



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química (FEQ)

BRUNO GUZZO DA SILVA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi:
tecnologias convencionais e com CO₂ supercrítico; influência da secagem sobre a qualidade
da matéria-prima; e atividade antiproliferativa em células tumorais humanas

CAMPINAS

2017

BRUNO GUZZO DA SILVA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi:
tecnologias convencionais e com CO₂ supercrítico; influência da secagem sobre a qualidade
da matéria-prima; e atividade antiproliferativa em células tumorais humanas

*Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de Doutor em Engenharia Química*

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Frattini Fileti
Coorientadora: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
BRUNO GUZZO DA SILVA, E ORIENTADO
PELA PROFA. DRA. ANA MARIA FRATTINI
FILETI

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140318/2013-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Si38e Silva, Bruno Guzzo da, 1988-
Extração de compostos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi :
tecnologias convencionais e com CO2 supercrítico; influência da secagem
sobre a qualidade da matéria-prima; e atividade antiproliferativa em células
tumoriais humanas / Bruno Guzzo da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Ana Maria Frattini Fileti.
Coorientador: Mary Ann Foglio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Extração supercrítica. 2. Secagem. I. Fileti, Ana Maria Frattini, 1965-. II.
Foglio, Mary Ann, 1960-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Extraction of compounds from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits : conventional technologies and supercritical carbon dioxide extraction; effects of drying on raw material quality; and antiproliferative activity in human tumor cell lines

Palavras-chave em inglês:

Supercritical extraction

Drying

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ana Maria Frattini Fileti [Orientador]

Maria do Carmo Ferreira

Cristiana Maria Pedroso Yoshida

Julian Martinez

Patricia Fazzio Martins Martinez

Data de defesa: 13-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Bruno Guzzo da Silva e aprovada em 13 de Março de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Ana Maria Frattini Fileti - FEQ/UNICAMP - Orientadora

Profa. Dra. Maria do Carmo Ferreira - DEQ/UFSCar

Profa. Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida - ICAQF/UNIFESP

Prof. Dr. Julian Martinez - FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Patricia Fazzio Martins Martinez - FEQ/UNICAMP

A Ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros da comissão examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

*A meus sobrinhos (Paulo, Pedro, Isabeli e
Miguel) e a todas as crianças,
Futuro do nosso país!*

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão:

A Deus, pela proteção, pela saúde e pelo equilíbrio;

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de aprendizado;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

A meus pais (Rosangela e Manoel) e demais familiares, pelo apoio, amor, pela compreensão e credibilidade;

À minha querida orientadora Profa. Dra. Ana Maria Frattini Fileti, pela amizade, pelo apoio, pela confiança e pelos valores passados nesses anos de convivência e aprendizado, desde o mestrado;

À minha coorientadora Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pela amizade e pelas valiosas sugestões na tese;

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa, pela confiança e pelas contribuições ao longo deste trabalho, com sugestões sempre tão pertinentes;

À pesquisadora Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz e aos seus orientados, pelo apoio e pela contribuição nos testes de atividade antiproliferativa;

Ao Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto, pelas contribuições na parte experimental deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Luz Lisbôa, pela amizade desde o mestrado;

À querida Ilza, pelos ensinamentos compartilhados, pela amizade e paciência;

Aos pesquisadores, funcionários e colegas do CPQBA/UNICAMP, em especial, à Natalia Niizu, Núbia, Adriana, Fabi, Letícia e Fabiana Nonato;

Aos pesquisadores, funcionários e colegas do IQ/UNICAMP, em especial, à Ana, ao Marcus e à Júlia;

Aos pesquisadores, funcionários e colegas da FEQ/UNICAMP, em especial, aos amigos do LESQ;

Ao Prof. Dr. Julian Martinez e à Profa. Dra. Patrícia Fazzio Martins Martinez, pelas contribuições e sugestões na qualificação deste trabalho;

Aos queridos amigos, pelos momentos de descontração, em especial, à Dayana de Gusmão (Day) e ao João Victor.

A todos, muito obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a extração de compostos bioativos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, espécie vegetal nativa do Brasil e que apresenta diversas atividades biológicas de interesse medicinal. Além disso, os frutos desidratados da *S. terebinthifolius* são amplamente utilizados como especiaria culinária, conhecida como pimenta-rosa. A ênfase do estudo foi: na avaliação dos efeitos das variáveis operacionais da hidrodestilação (Clevenger) e da extração com CO₂ supercrítico sobre a qualidade dos produtos; na análise da influência da secagem sobre a qualidade da matéria-prima, sendo investigados modelos matemáticos, clássicos e por Redes Neurais Artificiais (RNAs), para a previsão da cinética de secagem; e também na análise das atividades antiproliferativas dos extratos e do óleo essencial frente a um painel de células tumorais humanas [glioma (U251), mama (MCF7), ovário com fenótipo de resistência (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460), rim (786-0), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT29) e leucemia (K562)]. De forma geral, os resultados revelaram que o rendimento e a composição química dos extratos e do óleo essencial foram influenciados pelos seguintes fatores: condições climáticas do local de coleta dos frutos; etapas de pré-tratamento da matéria-prima (secagem); e tipo de processo e condições operacionais utilizados nas extrações. Portanto, estes resultados confirmam a importância da padronização de insumos e também do controle correto das condições operacionais dos processos extrativos utilizados para a obtenção de um produto derivado de uma espécie vegetal. Na extração do óleo essencial por hidrodestilação, foram observadas condições ótimas (rendimento maior que 6,8%) utilizando valores de razão sólido/água na faixa de 70 a 130 g/L e tempo de extração entre 4,5 e 8 h. A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) revelou os seguintes compostos majoritários no óleo essencial: δ -3-careno, α -felandreno, limoneno, α -pineno, germacreno D e cariofileno. Quanto à secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, os resultados revelaram que temperaturas na faixa de 40 a 55 °C asseguraram uma umidade adequada ao produto (<10%), sem degradação da cor e perdas de compostos voláteis. Os resultados da modelagem da cinética de secagem revelaram melhor desempenho dos modelos de Henderson e Pabis, de Page, de Henderson (Dois termos) e do modelo via RNAs. Na extração com CO₂ supercrítico, os resultados revelaram que o rendimento global e a composição química dos extratos foram influenciados pela pressão e temperatura do CO₂ supercrítico, principalmente devido às alterações na massa específica do CO₂ supercrítico e na pressão de vapor dos solutos presentes na matéria-prima. Para a definição das condições ótimas da extração supercrítica é necessário conhecer a finalidade para a qual os extratos serão utilizados. Por exemplo, se o objetivo for obter um produto com alto teor de compostos voláteis (como o óleo essencial), deverá-se utilizar os menores valores de massa específica do CO₂ supercrítico. Apesar do menor rendimento nessas condições operacionais, os produtos requerem processos de purificação menos laboriosos, sendo uma vantagem quando comparados aos extratos supercríticos obtidos em altas pressões. Quanto à atividade antiproliferativa, os resultados revelaram atividade potente contra câncer de rim em quase todos os produtos derivados dos frutos da *S. terebinthifolius*: óleo essencial obtido nas condições de maiores rendimentos [*Total Growth Inhibition* (TGI)=0,04 µg/mL]; e extratos supercríticos obtidos na faixa de 50 a 60 °C, independente da pressão utilizada (TGI<3,9 µg/mL). Ademais, é importante ressaltar que o extrato supercrítico (200 bar e 50 °C) apresentou atividades potentes para ovário com resistência (TGI=1,2 µg/mL), próstata (TGI=4 µg/mL), ovário (TGI=4,4 µg/mL) e glioma (TGI=3,9 µg/mL); e também que o óleo essencial apresentou atividades potentes para todas as linhagens investigadas. Portanto, os resultados sugerem que os compostos voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius*, especialmente os sesquiterpenos germacreno D e cariofileno, estão envolvidos com as atividades antiproliferativas destacadas anteriormente.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius* Raddi. Pimenta-rosa. Hidrodestilação. Extração supercrítica. Secagem. Voláteis. Atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

EXTRACTION OF COMPOUNDS FROM *Schinus terebinthifolius* Raddi FRUITS:

Conventional technologies and supercritical carbon dioxide extraction; effects of drying on raw material quality; and antiproliferative activity in human tumor cell lines

Schinus terebinthifolius Raddi is an important fruit tree native to Brazil. Owing to its medicinal properties, it has a great potential for commercial use. Moreover, the dried fruits of *S. terebinthifolius* are widely used as a culinary spice known as pink pepper. The extraction of bioactive compounds from *S. terebinthifolius* fruits is reported herein. Emphasis was placed on elucidating the effects of operational conditions of hydrodistillation by Clevenger apparatus, extraction with supercritical CO₂ (scCO₂), and drying of raw material. Classical models and topologies of artificial neural networks (ANNs) for predicting the drying kinetics of *S. terebinthifolius* fruits were investigated. Furthermore, the antiproliferative activity of its products (essential oil and extracts) was investigated against a panel of human tumor cell lines [glioma (U251), breast (MCF7), multidrug-resistant ovarian (NCI-ADR/RES), lung (NCI-H460), kidney (786-0), prostate (PC-3), ovarian (OVCAR-3), colon (HT29), and leukemia (K562)]. The results showed that the quantity and quality of products from *S. terebinthifolius* fruits were influenced by the following factors: climatic conditions of the collection site, drying conditions of raw material, and types of extraction processes and their operating conditions. Therefore, these results show the importance of standardizing raw material and controlling operating conditions of the extraction processes employed to obtain a product from a plant species. The optimum conditions for hydrodistillation (yield > 6.8%) included a solid-to-water ratio of 70 to 130 g/L and an extraction time of 4.5 to 8 h. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) revealed the following major compounds in the essential oil of *S. terebinthifolius* fruits: δ -3-carene, α -phellandrene, limonene, α -pinene, germacrene D, and caryophyllene. The drying of *S. terebinthifolius* fruits at an air temperature ranging from 40 to 55 °C provided the best results: adequate moisture (<10%) without dramatic degradation of color and essential oil. The modeling by ANNs and the models of Page, Henderson and Pabis, and Henderson (Two terms) showed the most suitable results. The global yield and chemical composition of the supercritical extracts were influenced by the pressure and temperature of scCO₂, mainly due to changes in its density and solute vapor pressure. The definition of the optimal operating conditions for supercritical extraction depends on the targeted application of the extracts. Accordingly, if the objective is to obtain a product with a high content of volatile compounds (such as essential oils), a relatively low scCO₂ density should be used; despite the lower yields, the extracts require relatively less laborious purification processes, showing an advantage over the supercritical extraction performed at a relatively higher scCO₂ density. Regarding antiproliferative activity, our results revealed potent activity against kidney cancer in all products from *S. terebinthifolius* fruits: essential oil obtained under optimized conditions [Total Growth Inhibition (TGI)=0.04 μ g/mL] and supercritical extracts obtained at a temperature range of 50 to 60 °C, irrespective of the pressure used (TGI < 3.9 μ g/mL). Furthermore, the following antiproliferative activities were highlighted: supercritical extract obtained at 200 bar and 50 °C showed potent activity against multidrug-resistant ovarian (TGI=1.2 μ g/mL), prostate (TGI=4 μ g/mL), ovarian (TGI=4.4 μ g/mL) cancer cell lines and glioma (TGI=3.9 μ g/mL) cell line; and the essential oil obtained under optimized conditions showed potent activity for all cell lines investigated. These results suggest that the volatile compounds extracted from *S. terebinthifolius* fruits, especially the sesquiterpenes (caryophyllene and germacrene D), might be the active metabolites responsible for the above-mentioned antiproliferative activities.

Keywords: *Schinus terebinthifolius* Raddi. Pink pepper. Hydrodistillation. Supercritical extraction. Drying. Volatile compounds. Antiproliferative activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 2.1 – Aspectos morfológicos da *S. terebinthifolius*: (A) aspecto geral da árvore; (B) casca do caule; (C) folhas; (D) inflorescência; (E) frutos29

Figura 2.2 – Frutos maduros de *S. terebinthifolius*29

CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi POR HIDRODESTILAÇÃO

Figura 3.1 – Localização do local de coleta dos frutos da *S. terebinthifolius* em Aracruz-ES45

Figura 3.2 – Amostras dos frutos da *S. terebinthifolius* (Lote A): a) bruta; b) classificada46

Figura 3.3 – Exsicata da espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* Raddi var. *rhoifolius* (Mart.) Engl. (Herbário UEC, número 188116)47

Figura 3.4 – Desenho esquemático do sistema de extração de óleo essencial com o aparelho de Clevenger48

Figura 3.5 – Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no ensaio de atividade antiproliferativa54

Figura 3.6 – Crescimento celular em função da concentração da amostra testada56

Figura 3.7 – Perfil cromatográfico por CCD do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* (ensaio de 1 a 11, nas condições operacionais da Tabela 3.2)57

Figura 3.8 – Cromatograma (CG-EM) e estrutura química dos monoterpenos majoritários do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* obtido nas condições operacionais do ponto central do planejamento experimental (ensaio 9 da Tabela 3.2)59

Figura 3.9 – Espectro de massas para: (a) δ -3-careno; (b) proposto pela espectroteca NIST 0559

Figura 3.10 – Diagramas de Pareto para as respostas: a) rendimento em base seca; b) teor de δ -3-careno no óleo essencial61

Figura 3.11 – Respostas do processo de hidrodestilação em função das condições operacionais de extração: a) rendimento em base seca, desvio padrão de 0,2%; b) teor de monoterpenos (área relativa), desvio padrão de 2%.63

Figura 3.12 – Variação do teor de δ -3-careno (área relativa), desvio padrão de 0,7%, em função de diferentes períodos de extração utilizados na hidrodestilação64

Figura 3.13 – Variação do rendimento da extração (desvio padrão de 0,2%) ao longo do tempo, para uma razão sólido/água de 97,4 g/L.....	65
Figura 3.14 – Variação na composição química do óleo essencial ao longo do tempo de extração: a) Perfil por CCD; b) Variação no teor de monoterpenos e sesquiterpenos por CG-EM (área relativa e desvio padrão de 2%).....	66
Figura 3.15 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para o rendimento da extração, em base seca, em função da razão sólido/água e do tempo de extração	70
Figura 3.16 – Crescimento celular de cada linhagem celular, após 48 horas de exposição, em função de diferentes concentrações de óleo essencial dos frutos da <i>S. terebinthifolius</i>	71

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA SECAGEM SOBRE PARÂMETROS QUALITATIVOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

Figura 4.1 – Diagrama esquemático do secador de bandeja.....	79
Figura 4.2 – Topologias de RNAs utilizadas para a modelagem da cinética de secagem... ..	85
Figura 4.3 – Amostras <i>in natura</i> de frutos da <i>S. terebinthifolius</i> que foram classificadas: a) Lote A; b) Lote B	87
Figura 4.4 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações do óleo essencial dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> do Lote A (frutos <i>in natura</i>) após 48 horas de exposição	90
Figura 4.5 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações do óleo essencial dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> do Lote B (frutos <i>in natura</i>) após 48 horas de exposição	91
Figura 4.6 – Diagrama de Pareto: a) conteúdo de umidade final em base seca (M_e); b) tempo final de secagem (t_e)	93
Figura 4.7 – Resultados experimentais para os ensaios de 1 a 4 (Tabela 4.2): a) cinética de secagem; b) taxas de secagem (DR)	94
Figura 4.8 – Resultados experimentais para os ensaios de 5 a 11 (Tabela 4.2): a) cinética de secagem; b) taxas de secagem (DR)	94
Figura 4.9 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para o conteúdo de umidade em base úmida (M^*) em função da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u)	97
Figura 4.10 – Parâmetros adimensionais (em relação aos frutos <i>in natura</i>) em função do conteúdo de umidade em base seca	99

Figura 4.11 – Diagramas de Pareto para os parâmetros de cor do sistema CIELAB: a) L^* ; b) a^* ; c) b^*	101
Figura 4.12 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para a diferença total de cor (ΔE) em função da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u)	102
Figura 4.13 – Amostras de frutos de <i>S. terebinthifolius</i> : a) mercado; b) produto deste trabalho (55 °C)	103
Figura 4.14 – Diagramas de Pareto: a) rendimento de óleo essencial; b) teor de monoterpenos	105
Figura 4.15 – Valor relativo, em relação aos frutos <i>in natura</i> , para cada ensaio de secagem (ensaio de 1 a 11 nas condições operacionais da Tabela 4.2)	106
Figura 4.16 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para o teor de monoterpenos (MC) no óleo essencial em função da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u)	108
Figura 4.17 – Diagrama de Pareto para a difusividade efetiva.....	110
Figura 4.18 – Ajuste dos modelos clássicos aos dados experimentais do Ensaio 3 ($T=40,9$ °C e $u=0,81$ m/s).....	111
Figura 4.19 – Ajuste dos modelos clássicos aos dados experimentais do ensaio 4 ($T=69,1$ °C e $u=0,81$ m/s).....	112
Figura 4.20 – Ajuste dos modelos clássicos aos dados experimentais do ensaio 11 ($T=55$ °C e $u=0,6$ m/s).....	112
Figura 4.21 – Ajuste do modelo neural da topologia A aos dados experimentais de verificação (ensaio 3, 4 e 11).....	114
Figura 4.22 – Ajuste do modelo neural da topologia B aos dados experimentais de verificação (ensaio 3, 4 e 11).....	115
Figura 4.23 – Ajuste do modelo neural da topologia C aos dados experimentais de verificação (ensaio 3, 4 e 11).....	115
Figura 4.24 – Ajuste do modelo neural da topologia D aos dados experimentais de verificação (ensaio 3, 4 e 11).....	116
Figura 4.25 – Dados experimentais (verificação) <i>versus</i> dados preditos pelo modelo neural (topologia C).....	117
Figura 4.26 – Ajuste do modelo de Henderson e Pabis e da RNA (topologia C) aos dados do ensaio 3	118

CAPÍTULO 5 - EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO

Figura 5.1 – Diagrama esquemático do sistema de extração com fluido supercrítico	125
Figura 5.2 – Diagrama esquemático do sistema de extração tipo Soxhlet	128
Figura 5.3 – Cinética de secagem dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> (Lote A) em estufa à 40 °C	130
Figura 5.4 – Amostras dos frutos da <i>S. terebinthifolius</i> (Lote A): a) antes da secagem; b) e após a secagem	131
Figura 5.5 – Faixas de diâmetro de partícula (f_i) presentes na amostra utilizada na extração supercrítica.....	133
Figura 5.6 – Cinética da extração supercrítica para as condições operacionais de 100 bar e 60°C	135
Figura 5.7 – Amostras de extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7, nas condições operacionais da Tabela 5.2), óleo essencial (OE), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE) dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i>	136
Figura 5.8 – Perfil cromatográfico por CCD das amostras de extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7, nas condições operacionais da Tabela 5.2), óleo essencial (OE), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE)	137
Figura 5.9 – Cromatograma (CG-EM) da fração volátil do extrato supercrítico obtido nas condições operacionais de 50 °C e 200 bar (ensaio 7 da Tabela 5.2)	139
Figura 5.10 – Curva analítica para o padrão de δ -3-careno.....	140
Figura 5.11 – Diagramas de Pareto para as respostas: a) rendimento global; b) teor mássico de δ -3-careno	142
Figura 5.12 – Efeitos da massa específica do CO ₂ supercrítico sobre as respostas do processo: a) rendimento global; b) teor mássico de δ -3-careno	143
Figura 5.13 – Efeitos da pressão do CO ₂ supercrítico sobre as respostas do processo: a) rendimento global; b) teor mássico de δ -3-careno	146
Figura 5.14 – Cinética da extração supercrítica para os ensaios de 1 a 7 (massa de extrato função da massa de CO ₂).....	147
Figura 5.15 – Cinética da extração supercrítica para os ensaios de 1 a 7 (rendimento em função do tempo de extração).....	147
Figura 5.16 – Cinética da extração supercrítica para os ensaios de 1 a 7 (rendimento em função da razão entre a massa de CO ₂ e a massa seca da matéria-prima, S/F)	148

Figura 5.17 – Cinética da extração, com CO ₂ supercrítico, para os frutos da <i>S. terebinthifolius</i> : a) 100 bar e 55 °C; b) 80 bar e 35 °C	150
Figura 5.18 – Cinética de extração com CO ₂ supercrítico (50 °C, 300 bar e vazão de 4,0×10 ⁻⁵ kg/s) para o alecrim-do-campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	150
Figura 5.19 – Variação na composição química (CG-EM) ao longo do tempo de extração para o ensaio 3 (100 bar e 60 °C: a) variação de terpenos (área relativa); b) variação no teor mássico de δ -3-careno	152
Figura 5.20 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de doxorrubicina após 48 horas de exposição	155
Figura 5.21 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 1 (100 bar e 40 °C) após 48 horas de exposição	156
Figura 5.22 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 2 (300 bar e 40 °C) após 48 horas de exposição	157
Figura 5.23 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 3 (100 bar e 60 °C) após 48 horas de exposição	158
Figura 5.24 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 4 (300 bar e 60 °C) após 48 horas de exposição	159
Figura 5.25 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 5 (200 bar e 50 °C) após 48 horas de exposição	160
Figura 5.26 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato diclorometânico (ED) após 48 horas de exposição	161
Figura 5.27 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato etanólico (EE) após 48 horas de exposição	162

APÊNDICE A – Curvas de calibração

Figura A1 – Curva de calibração para a placa de orifício do secador de bandeja.....	176
Figura A2 – Curva de calibração para o termopar do sistema de controle do secador de bandeja.	176

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 2.1 – Alguns modelos clássicos para a modelagem da cinética de secagem.....38

CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi POR HIDRODESTILAÇÃO

Tabela 3.1 – Níveis das variáveis independentes da hidrodestilação49

Tabela 3.2 – Planejamento experimental para a hidrodestilação.....50

Tabela 3.3 – Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação53

Tabela 3.4 – Composição química do óleo essencial (CG-EM) dos frutos da *S. terebinthifolius* para cada ensaio do planejamento experimental (ensaio de 1 a 11, nas condições operacionais da Tabela 3.2)58

Tabela 3.5 – Condições operacionais da hidrodestilação, rendimento da extração e teor de terpenos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*60

Tabela 3.6 – Variação na composição química (CG-EM) ao longo do tempo de extração para a hidrodestilação realizada em uma razão sólido/água de 97,4 g/L67

Tabela 3.7 – ANOVA do modelo preditivo para o rendimento da extração (Equação 3.6)69

Tabela 3.8 – ANOVA do modelo preditivo para o teor de δ -3-careno (Equação 3.7).....69

Tabela 3.9 – Concentração efetiva TGI ($\mu\text{g/mL}$) para cada amostra frente às linhagens testadas72

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA SECAGEM SOBRE PARÂMETROS QUALITATIVOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

Tabela 4.1 – Parâmetros adimensionais para o cálculo da vazão mássica de ar80

Tabela 4.2 – Planejamento experimental para o estudo da secagem em camada delgada ..
.....82

Tabela 4.3 – Caracterização física dos frutos in natura de *S. terebinthifolius* (Lotes A e B)
.....88

Tabela 4.4 – Análise colorimétrica (sistema CIELAB) dos frutos <i>in natura</i> de <i>S. terebinthifolius</i> (Lotes A e B).....	88
Tabela 4.5 – Concentração efetiva TGI ($\mu\text{g/mL}$) para cada amostra (Lotes A e B) frente às linhagens testadas	90
Tabela 4.6 – Condições operacionais e respostas do processo de secagem	92
Tabela 4.7 – ANOVA para o modelo preditivo para o conteúdo de umidade (Equação 4.19)	96
Tabela 4.8 – Parâmetros físicos dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> (Lote B).....	98
Tabela 4.9 – Análise colorimétrica (sistema CIELAB) dos frutos da <i>S. terebinthifolius</i> (secos sob as condições operacionais da Tabela 4.2)	100
Tabela 4.10 – ANOVA para o modelo preditivo para a diferença de cor total (Equação 4.20)	102
Tabela 4.11 – Composição química (CG-EM) e rendimento do óleo essencial dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> (Lote B), <i>in natura</i> e secos nas condições operacionais da Tabela 4.2.....	104
Tabela 4.12 – ANOVA para o modelo preditivo para o teor de monoterpenos (Equação 4.22)	107
Tabela 4.13 – Parâmetros ajustáveis para todos os modelos clássicos de secagem	109
Tabela 4.14 – Critérios de validação para os modelos clássicos de secagem	110
Tabela 4.15 – Resultados dos treinamentos das RNAs e da simulação com os dados de verificação	113

CAPÍTULO 5 - EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO

Tabela 5.1 – Níveis das variáveis da extração supercrítica utilizados no planejamento fatorial	127
Tabela 5.2 – Planejamento fatorial completo para a extração supercrítica	127
Tabela 5.3 – Especificações das faixas de diâmetro médio da partícula e distribuição granulométrica obtida a partir do peneiramento de amostras representativas da matéria-prima utilizada na extração supercrítica	132
Tabela 5.4 – Caracterização física do leito de extração supercrítica.....	134

Tabela 5.5 – Composição química (CG-EM) da fração volátil dos extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7), óleo essencial (OE) e extrato diclorometânico (ED).....	138
Tabela 5.6 – Condições operacionais da extração supercrítica, rendimento global e teor mássico de δ -3-careno nos extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7), óleo essencial (OE), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE).....	141
Tabela 5.7 – ANOVA do modelo preditivo para o rendimento global (Equação 5.6).....	145
Tabela 5.8 – ANOVA do modelo preditivo para o teor de δ -3-careno (Equação 5.7).....	145
Tabela 5.9 – Concentração efetiva TGI ($\mu\text{g/mL}$) para extratos supercríticos (ensaios de 1 a 5, nas condições operacionais indicadas na Tabela 5.2), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE) frente às linhagens investigadas	153

