

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *PIMPINELLA ANISUM* L. E
ESTUDO DA SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Marina Mondadori Gessinger
Aluna da Faculdade de Engenharia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga, 6681. Partenon. Porto Alegre/RS. CEP 90619-900.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a extração supercrítica utilizando semente de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) como matéria-prima. Foram realizadas nove extrações, com pares de temperatura e pressão distintos: 35°C/80 bar, 35°C/90 bar, 35°C/100 bar, 40°C/80 bar, 40°C/90 bar, 40°C/100 bar, 50°C/80 bar, 50°C/90 bar e 50°C/100 bar. Com os dados experimentais obtidos foi feita a modelagem matemática do processo, baseada no balanço diferencial da transferência de massa. Observou-se que o modelo utilizado representa satisfatoriamente os dados experimentais. Os extratos foram analisados pelo método da cromatografia gasosa, indicando, assim, a composição química do óleo em cada condição. Ainda, foram feitas análises através do método da bioautografia, a fim de investigar a ação antibacteriana do óleo essencial frente a uma bactéria. Os resultados indicaram que o óleo é eficaz contra a bactéria *Micrococcus luteus*.

PALAVRAS-CHAVE: Extração supercrítica. Óleos essenciais. Erva-doce. *Pimpinella anisum*. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

This study aimed to examine the supercritical extraction using anise seed (*Pimpinella anisum* L.) as a raw material. Nine extractions were performed with pairs of different pressure and temperature: 35°C/80 bar, 35°C/90 bar, 35°C/100 bar, 40°C/80 bar, 40°C/90 bar, 40°C/100 bar, 50°C/80 bar, 50°C/90 bar e 50°C/100 bar. With the experimental data it was obtained mathematical modeling, based on the differential mass transfer balance. It was observed that the model represents the experimental data satisfactorily. The extracts were analyzed using gas chromatography, thus indicating the chemical composition of the oil in each condition. Furthermore, analyzes were made by bioautography method in order to investigate the antibacterial activity of the essential oil against a bacteria. The results indicated that the oil is effective against the bacterium *Micrococcus luteus*.

KEY-WORDS: Supercritical fluid extraction. Essential oils. Anise. *Pimpinella anisum*. Antimicrobial activity.

1 INTRODUÇÃO

A extração supercrítica, dependendo das condições de operação, mais especificamente temperatura e pressão, pode promover a retirada de óleo essencial da matriz submetida ao processo. A extração supercrítica é uma técnica promissora, que pode substituir processos tradicionais de extração utilizando solventes, quando o objetivo é a obtenção de extratos com fragrâncias de interesse ou com atividade antimicrobiana (REVERCHON, 1997).

Óleo essencial pode ser definido como um material volátil presente em algumas plantas. Segundo Simões *et al* (1999), os óleos essenciais possuem como característica básica o cheiro e o sabor. As diversas plantas que contêm óleo podem apresentar uma porcentagem deste composto de 0,01% a 10% em massa seca. O odor característico dos óleos essenciais é resultado de uma complexa combinação, incluindo centenas de componentes, o que torna bastante difícil sua reprodução de forma sintética (REVERCHON, 1997). Devido a esta característica, a extração de óleos essenciais é de grande importância para a indústria mundial, em diversos setores, principalmente na fabricação de alimentos, bebidas e na área farmacêutica.

A extração supercrítica é, atualmente, um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. A principal vantagem está no fato de que nenhum traço de solvente permanece no produto, o que o torna mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos (SIMÕES *et al*, 1999). Além da questão da qualidade, existe uma legislação ambiental severa e restritiva, que visa à eliminação de resíduos de solventes em processos industriais.

A *Pimpinella anisum* L., conhecida popularmente como erva-doce ou anis, é uma planta originária da Ásia e bastante cultivada no Brasil, especialmente na região sul. A erva-doce possui propriedade aromatizante, cicatrizante, expectorante e sedativa (ÖZEL, 2008). O óleo essencial extraído desta planta é utilizado largamente na indústria cosmética e farmacêutica, para fabricação de perfumes e produtos de higiene (SIMÕES *et al*, 1999).

A semente da erva-doce contém cerca de 1 a 4% de óleo essencial, sendo o anetol seu componente majoritário (75 a 90%) (ÖZEL, 2008). Pesquisas apontam que o anetol apresenta propriedade antimicrobiana, antioxidante e antifúngica (ÖZEL, 2008).

O tipo de processo de extração empregado influencia fortemente no rendimento e na composição dos óleos essenciais obtidos a partir de plantas aromáticas, como é o caso da erva-doce. A escolha do método depende, principalmente, do local onde o mesmo se encontra na planta (folhas, semente, flores etc.) (PEREIRA, 2010).

Este trabalho tem como objetivo estudar a extração supercrítica utilizando erva-doce como matéria-prima através da avaliação de diferentes condições operacionais para a obtenção de seu óleo essencial, com subsequente modelagem matemática utilizando os dados experimentais obtidos. Além disso, será avaliada a ação antibacteriana do óleo essencial da erva-doce frente a uma bactéria patogênica.

As extrações serão realizadas mediante a passagem de dióxido de carbono através de uma unidade piloto de extração, sendo consideradas três temperaturas e três pressões distintas, a fim de verificar o rendimento de óleo com o tempo para as situações propostas de temperatura e pressão.

A modelagem matemática das curvas de extração foi realizada com base em um modelo matemático encontrado na literatura, cujo fundamento baseia-se nos princípios da transferência de massa. Os constituintes do óleo essencial foram quantificados através do método da cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

A análise das condições de extração supercrítica para a obtenção do óleo essencial que possui ação antimicrobiana, tanto para reduzir como para eliminar agentes patogênicos é um estudo relevante, já que esta operação de extração produz baixo impacto ambiental e não utiliza solventes tóxicos para a obtenção de um produto, no caso em estudo, natural, que poderá atender às demandas emergentes do mercado atual.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleo Essencial

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências (SIMÕES *et al*, 1999) são compostos secundários produzidos por algumas plantas para sua sobrevivência. São assim chamados por não serem diretamente necessários na alimentação das mesmas. Os compostos primários incluem açúcares e nitrogenados e os secundários, alcalóides, flavonóides e saponinas, além dos óleos essenciais. Os óleos essenciais exercem a função de defesa da planta, como a proteção contra a perda de água e contra fungos e bactérias (WOLFFENBÜTTEL, 2011).

