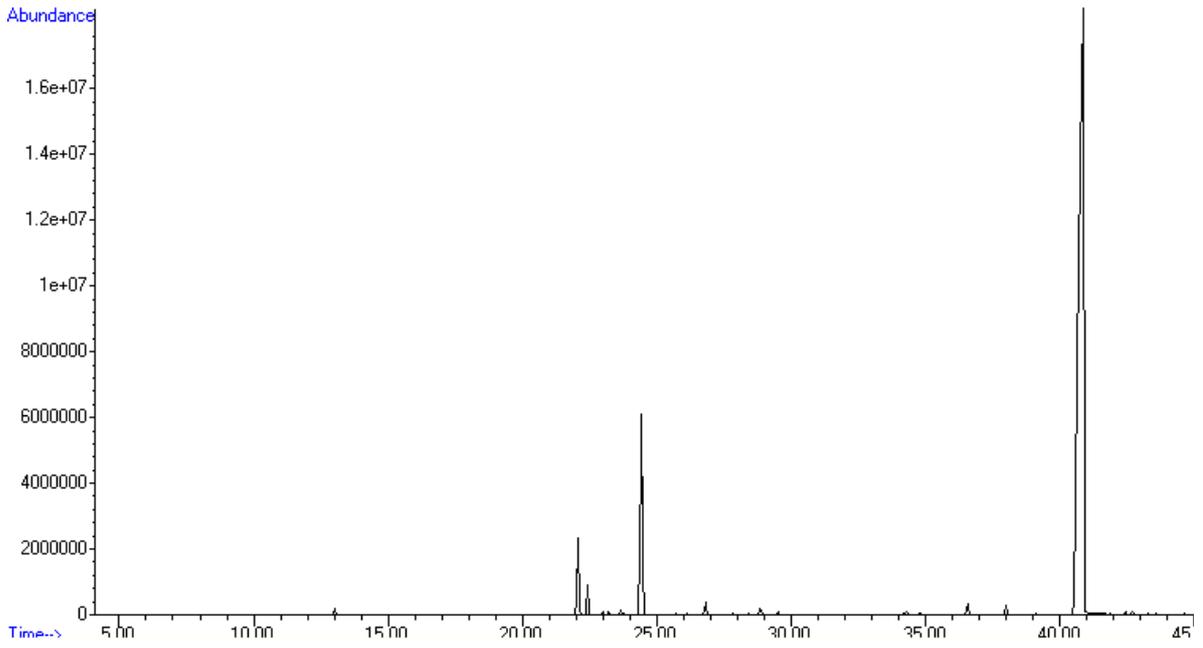


Figura A.11. Cromatograma extração supercrítica 5.