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Parâmetro ajustável do modelo de Henderson e Pabis	[-]
A_1	Área da tubulação do secador	[L ²]
a_1	Parâmetro ajustável do modelo de Henderson (Dois termos)	[-]
A_2	Área do orifício da placa de orifício do secador	[L ²]
A_3	Área da seção transversal do vaso de secagem	[L ²]
b	Parâmetro ajustável do modelo de Henderson (Dois termos)	[-]
C	Absorbância do controle de célula	[-]
c	Número de carbonos do alcano imediatamente anterior ao composto i	[-]
$\%C$	Crescimento celular	[-]
D_{ef}	Difusividade efetiva	[L ² T ⁻¹]
d_i	Abertura nominal da i -ésima peneira, pela qual a partícula ficou retida	[L]
D_i	Diâmetro médio das partículas retidas na i -ésima peneira	[L]
d_{i-1}	Abertura nominal de uma peneira maior que a i -ésima peneira	[L]
d_{mg}	Diâmetro médio geométrico da partícula	[L]
d_{pS}	Diâmetro médio de Sauter	[L]
\bar{d}_i	Diâmetro médio das partículas retidas na i -ésima peneira	[L]
DR	Taxa de secagem	[T ⁻¹]
e_i	Erro de ajuste do modelo	
F_{cal}	Distribuição de Fischer calculada	[-]
F_{tab}	Distribuição de Fischer tabelada	[-]
GI_{50}	Concentração para inibir 50% do crescimento celular	[ML ⁻³]
IR_i	Índice de retenção linear do composto i	[-]
K	Constante de secagem	[T ⁻¹]
K_1	Parâmetro ajustável do modelo de Page	[T ⁻¹]
K_2	Parâmetro ajustável do modelo de Henderson (Dois termos)	[T ⁻¹]
K_3	Parâmetro ajustável do modelo de Henderson (Dois termos)	[T ⁻¹]
K_o	Parâmetro ajustável do modelo de Henderson e Pabis	[T ⁻¹]
l	Número de experimentos realizados	[-]
L^*, a^*, b^*	Coordenadas do sistema CIELAB	[-]
LC_{50}	Concentração para que ocorra 50% de morte celular	[ML ⁻³]
M^*	Conteúdo de umidade em base úmida	[-]

m	Número de termos da série (modelo de difusão)	[-]
M	Conteúdo de umidade em base seca	[-]
m_l	Coefficiente adimensional para o cálculo da vazão mássica de ar	[-]
m_{ar}	Massa do ar de secagem	[M]
MC	Teor de monoterpenos	[-]
m_E	Massa de extrato	[M]
M_e	Conteúdo de umidade de equilíbrio em base seca	[-]
m_i	Massa do material retido na i-ésima peneira	[M]
m_l	Massa do leito de partículas	[M]
m_{leito}	Massa seca de matéria-prima utilizada durante a secagem	[M]
m_o	Massa de óleo essencial	[M]
M_o	Conteúdo de umidade inicial em base seca	[-]
m_p	Massa da partícula	[M]
MR	Umidade adimensional	[-]
m_{ss}	Massa seca do sólido	[M]
m_{su}	Massa úmida do sólido	[M]
N	Número de pontos experimentais	[-]
n	Parâmetro ajustável do modelo de Page	[-]
P	Pressão barométrica local	[ML ⁻¹ T ⁻²]
P_l	Pressão estática na linha de ar de secagem	[ML ⁻¹ T ⁻²]
ϕ_p	Esfericidade da partícula	[-]
$p\text{-valor}$	Probabilidade de significância (nível descritivo do teste)	[-]
Q	Vazão mássica do ar de secagem	[MT ⁻¹]
R	Coefficiente de correlação	[-]
R_1, R_2	Constantes do modelo para o cálculo da vazão mássica de ar	[-]
R^2	Coefficiente de determinação	[-]
RM	Razão entre a massa de ar e massa seca de matéria-prima	[-]
$RMSE$	Raiz do erro quadrático médio	
r_p	Raio da partícula	[L]
S	Desvio padrão	
S/F	Razão entre a massa de solvente e a massa seca da matéria-prima	[-]
T	Temperatura	[θ]
t	Tempo	[T]
T_0	Absorbância das células no dia da adição das amostras	[-]

t_e	Tempo final de secagem	[T]
TGI	Concentração para inibir 100% do crescimento celular	[ML ⁻³]
T_i	Média da absorbância da amostra analisada	[-]
$t_{R,c}$	Tempo de retenção do alcano imediatamente anterior a $t_{R,i}$	[T]
$t_{R,c+1}$	Tempo de retenção do alcano imediatamente posterior a $t_{R,i}$	[T]
$t_{R,i}$	Tempo de retenção do composto i	[T]
u	Velocidade do ar de secagem no leito	[LT ⁻¹]
UR	Umidade relativa do ar de secagem	[-]
V_{FF}	Valor medido a partir dos frutos <i>in natura</i>	
V_l	Volume do leito de partículas	[L ³]
V_p	Volume total da partícula	[L ³]
VR	Valor relativo da variável V	[-]
W_{1000}	Peso de 1000 frutos	[M]
x	Soma das entradas dos neurônios ocultos	[-]
x_1	Razão sólido/água codificada	[-]
x_2	Tempo de extração codificado	[-]
x_i	Fração mássica do material retido na i-ésima peneira	[-]
X_i	Variável real	
$X_{i,máximo}$	Maior valor real da variável	
$X_{i,mínimo}$	Menor valor real da variável	
X_o	Rendimento global de extrato em base seca	[-]
y_1	Pressão codificada do fluido supercrítico	[-]
y_2	Temperatura codificada do fluido supercrítico	[-]
y_i	Valor medido de uma variável para o cálculo do desvio padrão	
\bar{y}	Média dos valores medidos para o cálculo do desvio padrão	
Y_o	Rendimento de óleo essencial em base seca	[-]
Y_t	Resposta do processo	
z_i	Variável codificada	[-]

Símbolos gregos

Δh	Queda de pressão na placa de orifício do secador	[ML ⁻¹ T ⁻²]
α	Coefficiente adimensional para o cálculo da vazão mássica de ar	[-]
β	Coefficiente adimensional para o cálculo da vazão mássica de ar	[-]
β_0	Coefficiente de interceptação do modelo codificado	
β_1, β_2	Coefficientes lineares do modelo codificado	
β_{11}, β_{22}	Coefficientes quadráticos do modelo codificado	
β_{12}	Coefficiente de interação do modelo codificado	
γ	Fator de compressibilidade	[-]
ΔE	Diferença de cor total	[-]
ε	Porosidade do leito de extração supercrítica	[-]
ε_b	Porosidade <i>bulk</i> do leito	[-]
ρ	Massa específica do ar de secagem	[ML ⁻³]
ρ_{bulk}	Massa específica do leito de partículas (ou <i>bulk</i>)	[ML ⁻³]
ρ_l	Massa específica do leito de extração com fluido supercrítico	[ML ⁻³]
ρ_p	Massa específica aparente da partícula	[ML ⁻³]
ρ_r	Massa específica real da partícula	[ML ⁻³]

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	25
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.2 OBJETIVOS.....	26
1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO	27
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
2.1 A <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	28
2.2 APLICAÇÕES DOS FRUTOS DA <i>S. terebinthifolius</i>	30
2.3 COMPOSTOS DOS FRUTOS DA <i>S. terebinthifolius</i>	32
2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DA <i>S. terebinthifolius</i>	33
2.5 SECAGEM	35
2.6 MODELAGEM DA CINÉTICA DE SECAGEM	37
2.6.1 Cinética de secagem por modelos clássicos	38
2.6.2 Redes Neurais Artificiais	40
2.7 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	41
3 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi POR HIDRODESTILAÇÃO: efeitos das variáveis operacionais; condições ótimas; e atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> em células tumorais humanas	43
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.2.1 MATÉRIA-PRIMA	45
3.2.2 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	47
3.2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A HIDRODESTILAÇÃO.....	49
3.2.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	51
3.2.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	52
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
3.3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	57
3.3.2 EFEITOS DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA HIDRODESTILAÇÃO	60
3.3.3 CINÉTICA DA HIDRODESTILAÇÃO	64
3.3.4 OTIMIZAÇÃO DA HIDRODESTILAÇÃO	68
3.3.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL	71

3.4 CONCLUSÕES.....	73
---------------------	----

4 INFLUÊNCIA DA SECAGEM SOBRE PARÂMETROS QUALITATIVOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi: efeitos sobre compostos voláteis e produção de pimenta-rosa; e modelagem da cinética de secagem

4.1 INTRODUÇÃO	74
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
4.2.1 MATÉRIA-PRIMA	75
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	75
4.2.2.1 Conteúdo de umidade.....	76
4.2.2.2 Diâmetro médio dos frutos	77
4.2.2.3 Massa específica e porosidade	77
4.2.2.4 Análise colorimétrica.....	78
4.2.3 SECADOR	79
4.2.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	81
4.2.5 MODELAGEM DA CINÉTICA DE SECAGEM	83
4.2.5.1 Cinética de secagem por modelos clássicos	83
4.2.5.2 Modelagem por Redes Neurais Artificiais	84
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	87
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	87
4.3.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	89
4.3.3 EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM.....	92
4.3.3.1 Efeitos sobre o conteúdo de umidade.....	92
4.3.3.2 Efeitos sobre a integridade dos frutos	97
4.3.3.3 Efeitos sobre a coloração.....	99
4.3.3.4 Efeitos sobre compostos voláteis	103
4.3.4 MODELOS CLÁSSICOS DE SECAGEM.....	109
4.3.5 MODELOS POR REDES NEURAS ARTIFICIAIS.....	113
4.4 CONCLUSÕES.....	119

5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO: efeitos das condições operacionais sobre rendimento global, compostos voláteis, cinética de extração e atividade antiproliferativa em células tumorais humanas.....

121

5.1 INTRODUÇÃO	121
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	122
5.2.1 MATÉRIA-PRIMA	122
5.2.1.1 Granulometria	123
5.2.1.2 Massa específica e Porosidade	124
5.2.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	124
5.2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	127
5.2.4 EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS	128
5.2.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	129
5.2.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	130
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	130
5.3.1 MATÉRIA-PRIMA	130
5.3.2 ENSAIOS PRELIMINARES	134
5.3.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS	135
5.3.4 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS OPERACIONAIS	141
5.3.5 CINÉTICA DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	146
5.3.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS	152
5.4 CONCLUSÕES	162
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	164
6.1 CONCLUSÕES	164
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	166
REFERÊNCIAS	167
APÊNDICE A – Curvas de calibração	176
APÊNDICE B – Programa de treinamento e verificação das RNAs no software MATLAB®	177

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma das maiores biodiversidades do mundo, e isso o credencia como uma fonte próspera de compostos bioativos de interesse comercial. Entre as diversas espécies vegetais nativas do Brasil, a *Schinus terebinthifolius* Raddi (família *Anacardiaceae*) se destaca por apresentar um grande potencial para exploração e uso comercial em função de suas propriedades medicinais, cosméticas e alimentícias. Todas as partes da *S. terebinthifolius* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias. Além disso, os frutos desidratados são amplamente utilizados como especiaria culinária, conhecida como pimenta-rosa, um dos condimentos mais sofisticados da culinária internacional (LORENZI; MATOS, 2002; CARVALHO, M. et al., 2013; CARVALHO, R. et al., 2015).

Vários estudos investigaram as atividades biológicas de compostos obtidos a partir dos frutos da *S. terebinthifolius*, destacando-se as suas atividades alelopática (BARBOSA et al., 2007), antioxidante (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004), larvicida e inseticida (SILVA, A. et al., 2010; KWEKA et al., 2011), cicatrizante (GONÇALVES, 2012), antifúngica (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013) e antimicrobiana (COLE et al., 2014). Embora esses estudos mostrem que os frutos da *S. terebinthifolius* são uma fonte promissora de compostos bioativos, poucos trabalhos investigaram sua atividade anticâncer (BENDAOUD et al., 2010; LIVIA, 2013). A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico para o tratamento de câncer tem sido um importante caminho para a descoberta de drogas menos tóxicas, mais seletivas e eficazes, sendo que a *S. terebinthifolius* figura como fonte potencial de metabólitos ativos para o tratamento de alguns tipos de câncer (SALVI JÚNIOR, 2013).

Diversos estudos realizaram a extração de compostos dos frutos da *S. terebinthifolius*. Técnicas de extração como hidrodestilação (COLE et al., 2014), Soxhlet (JAIN et al., 1995), maceração dinâmica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004) e extração por arraste a vapor (SARTORELLI et al., 2012) foram as mais investigadas, sendo que pouca atenção foi dada à análise das condições operacionais desses processos extrativos. Apesar da simplicidade dos processos convencionais de extração, essas tecnologias apresentam uma série de desvantagens, por exemplo: na hidrodestilação, o uso de temperaturas elevadas pode degradar compostos termolábeis do óleo essencial; e na extração em sistema Soxhlet e maceração dinâmica, o uso de solventes orgânicos pode contaminar o extrato e o meio

ambiente com substâncias tóxicas. Por isso, como processo alternativo figura a extração com fluido supercrítico, sendo que, na literatura, poucos trabalhos investigaram a extração de compostos dos frutos da *S. terebinthifolius* utilizando a tecnologia supercrítica (LIVIA, 2013; ANDRADE, 2015).

A aplicação da tecnologia supercrítica é bastante vantajosa, pois permite, por exemplo: a utilização de solventes com pouca agressividade ao meio ambiente, como o dióxido de carbono (gás não inflamável, inerte e de toxicidade reduzida); e a obtenção de produtos de alta qualidade e funcionalidade, pois é possível a preservação de compostos termolábeis em função do uso de temperaturas amenas durante a extração. Outra vantagem observada é a facilidade na separação do solvente do produto final e também a alta seletividade, pois, ao modificar a massa específica do fluido supercrítico, manipula-se o seu poder de solvatação e, assim, diferentes produtos são obtidos (BRUNNER, 1994; RIZVI, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Na extração supercrítica, a secagem da matéria-prima é uma etapa de pré-tratamento fundamental para o processo, pois o alto conteúdo de umidade reduz o contato da matriz sólida com o fluido supercrítico e atua como uma barreira para a difusão do fluido, assim, reduzindo os rendimentos da extração (SAHENA et al., 2009). Além de sua aplicação como pré-tratamento, a secagem é uma etapa indispensável no processamento da pimenta-rosa, produzida a partir do beneficiamento dos frutos da *S. terebinthifolius*. Os frutos são secos para inibir o crescimento microbiano e a ação enzimática, dessa forma, evitando a deterioração do produto. Entretanto, caso a secagem não seja realizada de forma adequada, alguns efeitos desfavoráveis sobre a matéria-prima são observados, como perdas de compostos voláteis e degradação de pigmentos do produto (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; FIGIEL et al., 2010; KARAM et al., 2016). É válido mencionar que, na literatura, não foram encontrados trabalhos que tenham investigado a influência das condições da secagem sobre a qualidade dos frutos da *S. terebinthifolius* (cor, integridade, compostos voláteis, etc.).

1.2 OBJETIVOS

Em consonância com o exposto anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar a extração de compostos bioativos dos frutos da *S. terebinthifolius*, com isso, visando à sua utilização como recurso terapêutico para o tratamento de alguns tipos de câncer.

Para alcançar este objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- a) avaliar os efeitos das condições operacionais da hidrodestilação, em aparelho Clevenger, sobre a qualidade e quantidade do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*;
- b) investigar a atividade antiproliferativa do óleo essencial frente a um painel de linhagens de células tumorais humanas;
- c) avaliar a influência das condições operacionais da secagem, em camada delgada, sobre a qualidade dos frutos da *S. terebinthifolius* (integridade, cor, conteúdo de umidade e compostos voláteis);
- d) determinar as cinéticas de secagem em diferentes temperaturas e velocidades do ar de secagem;
- e) verificar o ajuste de modelos matemáticos, clássicos e por Redes Neurais Artificiais, para a previsão da cinética de secagem;
- f) investigar a extração supercrítica de compostos dos frutos de *S. terebinthifolius*, utilizando CO₂ supercrítico como solvente, com ênfase nos efeitos das condições operacionais da extração sobre rendimento global, compostos voláteis, cinética de extração e atividade antiproliferativa frente a um painel de linhagens de células tumorais humanas.

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em cinco capítulos, além deste, referente às “Considerações Iniciais”. No **Capítulo 2**, apresenta-se a revisão da literatura desenvolvida sobre o tema estudado, abordando conceitos sobre a matéria-prima (frutos de *S. terebinthifolius*) e detalhando as principais características dos processos e ferramentas matemáticas utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho. No **Capítulo 3**, descreve-se a extração de óleo essencial realizada, sendo definidas as condições ótimas para a hidrodestilação, e, também, investigada a atividade antiproliferativa do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* sobre células tumorais humanas. No **Capítulo 4**, explana-se acerca da influência da secagem sobre parâmetros qualitativos dos frutos de *S. terebinthifolius*, sendo investigados modelos matemáticos para a previsão da cinética de secagem. No **Capítulo 5**, expõe-se a extração supercrítica de compostos, utilizando CO₂ supercrítico como solvente, em que foram analisados os efeitos das variáveis operacionais da extração, bem como a atividade antiproliferativa dos extratos obtidos. As conclusões deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros são colocadas no **Capítulo 6**. Em seguida, elencam-se as **Referências** e os **Apêndices**.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, apresenta-se a revisão da literatura sobre o tema estudado, abordando os principais aspectos da *S. terebinthifolius* e detalhando as principais características dos processos de extração sólido-fluido e de secagem em camada delgada, que foram as principais operações unitárias utilizadas durante o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são colocados aspectos importantes do planejamento fatorial de experimentos e das Redes Neurais Artificiais (RNAs), que foram as principais ferramentas matemáticas utilizadas neste trabalho.

2.1 A *Schinus terebinthifolius* Raddi

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, do Paraguai e da Argentina, que não tem qualquer parentesco com a família das pimentas. Na verdade, ela pertence à família *Anacardiaceae*, sendo parente do caju, da manga e do cajá-mirim (LORENZI; MATOS, 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004). No Brasil, a *S. terebinthifolius* é encontrada em grande parte do seu território, do nordeste ao sul do país, sendo encontrada desde a planície costeira até altitudes de pouco mais de mil metros. As matas ciliares e terras úmidas são os ambientes propícios para o seu estabelecimento e desenvolvimento. Popularmente, a *S. terebinthifolius* é conhecida por diversos nomes, tais como aroeira-vermelha, pimenta-rosa, aroeirinha, aroeira, aroeira-mansa, aroeira-da-praia, araguaraiá, corneiba, fruto-de-sabiá, entre outros (BAGGIO, 1988; GOMES et al., 2005).

A espécie foi introduzida em diversos países para fins ornamentais devido principalmente ao seu aspecto (Figura 2.1), sendo uma árvore de pequeno a médio porte, com folhas verdes e perenes e tronco tortuoso com casca grossa e fissurada. Além disso, é muito recomendada para recuperação de áreas degradadas em virtude da sua característica de pioneirismo (MEDEIROS; ZANON, 1998; LORENZI, 2000).

Figura 2.1 – Aspectos morfológicos da *S. terebinthifolius*: (A) aspecto geral da árvore; (B) casca do caule; (C) folhas; (D) inflorescência; (E) frutos



Fonte: Adaptado de Salvi Júnior (2013, p. 15).

Essa árvore possui como frutificação cachos com frutos do tipo drupa, de formato esférico (com cerca de 5 mm de diâmetro) e de coloração variando do rosa ao vermelho, apresentando uma aparência lustrosa, conforme observado na Figura 2.2. Quando frescos e bem-conservados, os frutos apresentam uma película fina e delicada, de textura quebradiça, e que se transforma em uma espécie de “concha de papel” que envolve a semente. A semente é única, marrom-escura e mede cerca de 3 mm de diâmetro, sendo que possui sabor levemente adocicado e de pouca ardência. O período de frutificação acontece de janeiro a julho, dependendo da região de produção (LORENZI, 2000; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004).

Figura 2.2 – Frutos maduros de *S. terebinthifolius*



2.2 APLICAÇÕES DOS FRUTOS DA *S. terebinthifolius*

Apesar de ser uma espécie de pouco cultivo agrícola no Brasil, a *S. terebinthifolius* apresenta grande potencial para exploração e uso comercial por apresentar diversas atividades biológicas de interesse medicinal e também da indústria de cosméticos. A espécie foi incluída na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, em 1929, sendo que todas as suas partes (caule, folhas, flores e frutos) são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias (CARVALHO, M. et al., 2013). Na culinária são utilizados principalmente os frutos desidratados (pimenta-rosa), que são adocicados e aromáticos. A pimenta-rosa é considerada um condimento alimentar sofisticado por acrescentar sabores refinados aos pratos da culinária internacional, sendo que sua demanda vem aumentando tanto no mercado nacional quanto no internacional. No Brasil, o estado do Espírito Santo tem sido o maior exportador da pimenta-rosa. Normalmente, os frutos são coletados de forma manual em árvores nativas da região, o que propicia uma alternativa de renda às famílias de coletores (GOMES et al., 2005; CARVALHO, R. et al., 2015; INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - INCAPER, 2016)

A produção da pimenta-rosa, conquanto seja simples, atende a requisitos rígidos de qualidade impostos pelo mercado externo. A aparência do produto precisa ser bonita (vermelho brilhante) e os frutos não podem estar quebrados. No processo de beneficiamento da pimenta-rosa, primeiramente, os frutos *in natura* da *S. terebinthifolius* passam por um processo de pré-limpeza (retirada de ramos, folhas, materiais estranhos, etc.), seguido por uma lavagem com água potável em peneiras circulares. Os frutos classificados seguem, então, para a etapa de secagem. Na empresa AgroRosa Importação e Exportação LTDA, uma das maiores produtoras de pimenta-rosa do Brasil, localizada na cidade de São Mateus-ES, a secagem é realizada em secadores do tipo tambor rotativo. Entretanto secadores de bandejas também são utilizados em indústrias de menor produção. Após a etapa de secagem, os frutos secos passam por uma rigorosa etapa de classificação (manual ou mecanizada), em que apenas os frutos vermelhos e inteiros são selecionados para venda. Desse modo, grande parte dos frutos é descartada (por inadequação de forma, cor, maturação, etc.), gerando uma quantidade expressiva de resíduo sólido que pode ser utilizado como matéria-prima para extração de óleos essenciais (GOMES et al., 2005; LAURIANO et al., 2005; NICOLINI; PUGET; MAZZA, 2009; CARVALHO, R. et al., 2015).

Além do uso condimentar, a literatura apresenta diversos estudos que investigaram as atividades biológicas de extratos e de óleo essencial obtidos a partir dos frutos da *S. terebinthifolius*, tais como a atividade antioxidante de seus extratos aquosos e alcoólicos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004); a atividade alelopática de seu óleo essencial sobre a germinação e crescimento de *Lactuca sativa* e *Cucumis sativus* (BARBOSA et al., 2007); a atividade larvicida do óleo essencial em *Stegomyia aegypti* (SILVA, A. et al., 2010); a atividade inseticida do óleo essencial contra os vetores africanos da malária (KWEKA et al., 2011); o uso do óleo essencial para cicatrização de lesões (GONÇALVES, 2012); a atividade antifúngica do óleo essencial sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013); e a atividade antibacteriana do óleo essencial contra cepas de origem hospitalar (COLE et al., 2014).

Apesar de diversos estudos indicarem que os frutos da *S. terebinthifolius* são uma fonte promissora de compostos bioativos, na literatura, poucos trabalhos investigaram sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas (BENDAOUD et al., 2010; LIVIA, 2013). A atividade anticâncer de óleo essencial e de extratos das folhas da *S. terebinthifolius* foi investigada por Salvi Júnior (2013), sendo que o autor cita que a *S. terebinthifolius* figura como fonte potencial de metabólitos ativos para o tratamento de alguns tipos de câncer. Com relação aos frutos da *S. terebinthifolius*, Livia (2013) investigou a atividade antiproliferativa de extratos, obtidos com CO₂ supercrítico, em linhagem de células K562 (leucemia mieloide crônica agudizada) e Jurkat (leucemia aguda linfoblástica). Ademais, Bendaoud et al. (2010) investigaram a atividade antiproliferativa do óleo essencial dos frutos em câncer de mama (MCF-7). Os últimos autores citam uma atividade promissora do óleo essencial e sugerem que os sesquiterpenos são os metabólitos ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa observada. Já Matsuo et al. (2011) relataram que o monoterpeneo α -pineno, isolado a partir dos frutos da *S. terebinthifolius*, foi muito eficaz no tratamento do melanoma metastático.

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico para o tratamento de câncer tem sido um importante caminho para a descoberta de drogas menos tóxicas, mais seletivas e eficazes. Com o aprimoramento da cultura de células, foi possível, no final da década de 1980, o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, desse modo, possibilitando o desenvolvimento de uma metodologia para triagem *in vitro* de novos compostos que inibam o crescimento de células cancerígenas (BOYD, 1989; QUEIROZ et al., 1999). O *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos, um dos mais importantes centros de estudos sobre o câncer, preconiza a utilização de um painel de 60

linhagens tumorais humanas (NCI60). Nesse protocolo, o crescimento celular é determinado por espectrofotometria, utilizando-se o corante proteico sulforrodamina B (SRB), sendo que a metodologia inclui a determinação da densidade celular no momento de adição das amostras, o que possibilita o cálculo da concentração que inibe totalmente o crescimento celular (MONKS et al., 1991; CHABNER; ROBERTS, 2005; SHOEMAKER, 2006). Na literatura não foram encontrados estudos que tenham investigado a atividade antiproliferativa de derivados dos frutos da *S. terebinthifolius* frente a um painel de células tumorais humanas, assim, visando à triagem de atividades anticâncer que sejam promissoras.

2.3 COMPOSTOS DOS FRUTOS DA *S. terebinthifolius*

Os compostos voláteis, encontrados em teores e composições variáveis nas partes da *S. terebinthifolius* (caule, folhas, flores e frutos), são apontados como os principais responsáveis por suas diversas atividades biológicas, sendo que os frutos apresentam maior quantidade de óleo essencial quando comparados com as outras partes da *S. terebinthifolius*. O óleo essencial dos frutos é caracterizado por apresentar uma elevada concentração de monoterpenos (δ -3-careno, α -felandreno, β -felandreno, α -pineno e β -pineno) e um menor teor de sesquiterpenos (cariofileno e germacreno D) (BARBOSA et al., 2007).

Vários estudos realizaram a extração de óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, tais como Cole (2008), que cita os majoritários δ -3-careno, limoneno, α -felandreno, α -pineno e mirceno; Silva, A. et al. (2010), que citam os majoritários δ -3-careno, α -pineno, silvestreno, germacreno D e β -mirceno; Araújo (2010), que cita os majoritários α -pineno, δ -3-careno, α -felandreno, silvestreno, *p*-cimeno e cariofileno; Souza (2012), que cita os majoritários α -pineno, α -felandreno, δ -3-careno, o-cimeno, limoneno e β -felandreno; e Dourado (2012), que cita os compostos majoritários mirceno, germacreno D, δ -cadineno, α -pineno e trans- β -cariofileno. Essa variação observada nos compostos voláteis pode ser explicada pela alta complexidade química dos óleos essenciais, pois sua composição química e, conseqüentemente, suas atividades biológicas são influenciadas por diversos fatores, tais como o local de colheita da matéria-prima e suas condições climáticas; a variabilidade genética (quimiotipo) da espécie vegetal; as etapas de pré-tratamento da matéria-prima (moagem, secagem, etc.); o tipo de técnica de extração utilizado; e as condições operacionais

dos processos extrativos (BANDONI, 2003; CHAMORRO et al., 2012; KARAM et al., 2016).