Simões (*et al* 1999) definem os óleos essenciais como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Samuelsson (1999) ressalta que os óleos essenciais são opticamente ativos e apresentam elevado índice de refração, o que permite sua identificação e controle de qualidade.

Plantas ricas em óleos essenciais são encontradas em cerca de 30% das famílias de plantas, sendo que a família da erva-doce, *Apiaceae*, está no grupo que possui maior teor de óleo em suas plantas (SAMUELSSON, 1999).

Os óleos essenciais possuem algumas características físico-químicas básicas: aparência oleosa à temperatura ambiente, aroma agradável e intenso, solubilidade em solventes orgânicos apolares, como éter, pouca solubilidade em água e sabor geralmente ácido e picante (SIMÕES *et al*, 1999, SAMUELSSON, 1999).

O óleo essencial extraído de uma mesma planta pode apresentar composição química e aroma distintos quando extraído de diferentes partes da planta, como por exemplo: folhas, caule, raízes e flores, e por diferentes métodos, tais como a extração por solvente, a destilação por arraste a vapor e a extração supercrítica, entre outros (WOLFFENBÜTTEL, 2011).

2.2 Espécie Vegetal: *Pimpinella anisum* L.

Entende-se por plantas aromáticas aquelas que podem gerar produtos aromáticos, isto é, compostos que apresentam odor ou sabor determinado, não avaliando sua qualidade comercial e estética (BANDONI, 2008).

A *Pimpinella anisum* L., vulgarmente conhecida como erva-doce, é uma planta aromática da família *umbelliferae* (*apiaceae*), cultivada no Irã, Índia, Turquia, Egito e países da Europa e da América do Sul (SAMUELSSON, 1999).

2.3 Extração Supercrítica

O processo de extração supercrítica foi desenvolvido inicialmente na Alemanha, sendo aplicado primeiramente na indústria alimentícia (descafeinização do café). Atualmente, EUA e Alemanha possuem as maiores plantas industriais de extração supercrítica (PERRUT, 2000).

O princípio da extração supercrítica está baseado no fato de que acima e nas proximidades do ponto crítico, um pequeno aumento de pressão produz um grande aumento do poder de solubilização do solvente (BRUNNER, 1994).

Cassel (2008) define o princípio da extração supercrítica como “a solubilização de compostos de uma matriz sólida ou líquida através do uso de um solvente nas condições supercríticas”.

A técnica da extração supercrítica é empregada para inúmeros fins, alguns deles citados por Taylor (1996): a extração de óleos essenciais em plantas e de princípios amargos e aromáticos do lúpulo para a indústria cervejeira; a descafeinização do café, do mate e do guaraná; a obtenção comercial dos carotenos da cenoura e a extração de insumos farmacêuticos de plantas medicinais.

2.3.1 Fluido Supercrítico

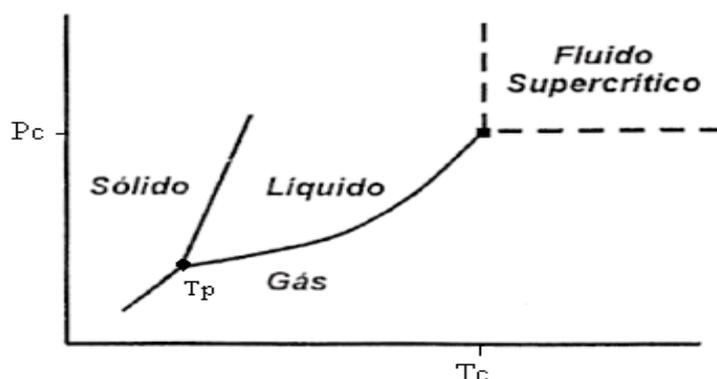
Um fluido supercrítico é qualquer fluido puro que esteja a uma temperatura acima da sua temperatura crítica e da sua pressão crítica. Nenhuma substância é um

fluido supercrítico, mas pode ser levada ao estado supercrítico pelo uso de calor e pressão até superar o seu ponto crítico (BRUNNER, 1994).

A região supercrítica começa logo acima do ponto crítico. A temperatura crítica é a maior temperatura na qual um gás pode ser convertido a líquido através de um aumento de pressão; enquanto que a pressão crítica é a maior pressão na qual um líquido pode ser convertido a gás com um aumento de temperatura (TAYLOR, 1996).

As condições descritas acima estão ilustradas na Figura 1.

Figura 1 - Definição do estado supercrítico para um componente puro.



Legenda: Tp: Ponto triplo. Pc: Pressão crítica; Tc: Temperatura crítica.

Fonte: Adaptado de BRUNNER (1994).

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso. Propriedades relacionadas à capacidade de solubilização, como a densidade de um fluido supercrítico, aproximam-se daquelas típicas de um líquido. As propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos de um gás (TAYLOR, 1996).

O dióxido de carbono é o solvente mais empregado para extração supercrítica, por apresentar temperatura e pressão críticas relativamente baixas: 31°C e 73,8 bar, o que facilita a operação e mantém as propriedades físicas e organolépticas dos extratos (MAUL *et al*, 1996). Além disso, apresenta baixa toxicidade e baixo custo, bem como alta pureza dos produtos obtidos (MEIRELES *et al*, 2009).

Ainda, podem ser adicionadas pequenas quantidades de outros produtos ao dióxido de carbono, como etanol e água, a fim de permitir a adequação de condições de extração para um processo específico (MAUL *et al*, 1996).