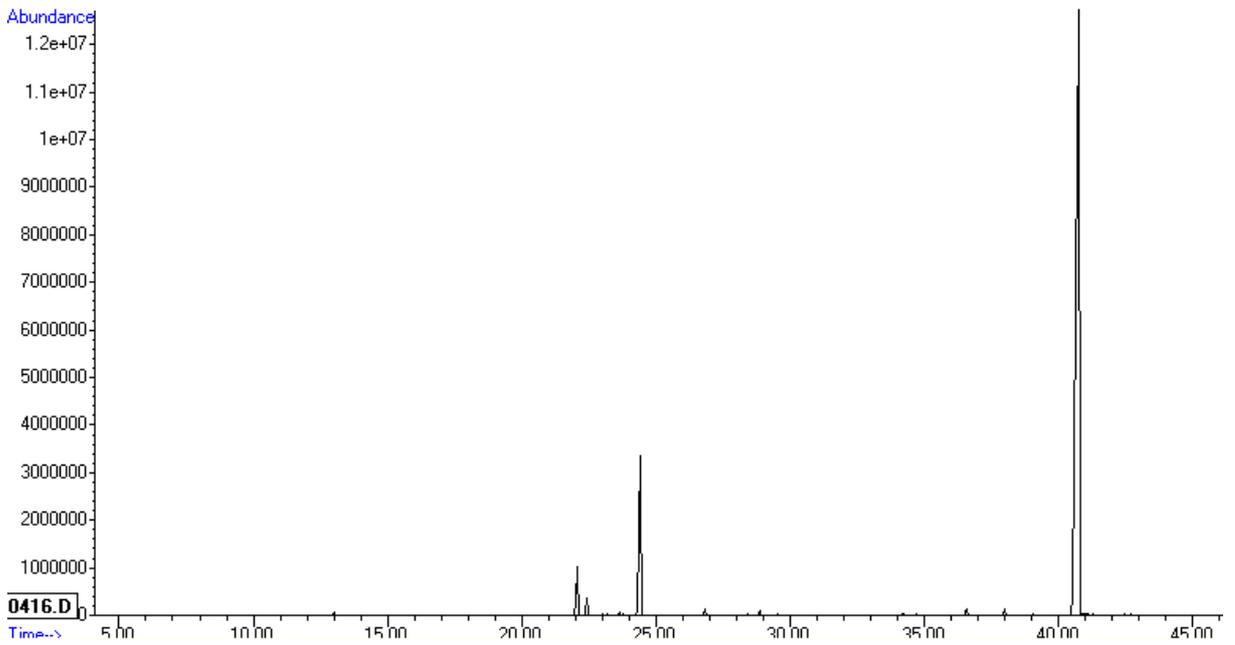


Figura A.12. Cromatograma extração supercrítica 6.

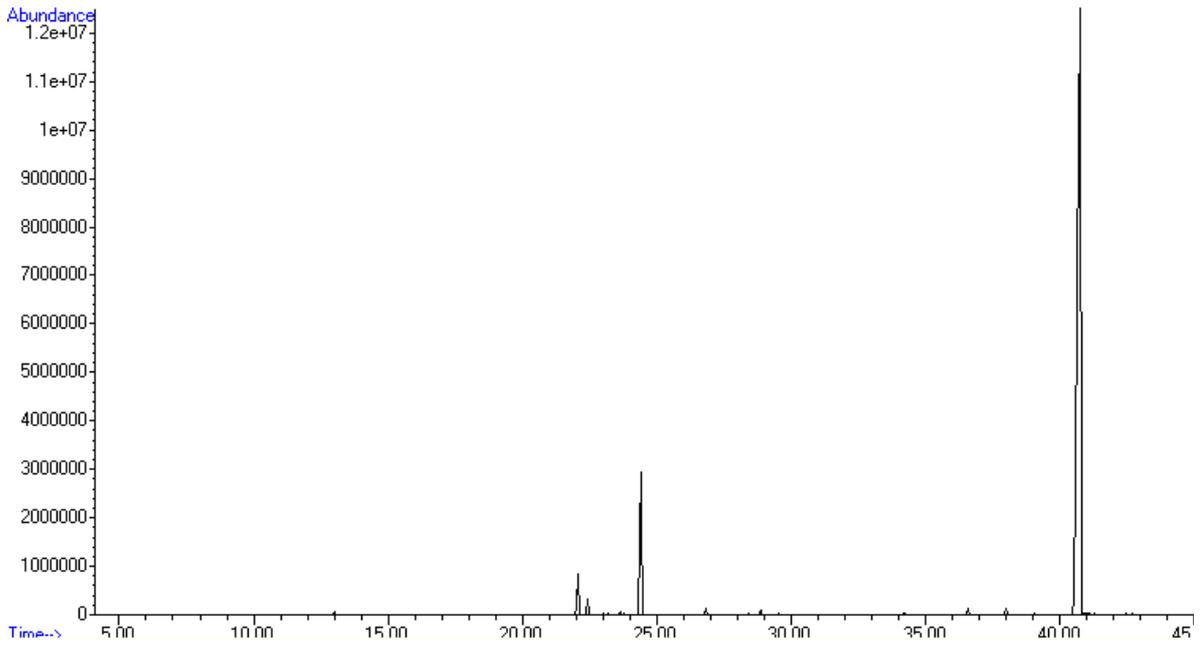


Figura A.13. Cromatograma extração supercrítica 7.