Além dos monoterpenos e sesquiterpenos, algumas atividades biológicas dos frutos da *S. terebinthifolius* são atribuídas a compostos de maior massa molecular presentes nos frutos, tais como compostos fenólicos (apigenina, ácido elágico e naringina) e carotenoides, sendo estes compostos apontados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos frutos da *S. terebinthifolius* (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004; BERTOLDI, 2006; PAGANI et al., 2014).

2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DA *S. terebinthifolius*

A operação unitária denominada extração é uma técnica de separação integrada no conjunto das operações baseadas na transferência de massa. Consiste na separação de um ou mais componentes (soluto) de uma mistura por meio de um solvente, sendo baseada nos diferentes graus de solubilidade dos constituintes. A mistura que se pretende separar pela extração pode ser sólida (extração sólido-fluido) ou líquida (extração líquido-líquido). Nos processos de extração sólido-fluido, os componentes de uma fase sólida são separados pela dissolução seletiva dos solutos presentes na matéria-prima por meio de um solvente apropriado. O sólido deve estar finamente triturado, de modo que o solvente entre em contato com todo ele. Usualmente, o componente desejável é solúvel no solvente, e o restante do sólido é insolúvel. O soluto deve, então, ser recuperado da solução do extrato (extrato e solvente), em outra etapa de separação (FOUST et al., 2008).

Na literatura, muitos trabalhos investigaram a extração de diversos compostos obtidos a partir dos frutos da *S. terebinthifolius*. Técnicas de extração como Soxhlet (JAIN et al., 1995), maceração dinâmica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004), hidrodestilação (COLE et al., 2014) e extração por arraste a vapor (SARTORELLI et al., 2012) foram as mais investigadas, sendo que pouca atenção foi dada à análise das condições ideais desses processos extrativos. Apesar da simplicidade dessas tecnologias convencionais de extração, esses processos apresentam uma série de desvantagens, por exemplo: na hidrodestilação, o uso de temperaturas elevadas pode degradar compostos termolábeis do óleo essencial; e, na extração em sistema Soxhlet e maceração dinâmica, o uso de solventes orgânicos pode contaminar o extrato e o meio ambiente com substâncias tóxicas. Desse modo,

como processo alternativo, tem-se a extração com fluido supercrítico. É válido ressaltar que o uso de solventes orgânicos e fluidos supercríticos também possibilita a extração de compostos não voláteis.

A aplicação da tecnologia supercrítica é bastante vantajosa, pois permite a utilização de solventes com pouca agressividade ao meio ambiente e a obtenção de produtos de alta qualidade e funcionalidade, sendo possível a preservação de compostos termolábeis em função do uso de temperaturas amenas durante a extração. Além disso, a alta seletividade da extração supercrítica é uma grande vantagem se comparada aos métodos tradicionais de extração, pois, ao modificar a massa específica do fluido supercrítico, manipula-se o seu poder de solvatação e, assim, diferentes compostos podem ser extraídos. É válido ressaltar que a seletividade do fluido supercrítico também pode ser modificada com a adição de outros compostos ao fluido, sendo estes conhecidos como cossolventes. Na extração supercrítica, a qualidade e a quantidade dos produtos obtidos dependem de vários fatores, como pressão, temperatura e vazão do solvente; características físicas do leito de extração, como o tamanho da partícula e a porosidade do leito; características do equipamento de extração; e também o tempo operacional utilizado na extração (BRUNNER, 1994; RIZVI, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Entre os fluidos supercríticos mais utilizados, o dióxido de carbono (CO₂) é a escolha padrão para aplicação em processos envolvendo produtos naturais, principalmente por apresentar as seguintes características: não tóxico; quimicamente inerte; baixo custo; não inflamável; e não apresenta risco de explosão. Além disso, o CO₂ apresenta temperatura crítica amena (31,2 °C) e pressão crítica relativamente baixa (73,4 bar) quando comparado a outros possíveis solventes, tais como a água, que também pode ser utilizada para a extração de compostos bioativos de produtos naturais. Outra vantagem da utilização do CO₂ supercrítico como solvente é a facilidade na sua separação do extrato, pois o CO₂ é um gás à temperatura e pressão ambientes, sendo essa uma característica interessante para produtos destinados à área de alimentos e farmacológica (BRUNNER, 1994; RIZVI, 1994; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Os extratos de frutos da *S. terebinthifolius*, obtidos por extração com CO₂ supercrítico, são comercializados por algumas empresas especializadas em tecnologia supercrítica, tais como a *Blue Marble Biomaterials* (Estados Unidos), a *Flavex[®] Naturextrakte GmbH* (Alemanha) e a *Albert Vieille SAS* (França). Ademais, Smith, Inomata e Peters (2013) mencionam que o perfume *Estée Lauder Pleasures*, criado pela *Firmenich* (Suíça), contém

em sua formulação o extrato de pimenta-rosa, obtido por meio de CO₂ supercrítico como solvente. Até o momento, poucos trabalhos investigaram a extração de compostos dos frutos da *S. terebinthifolius* utilizando a tecnologia supercrítica (LIVIA, 2013; ANDRADE, 2015). Livia (2013) realizou a extração de compostos bioativos dos frutos, utilizando CO₂ supercrítico como solvente, e avaliou a atividade citotóxica em células leucêmicas. Andrade et al. (2016) investigaram o processo de encapsulação de extrato supercrítico dos frutos de *S. terebinthifolius* utilizando a técnica de dispersão da solução melhorada por fluidos supercríticos (técnica SEDS). O extrato foi obtido utilizando CO₂ como solvente nas condições de 300 bar e 60 °C.

Na extração com fluido supercrítico, assim como em outros processos de extração, a moagem da matéria-prima é uma etapa de pré-tratamento fundamental para o processo, pois garante menor resistência interna à transferência de massa. Além disso, as partículas menores proporcionam maior área de contato do sólido, de forma que isso irá garantir mais soluto em contato direto com o solvente. Segundo Reverchon e de Marco (2006), as extrações de produtos naturais com fluido supercrítico, geralmente, são realizadas com partículas variando de 0,25 a 2,0 mm. Outra etapa de pré-tratamento fundamental para a extração supercrítica é a secagem da matéria-prima, pois o alto conteúdo de umidade reduz o contato da matriz sólida com o fluido supercrítico e atua como uma barreira para a difusão do fluido, assim, reduzindo o rendimento da extração (SAHENA et al., 2009). Conforme Meireles (2003), as extrações de produtos naturais com fluido supercrítico geralmente são realizadas com matéria-prima com conteúdo de umidade, em base úmida, menor que 10%.

2.5 SECAGEM

A secagem é um dos métodos mais antigos utilizados no pré-processamento de produtos agrícolas (frutas, legumes, grãos, especiarias, etc.), uma vez que contribui para a preservação das características originais do produto por longos períodos de armazenamento. Entretanto, caso as condições operacionais da secagem não sejam controladas de forma adequada, alguns efeitos desfavoráveis sobre o produto processado são observados, como mudanças indesejáveis na coloração e perdas de compostos voláteis da matéria-prima (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; FIGIEL et al., 2010; KARAM et al., 2016). Na literatura, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas focalizando principalmente a avaliação

da influência da secagem sobre a qualidade de diversas matérias-primas, o que mostra a importância de estudos adicionais nessa área (BUCHAILLOT et al., 2009; FIGIEL et al., 2010; SHAHHOSEINI et al., 2013; ROMDHANE et al., 2015).

Além de sua aplicação como etapa de pré-processamento na extração supercrítica, conforme citado anteriormente, a secagem é uma etapa indispensável no processamento da pimenta-rosa, que é produzida a partir do beneficiamento dos frutos da *S. terebinthifolius*. Os frutos são secos para inibir o crescimento microbiano e a ação enzimática, dessa maneira, evitando a deterioração do produto, bem como realçando o seu sabor e a sua aparência. Outra vantagem é que a remoção de grande parte de água contida no material torna o transporte e a embalagem economicamente mais vantajosos. No entanto, se a secagem não for realizada adequadamente, a qualidade da pimenta-rosa é comprometida e também sua comercialização. É válido mencionar que na literatura não foram encontrados trabalhos que tenham investigado a influência das condições da secagem sobre a qualidade dos frutos da *S. terebinthifolius*. Silva, B. (2013) estudou o processo de secagem dos frutos com ênfase no ajuste de modelos matemáticos para a previsão da cinética de secagem. Por outro lado, ainda não foi relatado trabalho científico sobre os efeitos de diferentes condições operacionais da secagem sobre a qualidade da pimenta-rosa (cor, integridade, compostos voláteis, etc.).

Na secagem, ocorrem simultaneamente dois fenômenos de transporte: o primeiro é a transferência de energia (calor) das vizinhanças para a superfície do sólido, por convecção, o que possibilita a evaporação da umidade superficial em uma temperatura inferior àquela de ebulição do líquido na pressão do sistema; o segundo mecanismo é a transferência de massa (umidade) que ocorre na forma de líquido ou vapor no interior do sólido e na forma de vapor a partir da superfície do sólido (VAN'T LAND, 1991). Portanto, o processo de secagem em leito fixo é afetado por vários fatores, que dependem principalmente das propriedades do sólido processado e do meio secante, assim como das características do secador utilizado. Desse modo, as variáveis operacionais que, em princípio, podem ter relevância no comportamento da secagem, em camada delgada, são aquelas relacionadas ao ar de secagem (temperatura, velocidade e umidade relativa), aos sólidos (granulometria, conteúdo de umidade inicial, porosidade, massa e espessura do leito) e à operação do processo (por exemplo, o tempo de secagem) (TREYBAL, 1981; FOUST et al., 2008).

2.6 MODELAGEM DA CINÉTICA DE SECAGEM

Na área de secagem, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas dando ênfase principalmente à avaliação da cinética do processo, o que inclui também o desenvolvimento de modelos matemáticos que visam à simulação do processo. A cinética de secagem está associada às mudanças do conteúdo de umidade do material e de sua temperatura ao longo do tempo de secagem, sendo intimamente relacionada aos fenômenos de transferência de calor e massa que ocorrem durante a secagem. De forma geral, a cinética de secagem apresenta três períodos característicos, são eles o período inicial de secagem, o período de secagem à taxa constante e o período de secagem à taxa decrescente (STRUMILLO; KUDRA, 1986).

A primeira etapa de secagem (**período inicial de secagem**) ocorre imediatamente após o contato entre a amostra e o meio secante, em que a temperatura do sólido e a taxa de secagem ajustam-se até atingir o equilíbrio. No **período de secagem à taxa constante**, a superfície exposta do sólido está saturada de água e o calor fornecido é totalmente usado para a evaporação da água livre presente na superfície do sólido, sendo a água na superfície substituída constantemente pelo líquido do interior do material, até atingir a umidade crítica. Neste momento, inicia-se o **primeiro período de taxa decrescente**, no qual a temperatura do sólido aumenta e a velocidade com que a água chega à superfície do sólido é menor que a taxa de evaporação da água na superfície. Assim, a difusão de água no interior do sólido passa a controlar o processo de secagem. No **segundo período de taxa decrescente**, já não existe a presença de líquido saturado na superfície; e a evaporação ocorre a partir do interior do sólido. A secagem é finalizada quando é alcançado o conteúdo de umidade de equilíbrio, que é o menor conteúdo de umidade que o sólido pode atingir nas condições de temperatura e umidade relativa do ar de secagem (STRUMILLO; KUDRA, 1986; FOUST et al., 2008).

Afzal e Abe (2000) citam que a modelagem matemática da cinética de secagem baseia-se em três categorias principais: **modelos teóricos**, que são baseados na teoria da difusão ou que relacionam equações simultâneas de transferência de calor e massa; **modelos empíricos**, que dependem apenas dos dados experimentais; e **modelos semiempíricos** ou **semiteóricos**, que relacionam equações teóricas com ajustes empíricos. Lauriano et al. (2005) referem que ainda não há muitos estudos sobre a modelagem da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*. Por isso, os autores iniciaram os estudos sobre a secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, sendo que os dados experimentais da secagem à 40 °C foram simulados de forma precisa pelo **Modelo a duas fases**, entretanto, nas temperaturas de 50 °C

e 60 °C o modelo não se ajustou adequadamente os dados da cinética de secagem. Portanto, esses resultados indicam a necessidade de investigar outros modelos para a previsão da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*. A seguir, tem-se a descrição de alguns modelos matemáticos utilizados para a previsão da cinética de secagem de diversos produtos.

2.6.1 Cinética de secagem por modelos clássicos

Na Tabela 2.1 são apresentados alguns modelos matemáticos frequentemente utilizados para descrever o comportamento dinâmico da secagem de produtos naturais.

Tabela 2.1 – Alguns modelos clássicos para a modelagem da cinética de secagem

Modelo	Equação
Difusão (CRANK, 1975)	$MR = \frac{6}{\pi^2} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{m^2} \exp\left[-m^2 \frac{\pi^2 D_{ef} t}{r_p^2}\right] \quad (2.1)$
Henderson e Pabis (HENDERSON; PABIS, 1961)	$MR = a \exp(-K_o t) \quad (2.2)$
Lewis (LEWIS, 1921)	$MR = \exp(-K t) \quad (2.3)$
Page (PAGE, 1949)	$MR = \exp(-K_1 t^n) \quad (2.4)$
Dois termos (HENDERSON, 1974)	$MR = a_1 \exp(-K_2 t) + b \exp(-K_3 t) \quad (2.5)$

Legenda: r_p é o raio dos frutos da *S. terebinthifolius*; D_{ef} é a difusividade efetiva; m é o número de termos da série; t é o tempo; K é a constante de secagem; n , a , a_1 , b , K_o , K_1 , K_2 , e K_3 são os parâmetros ajustáveis dos modelos semiempíricos; e MR é a umidade adimensional (ou razão de umidade) que é calculada conforme a Equação 2.6.

$$MR = \frac{M - M_e}{M_o - M_e} \quad (2.6)$$

Em que M é o conteúdo de umidade do sólido em base seca, M_e é o conteúdo de umidade de equilíbrio em base seca e M_o é o conteúdo de umidade inicial em base seca.

O modelo teórico de difusão (Equação 2.1) é fundamentado na transferência de massa, sendo obtido a partir da solução analítica, apresentada por Crank (1975), para a segunda lei de Fick. As seguintes hipóteses foram consideradas para a modelagem da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius* (SILVA, B., 2013): os frutos possuem geometria esférica, e o fluxo mássico de umidade ocorre somente na direção radial; o encolhimento do material durante a secagem é desprezível; o período da taxa decrescente é o fator controlador do processo de secagem, ou seja, há resistência à transferência de massa apenas na fase sólida; as condições ambientais do processo são constantes; o conteúdo de umidade inicial do sólido ($t=0$) está distribuído uniformemente no seu interior; existem condições de equilíbrio na superfície do sólido; e a difusividade efetiva é constante. Já o modelo de Henderson e Pabis (Equação 2.2), apresentado na Tabela 2.1, é uma simplificação do modelo de difusão, que foi truncado no primeiro termo da série descrita pela Equação 2.1.

Em uma analogia do período de taxa decrescente de secagem com a lei de resfriamento de Newton, Lewis (1921) sugeriu um modelo (Equação 2.3) que considera que a resistência à transferência de massa se encontra apenas na superfície do material. Assim, o autor assume que a taxa de secagem é proporcional ao teor de água livre do sólido, sendo que normalmente a equação é conhecida como modelo exponencial de secagem. Com o objetivo de melhorar o ajuste desse modelo aos dados experimentais, outros autores propuseram modificações ao modelo de Lewis. Uma pequena modificação foi realizada por Page (1949), desenvolvendo um novo modelo para a descrição da cinética de secagem em camada delgada (Equação 2.4). A modificação envolveu a adição de um termo exponencial (n) na variável tempo.

Outro modelo semiempírico que apresenta ajustes satisfatórios aos dados de cinética de secagem de produtos naturais é o modelo desenvolvido por Henderson (1974), também conhecido como modelo de Dois termos. É válido mencionar que, dos vários modelos clássicos de secagem investigados por Silva, Fileti e Taranto (2015), o modelo de Henderson (Dois termos) foi o que melhor representou a cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*. Entretanto, deve-se investigar o ajuste desse modelo em outras condições operacionais de secagem.

2.6.2 Redes Neurais Artificiais

As Redes Neurais Artificiais (RNAs) surgiram como uma inspiração na estrutura neural de organismos inteligentes. Essa ferramenta computacional foi criada como um modelo de resolução de problemas complexos por meio da simulação do cérebro humano, inclusive em seu comportamento, ou seja, aprendendo, errando e fazendo descobertas (BABINI; MARRANGHELLO, 2007).

Uma RNA é uma coleção massivamente paralela de pequenas unidades de processamento, que computam determinadas funções matemáticas, cujas interligações formam a maior parte da inteligência da RNA. Do ponto de vista físico, as RNAs diferem bastante das redes neurais biológicas, pois, em termos de escala, o cérebro é muito maior que qualquer RNA. Ademais, as unidades utilizadas em uma RNA são mais simples que os neurônios biológicos e o processo de aprendizado do cérebro humano, ainda desconhecido, é certamente muito diferente do comportamento das RNAs (BRAGA; CARVALHO; LUDERMIR, 1998). Os autores citam ainda que as RNAs, uma subespecialidade da Inteligência Artificial, são sem dúvida uma “poderosa” ferramenta matemática não convencional, que pode ser aplicada para modelagem de processos. É uma abordagem alternativa à forma fenomenológica de resolver problemas, principalmente para o ajuste não linear e multivariável de dados. A solução de problemas por meio de RNAs é bastante atrativa, visto que a forma como esses são representados internamente pela RNA e o paralelismo natural inerente à arquitetura das RNAs criam a possibilidade de um desempenho superior ao dos modelos tradicionais.

O elevado número de trabalhos publicados que aplicaram as RNAs reflete a potencialidade dessa ferramenta de modelagem empírica em diversos processos de engenharia (HIMMELBLAU, 2008). Na área de secagem, as RNAs foram utilizadas, por exemplo: para modelar o processo de secagem em leito fixo de tomate (MOVAGHARNEJAD; NIKZAD, 2007); na secagem de resíduos sólidos orgânicos (PERAZZINI; FREIRE; FREIRE, 2013); e para a previsão da cinética de secagem de folhas de hortelã (COSTA et al., 2014). A aplicação das RNAs para a previsão da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius* foi investigada inicialmente por Silva, Fileti e Taranto (2015), sendo que uma RNA com três neurônios de entrada (tempo, temperatura e velocidade do ar) apresentou os resultados mais promissores. Entretanto outras topologias de RNAs ainda devem ser investigadas.

De forma geral, para que a modelagem via RNA seja bem-sucedida são necessárias as seguintes análises: definição das variáveis de entrada e saída do processo; obtenção de um banco de dados para treinamento e verificação da RNA; definição da arquitetura da RNA; especificação da função de ativação de cada neurônio; estratégia de aprendizado; e verificação da RNA. Durante uma simulação utilizando uma RNA do tipo *feedforward*, o sinal percorre a rede em uma única direção, da entrada para a saída, sendo que os neurônios de uma mesma camada possuem as mesmas características (função de ativação) e não são conectados entre si. Cada neurônio passa seu dado valor para as conexões que saem dele. Assim, cada conexão transfere um sinal de um neurônio a outro, por meio do “peso”, que pode ser “amplificado” ou “diminuído” pela conexão. Cada neurônio na camada seguinte recebe um valor, que é a soma ponderada dos valores produzidos pelas conexões que chegam até ele. Em cada neurônio artificial é realizada uma computação simples sobre esse valor, utilizando a função de ativação. O processo é repetido com os resultados sendo passados através de camadas subsequentes de neurônios, até que os neurônios de saídas sejam atingidos e a resposta é então produzida (FILETI, 1995; FRANCISCO, 2000).

Na modelagem da cinética de secagem por RNAs, além da alta precisão, outra vantagem é a sua capacidade de prever o comportamento da cinética de secagem para uma faixa operacional e não apenas para uma única condição experimental. Assim, as RNAs podem ser utilizadas para a estimativa *on-line* de parâmetros de secagem (*soft sensor*) e também para o controle dos processos de secadores industriais (KONI et al., 2010; CUBILLOS et al., 2011; FREIRE et al., 2014).

2.7 PLANEJAMENTO FATORIAL

O alto desenvolvimento tecnológico nas indústrias e a grande competitividade no mercado tornam, a cada momento, mais difícil pensar em desenvolvimento de produtos e processos sem a utilização de planejamentos experimentais. Baseada nos fundamentos estatísticos, esta metodologia é, sem dúvida alguma, uma ferramenta de grande utilidade para conhecer as condições otimizadas de um processo, para o desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas ou simplesmente para investigar os efeitos que as variáveis independentes exercem nas saídas desejadas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

De forma geral, para utilizar a técnica de planejamento fatorial de experimentos é necessária a realização das seguintes etapas: definição das variáveis independentes e dependentes do processo e das faixas de estudo de cada uma delas; escolha do planejamento adequado, que é função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo; determinação da influência de uma ou mais variáveis independentes sobre as respostas do processo; ajuste de modelos empíricos aos dados experimentais; análise da qualidade de ajuste do modelo por meio da Análise de Variância (ANOVA); construção das superfícies de resposta e das curvas de nível para os modelos validados estatisticamente; e determinação das condições operacionais ótimas pela análise de superfície de resposta e curva de contorno.

Vários estudos da literatura revelam a grande vantagem do uso da metodologia do planejamento fatorial em relação ao uso da investigação de uma variável por vez. Esta metodologia fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro, sendo que há vantagens incomparáveis quanto ao número de ensaios e qualidade na informação (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Desse modo, estudos utilizando a metodologia do planejamento experimental fatorial são necessários para a investigação dos processos de secagem e extração, pois utilizando um menor número de experimentos é possível a exploração de um espaço experimental maior, com melhor qualidade nos resultados obtidos.

CAPÍTULO 3

EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi POR HIDRODESTILAÇÃO: efeitos das variáveis operacionais; condições ótimas; e atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais humanas

Neste capítulo, descreve-se a extração de óleo essencial realizada, sendo definidas as condições ótimas para a hidrodestilação, e, também, investigada a atividade antiproliferativa do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* sobre células tumorais humanas.

3.1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são produtos naturais constituídos por uma complexa mistura de compostos orgânicos voláteis (monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, ésteres, etc.) resultantes do metabolismo secundário de uma espécie vegetal, sendo empregados como matéria-prima em diferentes indústrias, tais como na produção de alimentos e bebidas, na indústria cosmética e farmacêutica, na formulação de perfumes, entre outras. Conforme a espécie vegetal, os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes partes (folhas, flores, frutos, sementes, caules e raízes), sendo produzidos e armazenados em diferentes estruturas, tais como glândulas, células secretoras, tricomas, etc. (MUKHOPADHYAY, 2000; CHAMORRO et al., 2012; ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015). No caso da *S. terebinthifolius*, os seus frutos apresentam maior quantidade de óleo essencial quando comparados às suas outras partes, sendo que o óleo essencial dos frutos é caracterizado por apresentar uma elevada concentração de monoterpenos, além de sesquiterpenos em menor quantidade (BARBOSA et al., 2007; SANTOS et al., 2009; SILVA, A. et al., 2010; COLE et al., 2014).

Segundo a *International Organization for Standardization* (ISO, 1997), um óleo essencial é definido como o produto obtido, a partir de uma matéria-prima vegetal, por meio de destilação com vapor, também chamada de destilação por arraste a vapor. Assim, os produtos obtidos são o óleo essencial e o hidrolato (água condensada), que são condensados e separados por decantação. No caso específico de frutos cítricos, o óleo pode ser obtido a partir de prensagem a frio. É válido ressaltar que os extratos obtidos com o uso de solventes

orgânicos e fluidos supercríticos não são definidos como óleos essenciais, embora sejam também extratos aromáticos.

O método mais utilizado para a extração de óleo essencial é o **arraste a vapor**, pelo qual o vapor d'água passa através de um leito fixo de matéria-prima rica em óleo essencial. Em escala de laboratório, comumente, utiliza-se para a extração de óleos essenciais o método da **hidrodestilação**, geralmente em aparelho Clevenger, no qual, diferentemente do método de **arraste a vapor**, a matéria-prima fica em contato direto com a água. O princípio de funcionamento baseia-se no fato de que o óleo essencial e a água formam uma mistura de líquidos imiscíveis e, por isso, o ponto de ebulição dessa mistura é sempre menor do que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes. Portanto, uma mistura de compostos de alto ponto de ebulição e água pode ser destilada à temperatura constante e menor que 100 °C, que é o ponto de ebulição da água em condições de atmosfera padrão (GEANKOPLIS, 2003; CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004; MILOJEVIC et al., 2008; PALMA et al., 2013).

O processo de hidrodestilação é afetado por diversos fatores, tais como a razão sólido/água; o tempo de extração; a taxa de hidrodestilação, que pode ser ajustada pela potência de entrada da manta de aquecimento; a moagem da matéria-prima (tamanho de partícula); entre outros fatores (SOVOVÁ; ALEKSOVSKI, 2006; MILOJEVIC et al., 2008; PENG; DON; TAHREL, 2012).

Apesar de diversos estudos avaliarem a composição química do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* e suas diversas atividades biológicas, pouca atenção foi dada à análise das condições operacionais do processo visando à sua otimização. Essa informação é extremamente importante para a redução de custos de produção, bem como para avaliar os efeitos das condições operacionais sobre o desempenho da hidrodestilação. Por isso, o objetivo deste estudo foi investigar a extração de óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, com ênfase nas análises das condições operacionais da hidrodestilação e da atividade antiproliferativa do óleo essencial. É válido mencionar que, na literatura, não foram encontrados estudos que tenham investigado a atividade antiproliferativa de derivados dos frutos da *S. terebinthifolius* (óleo essencial ou extratos) frente a um painel de células tumorais humanas, dessa forma, visando à triagem de atividades anticâncer que sejam promissoras.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATÉRIA-PRIMA

Os frutos maduros da *Schinus terebinthifolius* Raddi foram coletados manualmente no município de Aracruz, Espírito Santo, em junho de 2014 (Lote A). A Figura 3.1 ilustra a localização do local de coleta dos frutos, sendo que a região apresenta as seguintes coordenadas geográficas: latitude sul 19°55'15"; longitude oeste 40°10'11"; e altitude de 32 metros.