Estudos realizados por Rodrigues *et al* (2003), apontaram rendimentos de 3,13% na extração supercrítica do óleo essencial da *Pimpinella anisum* L. a 30°C e 80 bar e 7,94% a 30°C e 100 bar.

Calame e Steiner, citados por Rodrigues (*et al* 2003) obtiveram, também por extração supercrítica, óleo essencial da *Pimpinella anisum* L. a 75 bar e 40°C com rendimento de 9,7%.

2.4 Análise Cromatográfica

Quando se trata do estudo de óleos essenciais, geralmente a técnica mais utilizada para a análise qualitativa é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (BANDONI, 2008).

A cromatografia gasosa é uma técnica de análise, onde substâncias voláteis podem ser separadas. A eluição é a técnica utilizada, onde uma corrente de gás (fase móvel) é injetada continuamente através da coluna. A amostra é vaporizada e introduzida na corrente de gás, passando também pela fase estacionária (BRAGA; COLLINS, 1988).

A cromatografia gasosa consiste em mecanismos de partição dos componentes da amostra entre a fase fixa (líquido não volátil) e a fase móvel (gás) (BRAGA; COLLINS, 1988).

Após a separação, os componentes eluídos são identificados e quantificados por um detector. Segundo Harris (2001), o detector geralmente não fornece identificação, apenas aponta que os componentes foram separados.

Os equipamentos que realizam identificação são o espectrômetro de massa e o espectrômetro por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Um pico pode ser identificado pela comparação de seu espectro de massa e índice de retenção com uma biblioteca de espectros (HARRIS, 2001).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica, na qual átomos ou moléculas são ionizados (em geral, positivamente) e separados de acordo com suas massas (BARKER, 1999).

A amostra eluída do cromatógrafo passa dentro do espectrômetro de massa, que registra o espectro de massa de todos os íons, identificados com um pico no cromatograma (HARRIS, 2001).

2.5 Ação Antimicrobiana

Os óleos essenciais possuem ação antimicrobiana, conforme citado anteriormente, pois protegem a planta de fungos e bactérias. Os óleos essenciais agem danificando a membrana celular das bactérias, causando desequilíbrio iônico e de pH no interior da célula (WOLFFENBÜTTEL, 2011).

O interesse no uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos é atribuído, basicamente, a duas razões: a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada, havendo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas (ISMAIEL; PIERSON, 1990).

Abu Darwish *et al* (2012) investigaram a ação do óleo essencial da *Pimpinella anisum* L. e foi verificada a eficiência do mesmo contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Al-Baiaty *et al* (2008) verificaram a eficiência do óleo contra *Staphylococcus aureus*. Trajano *et al* (2009) constataram que o óleo essencial foi eficaz contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3 METODOLOGIA

3.1 Extração Supercrítica

A semente de erva doce para realização dos experimentos foi adquirida no Mercado Público de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. A preparação da planta consistiu na moagem da mesma e posterior análise granulométrica, para que em todas as extrações as sementes tivessem o mesmo diâmetro médio (1,1 mm). Foram utilizadas 150 g de semente em cada extração.

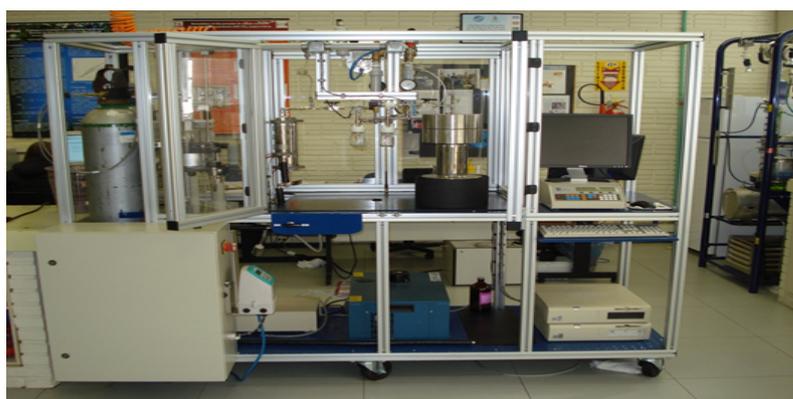
As extrações do óleo essencial da semente de erva doce foram realizadas na unidade piloto de extração supercrítica do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) (Figura 2).

Apoiado nos estudos de Rodrigues (*et al* 2003), citados anteriormente, os experimentos foram feitos nas seguintes condições de temperatura e pressão: 35°C/80 bar, 35°C/90 bar, 35°C/100 bar, 40°C/80 bar, 40°C/90 bar, 40°C/100 bar, 50°C/80 bar, 50°C/90 bar e 50°C/100 bar. A vazão de CO₂ utilizada foi de 650 g/h.

O dióxido de carbono é armazenado em dois cilindros e flui pela tubulação. Para que seja feita a passagem do CO₂ do estado líquido para o estado supercrítico, este é pressurizado através de uma bomba de alta pressão (Maximator[®] G35) e aquecido em um pré-aquecedor.

O fluido supercrítico passa pelo vaso extrator, que contém as sementes de erva-doce, solubilizando o soluto. A mistura resultante que deixa o vaso é expandida através de uma válvula micrométrica (Hoke[®]-Micromite[®] 1600). Na expansão, o CO₂ passa para o estado gasoso, seguindo em direção ao sensor de medição de vazão mássica Siemens[®]Sitrans F C Mossflo[®] Mass 6000. O óleo passa para o estado líquido, sendo coletado em um vaso de separação.

Figura 2 – Unidade piloto de extração supercrítica.



Fonte: <http://www.feng.pucrs.br/laboratorios/lope/fotos/fotos.php>.

3.2 Análise por Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas (análise CG/MS)

Os nove extratos do óleo essencial da erva doce foram analisados por um cromatógrafo gasoso, da marca Agilent Technologies modelo 7890A CG system, acoplado a um espectrômetro de massa, marca Agilent Technologies modelo 5975C VL MSD, operando em 70eV.