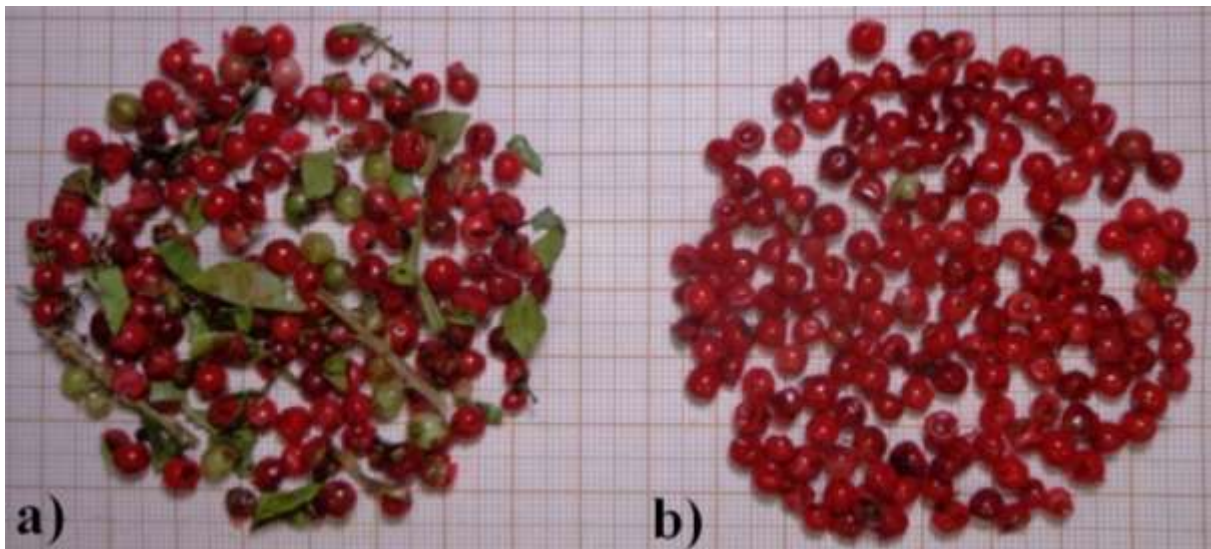
Figura 3.1 – Localização do local de coleta dos frutos da *S. terebinthifolius* em Aracruz-ES



Fonte: Google Earth (2014).

Os frutos da *S. terebinthifolius* foram coletados de forma manual, por catadores locais, em pontos aleatórios de árvores nativas da Mata Atlântica da região. Após a colheita, os frutos foram separados de impurezas (folhas, galhos, pedras, etc.) com o auxílio de peneiras metálicas de aberturas de 5,6 e 4,0 mm (Granutest[®]), sendo que os frutos verdes foram separados manualmente. A Figura 3.2 apresenta as amostras da matéria-prima “bruta” e após a retirada das impurezas (“classificada”), sendo que a matéria-prima “bruta” apresentou 83% de frutos maduros, 13% de frutos verdes e 4% de impurezas. Todas as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas herméticas e mantidas em *freezer* à temperatura em torno de -18 °C, até o início dos ensaios de extração.

Figura 3.2 – Amostras dos frutos da *S. terebinthifolius* (Lote A): a) bruta; b) classificada



Fonte: Acervo do autor.

Com o objetivo de identificar a espécie vegetal, foram coletados ramos com folhas e frutos para a confecção de exsiccatas a serem depositadas em herbário. Os ramos, de aproximadamente 30 cm, foram colocados entre folhas de papel absorvente e o conjunto foi prensado entre duas grades de madeira, sendo mantido ao sol para a secagem. A Figura 3.3 mostra a exsiccata que representa a coleta dos frutos da *S. terebinthifolius* em Aracruz-ES. A identificação foi realizada pela bióloga Cíntia Luíza da Silva Luz, sendo que uma amostra foi depositada no herbário do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP (Herbário UEC, número 188116).

Figura 3.3 – Exsicata da espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* Raddi var. *rhoifolius* (Mart.) Engl. (Herbário UEC, número 188116)

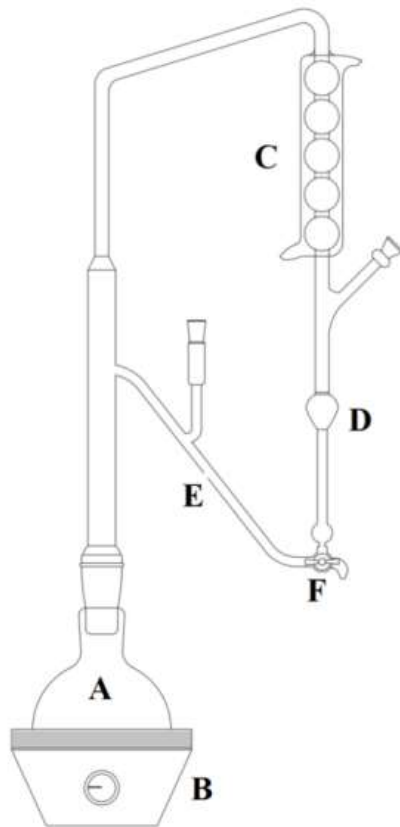


Fonte: Acervo do autor.

3.2.2 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

A extração de óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger (Figura 3.4), de acordo com os procedimentos para a extração de óleos essenciais em drogas aromáticas descritos na Farmacopeia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2010).

Figura 3.4 – Desenho esquemático do sistema de extração de óleo essencial com o aparelho de Clevenger



- (A) Balão de fundo redondo de 2 L;
- (B) Manta de aquecimento de 2 L;
- (C) Condensador;
- (D) Reservatório de óleo essencial e água;
- (E) Retorno da água para o balão;
- (F) Válvula de separação.

Fonte: Acervo do autor.

Previamente a cada extração, os frutos congelados foram triturados em um liquidificador industrial (Waring Commercial[®], modelo 33BL79), por 2 minutos. Os frutos triturados foram colocados em um balão de fundo redondo de 2 L (A) juntamente com 1 L de água destilada e pérolas de vidro. Em seguida, o balão foi adaptado ao aparelho Clevenger, sendo o sistema aquecido em manta de aquecimento de 2 L (B) (Fisaton[®], modelo 203, 850 W) e mantido em ebulição (potência da manta no nível 3) durante todo o processo de extração. A água e os compostos voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius* foram vaporizados e, em seguida, condensados (C) por meio do contato indireto com uma solução aquosa de etilenoglicol (-3 °C). No reservatório do aparelho Clevenger (D), o óleo essencial ficou na parte superior; e a água na parte inferior, com a água retornando ao balão pelo tubo de retorno (E).

Após a extração, o destilado (óleo essencial e água) foi recolhido e o aparelho de Clevenger foi lavado com diclorometano anidro (Sigma-Aldrich[®]), por três vezes, para recuperar o óleo essencial aderido à parede da vidraria. O produto da lavagem e o destilado foram transferidos para um funil de separação, onde foram adicionados 30 mL de diclorometano (por três vezes). Em seguida, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica

(óleo essencial e diclorometano) foi recolhida em erlenmeyer para a retirada da água residual. Para tanto, o sulfato de sódio anidro (Synth[®]) foi misturado em excesso à solução e, em seguida, a mistura foi filtrada sobre papel para a retirada do sulfato de sódio. O filtrado foi levado ao rotaevaporador (Buchi[®], modelo B-490) a 40 °C e pressão reduzida, para a remoção do diclorometano. Em seguida, a massa do óleo essencial foi determinada em uma balança analítica (SHIMADZU[®], precisão de 0,0001 g) para o cálculo do rendimento em base seca da hidrodestilação (Y_o), segundo a Equação 3.1.

$$Y_o = \frac{m_o}{m_{ss}} 100 \quad (3.1)$$

Em que m_o é a massa do óleo essencial e m_{ss} é a massa seca da matéria-prima utilizada na hidrodestilação. Após os procedimentos de extração, o óleo essencial foi colocado em frasco de vidro e mantido em *freezer* (-18 °C) até o momento de sua utilização nas análises.

3.2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A HIDRODESTILAÇÃO

A metodologia do planejamento fatorial de experimentos foi utilizada para avaliar as influências da razão sólido/água (massa seca de matéria-prima/volume de água) e do tempo de extração sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* (teor de terpenos). Na Tabela 3.1, estão indicados os níveis das variáveis independentes investigadas neste trabalho, sendo que os valores máximos e mínimos foram definidos de acordo com dados publicados na literatura para a hidrodestilação (JANTAN et al., 2003; BARBOSA et al., 2007; MILOJEVIC et al., 2008; KWEKA et al., 2011; PENG; DON; TAHREL, 2012; SARTORELLI et al., 2012; COLE et al., 2014).

Tabela 3.1 – Níveis das variáveis independentes da hidrodestilação

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Razão sólido/água (g/L)	17,71	41,05	97,40	153,7	177,1
Tempo de extração (h)	1,0	2,0	4,5	7,0	8,0

Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 3.2 apresenta a matriz do planejamento experimental, tendo sido desenvolvido um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 11 ensaios de hidrodestilação, composto por um planejamento fatorial completo (2^2), incluindo quatro pontos axiais e três repetições no ponto central.

Tabela 3.2 – Planejamento experimental para a hidrodestilação

Ensaio	Razão sólido/água (g/L) ¹	Tempo de extração (h) ¹
1	41,05 (-1)	2,0 (-1)
2	153,7 (+1)	2,0 (-1)
3	41,05 (-1)	7,0 (+1)
4	153,7 (+1)	7,0 (+1)
5	17,71 (-1,41)	4,5 (0)
6	177,1 (+1,41)	4,5 (0)
7	97,40 (0)	1,0 (-1,41)
8	97,40 (0)	8,0 (+1,41)
9	97,40 (0)	4,5 (0)
10	97,40 (0)	4,5 (0)
11	97,40 (0)	4,5 (0)

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota:¹Valores codificados entre parênteses.

Todos os ensaios apresentados na Tabela 3.2 foram realizados em duplicata e por ordem aleatória. Para investigar a cinética de extração do óleo essencial, foram realizados ensaios de hidrodestilação na razão sólido/água de 97,4 g/L, ou seja, no mesmo valor utilizado nos ensaios do ponto central do DCCR (Tabela 3.2). Para os experimentos cinéticos, foram utilizados vários frascos para a coleta do óleo essencial ao longo do tempo, sendo coletados em intervalos de 20, 30 e 60 minutos até o final da extração (8 horas).

Os dados experimentais foram analisados com o auxílio do *software* STATISTICA[®]. Inicialmente, os efeitos significativos das variáveis independentes do processo foram calculados e com esses resultados foram determinados os coeficientes de regressão ($\beta_0, \beta_1, \beta_{11}, \beta_2, \beta_{22}, \beta_{12}$) do modelo codificado (Equação 3.2).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3.2)$$

A Equação 3.2 é uma equação polinomial de segunda ordem que relaciona as respostas do processo de extração (Y_i) com as variáveis independentes que foram codificadas segundo a Tabela 3.1: razão sólido/água (x_1) e tempo de extração (x_2).

Para verificar a qualidade de ajuste dos modelos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). Em seguida, foram obtidas as superfícies de resposta e curvas de nível, sendo utilizadas para a definição das condições ótimas do processo de hidrodestilação.

3.2.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A caracterização química dos compostos voláteis das amostras foi realizada por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, modelo HP-6890) com espectrômetro de massas (Agilent Technologies, modelo HP-5975), operando com impacto de elétrons de 70 eV e analisador quadrupolo linear. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com vazão na coluna de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de 220 °C e a temperatura do detector foi de 250 °C. A coluna capilar utilizada foi uma HP-5MS[®] (5% fenil e 95% dimetilpolissiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) com programação linear de temperatura do forno de 60 a 240 °C e taxa de aquecimento de 3 °C/min (ADAMS, 2007). Previamente a cada análise cromatográfica, amostras foram preparadas por meio da diluição de 10 mg do óleo essencial em 1 mL de acetato de etila, sendo utilizada uma balança analítica de alta precisão (SHIMADZU[®], série AUW220D e precisão de 0,00001 g). Para injeção de amostras no sistema CG-EM, foi utilizado um injetor automático que inseria no sistema alíquotas de 1 µL de cada amostra com divisão de fluxo de 30:1.

A identificação dos compostos foi efetuada mediante comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (NIST 05, Versão 2.0) e pela comparação dos índices de retenção obtidos experimentalmente com os valores tabelados (ADAMS, 2007). O índice de retenção linear foi calculado por meio da Equação 3.3 (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), sendo que foram utilizados os dados de tempo de retenção observados para uma solução de n-alcenos (C₈–C₂₂) injetada no cromatógrafo, nas mesmas condições de operação usadas para a análise cromatográfica das amostras. A porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas foi utilizada como um indicativo do teor dos compostos voláteis nas amostras (CHAMORRO et al., 2012).

$$IR_i = \left(\frac{t_{R,i} - t_{R,c}}{t_{R,c+1} - t_{R,c}} + c \right) 100 \quad (3.3)$$

Em que: IR_i é o índice de retenção do composto i ; $t_{R,i}$ é tempo de retenção do composto i ; $t_{R,c}$ é o tempo de retenção do alcano imediatamente anterior a $t_{R,i}$; $t_{R,c+1}$ é tempo de retenção do alcano imediatamente posterior a $t_{R,i}$; e c é o número de carbonos do alcano imediatamente anterior ao composto i .

As amostras também foram monitoradas qualitativamente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foram utilizadas como fase estacionária cromatoplasas de alumínio, cobertas por uma fina camada de sílica gel (Merck[®], CCF-C/25, Sílica gel 60). As análises foram desenvolvidas utilizando-se como fase móvel um sistema de solventes (Merck[®]) composto de hexano e acetato de etila, 85:15 (v/v). As amostras analisadas foram preparadas por meio da diluição de 10 mg do óleo essencial em 1 mL de acetato de etila. Um volume de 10 μ L das soluções de amostras foi aplicado com auxílio de uma microseringa de 25 μ L (Hamilton[®]), em um ponto próximo ao extremo inferior da cromatoplasa. Para a análise, a cromatoplasa foi inserida em cuba de vidro contendo a fase móvel e, por efeito de capilaridade, a fase móvel atinge o topo da placa, sendo esta, então, retirada da cuba. Para a detecção dos compostos, as cromatoplasas foram pulverizadas com solução ácida de anisaldeído, seguido de aquecimento em estufa a 100 °C até a completa revelação dos compostos.

3.2.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Neste trabalho, foi investigada a atividade antiproliferativa do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, obtido nas condições operacionais da hidrodestilação que resultaram em maiores rendimentos. Os experimentos foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks et al. (1991).

De forma geral, a atividade foi avaliada pela exposição de células tumorais humanas a diferentes concentrações das amostras investigadas. A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada em nove linhagens celulares tumorais humanas e uma linhagem celular não tumoral, conforme apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação

Linhagem celular	Linhagem de referência	Densidade celular de inoculação (10⁴ células/mL)
Ovário resistente ¹	NCI-ADR/RES	5,0
Cólon	HT29	4,0
Mama	MCF7	6,0
Ovário	OVCAR-3	7,0
Próstata	PC-3	5,0
Rim	786-0	4,5
Pulmão	NCI-H460	4,0
Glioma	U251	4,0
Leucemia	K562	6,0
Queratinócito ²	HaCaT	4,0

Fonte: Della Torre (2013, p.18).

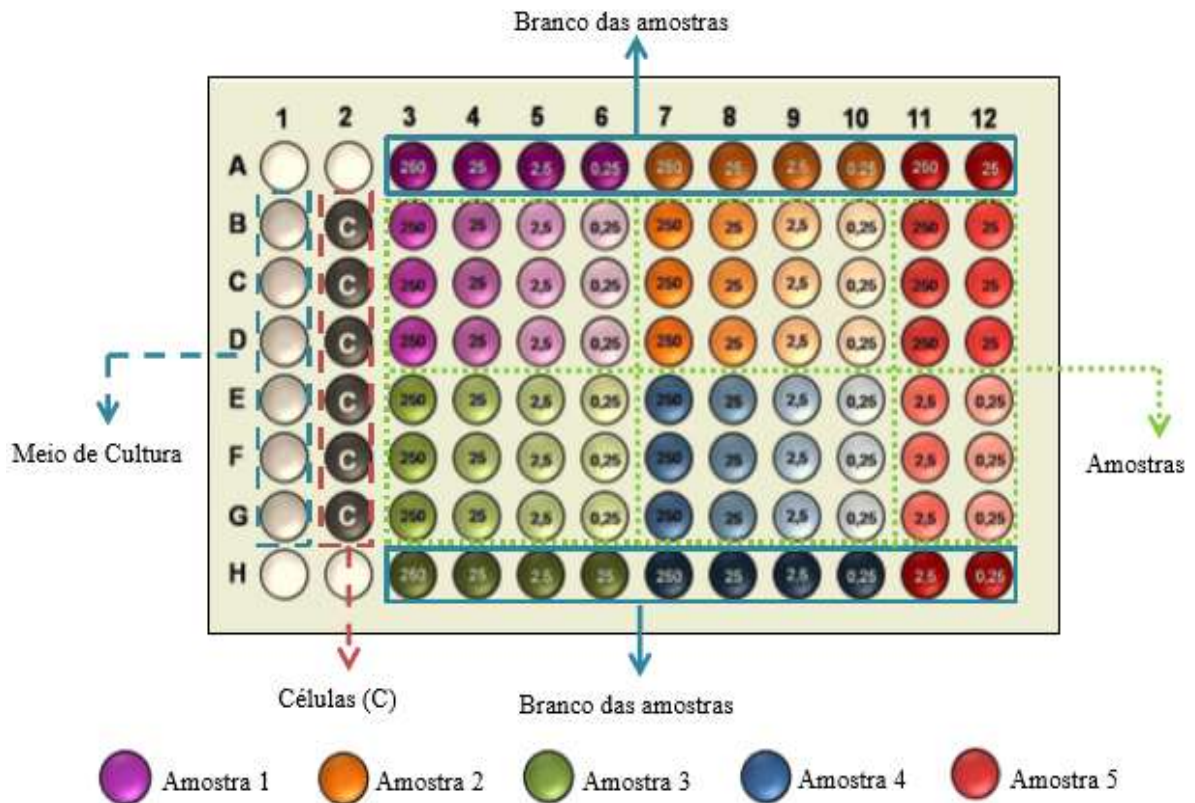
Notas: ¹ Ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; ² Linhagem celular não tumoral.

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho eram originárias de neoplasias humanas, provenientes de culturas mantidas pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP e que foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos. As linhagens celulares se encontram acondicionadas em frascos de manutenção de 25 cm³ (T²⁵) com meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco[®]) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB/Gibco[®]) e 1% (v/v) de penicilina:estreptomicina (1000 UI/mL:1000 µg/mL), e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As amostras de óleo essencial foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck[®]) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição à cultura de células, esta solução-mãe foi diluída em meio de cultura RPMI com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina (2 mg/L), para a preparação das seguintes concentrações: 0,25; 2,5; 25; e 250 µg/mL.

No início dos ensaios, em uma placa de 96 compartimentos (Figura 3.5), foram inoculados 100 µL de suspensão celular por compartimento da placa. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T₀) contendo todas as linhagens celulares utilizadas nos

experimentos. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Figura 3.5 – Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no ensaio de atividade antiproliferativa



Fonte: Della Torre (2013, p.19).

Após 24 horas de incubação, as amostras diluídas do óleo essencial (0,25; 2,5; 25 e 250 μg/mL) foram aplicadas à placa (100 μL/compartimento), exceto na T_0 (placa controle), de acordo com a Figura 3.5. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina (cloridrato de doxorrubicina[®], Europharma) nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 μg/mL (100 μL/compartimento) em triplicata. Em seguida, a placa foi incubada por 48 horas, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T_0 foram fixadas com a adição de 50 μL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma-Aldrich[®]) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas.

Após 48 horas de tratamento, as células em que foram adicionadas as amostras também foram fixadas com 50 μL/compartimento de TCA e incubadas por 1 hora e temperatura de 4 °C. Após esse período, as placas foram submetidas a quatro lavagens

consecutivas com água para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, foram adicionados 50 µL/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich[®]) a 0,4% (m/v) dissolvido em ácido acético a 1% (v/v). As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas por quatro vezes consecutivas, com solução de ácido acético 1% (v/v), e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma-Aldrich[®]).

A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices[®], modelo VersaMax). As médias das absorbâncias (T_i) foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos, e o crescimento celular (%C) foi determinado segundo as considerações descritas a seguir:

a) Se $T_i > C$: a amostra estimulou o crescimento celular;

b) Se $C > T_i \geq T_0$: a amostra apresenta atividade citostática (Equação 3.4);

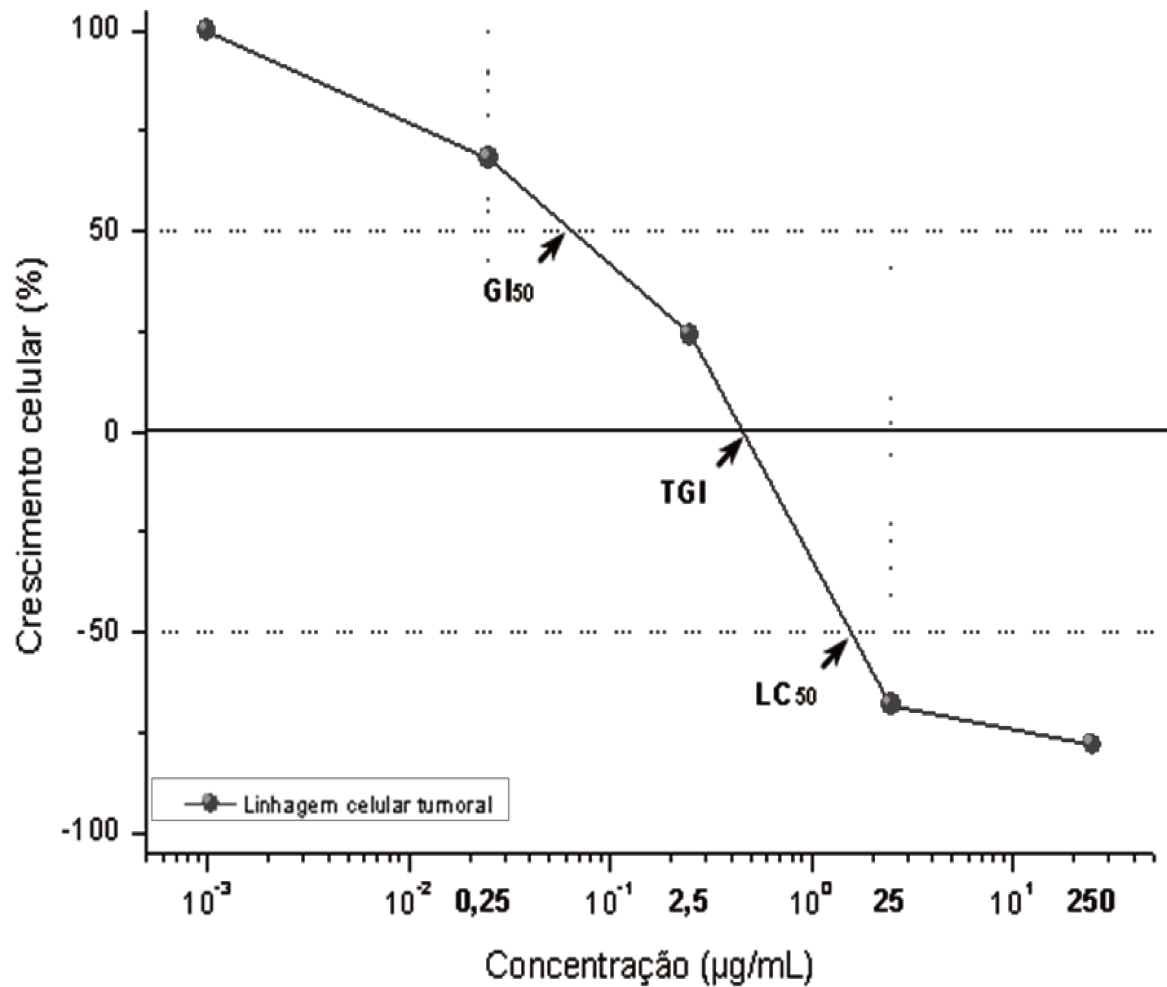
$$\%C = \left(\frac{T_i - T_0}{C - T_0} \right) 100 \quad (3.4)$$

c) Se $T_i \leq T_0$: a amostra apresenta atividade citocida (Equação 3.5);

$$\%C = \left(\frac{T_i - T_0}{T_0} \right) 100 \quad (3.5)$$

Em que: T_i é média da absorbância da amostra analisada; C é absorbância do controle de célula; e T_0 é a absorbância das células no dia da adição das amostras. Com os dados calculados de crescimento celular (%C), foram gerados gráficos que relacionam esse crescimento em função da concentração da amostra testada (Figura 3.6).

Figura 3.6 – Crescimento celular em função da concentração da amostra testada



Fonte: Salvi Júnior (2013, p. 106).

Legenda:

GI₅₀ (*growth inhibition of 50%*): Concentração para inibir 50% do crescimento celular;

TGI (*total growth inhibition*): Concentração para inibir 100% do crescimento celular;

LC₅₀: (*lethal concentration 50*): Concentração para que ocorra 50% de morte celular.

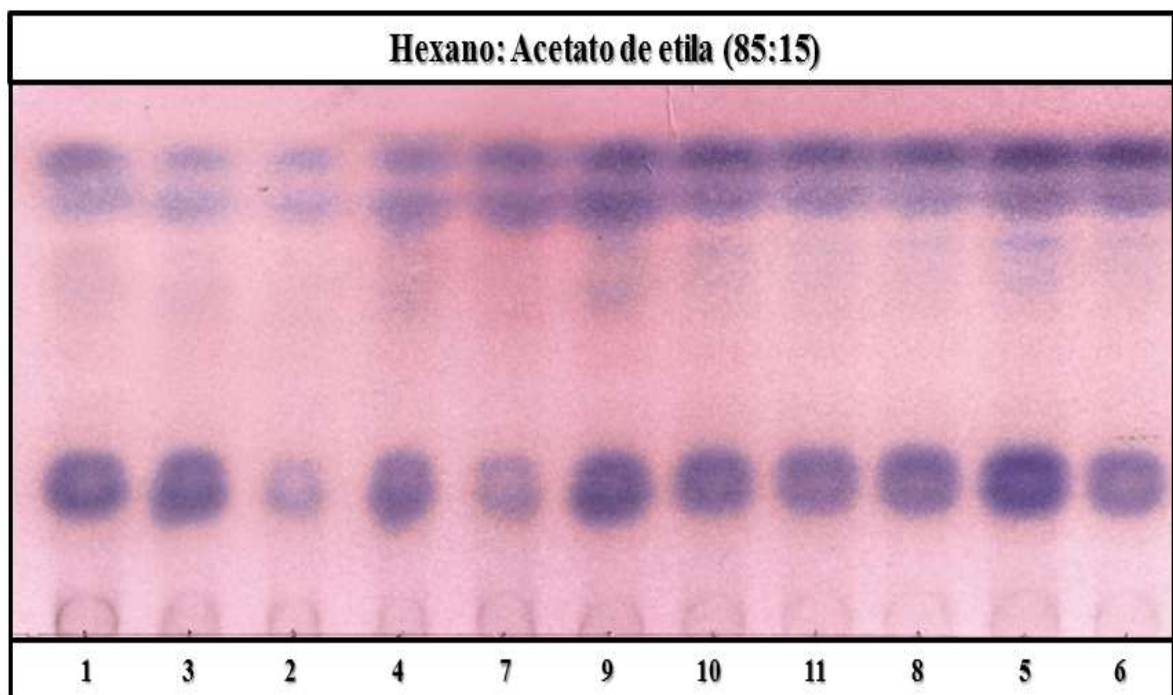
Na Figura 3.6 os valores positivos (acima de zero e abaixo de 100%) representam inibição do crescimento celular, enquanto que valores negativos (abaixo de zero) representam morte celular, pois, neste caso, a quantidade de células (aferida pela absorvância no final do experimento) é menor do que a que iniciou o experimento (absorvância em T_0) (MONKS et al., 1991). As concentrações efetivas GI₅₀ (concentração para inibir 50% do crescimento celular), TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular) e LC₅₀ (concentração para que ocorra 50% de morte celular) são parâmetros utilizados para mensurar a atividade antiproliferativa. No presente trabalho optou-se pelo TGI que representa a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular. O TGI foi calculado por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando o *software* Origin 7.5[®].

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A Figura 3.7 apresenta o perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos produtos obtidos nos ensaios de hidrodestilação do planejamento experimental (Tabela 3.2).

Figura 3.7 – Perfil cromatográfico por CCD do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* (ensaios de 1 a 11, nas condições operacionais da Tabela 3.2)



Fonte: Acervo do autor.

Nota: A fase móvel utilizada foi o sistema hexano: acetato de etila (85: 15) e os compostos foram revelados com solução ácida de anisaldeído.

Segundo Jork et al. (1990), a solução ácida de anisaldeído, utilizada como revelador neste trabalho, permite a revelação de terpenos em óleos essenciais e extratos. Desse modo, conforme observado na Figura 3.7, o perfil por CCD revelou a presença de terpenos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*. De forma geral, o perfil cromatográfico em todos os produtos foi semelhante, sendo observadas quatro bandas (grupos de compostos de características semelhantes). Estes resultados qualitativos são melhores discutidos por meio dos resultados da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) (Tabela 3.4), que fornece dados quantitativos da composição química do óleo essencial.

Tabela 3.4 – Composição química do óleo essencial (CG-EM) dos frutos da *S. terebinthifolius* para cada ensaio do planejamento experimental (ensaios de 1 a 11, nas condições operacionais da Tabela 3.2)

Composto	IR _i ¹	Área relativa (%) ²										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-
α -pineno	932	8,14	9,05	8,49	8,92	7,09	7,12	9,20	8,68	7,03	8,68	8,32
Sabineno	969	2,58	2,58	2,27	2,45	1,77	2,22	2,90	2,34	2,13	2,36	2,37
β -pineno	974	0,87	0,87	0,83	0,87	0,80	0,74	0,92	0,89	0,77	0,83	0,74
β -mirceneno	988	3,18	3,19	2,96	3,05	3,19	2,99	3,26	3,05	3,06	3,06	3,11
α -felandreno	1002	15,75	17,30	16,32	16,73	15,67	16,32	17,01	16,97	16,26	16,82	16,63
δ -3-careno	1008	35,05	36,73	33,99	34,82	33,78	34,61	36,55	34,91	34,07	34,74	35,37
α -terpineno	1014	0,21	-	0,20	0,23	0,19	-	0,22	0,24	0,18	0,21	0,23
<i>o</i> -cimeno	1022	1,06	0,94	0,87	0,80	1,19	0,84	1,20	0,89	0,88	0,91	0,92
Limoneno	1024	15,52	16,23	15,03	15,31	15,32	15,34	16,32	15,45	15,22	15,54	15,37
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	-
Terpinoleno	1086	1,48	1,49	1,42	1,45	1,48	1,56	1,47	1,47	1,53	1,45	1,49
n.i. ³	-	0,18	-	-	-	0,22	-	-	0,25	-	-	-
δ -elemeno	1335	0,60	0,52	0,69	0,61	0,68	0,72	0,46	0,58	0,73	0,61	0,60
n.i. ³	-	0,73	0,66	0,66	0,67	0,67	0,79	0,62	0,59	0,75	0,66	0,66
n.i. ³	-	0,77	0,60	0,71	0,62	0,55	0,89	0,64	0,52	0,88	0,61	0,55
n.i. ³	-	0,61	0,53	0,67	0,70	0,76	0,74	0,37	0,75	0,67	0,73	0,83
Cariofileno	1417	2,75	2,53	2,99	2,76	3,28	3,31	2,41	2,69	3,32	2,78	2,94
α -himachaleno	1449	0,53	0,45	0,56	0,52	0,57	0,64	0,41	0,47	0,62	0,54	0,55
n.i. ³	-	0,18	-	-	-	0,22	-	-	0,22	-	-	-
germacreno D	1484	5,92	5,24	6,25	5,46	6,65	6,99	5,10	4,98	6,92	5,67	5,53
α -farneseno	1497	0,46	0,37	0,50	0,45	0,54	0,52	0,33	0,41	0,53	0,43	0,44
δ -cadineno	1522	0,29	-	0,39	0,43	0,43	0,40	-	0,41	0,40	0,38	0,46
Elemol	1548	1,04	0,41	1,15	0,82	1,39	1,02	0,33	0,87	1,14	0,89	0,79
germacreno B	1559	0,44	0,33	0,49	0,42	0,54	0,51	0,30	0,38	0,52	0,43	0,41
γ -eudesmol	1630	0,61	-	1,00	0,68	1,09	0,60	-	0,68	0,75	0,57	0,57
β -eudesmol	1650	0,26	-	0,41	0,35	0,45	0,32	-	0,33	0,40	0,31	0,32
α -eudesmol	1652	0,49	-	0,79	0,60	0,87	0,51	-	0,59	0,68	0,53	0,55
n.i. ³	-	-	-	-	-	0,27	-	-	-	-	-	-
n.i. ³	-	0,28	-	0,36	0,30	0,37	0,30	-	0,28	0,35	0,27	0,26

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas:

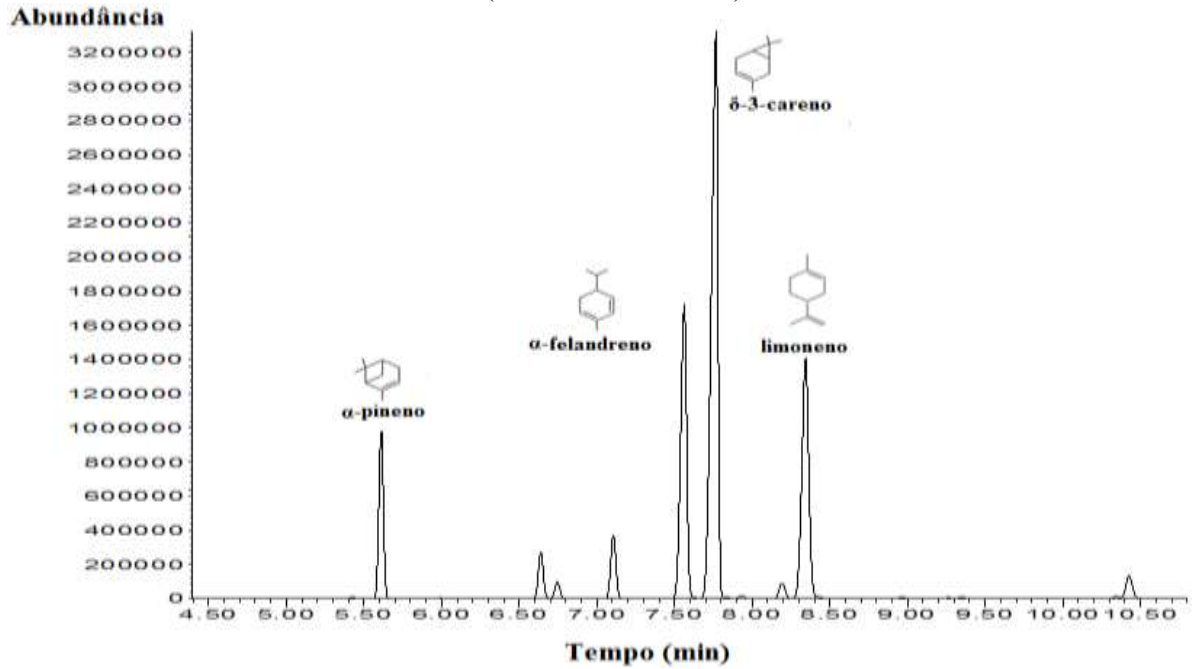
¹Índice de retenção (ADAMS, 2007);

²Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas;

³Não identificado.

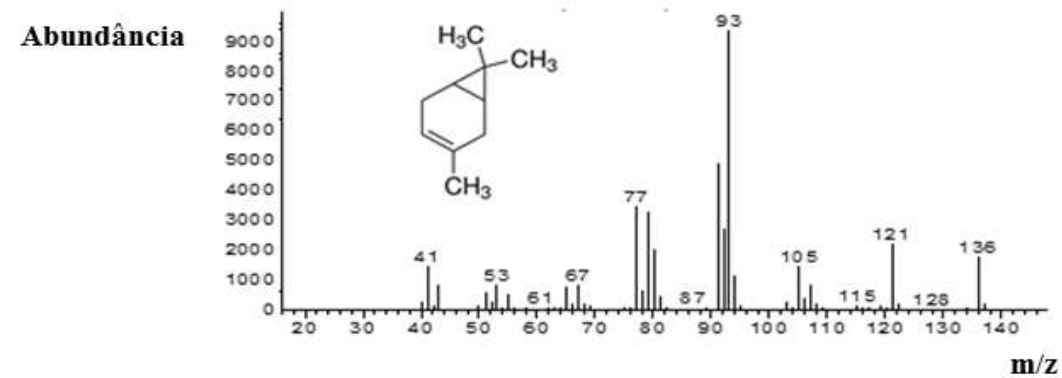
De acordo com os dados da Tabela 3.4, a análise por CG-EM permitiu a detecção de 30 compostos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, sendo que 21 desses compostos foram identificados, o que representa, em média, 97% da composição química do óleo essencial. Os compostos majoritários do óleo essencial foram o δ -3-careno (33,78%-36,73%), α -felandreno (15,67%-17,30%), limoneno (15,03%-16,32%), α -pineno (7,03%-9,20%) e germacreno D (4,98%-6,99%). De forma geral, esses cinco compostos correspondem a mais de 80% da composição química do óleo essencial. A Figura 3.8 apresenta o cromatograma do óleo essencial obtido nas condições operacionais do ponto central do planejamento experimental (ensaio 9 da Tabela 3.2), indicando os monoterpênicos majoritários presentes no óleo essencial. Já a Figura 3.9 apresenta o espectro de massas e a estrutura química do δ -3-careno, componente majoritário do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*.

Figura 3.8 – Cromatograma (CG-EM) e estrutura química dos monoterpenos majoritários do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* obtido nas condições operacionais do ponto central do planejamento experimental (ensaio 9 da Tabela 3.2)

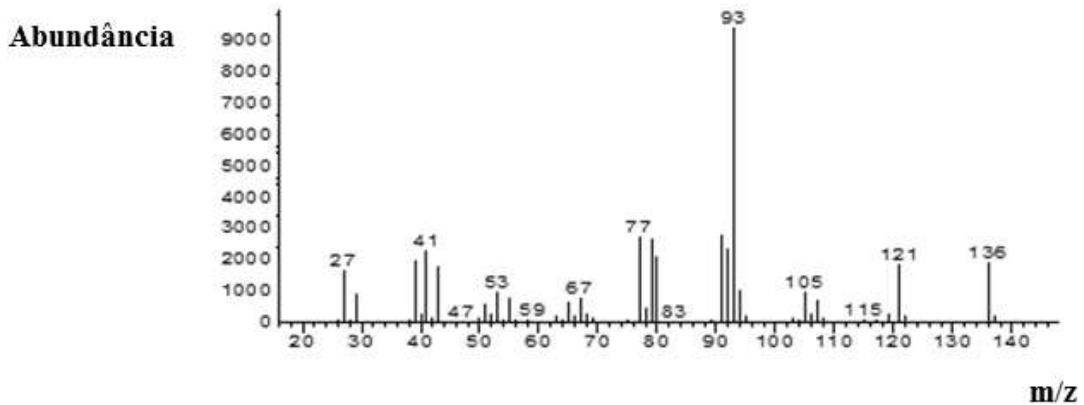


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 3.9 – Espectro de massas para: (a) δ-3-careno; (b) proposto pela espectroteca NIST 05



a)



b)

Fonte: Dados da pesquisa.

Além dos monoterpenos citados anteriormente (δ -3-careno, α -felandreno, limoneno e α -pineno), é válido destacar os compostos germacreno D e cariofileno, que foram os sesquiterpenos majoritários encontrados no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*. Ademais, é importante mencionar que os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados neste trabalho foram semelhantes, com ligeiras variações, aos resultados relatados na literatura para o óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, por exemplo, nos trabalhos de: Barbosa et al. (2007), que citam os compostos majoritários δ -3-careno, α -felandreno, β -felandreno, α -pineno, cariofileno e germacreno D; e Cole et al. (2014), que citam os majoritários δ -3-careno, limoneno, α -felandreno, α -pineno e cariofileno. As variações observadas na composição química do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* podem ser devidas a diversos fatores, tais como o local de colheita dos frutos e suas condições climáticas; a variabilidade genética (quimiotipo) da *S. terebinthifolius*; as etapas de pré-tratamento dos frutos (moagem, secagem, etc.); o tipo de técnica de extração utilizado (hidrodestilação ou arraste a vapor); além das condições operacionais utilizadas nos processos extrativos (BANDONI, 2003; CHAMORRO et al., 2012; KARAM et al., 2016).

3.3.2 EFEITOS DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA HIDRODESTILAÇÃO

Na Tabela 3.5, são apresentados os resultados de rendimento da extração e teores de monoterpenos e sesquiterpenos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, obtido em cada ensaio do DCCR.

Tabela 3.5 – Condições operacionais da hidrodestilação, rendimento da extração e teor de terpenos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*

Ensaio	Razão sólido/água (g/L)	Tempo de extração (h)	Rendimento da extração (%)	Teor de Monoterpenos (%) ¹	Teor de Sesquiterpenos (%) ¹
1	41,05	2,0	5,39	84,01	15,99
2	153,7	2,0	5,83	88,38	11,62
3	41,05	7,0	6,48	82,39	17,61
4	153,7	7,0	6,59	84,61	15,39
5	17,71	4,5	5,60	80,70	19,30
6	177,1	4,5	5,91	81,74	18,26
7	97,40	1,0	6,03	89,04	10,96
8	97,40	8,0	6,74	85,47	14,53
9	97,40	4,5	6,67	81,11	18,89
10	97,40	4,5	6,71	84,59	15,41
11	97,40	4,5	7,02	84,54	15,46

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: ¹Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico do cromatograma.

Segundo o indicado na Tabela 3.5, o rendimento da extração variou de 5,39% (41,05 g/L e 2 horas de extração) a 7,02% (97,4 g/L e 4,5 h), com um desvio padrão de 0,2%. O teor de monoterpenos no óleo essencial variou de 80,70% (17,7 g/L e 4,5 h) a 89,04% (97,4 g/L e 1 h), com um desvio padrão de 2%. Já para os sesquiterpenos, o teor variou entre 10,96% (97,4 g/L e 1 h) e 19,30% (17,7 g/L e 4,5 h), com um desvio padrão de 2%. Estes resultados indicam que o rendimento e a qualidade do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* dependem das condições operacionais do processo de hidrodestilação. Assim, os efeitos padronizados da razão sólido/água e do tempo de extração sobre o rendimento da extração (Figura 3.10a) e o teor de δ -3-careno no óleo essencial (Figura 3.10b) são mostrados nos diagramas de Pareto da Figura 3.10.

Figura 3.10 – Diagramas de Pareto para as respostas: a) rendimento em base seca; b) teor de δ -3-careno no óleo essencial.



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 3.10, a razão sólido/água e o tempo de extração apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial. Esses efeitos estão de acordo com os resultados descritos por Milojevic et al. (2008), na extração de óleo essencial de frutos de *Juniperus communis* L.; e também por Peng, Don e Tahrel (2012), que otimizaram a extração de óleo essencial de rizomas de *Zingiber Cassumunar*. Vale mencionar que, na literatura, não foram encontrados estudos que tenham abordado a influência das condições operacionais da hidrodestilação sobre a qualidade e a quantidade do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*.

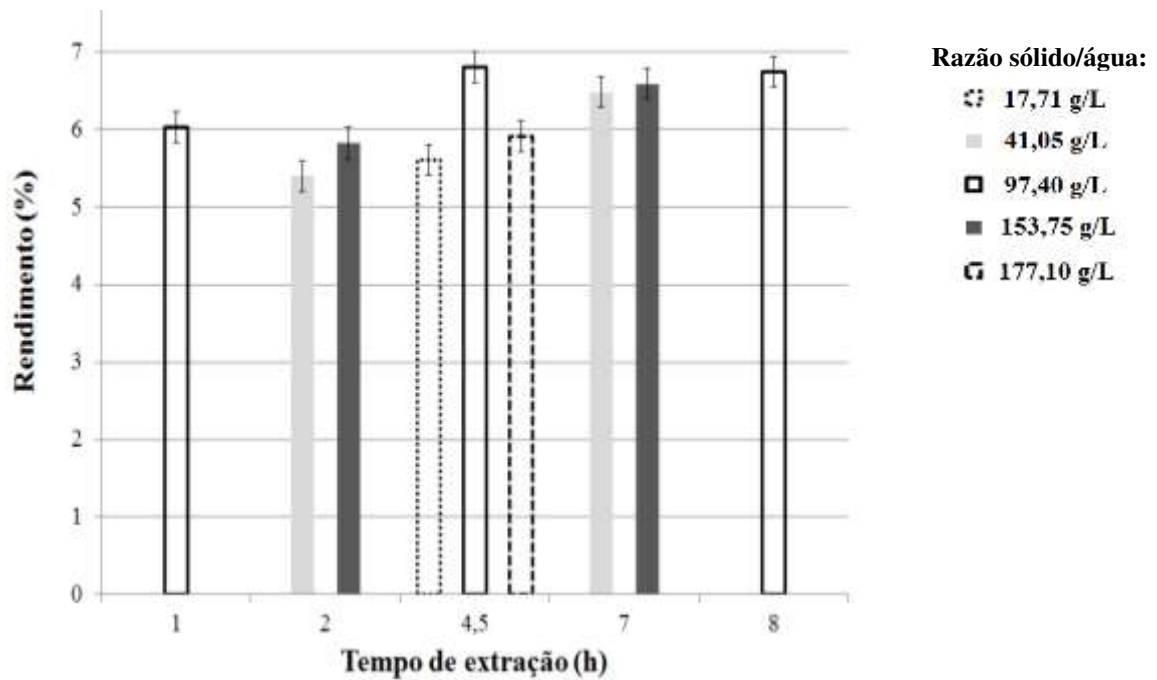
Os efeitos positivos da razão sólido/água sobre as respostas (Figura 3.10) indicam que um aumento dessa variável, do nível mais baixo para o mais alto, ocasiona um aumento no teor de δ -3-careno, bem como no rendimento da extração. O efeito sobre o teor de δ -3-careno está de acordo com o esperado, pois, na hidrodestilação, uma maior quantidade de água (o que ocorre em menores valores de razão sólido/água) facilita a extração de maior número de compostos, o que, conseqüentemente, diminui o teor de δ -3-careno. Por exemplo, no ensaio 1 (41,05 g/L e 2 h) foram extraídos 27 compostos voláteis (Tabela 3.4), enquanto que no ensaio 2 (153,7 g/L e 2 h) apenas 19 compostos foram extraídos e, por conseguinte, um maior teor de δ -3-careno foi observado. De acordo com Milojevic et al. (2008), taxas de extração elevadas são observadas em menores valores de razão sólido/água, provavelmente, devido ao maior contato entre as partículas da matéria-prima e a água, assim, tornando o óleo essencial mais acessível para a destilação.

Ao ter como base o efeito da razão sólido/água sobre o teor de δ -3-careno, esperava-se que uma diminuição na razão sólido/água acarretaria aumento do rendimento devido à extração de um maior número de compostos. De fato, conforme a Tabela 3.5, essa tendência foi observada quando se utilizou 4,5 horas de extração (ensaios 6 e 9), uma vez que a diminuição da razão sólido/água de 177,1 g/L para 97,4 g/L resultou num aumento do rendimento de extração de 5,91% para 6,67%. Em contrapartida, nos ensaios 5 e 9, o aumento da razão sólido/água de 17,7 g/L para 97,4 g/L (em 4,5 horas de extração) resultou em um aumento no rendimento da extração de 5,60% para 6,67%. Assim, estes resultados indicam que baixos valores de razão sólido/água (17,7 g/L e 41,05 g/L) acarretam diminuição do rendimento da extração, provavelmente, devido às perdas intrínsecas de óleo essencial durante a hidrodestilação, bem como durante os procedimentos de separação do óleo essencial da água.

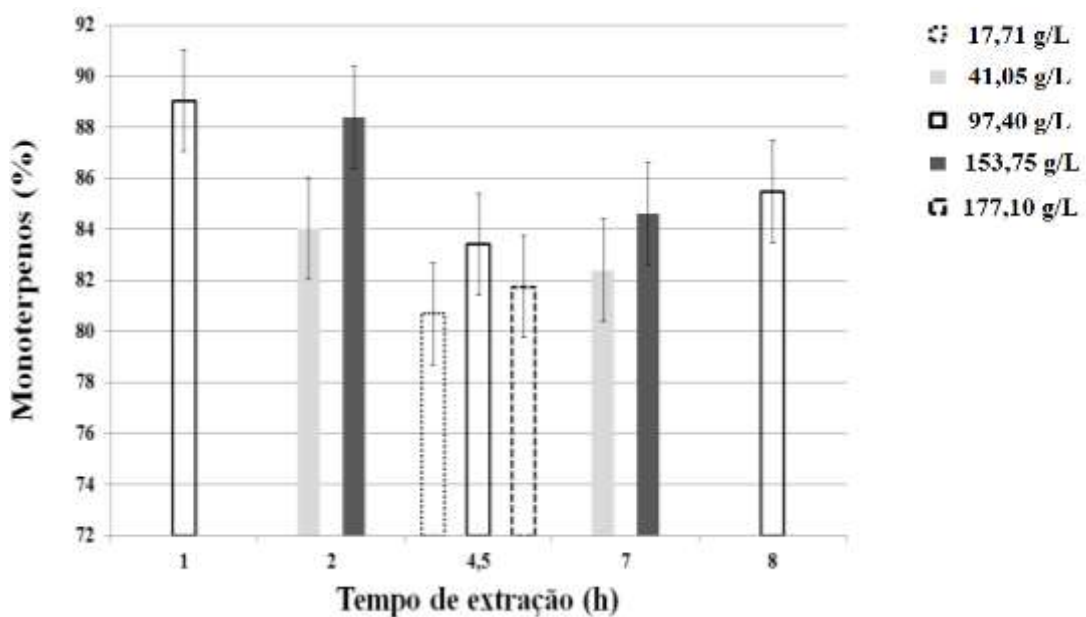
Segundo a *American Spice Trade Association* - ASTA (1968 apud CHARLES; SIMON, 1990; EHLERT et al., 2006), para a quantificação do rendimento de óleo essencial, de forma precisa, é recomendado utilizar no mínimo 75 g da matéria-prima seca, o que diminui as perdas intrínsecas dos procedimentos experimentais da hidrodestilação. Portanto, a perda do óleo essencial com o aumento da quantidade de água pode ser devido ao produto aderido à parede das vidrarias ou até mesmo pode ser atribuída à hidrólise dos constituintes do óleo essencial na presença de uma maior quantidade de água (MILOJEVIC et al., 2008).

Para melhor visualização dos efeitos da razão sólido/água discutidos anteriormente, na Figura 3.11, são apresentados o rendimento e o teor de monoterpenos no óleo essencial em função das condições experimentais do planejamento utilizado neste trabalho (Tabela 3.2).

Figura 3.11 – Respostas do processo de hidrodestilação em função das condições operacionais de extração: a) rendimento em base seca, desvio padrão de 0,2%; b) teor de monoterpenos (área relativa), desvio padrão de 2%.



a)



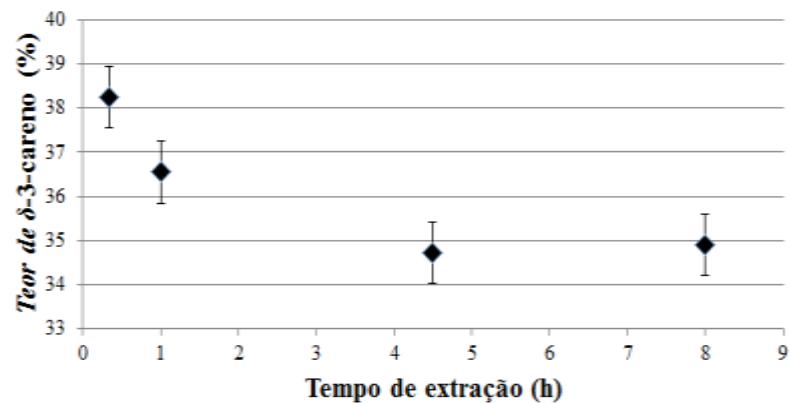
b)

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 3.11, os efeitos da razão sólido/água foram mais evidentes quando se utilizou os menores períodos de extração (2 horas), o que indica que o efeito do tempo de extração é mais pronunciado do que o efeito da razão sólido/água. Assim, de acordo com os diagramas de Pareto da Figura 3.10, o tempo de extração apresentou efeitos

estatisticamente significativos sobre o rendimento da extração e também sobre o teor de δ -3-careno. Como esperado, estes resultados indicam que um aumento no tempo de extração ocasiona um aumento no rendimento do óleo essencial. Em contraste, foi observado um decréscimo no teor de δ -3-careno, quando se utilizou os maiores tempos de hidrodestilação, como se pode visualizar na Figura 3.12.