A programação de temperatura do forno é dividida em quatro etapas: a primeira começa em 60°C e é mantida por 8 minutos. Após, a temperatura é aumentada para 180°C, durante 1 minuto, a uma taxa de 3°C/min. Na terceira etapa, a temperatura é aumentada para 250°C, durante 10 minutos, a uma taxa de 20°C/min.

Foi utilizado o gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do injetor de 250°C, volume de injeção 0,2 µL, no modo *split*, razão de *split* 1:55. A faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u.m.

Os compostos foram identificados através da comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007).

3.3 Modelagem Matemática

A seleção do modelo matemático apropriado para descrever o processo de extração supercrítica depende da distribuição inicial do soluto no interior do substrato sólido. Esta distribuição se dá de diferentes formas: as substâncias de interesse podem estar livres na superfície do material sólido, adsorvidas na superfície exterior, situadas dentro dos poros ou uniformemente distribuídas dentro das células vegetais (REVERCHON, 1997).

Três abordagens têm sido propostas para a modelagem matemática da extração supercrítica de óleos essenciais: equações empíricas, equações com base em modelos de analogia com a transferência de calor e modelos baseados no balanço diferencial da transferência de massa.

O modelo matemático utilizado neste trabalho foi proposto por Sovová (1994).

O modelo de Sovová (1994) descreve o processo em que o solvente flui em

direção axial com velocidade U , em um extrator cilíndrico de leito fixo. O leito é considerado homogêneo em relação ao tamanho das partículas e à distribuição inicial de soluto. O soluto é protegido pela parede das células, no entanto, parte das paredes é quebrada e aberta pelo processo de moagem, deixando uma parcela da massa do soluto livre e exposto ao solvente (P). A massa de soluto contida inicialmente na fase sólida (O) é a soma da massa de soluto facilmente acessível (P) com a massa de soluto inacessível no interior das partículas da fase sólida (K).

$$O = P + K \quad (1)$$

O balanço material para o processo é representado pelas equações 2 e 3, associadas às fases sólida e líquida, respectivamente.

$$\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (2)$$

$$\rho\varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (3)$$

onde h é a distância axial ao longo do leito, ε é a porosidade, ρ_s é a concentração de fase sólida, x é a fração do óleo na fase sólida, ρ é a concentração do fluido, y é a fração de óleo no fluido e J é o fluxo de óleo extraído.

Para facilitar a resolução do sistema de equações, o termo de acúmulo associado ao balanço na fase fluida, o primeiro termo da equação 3, é negligenciado, resultando em:

$$\rho U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (4)$$

Para o cálculo da taxa de transferência de massa, considera-se que o soluto facilmente acessível é extraído primeiro. Quando a concentração na fase sólida diminui para x_k , a transferência de massa passa a ser controlada pela difusão na fase sólida.

A taxa de transferência de massa é representada pelas seguintes equações, para as fases fluida e sólida, respectivamente:

$$J(x > x_k, y) = k_f a_o \rho (y_r - y) \quad (5)$$

$$J(x \leq x_k, y) = k_s a_o \rho_s \left(1 - \frac{y}{y_r}\right) \quad (6)$$

A solução analítica das equações diferenciais foi realizada por Sovová (1994) e apresentada para três períodos de extração, em termos da massa de extrato relativa à massa de sólido sem contabilizar a massa de soluto (N).

Sovová considera três períodos distintos durante a extração: o primeiro está relacionado com a parte inicial e linear da curva, no qual o óleo extraído é de fácil acesso, a partir das células abertas pela moagem ($q < q_m$). O segundo período é relativo à faixa de transição, onde o óleo pode estar sendo extraído tanto das células abertas como das células fechadas ($q_m \leq q < q_n$) dependendo da região do leito considerada. No último período, apenas o óleo de difícil acesso, proveniente das células fechadas, está sendo extraído ($q \geq q_n$).

$$e = \begin{cases} q y_r [1 - \exp(-Z)] & q < q_m \\ y_r [q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q < q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \{1 + [\exp(W x_0 / y_r) - 1] \exp[W(q_m - q)] x_k / x_0\} & q \geq q_n \end{cases} \quad (7)$$

onde,

$$q_m = \frac{(x_0 - x_k)}{y_r Z} \quad (8)$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(W x_0 / y_r)}{x_0} \quad (9)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_r}{W x_0} \ln \frac{x_0 \exp[W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad (10)$$

onde q é a quantidade específica de CO₂ gato até um determinado tempo de extração, relativa à N, e x_0 é a concentração inicial de soluto na fase sólida.

Os parâmetros Z e W são diretamente proporcionais aos coeficientes de transferência de massa das fases fluida e sólida (k_f e k_s), respectivamente, e

inversamente proporcionais à vazão mássica de solvente (\dot{q}) relativa à N.

Z é o parâmetro relacionado ao período rápido de extração e W está relacionado ao período lento.

$$Z = \frac{k_f a_o \rho}{[\dot{q}(1 - \varepsilon)\rho_s]} \quad (11)$$

$$W = \frac{k_s a_o}{[\dot{q}(1 - \varepsilon)]} \quad (12)$$

onde y_r é a solubilidade e a_o é a área específica.

3.4 Análise Antimicrobiana: Método da Bioautografia

O método da bioautografia (VALGAS, 2002) é um teste qualitativo que permite identificar a ação antimicrobiana de extratos frente à microorganismos. Neste trabalho, o óleo essencial da *Pimpinella anisum* L. foi testado frente à bactéria *Micrococcus luteus*, cujo controle é recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O método da bioautografia pode ser separado em três etapas: preparação da amostra e dos inóculos, cromatografia em camada delgada e a bioautografia propriamente dita.

Na etapa de preparação da amostra, os extratos foram diluídos numa proporção de 10mg para 10 mL de hexano e aplicados em placa cromatográfica sílica gel GF₂₅₄. O solvente foi eliminado por evaporação. Cada uma das placas de CCD (cromatografia de camada delgada) recebeu nove aplicações de 1,5µL de óleo essencial.

Para a preparação do inóculo, foi utilizado o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton. Para cada 100 mL de meio de cultura foi inoculado 1 mL da suspensão de microorganismo.

A última etapa consiste no método da bioautografia, no qual uma camada do meio de cultura inoculado com o microorganismo foi adicionado a placas de Petri. Em seguida, as placas cromatográficas contendo os extratos foram imersas nas placas e cobertas com outra camada do meio de cultura inoculado. As placas foram incubadas em estufa durante 24 horas na temperatura de 37 °C. Após, uma solução de violeta INT

(*p-iodonitrotetrazoliumviolet*) foi adicionada para melhor visualização dos halos de inibição (FALCÃO, 2012), que são os indicadores de ação antimicrobiana.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Modelagem Matemática

Conforme mencionado anteriormente, foi utilizado o modelo de Sovová (1994) para descrever o fenômeno da transferência de massa associado ao processo de extração supercrítica do óleo essencial da erva-doce.

Alguns parâmetros de entrada foram necessários para utilização do modelo: a vazão de CO₂ (Q_{CO_2}), a porosidade (ε), a densidade da partícula de erva-doce (ρ_s), a densidade do solvente em cada condição operacional (ρ_{CO_2}), o diâmetro médio da partícula ($\overline{D_p}$) e a área específica (a_0).

A vazão de CO₂ foi mantida constante em todas as extrações e o seu valor foi obtido diretamente do equipamento extrator; a porosidade foi calculada através da relação entre o volume do leito de extração e o volume das sementes de erva-doce; as densidades do solvente foram calculadas através da equação de Peng-Robinson, o diâmetro médio da partícula foi calculado pelo método da média Sauter utilizando os dados da análise granulométrica realizada e a área específica foi estimada dividindo-se 6 pelo diâmetro médio da partícula. Estes dados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de entrada do modelo de Sovová (1994).

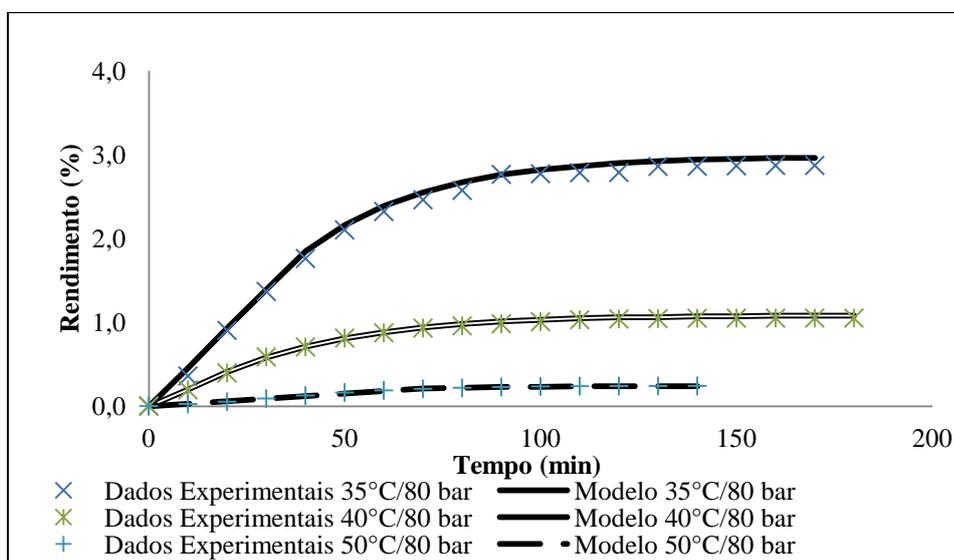
Q_{CO_2} (g/s)	0,181
ε	0,473
ρ_s (g/cm ³)	0,950
\overline{D}_p (m)	0,00114
a_0 (m ⁻¹)	5263,158
$\rho_{CO_2}^1$ (g/cm ³)	0,3979
$\rho_{CO_2}^2$ (g/cm ³)	0,2827
$\rho_{CO_2}^3$ (g/cm ³)	0,224
$\rho_{CO_2}^4$ (g/cm ³)	0,588
$\rho_{CO_2}^5$ (g/cm ³)	0,442
$\rho_{CO_2}^6$ (g/cm ³)	0,288
$\rho_{CO_2}^7$ (g/cm ³)	0,650
$\rho_{CO_2}^8$ (g/cm ³)	0,561
$\rho_{CO_2}^9$ (g/cm ³)	0,372

1)35°C/80 bar; 2) 40°C/80 bar; 3) 50°C/80 bar 4) 35°C/90 bar 5) 40°C/90 bar 6) 50°C/90 bar 7) 35°C/100 bar 8) 40°C/100 bar 9) 50°C/100 bar.

A seguir serão apresentadas as curvas de extração obtidas em cada condição de extração, bem como o modelo gerado. Os gráficos estão agrupados em famílias de pressões.

Pode-se observar na Figura 3 que a condição a 35°C/80 bar resultou no melhor rendimento experimental entre todas as extrações realizadas. Nessa mesma condição, a curva apresenta exatamente o comportamento descrito por Sovová (1994), em que a parte inicial da curva é linear, passando por uma faixa de transição até estabilizar em um determinado valor.

Figura 3 – Dados experimentais vs simulado nas condições a pressão de 80 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C.



Na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros estimados para as condições anteriores. Os parâmetros x_k , Z , W e y_r foram gerados para o modelo de Sovová (1994), utilizando a técnica numérica que minimiza o quadrado da diferença entre os valores experimentais e calculados pelo modelo. Os coeficientes de transferência de massa da fase sólida e fluida foram calculados a partir destes parâmetros. Observa-se que nessas condições o parâmetro x_k (fração mássica de soluto de difícil acesso em base livre de soluto) apresentou os menores valores. Isto ocorreu porque a maior parte do soluto foi extraída pelas duas fases anteriores.