Figura 3.12 – Variação do teor de δ -3-careno (área relativa), desvio padrão de 0,7%, em função de diferentes períodos de extração utilizados na hidrodestilação



Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Os ensaios foram realizados utilizando uma razão sólido/água de 97,4 g/L.

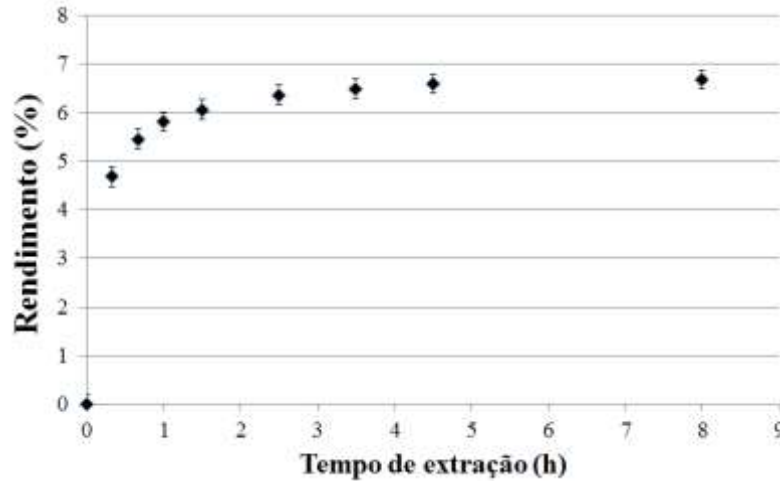
Conforme observado na Figura 3.11b, a mesma tendência foi observada para os monoterpenos, ou seja, deu-se um decréscimo no teor de monoterpenos com o aumento do tempo de extração. Estes resultados podem ser explicados pela extração de um maior número de compostos ao longo do tempo. Por exemplo, no ensaio 7, em que se utilizou um tempo de extração de 1 hora (97,4 g/L), 20 compostos foram extraídos (Tabela 3.4). Por sua vez, quando se utilizou 8 horas de extração (ensaio 8), foram observados 28 compostos no óleo essencial. Obviamente, os compostos adicionais que foram extraídos em tempos mais longos de extração reduziram as porcentagens relativas dos compostos mais leves, como os monoterpenos. Esses componentes extraídos em tempos de extração mais longos, tais como sesquiterpenos, são particularmente menos voláteis que os monoterpenos. Os efeitos do tempo de extração estão em completa concordância com os resultados relatados por Chatzopoulou e Katsiotis (1995), na extração de óleo essencial de frutos de *Juniperus communis*.

3.3.3 CINÉTICA DA HIDRODESTILAÇÃO

Na Figura 3.13, é apresentada a cinética da hidrodestilação em uma razão sólido/água de 97,4 g/L. Lembrando que essa razão foi a mesma utilizada no ponto central do

planejamento experimental (Tabela 3.5), sendo válido ressaltar que tal condição apresentou um dos maiores rendimentos de extração.

Figura 3.13 – Variação do rendimento da extração (desvio padrão de 0,2%) ao longo do tempo, para uma razão sólido/água de 97,4 g/L



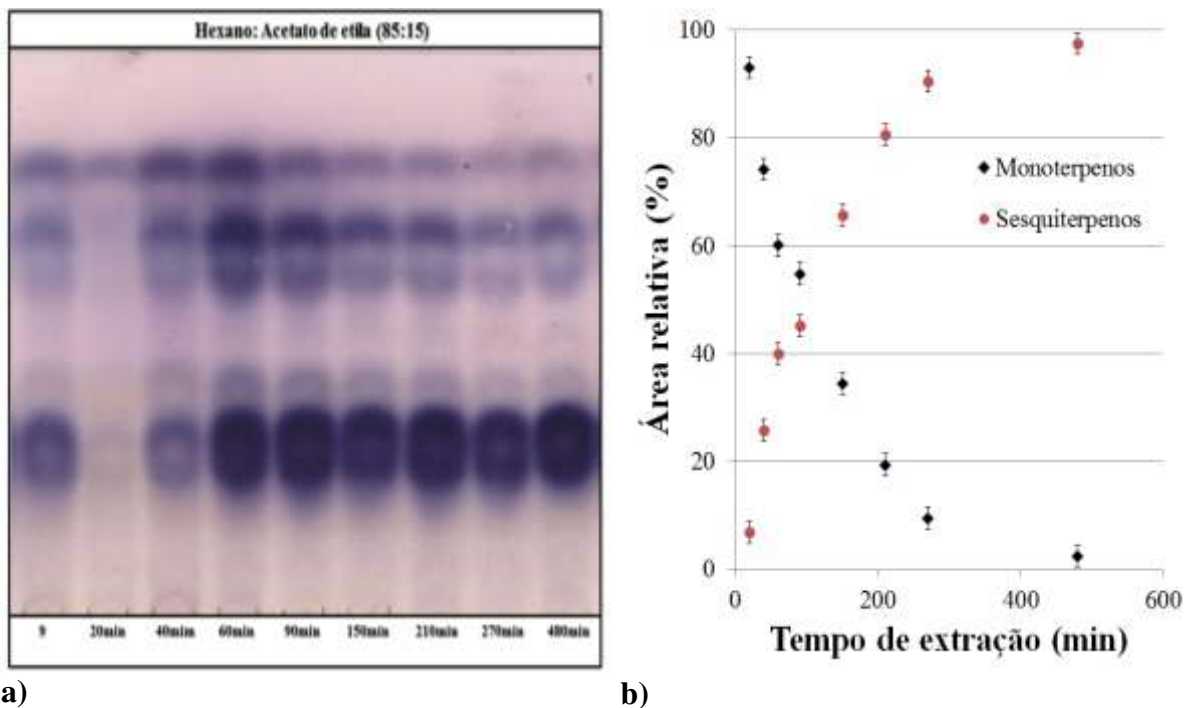
Fonte: Dados da pesquisa.

Pela Figura 3.13, é possível perceber que a cinética da extração apresentou um comportamento típico de processos de hidrodestilação, com dois períodos característicos (MILOJEVIC et al., 2008; PENG; DON; TAHREL, 2012). Durante a fase inicial da hidrodestilação (denominada de *fast oil distillation*), grande quantidade de óleo essencial foi extraída em um tempo muito curto. Por exemplo, em 20 minutos de extração (primeiro ponto da curva indicada na Figura 3.13), aproximadamente, 70% da massa total do óleo essencial foram obtidos. Nesse período, provavelmente, ocorreu a extração do soluto de fácil acesso, ou seja, o produto contido na superfície externa das partículas devido à ruptura das células durante o processo de moagem (o termo “célula” é usado aqui para designar uma cavidade que contém o óleo essencial, e não no sentido biológico da palavra). Na última fase da hidrodestilação (designada por *slow oil distillation*), provavelmente, ocorreu a difusão do óleo essencial (presente nos reservatórios intactos) do interior das partículas para a superfície delas, sendo seguida pela destilação do óleo essencial na superfície. Assim, nesta etapa final da extração, todo o óleo essencial foi retirado do interior das partículas, e a hidrodestilação foi controlada pela difusão do óleo essencial no interior do sólido.

A definição do tempo ideal para a hidrodestilação depende da finalidade para a qual o óleo essencial será utilizado. Assim, como se pode ver na Figura 3.13, se o objetivo for a obtenção de maiores rendimentos, períodos de extração na faixa de 2,5 a 4,5 horas são suficientes para garantir a exaustão da matéria-prima: no tempo de 2,5 horas de extração,

aproximadamente, 95% da massa total do óleo essencial foram obtidos; e, no tempo de 4,5 horas de extração, foram obtidos em torno de 99% da massa final do óleo essencial. Portanto, em termos econômicos, recomenda-se utilizar um tempo de extração próximo de 2,5 horas, pois irá garantir um menor consumo de energia e ainda altos rendimentos de óleo essencial. Por outro lado, se o objetivo for a extração de maior quantidade de sesquiterpenos, períodos mais longos de extração são recomendados para a hidrodestilação, conforme observado na Figura 3.14, que ilustra os perfis cromatográficos (CCD e CG-EM) do óleo essencial obtido ao longo do tempo de extração, utilizando uma razão sólido/água de 97,4 g/L.

Figura 3.14 – Variação na composição química do óleo essencial ao longo do tempo de extração: a) Perfil por CCD; b) Variação no teor de monoterpênicos e sesquiterpenos por CG-EM (área relativa e desvio padrão de 2%)



Fonte: Dados da pesquisa.

Notas:

- 9 é o ensaio do ponto central indicado na Tabela 3.5 (97,4 g/L e 4,5 h);
- O ensaio cinético foi realizado utilizando uma razão sólido/água de 97,4 g/L (períodos de 20 min a 480 min);
- A fase móvel utilizada na CCD foi o sistema hexano:acetato de etila (85:15) e os compostos foram revelados com solução ácida de anisaldeído.

Conforme observado na Figura 3.14a, os perfis por CCD apresentaram, de forma geral, quatro bandas em todos os produtos obtidos ao longo do tempo de extração. Entretanto foram observadas diferenças significativas entre os perfis ao longo do processo de hidrodestilação. Estes resultados qualitativos são melhores discutidos por meio dos resultados da CG-EM (Tabela 3.6), que fornece dados quantitativos da composição química do óleo essencial ao longo do tempo de extração.

Tabela 3.6 – Variação na composição química (CG-EM) ao longo do tempo de extração para a hidrodestilação realizada em uma razão sólido/água de 97,4 g/L

Composto	IR _r ¹	Área relativa (%) ²							
		20 min	40 min	60 min	90 min	150 min	210 min	270 min	480 min
<i>α</i> -pineno	932	9,81	5,27	4,28	5,11	2,71	1,61	0,52	0,14
Sabineno	969	3,03	1,27	0,65	0,46	0,18	-	-	-
<i>β</i> -pineno	974	0,91	0,58	0,46	0,48	0,30	0,23	-	-
<i>β</i> -mirceno	988	3,41	2,60	2,06	1,78	1,08	0,57	0,25	-
<i>α</i> -felandreno	1002	17,68	14,83	11,83	10,48	6,46	3,48	1,60	0,12
<i>δ</i> -3-careno	1008	38,26	31,42	25,83	24,12	15,69	9,08	4,32	0,28
<i>α</i> -terpineno	1014	0,20	0,26	0,29	0,27	0,19	-	-	-
<i>o</i> -cimeno	1022	1,33	0,85	0,63	0,48	0,31	0,25	0,20	-
Limoneno	1024	16,91	14,52	11,57	9,73	6,15	3,24	1,60	0,27
<i>γ</i> -terpineno	1054	-	0,33	0,37	0,34	0,27	0,17	-	-
Terpinoleno	1086	1,51	1,65	1,40	1,13	0,80	0,44	0,25	-
n.i. ³	-	-	0,59	0,69	0,40	0,24	-	-	0,15
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	0,34	0,38	0,29
<i>δ</i> -elemeno	1335	0,28	1,27	1,80	1,78	1,99	1,49	1,20	1,10
Cariofileno	1417	1,77	5,07	6,86	6,90	7,59	6,65	5,76	4,94
n.i. ³	-	-	-	-	-	0,36	0,34	-	0,31
<i>α</i> -himachaleno	1449	0,29	1,03	1,56	1,67	2,01	1,90	1,65	1,40
<i>α</i> -humuleno	1452	-	0,35	0,55	0,57	0,70	0,59	0,52	0,43
<i>γ</i> -muuroleno	1478	-	-	0,31	0,54	1,14	1,52	1,38	1,16
germacreno D	1484	3,43	11,29	14,79	14,02	13,02	8,89	6,23	5,43
n.i. ³	-	-	-	-	-	0,50	0,57	0,51	0,41
<i>α</i> -farneseno	1497	-	0,81	1,28	1,53	1,95	1,91	1,71	1,53
<i>α</i> -muuroleno	1500	-	-	-	0,28	0,57	0,73	0,77	0,68
<i>δ</i> -amorfeno	1511	-	-	-	-	0,53	0,57	0,53	0,45
<i>γ</i> -cadineno	1513	-	-	-	0,28	0,58	0,76	0,80	0,75
<i>δ</i> -cadineno	1522	-	0,55	1,19	1,60	2,70	3,37	3,46	2,90
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	0,27	0,29	0,25
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	0,18	0,21	0,19
Elemol	1548	-	0,80	2,04	3,09	5,82	7,99	8,63	5,55
germacreno B	1559	-	0,79	1,30	1,43	1,79	1,71	1,49	1,06
n.i. ³	-	-	-	-	0,27	0,44	0,56	0,49	-
<i>γ</i> -eudesmol	1630	-	-	0,96	1,88	5,03	9,51	13,85	19,58
n.i. ³	-	-	-	-	0,40	1,08	2,00	2,69	2,76
<i>β</i> -eudesmol	1650	-	-	0,51	1,05	2,94	5,71	8,01	10,36
<i>α</i> -eudesmol	1652	-	-	0,78	1,59	4,36	8,48	12,05	16,13
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	-	0,48	0,50
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	-	0,37	0,73

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas:

¹Índice de retenção (ADAMS, 2007);

²Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas;

³Não identificado.

De acordo com a Tabela 3.6, durante a hidrodestilação, cada classe de terpenos apresentou a sua própria cinética de extração. De forma geral, o teor de monoterpenos diminuiu com o tempo de extração e, conseqüentemente, o teor de sesquiterpenos aumentou ao longo do tempo de extração (Figura 3.14b). Essa mesma tendência foi citada por Barbosa et al. (2007), que também investigaram a cinética da hidrodestilação dos frutos da *S. terebinthifolius*. Os autores referem que, em geral, os monoterpenos foram quase que completamente extraídos durante os primeiros 20 minutos da hidrodestilação, o que indica a influência da volatilidade dos compostos durante o processo de hidrodestilação. De acordo com Chatzopoulou e Katsiotis (1995), durante a fase inicial da hidrodestilação, compostos como os monoterpenos são destilados rapidamente devido à sua volatilidade relativamente elevada. Outra hipótese que pode explicar a variação química dos terpenos, durante a hidrodestilação, sugere que os sesquiterpenos e os monoterpenos estão localizados em diferentes estruturas de armazenamento, conforme citado por Mettal et al. (1988). Assim, o soluto de fácil acesso é composto majoritariamente por monoterpenos, enquanto o soluto de difícil acesso é composto por sesquiterpenos. No entanto estudos específicos são necessários para identificar uma relação definitiva entre esses fenômenos.

3.3.4 OTIMIZAÇÃO DA HIDRODESTILAÇÃO

Mediante os dados experimentais indicados na Tabela 3.5 e com o auxílio do *software* STATISTICA[®], foi avaliado o ajuste de modelos matemáticos (Equação 3.2) para o rendimento da extração (Equação 3.6) e também para o teor de δ -3-careno no óleo essencial (Equação 3.7) em função da razão sólido/água (x_1) e do tempo de extração (x_2), variáveis codificadas segundo a Tabela 3.1.

$$Y_o = 6,80 + 0,124x_1 - 0,522x_1^2 + 0,357x_2 - 0,207x_2^2 \quad (3.6)$$

$$\text{Teor de } \delta\text{-3-careno} = 34,52 + 0,4605x_1 - 0,6612x_2 + 0,6125x_2^2 \quad (3.7)$$

Para avaliar a qualidade de ajuste dos modelos codificados, nas Tabelas 3.7 e 3.8 são apresentados os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os modelos, sendo que os valores apresentados foram gerados pela tabela ANOVA do *software* STATISTICA[®].

Tabela 3.7 – ANOVA do modelo preditivo para o rendimento da extração (Equação 3.6)

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	F_{tab}	R^2
Regressão	2,70	4	0,674	21,1	4,53	0,934
Resíduos	0,192	6	0,0319			
Falta de ajuste	0,118	4	0,0296	0,805	19,2	-
Erro puro	0,0734	2	0,0367			
Total	2,89	10	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda:

F_{cal} : Distribuição de Fischer (calculada).

F_{tab} : Distribuição de Fischer (tabelada).

R^2 : Coeficiente de determinação.

Tabela 3.8 – ANOVA do modelo preditivo para o teor de δ -3-careno (Equação 3.7)

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	F_{tab}	R^2
Regressão	7,51	3	2,50	10,7	4,35	0,821
Resíduos	1,64	7	0,235			
Falta de ajuste	0,797	5	0,159	0,377	19,3	-
Erro puro	0,845	2	0,423			
Total	9,16	10	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda:

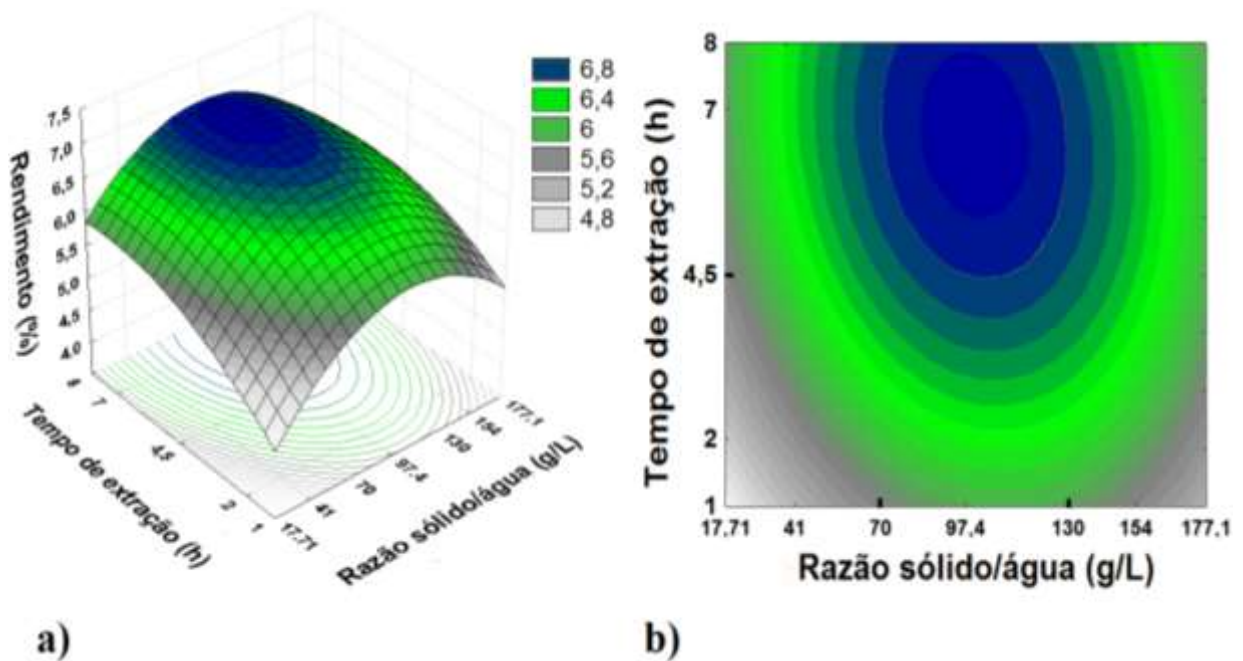
F_{cal} : Distribuição de Fischer (calculada).

F_{tab} : Distribuição de Fischer (tabelada).

R^2 : Coeficiente de determinação.

Segundo os resultados assinalados nas Tabelas 3.7 e 3.8, observa-se que apenas o modelo que descreve o rendimento da extração (Equação 3.6) pode ser considerado válido, pois, de acordo com a Tabela 3.7, verifica-se que: o coeficiente de determinação (R^2) é maior que 0,9; o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} ; e o F_{cal} da falta de ajuste em relação ao erro puro é inferior ao F_{tab} . Desse modo, ao ajustar aos dados experimentais da hidrodestilação, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos, com isso, satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta e curva de nível (Figura 3.15).

Figura 3.15 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para o rendimento da extração, em base seca, em função da razão sólido/água e do tempo de extração



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com o ilustrado pela Figura 3.15 e já relatado anteriormente, o rendimento do óleo essencial depende das condições operacionais da hidrodestilação. Como já discutido, um aumento no tempo da extração acarretou no aumento do rendimento devido à extração de maior número de compostos ao longo do tempo de extração. Já para a razão sólido/água, foram observados dois efeitos opostos: na faixa de 177,1 a 97,4 g/L deu-se um aumento no rendimento com a diminuição da razão sólido/água, devido à extração de um maior número de compostos; já na faixa de 17,1 g/L até aproximadamente 97,4 g/L observou-se diminuição no rendimento com a diminuição da razão sólido/água, provavelmente, devido às perdas intrínsecas de óleo essencial durante a hidrodestilação. Essa mesma tendência do efeito da razão sólido/água foi encontrada por Peng, Don e Tahrel (2012), que realizaram a otimização da extração de óleo essencial de rizomas de *Zingiber Cassumunar*.

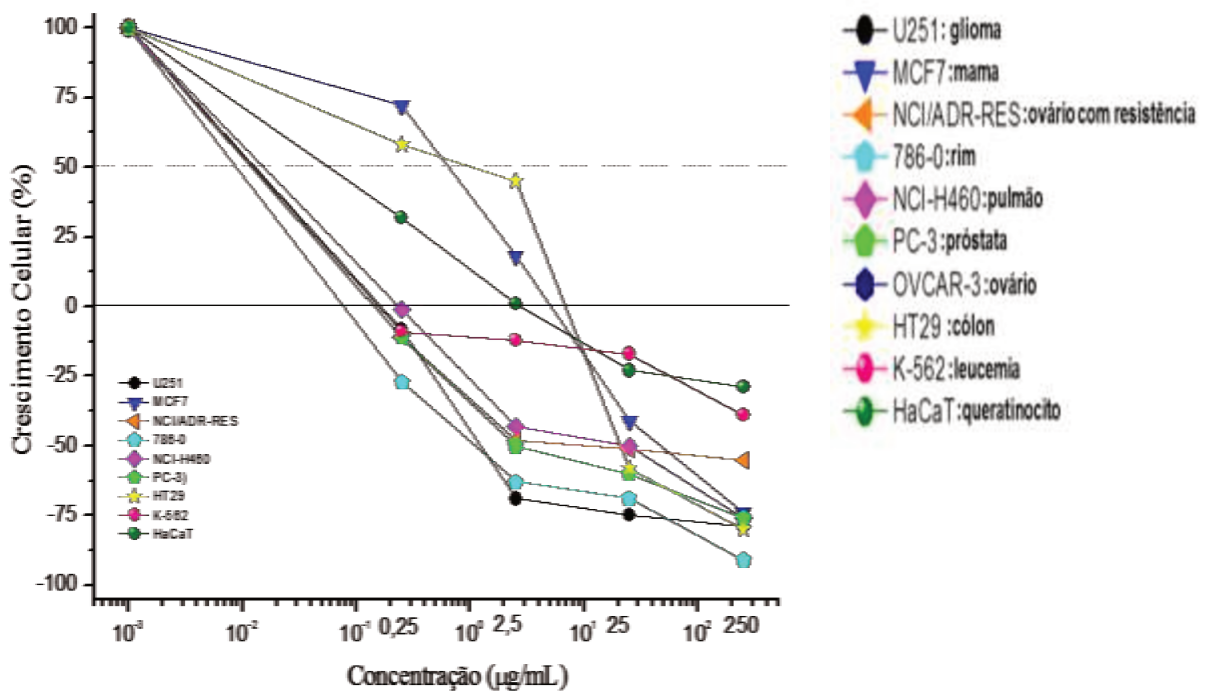
A definição das condições ótimas para a hidrodestilação depende da finalidade para a qual o óleo essencial será utilizado. Portanto, tendo como base a Figura 3.15, se o objetivo for a exaustão da matéria-prima, as seguintes condições deverão ser utilizadas na hidrodestilação ($Y_o \geq 6,8\%$): razão sólido/água de 70 a 130 g/L; e tempo de extração de 4,5 a 8 horas. É válido ressaltar que, em termos de consumo de energia, recomenda-se utilizar o tempo mínimo de extração. Ademais, é interessante mencionar que a faixa de razão sólido/água definida como

ideal está de acordo com os valores recomendados pela Farmacopeia Brasileira para a extração de óleos essenciais em drogas aromáticas (ANVISA, 2010).

3.3.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL

O produto obtido nas condições operacionais da hidrodestilação que resultaram nos maiores rendimentos de extração (com a completa exaustão da matéria-prima) foi utilizado para investigar a atividade antiproliferativa dos compostos voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius*. Assim, na Figura 3.16, são apresentados os resultados dos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* obtido nas condições experimentais do ponto central do DCCR (97,4 g/L e 4,5 horas de extração).

Figura 3.16 – Crescimento celular de cada linhagem celular, após 48 horas de exposição, em função de diferentes concentrações de óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme se pode visualizar na Figura 3.16, o óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* apresentou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa: pouca inibição do crescimento celular para mama e cólon na concentração de 0,25 µg/mL; atividade citostática e seletiva para queratinócito (0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL) e na concentração de 2,5 µg/mL para cólon e mama; e atividade citocida e seletiva na concentração de 0,25 µg/mL para glioma, ovário com resistência, rim, pulmão, próstata, ovário e leucemia.

As concentrações efetivas TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular), para cada linhagem celular, estão indicadas na Tabela 3.9; lembrando que esse parâmetro foi utilizado neste trabalho para mensurar a atividade antiproliferativa.

Tabela 3.9 – Concentração efetiva TGI ($\mu\text{g/mL}$) para cada amostra frente às linhagens testadas

Linhagens celulares	Doxorrubicina²	Óleo essencial
U251 (glioma)	2,58	0,13
MCF7 (mama)	1,47	5,36
NCI-ADR/RES (ovário resistente)	2,35	0,02
786-0 (rim)	1,41	0,04
NCI-H460 (pulmão)	0,34	0,17
PC-3 (próstata)	1,93	0,08
HT29 (cólon)	25	5,75
K562 (leucemia)	2,7	0,08
HaCaT (queratinócito) ¹	0,29	4,48

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹ Linhagem não tumoral humana; ² Controle positivo.

Segundo Fouche et al. (2008), a atividade antiproliferativa pode ser classificada em quatro categorias: inativa ($\text{TGI} > 50 \mu\text{g/mL}$); atividade fraca ($15 \mu\text{g/mL} < \text{TGI} < 50 \mu\text{g/mL}$); atividade moderada ($6,25 \mu\text{g/mL} < \text{TGI} < 15 \mu\text{g/mL}$); e atividade potente ($\text{TGI} < 6,25 \mu\text{g/mL}$). Assim, como exposto na Tabela 3.9, o óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* revelou atividade classificada como potente para todas as linhagens celulares investigadas. Os resultados mais promissores foram contra câncer de rim ($\text{TGI} = 0,04 \mu\text{g/mL}$), ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos ($\text{TGI} = 0,02 \mu\text{g/mL}$), próstata ($\text{TGI} = 0,08 \mu\text{g/mL}$) e leucemia ($\text{TGI} = 0,08 \mu\text{g/mL}$). Portanto, estes resultados indicam que os compostos voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius* são os metabólitos ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa previamente destacada.