Tabela 2 - Parâmetros estimados e coeficientes de transferência de massa para a pressão de 80 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C.

80 bar						
	x_k	Z	W	y_r	$k_f(m/s)$	$k_s(m/s)$
35°C	0,011	0,195	0,450	0,035	$5,61 \times 10^{-8}$	$5,44 \times 10^{-8}$
40°C	0,00879	0,368	0,460	0,00867	$1,49 \times 10^{-7}$	$5,56 \times 10^{-8}$
50°C	0,000354	0,412	0,248	0,00123	$2,11 \times 10^{-7}$	$2,99 \times 10^{-8}$

Na Figura 4 estão expostos os resultados obtidos experimentalmente na condição de 90 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C, bem como a simulação realizada. Observa-se que neste caso as curvas não seguem rigorosamente o comportamento descrito por Sovová (1994) no que diz respeito ao período de transição. Isto ocorre porque esta fase é muito pequena em relação às outras duas.

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros calculados para estas condições.

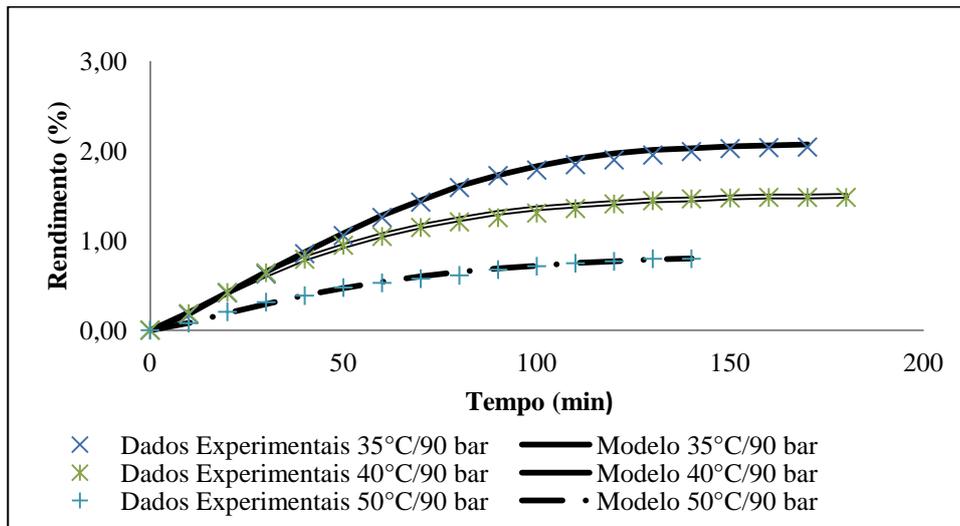


Figura 4 – Dados experimentais vs simulado nas condições a pressão de 90 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C.

Tabela 3 - Parâmetros estimados e coeficientes de transferência de massa para a pressão de 90 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C.

90 bar						
	x_k	Z	W	y_r	$k_f(m/s)$	$k_s(m/s)$
35°C	0,0209	0,00288	0,573	0,00337	$5,64 \times 10^{-10}$	$6,93 \times 10^{-8}$
40°C	0,0137	0,724	0,393	0,00506	$1,88 \times 10^{-7}$	$4,75 \times 10^{-8}$
50°C	0,00764	0,637	0,397	0,00219	$2,54 \times 10^{-7}$	$4,80 \times 10^{-8}$

A seguir, estão apresentadas as curvas geradas para as condições a 100 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C (Figura 5) e os parâmetros calculados para as condições mencionadas (Tabela 4).

De maneira geral, as extrações a 50°C resultaram nos menores rendimentos nas três pressões realizadas. Isto pode ser associado à baixa densidade do CO₂ a esta temperatura. Analogamente, as curvas a 35°C apresentaram melhor rendimento em todas as extrações, visto que nessa temperatura a densidade do CO₂ é maior, o que aumenta a sua capacidade de carregar o soluto.

Figura 5 – Dados experimentais vs simulado nas condições a pressão de 100 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C.

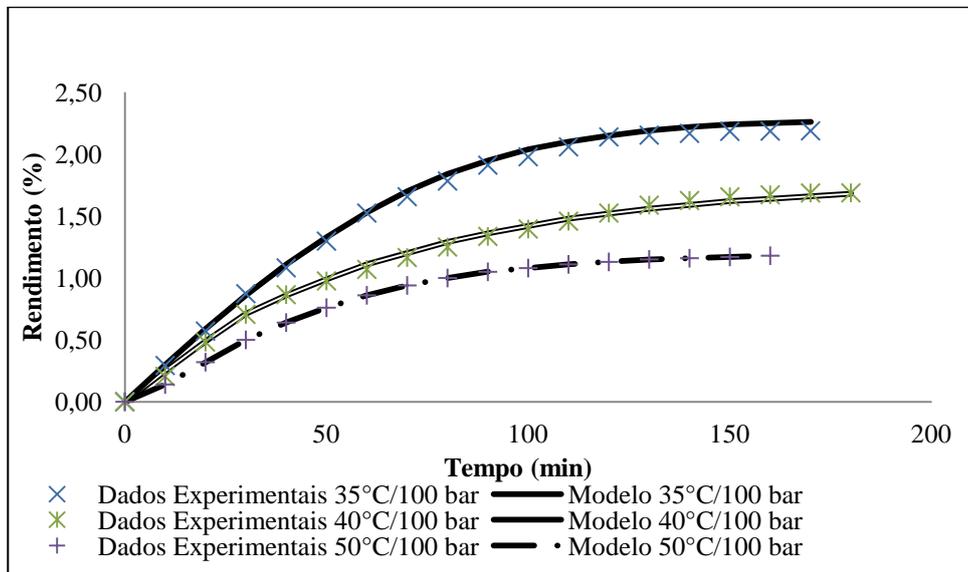


Tabela 4 - Parâmetros estimados e coeficientes de transferência de massa para a pressão de 100 bar e temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C.

100 bar						
	x_k	Z	W	y_r	k_f(m/s)	k_s(m/s)
35°C	0,0228	0,3501	0,475	0,00456	6,18x10 ⁻⁸	5,74x10 ⁻⁸
40°C	0,0109	0,534	0,236	0,00806	1,09x10 ⁻⁷	2,85x10 ⁻⁸
50°C	0,0104	0,384	0,390	0,00585	1,18x10 ⁻⁷	4,71x10 ⁻⁸

Na Tabela 5 estão apresentados os coeficientes de determinação (R²) para cada condição de extração. Os valores mostram a alta capacidade de representação dos dados experimentais pelo modelo proposto.

Tabela 5 – Coeficientes de Determinação (R²).

	80 bar	90 bar	100 bar
35°C	0,9989	0,9995	0,9995
40°C	0,9993	0,9985	0,9977
50°C	0,9964	0,9972	0,9987

4.2 Análise por Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas (análise CG/MS)

A partir da análise cromatográfica do óleo essencial obtido em cada condição de operação, foi possível identificar os componentes que o constituem. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. Pode-se observar que em todas as extrações o composto majoritário é o anetol, componente de interesse do óleo essencial da erva-doce, seguido pelo E-2-methylbutirato.

Observa-se que em 50°C obteve-se o maior teor de anetol em todas as extrações. Ainda nesta temperatura, cinco compostos presentes nos demais extratos não foram encontrados. É possível que a alta temperatura tenha degradado estes compostos.

Em geral, a condição de operação em 100 bar foi a que apresentou menor teor de anetol.

Tabela 6 – Análise cromatográfica do óleo essencial da erva doce na pressão de 80 bar e temperaturas de 35, 40 e 50°C.

Composto ^a	IR ^b	80 bar	80 bar	80 bar
		35°C	40°C	50°C
		Área ^c (%)		
Methyl-chavicol	1197	1,37	1,32	1,57
p-Anisaldehyde	1254	3,39	3,10	3,23
E-Anethol	1290	78,42	77,69	87,43
g-Himalachene	1478	3,59	3,75	3,48
Germacrene D	1481	0,49	0,51	-
a-Curcumene	1484	0,53	0,54	-
a-Zingiberene	1496	0,70	0,77	-
b-Himalachene	1501	-	-	-
b-Bisabolene	1510	0,54	0,62	-
E-2-Methylbutirate	1850	6,31	6,57	2,87
Epoxy-pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	1899	3,69	4,08	1,41
Total Identificado		99,03	98,95	100,00

^a = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007).

^bIR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos.

^c% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

Tabela 7 – Análise cromatográfica do óleo essencial da erva doce na pressão de 90 bar e temperaturas de 35, 40 e 50°C.

Composto ^a	IR ^b	90 bar	90 bar	90 bar
		35°C	40°C	50°C
		Área ^c (%)		
Methyl-chavicol	1197	1,32	1,19	1,25
p-Anisaldehyde	1254	3,60	3,63	3,27
E-Anethol	1290	76,03	80,44	84,20
g-Himalachene	1478	3,57	3,38	3,21
Germacrene D	1481	0,45	-	-
a-Curcumene	1484	0,52	-	-
a-Zingiberene	1496	0,57	0,68	-
b-Himalachene	1501	-	-	-
b-Bisabolene	1510	0,60	-	-
E-2-Methylbutirate	1850	6,39	6,30	5,13
Epoxy-pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	1899	3,78	3,54	2,95
Total Identificado		96,84	99,16	100,00

^a = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007).

^bIR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos.

^c% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

Tabela 8 - Análise cromatográfica do óleo essencial da erva doce na pressão de 100 bar e temperaturas de 35, 40 e 50°C.

Composto ^a	IR ^b	100 bar	100 bar	100 bar
		35°C	40°C	50°C
		Área ^c (%)		
Methyl-chavicol	1197	1,22	1,27	1,20
p-Anisaldehyde	1254	3,48	3,99	3,44
E-Anethol	1290	78,56	73,56	81,02
g-Himalachene	1478	3,64	3,51	3,36
Germacrene D	1481	-	0,45	-
a-Curcumene	1484	0,52	0,51	-
a-Zingiberene	1496	0,57	0,63	0,58
b-Himalachene	1501	-	0,21	-
b-Bisabolene	1510	0,64	0,82	-
E-2-Methylbutirate	1850	6,54	6,64	6,23
Epoxy-pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	1899	3,79	3,93	3,63
Total Identificado		99,05	95,53	99,47

^a = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007).

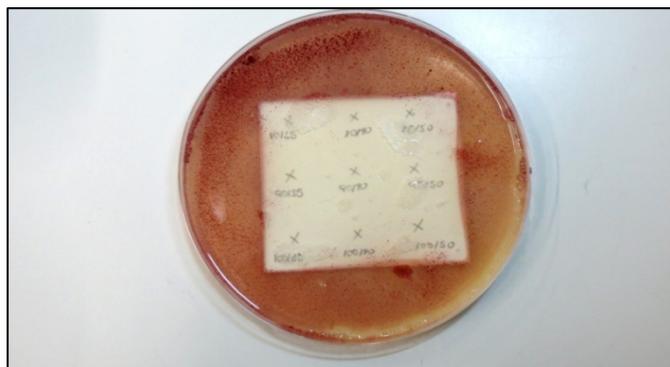
^bIR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos.

^c% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

4.3 Análise Antimicrobiana

Tomando como base a recomendação da ANVISA, citada anteriormente, foram realizados testes a fim de investigar a ação do óleo essencial da *Pimpinella anisum* L. frente à bactéria *Micrococcus luteus*. Verificou-se que o óleo foi eficaz, gerando halo de inibição (Figura 6).