Especificamente para o câncer de mama, a atividade foi classificada como potente ($\text{TGI} = 5,36 \mu\text{g/mL}$), o que está de acordo com os resultados de Bendaoud et al. (2010), que citam uma atividade antiproliferativa promissora (citotoxicidade) do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* em uma linhagem de câncer de mama (MCF-7). Esses autores sugeriram que os sesquiterpenos podem ser os metabólitos ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa. De fato, os efeitos citotóxicos dos sesquiterpenos foram previamente descritos em várias linhagens de células tumorais humanas (AHMED et al., 2004; SIBANDA

et al., 2004; LEGAULT; PICHETTE, 2007; LOIZZO et al., 2008; HONG et al., 2014). No entanto estudos adicionais são necessários para estabelecer uma relação definitiva entre esses compostos e a atividade antiproliferativa do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*.

3.4 CONCLUSÕES

A metodologia de superfície de resposta, tendo como base um planejamento fatorial de experimentos, permitiu estabelecer as condições ideais do processo de hidrodestilação dos frutos da *S. terebinthifolius*, para as condições operacionais analisadas neste trabalho. Essa informação é extremamente importante para reduzir os custos de produção, bem como para avaliar os efeitos das condições operacionais da hidrodestilação sobre a qualidade do óleo essencial. Os resultados revelaram que o rendimento e a qualidade do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* foram influenciados tanto pela razão sólido/água como pelo tempo da extração. A cinética da extração apresentou um comportamento típico de processos de hidrodestilação, isto é, exibiu um período inicial de destilação, denominado *fast oil distillation*, seguido do período final conhecido como *slow oil distillation*, em que a difusão do óleo essencial no interior das partículas foi o mecanismo controlador do processo da extração. Para a definição das condições ótimas para a hidrodestilação, é necessário conhecer a finalidade para a qual o óleo essencial será utilizado. Por exemplo, se o objetivo for a obtenção de maiores rendimentos, a hidrodestilação deverá ser realizada nas seguintes condições ótimas: razão sólido/água de 70 a 130 g/L; e tempo de 4,5 a 8 horas de extração, sendo que, em termos de consumo de energia, recomenda-se utilizar o tempo mínimo de extração.

O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*, obtido nas condições de maiores rendimentos, apresentou atividade antiproliferativa classificada como potente para todas as linhagens celulares investigadas, sendo observados resultados mais promissores contra câncer de rim, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, próstata e leucemia. Portanto, estes resultados assinalam que os compostos voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius* são compostos bioativos com potencial interesse farmacológico para o tratamento de alguns tipos de câncer. Os compostos majoritários no óleo essencial foram o δ -3-careno, α -felandreno, limoneno, α -pineno, germacreno D e cariofileno. Sugere-se, para trabalhos futuros, o fracionamento do óleo essencial para o melhor entendimento dos compostos químicos responsáveis por cada atividade antiproliferativa.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DA SECAGEM SOBRE PARÂMETROS QUALITATIVOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi: efeitos sobre compostos voláteis e produção de pimenta-rosa; e modelagem da cinética de secagem

Neste capítulo, explana-se acerca da influência da secagem sobre parâmetros qualitativos dos frutos de *S. terebinthifolius*, sendo investigados modelos matemáticos para a previsão da cinética de secagem.

4.1 INTRODUÇÃO

Assim como a escolha do processo de extração e de suas condições operacionais ideais afetam a produção de óleo essencial, o monitoramento da qualidade da matéria-prima também é fundamental para garantir a qualidade do produto, pois a sua composição química e, conseqüentemente, suas atividades biológicas são influenciadas por etapas de pré-tratamento, tais como a moagem e a secagem. A secagem ainda é o método mais utilizado para a preservação de produtos agrícolas (frutas, legumes, grãos, especiarias, etc.), uma vez que esse processo contribui para a preservação das características originais do produto por longos períodos de armazenamento. Entretanto, caso as condições operacionais da secagem não sejam controladas de forma adequada, alguns efeitos desfavoráveis sobre a matéria-prima processada são observados, como mudanças indesejáveis na coloração do produto e perdas de compostos voláteis (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; FIGIEL et al., 2010; KARAM et al., 2016). Por essa razão, é importante estabelecer a padronização de metodologias de processamento como forma de melhorar a qualidade da matéria-prima, o que é fundamental para a eficácia da cadeia produtiva da indústria de óleos essenciais.

Além de seu uso visando à preservação de princípios ativos, a secagem da matéria-prima é uma etapa de pré-tratamento fundamental para o processo de extração com fluido supercrítico. Assim, matérias-primas contendo mais de 10% de umidade, em base úmida, requerem um processo de secagem antes da extração com fluido supercrítico (MEIRELES, 2003), pois o alto conteúdo de umidade reduz o contato da matriz sólida com o solvente, atuando como uma barreira para a difusão do fluido na amostra, o que pode reduzir o rendimento da extração (SAHENA et al., 2009). Outra aplicação da secagem é no beneficiamento dos frutos da *S. terebinthifolius* para a produção de pimenta-rosa, em que a

secagem é uma etapa indispensável. A produção da pimenta-rosa, embora simples, atende a requisitos rígidos de qualidade impostos pelo mercado externo. A secagem tem como finalidade aumentar a vida de prateleira e agregar valor aos frutos, realçando o sabor e a aparência do produto. Também a remoção de grande parte da água contida no material torna o transporte e a embalagem economicamente mais vantajosos. No entanto, se a secagem não for realizada adequadamente, a qualidade da pimenta-rosa é comprometida, bem como sua comercialização.

Em consonância com o exposto anteriormente, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência da secagem sobre aspectos qualitativos dos frutos da *S. terebinthifolius*, com isso, visando tanto à preservação dos princípios ativos dos óleos voláteis como à produção da especiaria pimenta-rosa. Ademais, modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais da cinética de secagem, em camada delgada, intencionando a simulação do processo, bem como avaliar os fenômenos envolvidos durante a secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 MATÉRIA-PRIMA

Para a realização deste estudo, um segundo lote de frutos da *S. terebinthifolius* foi coletado em maio de 2015 (Lote B), no município de Aracruz, Espírito Santo. Foi realizada uma classificação manual da matéria-prima, sendo separadas impurezas (folhas, galhos, etc.) e também os frutos que se apresentavam danificados e verdes. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas herméticas e mantidas em *freezer* (-18 °C) até o início dos ensaios.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O conhecimento de parâmetros físicos de sistemas particulados é fundamental no projeto, na modelagem e na otimização de muitas operações de processamento de alimentos, tais como a secagem. Embora uma quantidade considerável de dados sobre propriedades importantes para muitos produtos agrícolas já tenha sido relatada na literatura, vale a pena mencionar que nenhum estudo detalhado sobre as propriedades físicas dos frutos da *S. terebinthifolius* foi relatado até o momento. Desse modo, para a caracterização física dos

frutos (frescos e secos), os seguintes parâmetros foram determinados: conteúdo de umidade; diâmetro médio; massa específica; porosidade; “peso” de 1000 frutos; e coloração da matéria-prima (Sistema CIELAB). Para estimar o erro padrão, associado a cada medida, calculou-se o desvio padrão (S) (Equação 4.1), que mede o grau de dispersão dos valores em relação ao valor médio (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (y_i - \bar{y})^2}{l-1}} \quad (4.1)$$

Em que y_i é o valor medido da variável, \bar{y} é a média dos valores medidos e l é número de experimentos realizados. Os métodos empregados na medida de cada parâmetro físico são descritos a seguir.

4.2.2.1 Conteúdo de umidade

Neste trabalho, o conteúdo de umidade em base seca (M) e conteúdo de umidade em base úmida (M^*) foram determinados para analisar a umidade dos frutos de *S. terebinthifolius*. Esses parâmetros estão relacionados por meio da Equação 4.2.

$$M = \frac{M^*}{1 - M^*} \quad (4.2)$$

O conteúdo de umidade em base seca foi determinado por meio da Equação 4.3.

$$M = \frac{m_{su} - m_{ss}}{m_{ss}} \quad (4.3)$$

Em que m_{su} é a massa úmida de sólido e m_{ss} é a massa seca de sólido. A massa seca foi determinada pelo **método de estufa a vácuo**, no qual as amostras foram mantidas em estufa a vácuo (Quimis[®], Q819V2), à temperatura de 70 °C e durante 24 horas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2000; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL, 2008). Essas condições levaram a massas constantes, sendo que este método é fundamentado na perda de umidade e voláteis. Logo após a secagem, o material foi retirado

da estufa e colocado em um dessecador, contendo sílica gel, até esfriar. Em seguida, a massa da amostra foi determinada em balança analítica (SHIMADZU® AUY220, precisão de 0,0001 g).

4.2.2.2 Diâmetro médio dos frutos

Para determinar a granulometria dos frutos da *S. terebinthifolius*, amostras representativas foram classificadas de acordo com a série padrão de peneiras Tyler de 1/4" a 7 mesh (Granutest®). O peneiramento foi realizado utilizando um agitador de peneiras (Bertel®, modelo 302) em frequência máxima e por um tempo de 20 minutos. As massas retidas em cada peneira foram determinadas em uma balança semianalítica (SHIMADZU®, precisão de 0,01 g). O **diâmetro médio de Sauter** (d_{pS}) foi calculado para representar o tamanho médio dos frutos, calculado segundo a Equação 4.4.

$$d_{pS} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i}{D_i} \right)} \quad (4.4)$$

Em que x_i é fração mássica do material retido na i -ésima peneira e D_i é o diâmetro médio das partículas retidas na i -ésima peneira, calculado conforme a Equação 4.5.

$$D_i = \frac{d_i + d_{i-1}}{2} \quad (4.5)$$

Em que: d_i é abertura nominal da i -ésima peneira, pela qual a partícula ficou retida; e d_{i-1} é abertura nominal de uma peneira maior que a i -ésima peneira, pela qual a partícula passou.

4.2.2.3 Massa específica e porosidade

A **massa específica aparente de um fruto** (ρ_p) foi determinada pela razão entre a massa (m_p) e o volume total (aparente) da partícula (V_p), conforme a Equação 4.6.

$$\rho_p = \frac{m_p}{V_p} \quad (4.6)$$

A massa da partícula (m_p) foi determinada a partir das medidas de **peso de 1000 frutos** (W_{1000}), que foi determinado conforme o método descrito pela *International Seed Testing Association* (ISTA, 2008) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009). Assim, a massa de 1000 frutos foi determinada em uma balança analítica (SHIMADZU® AUY220, precisão de 0,0001 g). Considerando os frutos da *S. terebinthifolius* como esferas ($\phi_p = 1$), o volume aparente de um fruto foi calculado (Equação 4.7) em função do diâmetro médio de Sauter.

$$V_p = \frac{\pi d_{pS}^3}{6} \quad (4.7)$$

A **massa específica bulk** (ρ_{bulk}) foi determinada a partir das medidas de massa (m_l) e volume (V_l) de amostras dos frutos de *S. terebinthifolius*, conforme a Equação 4.8.

$$\rho_{bulk} = \frac{m_l}{V_l} \quad (4.8)$$

Para esta análise, uma quantidade conhecida de frutos foi colocada em uma proveta de 2 L, sendo o material acomodado de tal forma que não ficasse compactado. Em seguida, foi realizada a leitura do volume pela escala graduada da proveta. A massa foi determinada por meio de uma balança semianalítica (SHIMADZU®, precisão de 0,01 g). A porosidade *bulk* do leito (ε_b) foi determinada por meio da Equação 4.9.

$$\varepsilon_b = 1 - \frac{\rho_{bulk}}{\rho_p} \quad (4.9)$$

4.2.2.4 Análise colorimétrica

A cor dos frutos da *S. terebinthifolius* foi analisada segundo o sistema CIELAB, com o auxílio de um colorímetro manual (Hunter Lab® Mini Scan XE, Modelo 4510-L). Assim, os parâmetros de cor foram expressos pelas seguintes coordenadas: L^* que mede a variação da luminosidade entre o preto e o branco ($L^*=0$ para preto e $L^*=100$ para branco); a^* que mede a tonalidade vermelha/verde ($+a^*$ =vermelho e $-a^*$ =verde); e b^* que mede a tonalidade amarela/azul ($+b^*$ =amarelo e $-b^*$ =azul). O colorímetro foi previamente calibrado com placas

padrão de cerâmica das cores branca e preta. Para a medição dos parâmetros de cor, foi utilizado como referência o iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. A partir das coordenadas L^* , a^* e b^* foi determinada a diferença de cor total (ΔE), calculada conforme a Equação 4.10, que permite avaliar a alteração de cor total do produto em relação a uma amostra padrão.

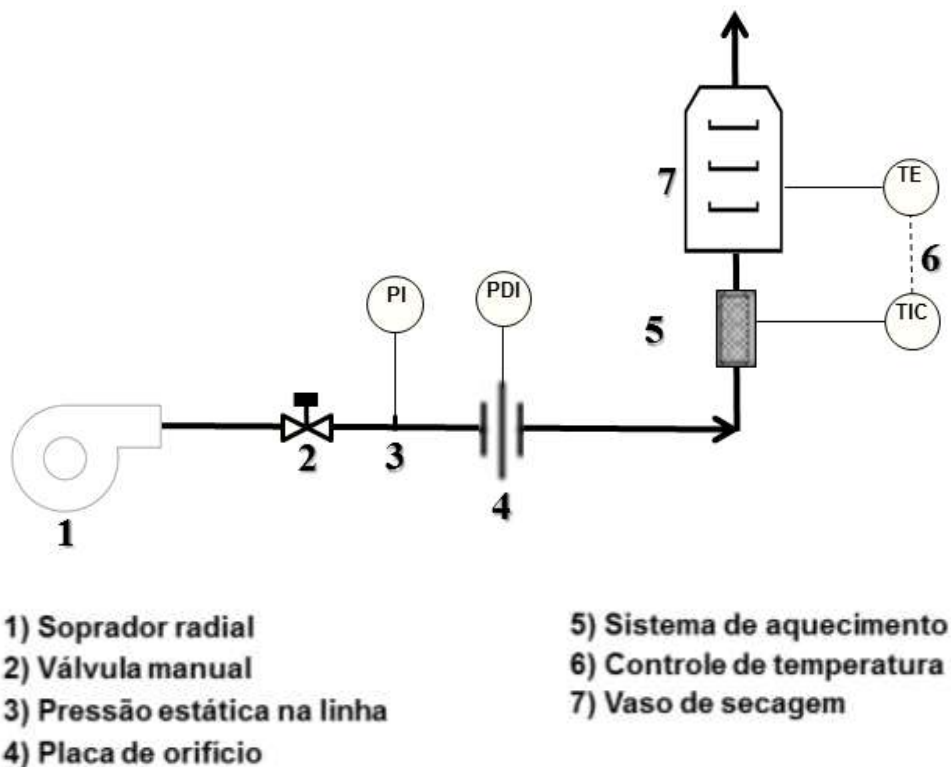
$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (4.10)$$

Em que L_0^* , a_0^* , b_0^* são os valores da amostra adotada como referência para avaliar as diferenças de cor.

4.2.3 SECADOR

A secagem dos frutos da *S. terebinthifolius* foi realizada em um secador convectivo de bandejas com fluxo de ar ascendente (Figura 4.1). O equipamento está instalado no Laboratório de Fluidodinâmica e Secagem (LFS), da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da UNICAMP, e foi gentilmente cedido para a realização deste trabalho.

Figura 4.1 – Diagrama esquemático do secador de bandeja



O secador (Figura 4.1) foi alimentado com ar, à temperatura ambiente, por um **soprador radial (1)** do tipo CRE-02, com motor de 0,75 cv e acoplado a um filtro e atenuador. O ajuste da vazão de ar no sistema foi realizado por uma **válvula manual (2)**. No secador, o ar escoou pela tubulação e passou por um **ponto de tomada de pressão estática na linha (3)**, acoplado a um **manômetro diferencial de tubo em “U” (5)**, que utiliza água como fluido manométrico e possui um dos lados abertos para a pressão atmosférica. Em seguida, o ar passou por uma **placa de orifício (4)**, com 20 mm de diâmetro de orifício e acoplada a um manômetro diferencial de tubo em “U”, que, também, utiliza água como fluido manométrico. As duas tomadas de pressão forneceram dados que foram utilizados para determinar a vazão mássica de ar no equipamento (Q). Desse modo, a vazão mássica de ar, em kg/min, foi calculada por meio da Equação 4.11 (OWER; PANKHURST, 1977).

$$Q = R_1 \cdot \gamma \cdot \alpha \cdot A_2 \sqrt{\frac{I}{1 - m_1^2} \cdot \Delta h \cdot \frac{P}{R_2 + T}} \quad (4.11)$$

Em que Δh é a queda de pressão na placa de orifício (em cmH₂O), T é temperatura do ar a montante da placa de orifício e P é a pressão barométrica local. Se os valores obtidos para a temperatura e a altura barométrica são dados em °C e mmHg, respectivamente, então: $R_1=0,0573$ e $R_2=273$. No ensaio de calibração da placa de orifício, a temperatura média do ar na entrada da placa e a pressão barométrica local eram, respectivamente, 27 °C e 718 mmHg.

A tubulação do secador possuía um diâmetro de 3,175 cm; e a placa de orifício, uma abertura com diâmetro de 2 cm. Desse modo, $A_1=7,92 \text{ cm}^2$ e $A_2=3,14 \text{ cm}^2$, sendo A_1 a área da tubulação e A_2 a área do orifício da placa. Logo, na Tabela 4.1, são apresentados os parâmetros adimensionais.

Tabela 4.1 – Parâmetros adimensionais para o cálculo da vazão mássica de ar

Parâmetros Adimensionais	Equação	Valor
m_1	A_2/A_1	0,40
α	$0,5959 + 0,0312m_1^{1,05} - 0,184m_1^4$	0,60
β	$0,3041 + 0,0876m_1 - 0,1166m_1^2 + 0,4089m_1^3$	0,35

Fonte: Ower e Pankhurst (1977).

Na Equação 4.11, γ é o fator de compressibilidade, que foi calculado com o auxílio da Equação 4.12.

$$\gamma = 1 - \frac{\beta \cdot \Delta h}{P_1 + P} \quad (4.12)$$

Em que P_1 é a pressão estática na linha de ar, em cmH₂O, obtida por meio de um ponto localizado a montante da placa de orifício. No ensaio de calibração da placa de orifício, aumentou-se gradativamente a vazão de ar por meio da abertura da válvula, e a cada valor escolhido eram lidas as respectivas quedas de pressão na placa de orifício e a pressão estática na linha, além da temperatura do ar a montante da placa de orifício. Dessa maneira, foi obtida a curva de calibração (vazão mássica do ar em função da queda de pressão na placa de orifício) para a placa de orifício do secador de bandeja (Apêndice A). A velocidade do ar de secagem (u) foi calculada por meio da Equação 4.13.

$$u = \frac{Q}{A_3 \cdot \rho} \quad (4.13)$$

Em que A_3 é a área da seção transversal do vaso de secagem (aproximadamente 0,02 m²) e ρ é massa específica do ar de secagem. O **sistema de aquecimento de ar (6)** do secador está situado logo após a placa de orifício e é constituído de quatro resistências elétricas ligadas a um **sistema de controle de temperatura (7)**. Este sistema é formado por um controlador (N1200-485, Novus) conectado a um indicador digital de temperatura (termopar tipo T) posicionado antes da bandeja. O **vaso de secagem (8)** do equipamento, com abertura na parte superior, é constituído de um tubo cilíndrico com fundo e topo cônicos, feito de chapa de ferro. Possui 70 cm de altura e 16 cm de diâmetro interno. O vaso contém três aberturas com portas, por onde se colocam as bandejas, sendo que neste trabalho apenas a bandeja do meio foi utilizada. A **bandeja metálica (9)** utilizada foi construída em tela de arame de malha fina e tem aproximadamente 7,2 cm de diâmetro interno e 2 cm de altura.

4.2.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

De forma geral, o procedimento experimental consistiu em duas etapas: na primeira etapa, executou-se a secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*; e, na segunda etapa, foi realizada a caracterização física e também a extração de compostos voláteis do produto seco. Desse modo, para estudar a influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem sobre a qualidade dos frutos, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

com 11 experimentos (Tabela 4.2). Os ensaios foram realizados em ordem aleatória, sendo que os dados experimentais foram analisados com o auxílio do *software* STATISTICA®, utilizando um nível de significância fixa de 5%.

Tabela 4.2 – Planejamento experimental para o estudo da secagem em camada delgada

Ensaio	Temperatura do ar (°C) ¹	Velocidade do ar (m/s) ¹
1	40,9 (-1)	0,39 (-1)
2	69,1 (+1)	0,39 (-1)
3	40,9 (-1)	0,81 (+1)
4	69,1 (+1)	0,81 (+1)
5	35,0 (-1,41)	0,60 (0)
6	75,0 (+1,41)	0,60 (0)
7	55,0 (0)	0,30 (-1,41)
8	55,0 (0)	0,90 (+1,41)
9	55,0 (0)	0,60 (0)
10	55,0 (0)	0,60 (0)
11	55,0 (0)	0,60 (0)

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Valores codificados entre parênteses.

Os ensaios de secagem foram realizados no secador convectivo de bandeja descrito na Seção 4.2.3 deste trabalho. Inicialmente, o soprador do equipamento (1) foi ligado, e a velocidade do ar foi ajustada por meio da válvula manual do sistema (2). Em seguida, as resistências elétricas (6) foram ligadas e a temperatura do ar de secagem foi ajustada no controlador de temperatura (7). Após a estabilização do sistema, a umidade relativa do ar de secagem na entrada da bandeja foi medida com um termo-higrômetro (Ummi®), e assim foi durante todo o processo de secagem. Para a preparação do leito de secagem, os frutos *in natura* foram distribuídos uniformemente na bandeja (espessura do leito de 1 cm) e a massa do conjunto (bandeja + amostra) foi determinada em uma balança analítica (ADA®, modelo 210L e precisão de 0,0001 g). Em seguida, a bandeja foi colocada dentro do secador por meio da abertura do vaso de secagem, e o processo de secagem foi iniciado (tempo zero) com o ar fluindo de forma ascendente através do leito fixo de frutos. Em cada um dos experimentos de secagem (Tabela 4.2), foi analisada a cinética do processo, coletando dados de massa em tempos fixados previamente até o equilíbrio. Os resultados foram registrados em intervalos de 5 minutos até as duas primeiras horas do processo, depois, a cada 10 minutos, até atingir

quatro horas do processo; e, a cada 15 minutos, até que as variações da massa das amostras fossem insignificantes.

Ao final do processo de secagem, realizou-se a caracterização física dos frutos secos mediante os seguintes parâmetros: conteúdo de umidade; diâmetro médio; massa específica; porosidade; peso de 1000 frutos; e coloração (Sistema CIELAB). A extração do óleo essencial dos frutos secos foi realizada por hidrodestilação em aparelho Clevenger, conforme o método descrito na Seção 3.2.2 deste trabalho (razão sólido/água de 97,4 g/L e 4,5 horas de extração). Para a caracterização química dos compostos voláteis foi utilizada a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, modelo HP-6890) com espectrômetro de massas (Agilent Technologies, modelo HP-5975). As condições operacionais da CG-EM são as mesmas descritas na Seção 3.2.4 deste trabalho.

4.2.5 MODELAGEM DA CINÉTICA DE SECAGEM

Os dados experimentais da cinética de secagem, para todas as condições estudadas (Tabela 4.2), foram ajustados a vários modelos matemáticos, sendo realizada a comparação de modelos clássicos de secagem com modelos fundamentados nas Redes Neurais Artificiais (RNAs).

4.2.5.1 Cinética de secagem por modelos clássicos

Os modelos clássicos de secagem (Equações de 2.1 a 2.5 da Tabela 2.1) foram ajustados com o auxílio do *software* STATISTICA[®]. A estimativa dos parâmetros dos modelos foi realizada pela minimização da função objetivo (soma dos quadrados dos resíduos), sendo utilizado o método de otimização de Quasi-Newton.

A validação dos modelos foi realizada mediante a análise de gráficos de dispersão (dados experimentais *versus* dados preditos pelo modelo): quando os dados se apresentavam na forma de uma reta coincidente com a diagonal, em que o coeficiente linear se aproximava de zero; e o coeficiente angular e o coeficiente de determinação (R^2) eram próximos de 1,0, o modelo foi considerado adequado. Esses parâmetros, juntamente com a Raiz do Erro Médio Quadrático (*RMSE*), calculada conforme a Equação 4.14, foram utilizados para definir os modelos mais adequados para prever a cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N e_i^2}{N}} \quad (4.14)$$

Em que $\sum_{i=1}^N e_i^2$ é o somatório do erro ao quadrado; e N é o número de pontos experimentais da cinética de secagem. Para uma melhor visualização do ajuste do modelo, também foi calculado o valor do erro de ajuste ($e_i = valor_{real} - valor_{predito}$).

4.2.5.2 Modelagem por Redes Neurais Artificiais

Neste trabalho, várias topologias de RNAs foram investigadas para a previsão da cinética de secagem dos frutos de *S. terebinthifolius*. Para que a modelagem por RNAs seja eficiente, é necessário utilizar um banco de dados que garanta um mapeamento para qualquer par entrada/saída que seja introduzido na RNA e que faça parte de seu domínio. Nesse sentido, o uso do planejamento de experimentos permitiu a exploração de um espaço experimental amplo, com a utilização de poucos experimentos de secagem. Assim, a partir dos ensaios indicados na Tabela 4.2, foi organizado um banco de dados constituído por oito experimentos, que foram utilizados na etapa de treinamento das RNAs (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), e por três experimentos que foram utilizados na etapa de verificação/validação dos modelos (3, 4 e 11). Os conjuntos de treinamento e verificação das RNAs foram expandidos usando interpolação de dados por **spline cúbica** com o auxílio do *software* MATLAB[®]. Esta etapa foi realizada com o objetivo de obter dados em intervalos iguais de tempo (5 em 5 minutos). Inicialmente, o banco de dados possuía 600 vetores, mas, após a interpolação, esse número passou para 1118 vetores: 818 para o treinamento e 300 para a verificação das RNAs.

O banco de dados também foi normalizado, procurando-se, dessa maneira, eliminar eventuais problemas relacionados às diferentes magnitudes dos dados. Para cada variável, foram assumidos os valores +1 para o seu maior valor real ($X_{i,máximo}$) e -1 para o seu menor valor real ($X_{i,mínimo}$). Assim, para a transformação dos valores reais em valores codificados, foi determinada a Equação 4.15, que relaciona as variáveis codificadas (z_i) com as variáveis reais (X_i).