Figura 6 - Placas cromatográficas com indicador p-INT. Halo de inibição em todos os pontos de aplicação do óleo essencial.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram realizadas extrações por solvente supercrítico utilizando a semente de *Pimpinella anisum* L. como matriz e seu óleo essencial foi obtido. O modelo matemático escolhido representa adequadamente os dados experimentais.

O óleo extraído em cada condição operacional foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A análise resultou coerente com os dados encontrados na literatura, sendo o anetol o constituinte majoritário em todas as condições estudadas. A maior concentração deste composto (87,43%) foi atingida pela condição a 80 bar e 50°C e a menor, a 100 bar e 40°C (73,56%).

Foi comprovada a ação antimicrobiana do óleo essencial frente a bactéria *Micrococcus luteus*.

Sugere-se pesquisas a fim de investigar mais detalhadamente a ação antimicrobiana do óleo essencial, através da identificação dos compostos responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano. Ainda, pode-se investigar a ação do óleo essencial contra fungos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao professor Dr. Rubem Vargas, pela idéia deste trabalho e pelas incontáveis ajudas prestadas por ele.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Rubem Reis, pela atenção e disponibilidade em me orientar.

Agradeço em especial a quatro integrantes do LOPE que cederam seu tempo e sua paciência para me ajudar e que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho: Me. Rodrigo Scopel, pela cedência do *software* por ele construído, essencial para obter os parâmetros do modelo matemático e pelas explicações acerca de como usar o *software*; Me. Manuel Falcão e Mestranda Ana Luísa Fianco, pela realização dos ensaios antimicrobianos e explicações por eles dadas; e Rafael Nolibos, pela realização das extrações e outros auxílios por ele prestados.

REFERÊNCIAS

- ABU DARWISH, M., AL-RAMAMNEH, E., KARPIUK, U., KYSLYCHENKO, U., The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region--South of Jordan, **Pakistan journal of pharmaceutical sciences [1011-601X]**, 2012. Vol:25, pg:239. Disponível em: <<http://go.galegroup.com.ez94.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?id=GALE%7CA293351258&v=2.1&u=capes58&it=r&p=AONE&sw=w>>. Acesso em: 27 Maio 2013.
- AL-BAIATY, F., Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, **Journal of Ethnopharmacology**, 2008. Pg 403–406. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.jep.2007.12.003>>. Acesso em: 27 Maio 2013.
- ANVISA, Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988.
- BANDONI, A. L. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008.
- BARKER, J. **Mass Spectrometry**. John Wiley & Sons, 1999.
- BRAGA, G. L. e COLLINS, C. H.; **Introdução a métodos cromatográficos**, 3. ed., Campinas: Unicamp, 1988.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation**. Ed. Steinkopff Darmstadt Springer New York, 1994.

CASSEL, E.; VARGAS, R.; BRUN, G. **Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapéuticos**. Processos de extração supercrítica aplicados a produtos naturais. Porto Alegre, 2008, 2ª Edição.

FALCÃO, M. A. **Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial do capim limão e suas frações para produtos de higiene corporal**, Programa de Pós Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, 2012.

FREIRE, R. S.; MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E.; PINHEIRO, D.S. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds, **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 13, (2005) 4353–4358. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.bmc.2005.03.058>>. Acesso em: 03 Abr. 2013.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., 2001. p. 556-557, 579.

ISMAIEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of Growth and Germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by Essential Oil of Spices. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, 1990. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03598.x>>. Acesso em: 14 jun. 2013.

MAUL, A.; WASICKY, R. e BACCHI, E., Extração por fluido supercrítico, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S0102-695X1996000200006>>. Acesso em: 04 Abr. 2013

MEIRELES, M.; ZAHEDI, G.; HATAMI, T., Mathematical modeling of supercritical fluid extraction for obtaining extracts from vetiver root, **Journal of Supercritical Fluids** 49 (2009) 23. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.supflu.2008.12.009>>. Acesso em: 03 Abr. 2013.

ÖZEL, Abdulhabip. Anise (*Pimpinella anisum*): Changes in yields and component composition on harvesting at different stages of plant maturity, **Expl Agric.** (2008), volume 45, pp. 117–126. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S0014479708006959>>. Acesso em: 14 jun. 2013.

PEREIRA, M. A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica**, Programa de Pós

Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, 2010.

PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications: Industrial Developments and Economic Issues, **Industrial Engineering Chemistry Research**, 2000, 39, 4531-4535. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1021/ie000211c>>. Acesso em: 03 Abr. 2013.

REVERCHON, E.; Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, **Journal of Supercritical Fluids**, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0896-8446\(97\)00014-4](http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0896-8446(97)00014-4)>. Acesso em: 03 Abr. 2013.

RODRIGUES, V., ROSA, P., MARQUES, M., PETENATE, A., MEIRELES, A. Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L.) using CO₂: Solubility, kinetics, and composition data, **Journal of Agricultural and food chemistry**, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1021/jf0257493>>. Acesso em: 27 Maio 2013.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy**, Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 1999. 551p.

SIMÕES, C. M. O., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1999. 821 p.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-I. Modelling of extraction curves, **Chemical Engineering Science**, v. 49, p. 409-414, 1994. Disponível em: <[http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0009-2509\(94\)87012-8](http://dx.doi.org.ez94.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0009-2509(94)87012-8)>. Acesso em: 27 Mar. 2013.

TAYLOR, L. T., **Supercritical Fluid Extraction**, Wiley-Interscience publication, 1996.181 p.

TRAJANO, V., LIMA, E., SOUZA, E., TRAVASSOS, A., Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2009. Pg. 542-545. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300014>>. Acesso em: 27 Maio 2013.

VALGAS, C. **Avaliação de método de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. (Dissertação de mestrado em Farmácia. Faculdade de Farmácia). Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2002. 103p.

WOLFFENBÜTTEL, A. N.. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2010. pg. 1-2.