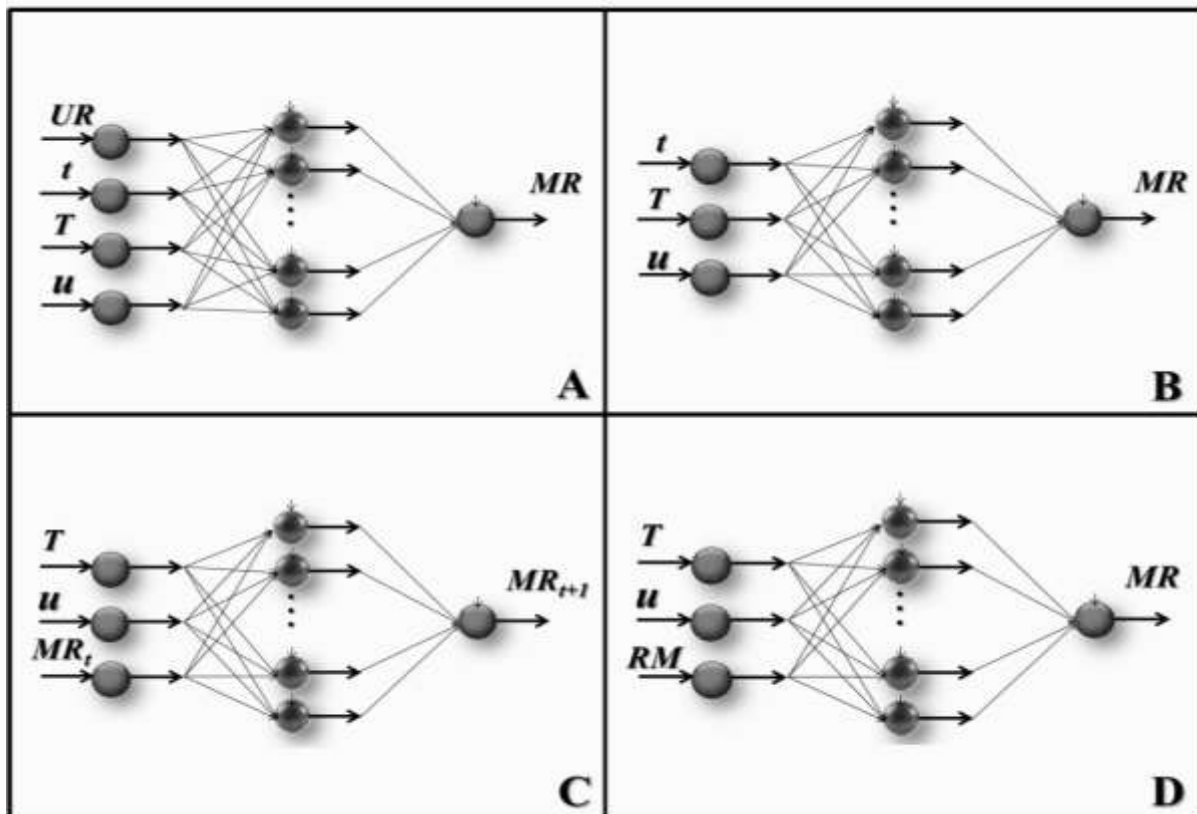
$$z_i = 2 \left(\frac{X_i - X_{i,mínimo}}{X_{i,máximo} - X_{i,mínimo}} \right) - 1 \quad (4.15)$$

Essa normalização foi realizada no MATLAB[®], utilizando o comando **premnmx**. Os dados de saída da RNA foram desnormalizados utilizando a Equação 4.16, sendo que, no MATLAB[®], foi utilizado o comando **postmnmx**.

$$X_i = \frac{(X_{i,máximo} - X_{i,mínimo}) \cdot (z_i + 1)}{2} + X_{i,mínimo} \quad (4.16)$$

Para determinar a melhor arquitetura da RNA, várias topologias comumente aplicadas à modelagem de secagem foram investigadas e suas performances de previsão foram avaliadas. O número de neurônios de entrada e saída depende das variáveis dependentes e independentes do processo, respectivamente. Assim, três e quatro neurônios na camada de entrada foram investigados. A Figura 4.2 mostra as características dos quatro modelos neurais investigados neste trabalho (topologias A, B, C e D).

Figura 4.2 – Topologias de RNAs utilizadas para a modelagem da cinética de secagem



Fonte: Acervo do autor.

Legenda: UR : umidade relativa; T : temperatura; u : velocidade do ar de secagem; t : tempo; MR : umidade adimensional; RM : massa de ar de secagem/massa seca de matéria-prima.

Conforme observado na Figura 4.2, em todas as topologias, a temperatura (T) e a velocidade do ar de secagem (u) foram utilizadas como entrada da RNA, sendo que a

topologia A apresentou também a umidade relativa do ar de secagem (UR) como entrada da RNA. Veja-se, também, que, nas topologias A e B, o tempo (t) foi utilizado como uma das entradas da RNA, em pertinência ao relatado nos trabalhos de Movagharnejad e Nikzad (2007), Ceylan (2008), Topuz (2010), Singh e Pandei (2011), Balbay, Şahin e Karabatak (2011), Perazzini, Freire e Freire (2013) e Silva, Fileti e Taranto (2015). Nas topologias C e D, o tempo não foi utilizado como entrada da RNA: na topologia C, o tempo foi substituído pelo conteúdo de umidade em um momento antes da saída prevista pela rede, como utilizado na RNA desenvolvida por Kaminski, Tomczak e Strumill (1998); e, na topologia D, o tempo foi substituído pela razão entre a massa de ar de secagem (m_{ar}) e a massa seca de matéria-prima utilizada na secagem (m_{leito}), de acordo com a Equação 4.17.

$$RM = \frac{m_{ar}}{m_{leito}} \quad (4.17)$$

A massa do ar de secagem foi calculada a partir dos dados de vazão mássica do ar de secagem e do tempo de secagem. Em todas as modelagens, a variável de saída de interesse foi a umidade adimensional (MR) dos frutos da *S. terebinthifolius*, calculada conforme a Equação 2.6. Para realizar as modelagens e simulações, foi utilizado como ferramenta computacional o software MATLAB[®] (*Neural Network Toolbox*). No Apêndice B, encontra-se o programa desenvolvido, que, de forma geral, apresenta as seguintes etapas: carregamento do banco de dados; normalização dos dados; divisão dos dados (treinamento e verificação); definição da arquitetura da RNA; treinamento; e verificação da RNA. Em todas as modelagens investigadas, foi utilizada uma RNA do tipo *feedforward* (**newff** no software MATLAB[®]), formada por três camadas: uma camada de entrada; uma camada oculta; e uma camada de saída. A função de ativação utilizada no neurônio da camada de saída foi a função linear (**purelin** no software MATLAB[®]). Na camada oculta, a função de ativação dos neurônios foi a função tangente hiperbólica (**tansig** no MATLAB[®]), calculada segundo a Equação 4.18.

$$f(x)_{atv} = \frac{1 - e^{-x}}{1 + e^{-x}} \quad (4.18)$$

Em que x é a soma das entradas dos neurônios ocultos. Para a etapa de treinamento das RNAs, foi utilizado o algoritmo de treinamento de Levenberg-Marquardt com regularização bayesiana (função **trainbr** no software MATLAB[®]). Em cada topologia de RNA, o número de neurônios da camada oculta foi determinado buscando-se um ajuste eficaz do modelo

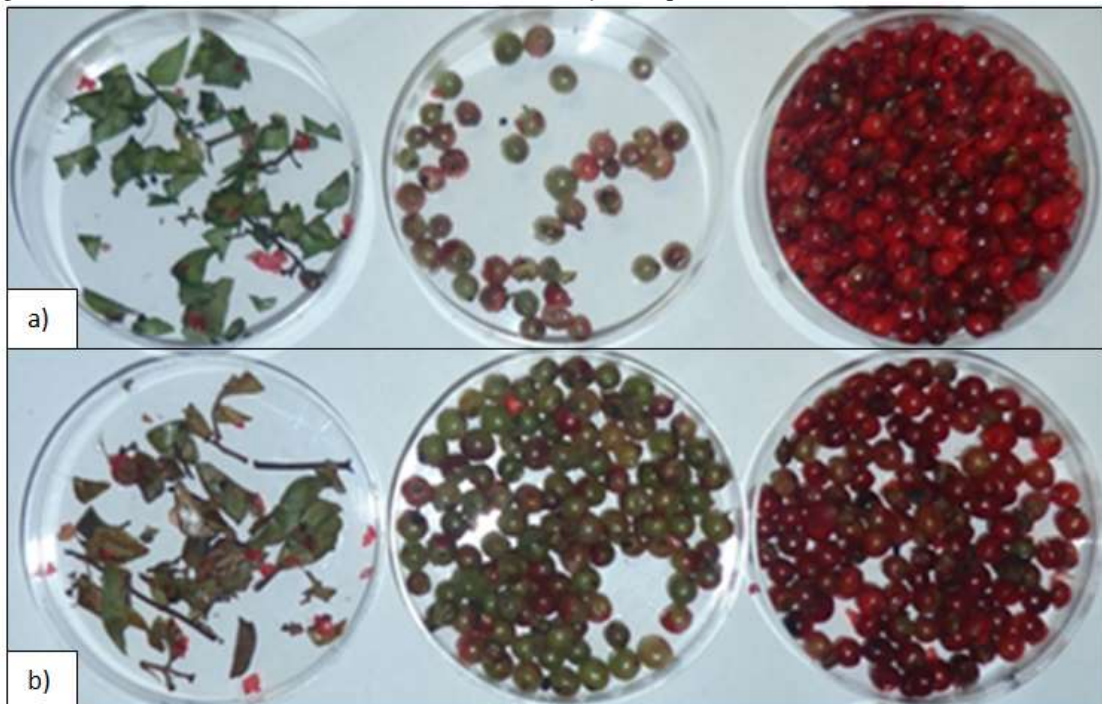
neural aos dados de verificação. Desse modo, durante as modelagens, o número de neurônios ocultos foi aumentado e, para cada número fixo de neurônios, foram realizados vários treinamentos até encontrar o melhor ajuste da RNA aos dados de verificação. Após a etapa de treinamento, foi realizada a etapa de verificação da rede (validação), sendo apresentados novos dados de entrada, obtendo-se, assim, por simulação, os dados de saída desejados. O valor determinado pelo modelo neural foi então comparado ao valor real por meio da análise dos gráficos de dispersão (dados experimentais de verificação *versus* dados preditos pelo modelo neural). O valor de *RMSE* para cada modelagem foi calculada conforme a Equação 4.14, tanto para a etapa de treinamento como para a etapa de verificação das RNAs.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Como citado anteriormente, um segundo lote de frutos da *S. terebinthifolius* (Lote B) foi coletado para a realização deste estudo: o lote coletado em 2015 apresentou 50% de frutos maduros, 46% de frutos verdes e 4% de impurezas (folhas, galhos, etc.). Lembrando que o Lote A, coletado em 2014, apresentou 83% de frutos maduros, 13% de frutos verdes e 4% de impurezas. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 4.3, que ilustra as amostras *in natura* dos dois lotes que foram classificados.

Figura 4.3 – Amostras *in natura* de frutos da *S. terebinthifolius* que foram classificadas: a) Lote A; b) Lote B



Fonte: Acervo do autor.

Na Figura 4.3, verificam-se diferenças significativas entre os dois lotes coletados no mesmo local (Aracruz-ES), porém em datas diferentes (2014 e 2015), principalmente em relação ao grau de maturação dos frutos. Para melhor discussão dessas diferenças, nas Tabelas 4.3 e 4.4, são expostos os resultados da caracterização física dos dois lotes coletados para o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 4.3 – Caracterização física dos frutos *in natura* de *S. terebinthifolius* (Lotes A e B)

Amostra	$M (-)^1$	$\rho_{bulk} (g/cm^3)^2$	$W_{1000} (g)^3$	$d_{pS} (cm)^4$	$\rho_p (g/cm^3)^5$	$\varepsilon_b (-)^6$
Lote A	0,694±0,009	0,413±0,01	38,0±0,8	0,470±0,004	0,70±0,05	0,41±0,04
Lote B	1,62±0,02	0,543±0,02	54,6±0,9	0,496±0,003	0,85±0,08	0,36±0,06
Lauriano et al. (2005)	0,442	-	-	0,465	0,32	0,33
Silva, Fileti e Taranto (2015)	0,512	0,306	-	0,470	0,56	0,46

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Conteúdo de umidade em base seca; ²Massa específica *bulk*; ³Peso de 1000 frutos; ⁴Diâmetro médio dos frutos; ⁵Massa específica aparente de um fruto; ⁶Porosidade *bulk*.

Tabela 4.4 – Análise colorimétrica (sistema CIELAB) dos frutos *in natura* de *S. terebinthifolius* (Lotes A e B)

Amostra	L^*	a^*	b^*	ΔE^1
Lote A	23,57±0,9	25,33±1	16,57±0,4	-
Lote B	22,91±1	12,08±2	19,74±0,7	13,70±1

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: ¹Em relação ao Lote A.

Nas Tabelas 4.3 e 4.4, pode-se perceber que todas as medidas apresentaram repetibilidade, isso indicado pelos baixos valores do desvio padrão. Ao comparar os resultados deste trabalho com os valores determinados por Lauriano et al. (2005) e Silva, Fileti e Taranto (2015), são observados desvios significativos, principalmente para as massas específicas. Esses desvios são devidos à influência do conteúdo de umidade de diferentes amostras de frutos de *S. terebinthifolius*, resultado de diferentes condições ambientais e de cultivo, local de coleta, etapas de pré-tratamento da matéria-prima, entre outros fatores.

Na Tabela 4.3, conforme citado anteriormente, são observadas diferenças significativas entre os dois lotes coletados neste trabalho, principalmente em relação ao conteúdo de umidade: o Lote B apresentou um conteúdo de umidade em base seca de 1,62; e o Lote A, um valor de 0,69. Essa diferença na umidade da matéria-prima impactou nas outras características físicas dos frutos da *S. terebinthifolius*. Com relação à coloração dos frutos da *S. terebinthifolius*, na Tabela 4.4, é possível detectar que o Lote B apresentou frutos com coloração avermelhada (a^* e b^* positivos) e de baixa luminosidade (L^* baixo), como esperado para essa espécie vegetal. Porém, quando comparado ao Lote A, evidenciou-se uma diferença de cor total (ΔE) de 13,70. Este resultado foi devido, principalmente, às diferenças observadas no parâmetro a^* , que mede a tonalidade vermelha/verde. O Lote A apresentou um valor médio do parâmetro a^* mais que o dobro do valor do Lote B, o que indica uma coloração mais avermelhada para o Lote A devido ao seu maior grau de maturação. Vale mencionar que, na literatura, não foram encontrados estudos que determinassem a coloração de frutos da *S. terebinthifolius*.

As diferenças observadas entre lotes coletados no mesmo local (Aracruz- ES), porém em datas distintas, podem ter sido causadas pelas mudanças climáticas ocorridas na região de produção dos frutos da *S. terebinthifolius*. Segundo a Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG, 2016), do final de 2014 até 2016, o estado do Espírito Santo enfrentou uma das maiores secas de sua história. Por causa dessa estiagem, a produção agrícola do estado foi afetada, o que inclui também a produção de frutos da *S. terebinthifolius*.

4.3.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Além das distintas características físicas, a utilização de diferentes lotes pode resultar em diferentes atividades biológicas devido à variação química do óleo essencial. Nas Figuras 4.4 e 4.5, são apresentados os resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* do óleo essencial obtido com os diferentes lotes *in natura* (Lotes A e B) dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Os valores de TGI calculados para essas amostras estão dispostos na Tabela 4.5. Os experimentos de atividade antiproliferativa *in vitro* foram realizados segundo a metodologia descrita na Seção 3.2.5 deste trabalho.

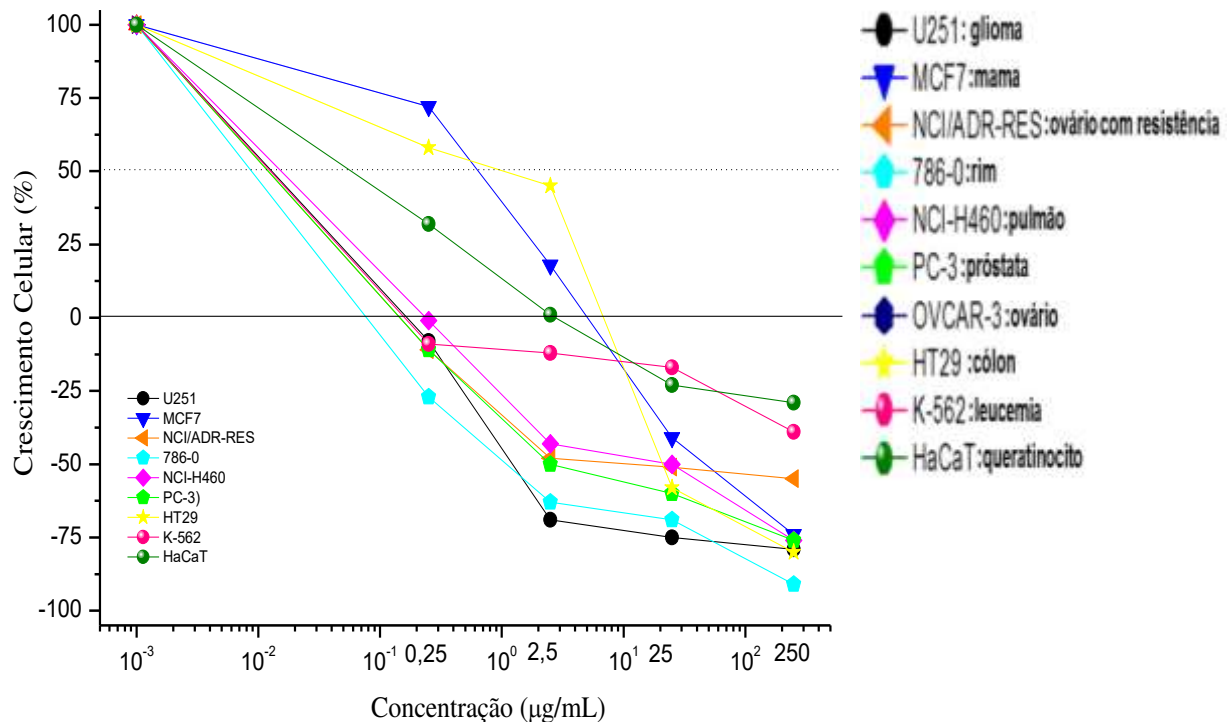
Tabela 4.5 – Concentração efetiva TGI ($\mu\text{g/mL}$) para cada amostra (Lotes A e B) frente às linhagens testadas

Linhagens celulares	Doxorrubicina ²	Lote A	Lote B
U251 (glioma)	2,58	0,13	8,86
MCF7 (mama)	1,47	5,36	13,58
NCI-ADR/RES (ovário com resistência)	2,35	0,02	28,72
786-0 (rim)	1,41	0,04	19,17
NCI-H460 (pulmão)	0,34	0,17	13,32
PC-3 (próstata)	1,93	0,08	5,64
HT29 (cólon)	25	5,75	68,05
K562 (leucemia)	2,7	0,08	10,21
HaCaT (queratinócito) ¹	0,29	4,48	6,37

Fonte: Dados da pesquisa.

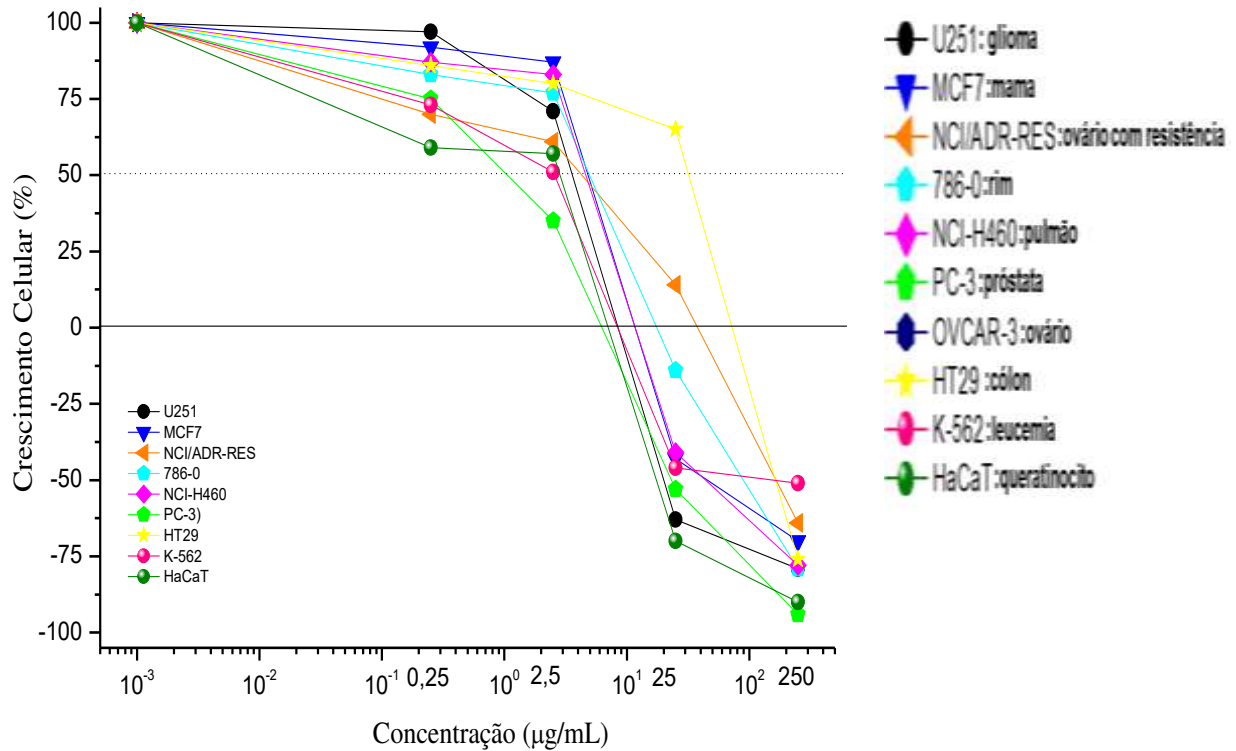
Notas: ¹Linhagem celular não tumoral; ² Controle positivo.

Figura 4.4 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* do Lote A (frutos *in natura*) após 48 horas de exposição



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 4.5 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* do Lote B (frutos *in natura*) após 48 horas de exposição



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados apresentados nas Figuras 4.4 e 4.5 e Tabela 4.5 revelaram uma melhor atividade para o óleo essencial obtido a partir dos frutos do Lote A. De acordo com o TGI (Tabela 4.5), o óleo essencial do Lote A apresentou uma melhor atividade para leucemia (TGI=0,08 µg/mL), câncer de rim (TGI=0,04 µg/mL), ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (TGI=0,02 µg/mL) e próstata (TGI=0,08 µg/mL). Em contrapartida, o óleo essencial do Lote B exerceu atividade potente apenas contra câncer de próstata (TGI=5,64 µg/mL), porém com atividade menos potente que a observada para o óleo essencial do Lote A.

Portanto, estes resultados apontam que o óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, obtidos de diferentes lotes, apresentaram variações na atividade antiproliferativa de acordo com a composição química do mesmo (descrita na Seção 4.3.3.4). Assim, estes resultados mostram a importância do controle da qualidade da matéria-prima, pois a qualidade de um produto agrícola depende diretamente das condições ambientais da região de produção, além de fatores como localização geográfica, fatores ecológicos, variabilidade genética, entre outros fatores.

4.3.3 EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM

Neste trabalho, a influência da secagem sobre aspectos qualitativos dos frutos da *S. terebinthifolius* foi investigada visando tanto à preservação de compostos voláteis como à produção da pimenta-rosa. A qualidade do produto foi mensurada principalmente pelo conteúdo de umidade, integridade, cor e compostos voláteis. Nas próximas seções deste trabalho, os efeitos das condições operacionais da secagem sobre esses parâmetros são discutidos detalhadamente.

4.3.3.1 Efeitos sobre o conteúdo de umidade

Na Tabela 4.6, são descritas as condições operacionais dos experimentos de secagem e, também, as respostas analisadas ao final do processo de secagem em camada delgada.

Tabela 4.6 – Condições operacionais e respostas do processo de secagem

Ensaio	UR (%) ¹	M _o (-) ²	M* _o (%) ²	M _e (-) ³	M* _e (%) ³	t _e ⁴ (min)
1	22	1,62	61,8	0,103	9,34	690
2	6	1,62	61,8	0,0378	3,64	270
3	23	1,62	61,8	0,118	10,5	705
4	7	1,63	62,0	0,0528	5,01	300
5	31	1,62	61,8	0,157	13,6	840
6	5	1,64	62,1	0,0216	2,12	240
7	11	1,64	62,1	0,0574	5,43	495
8	13	1,64	62,1	0,0778	7,22	510
9	12	1,63	62,0	0,0586	5,54	495
10	13	1,62	61,8	0,0684	6,40	510
11	13	1,62	61,8	0,0854	7,87	480

Fonte: Dados da pesquisa.

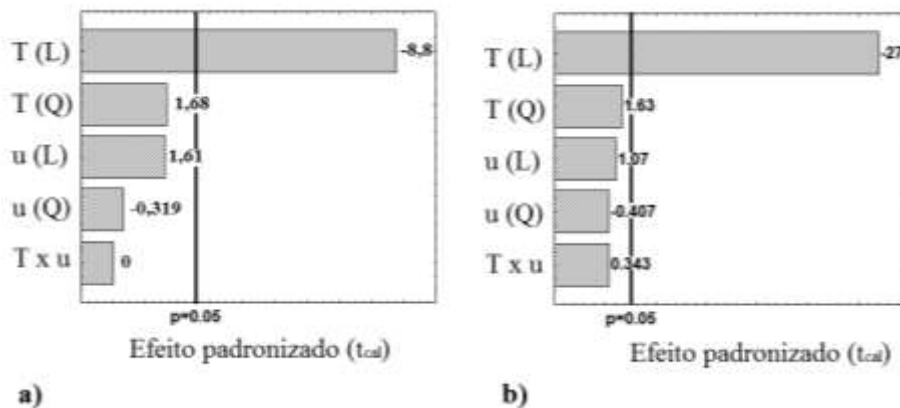
Notas: ¹Umidade relativa do ar de secagem; ²Conteúdo de umidade inicial dos frutos (M: conteúdo de umidade em base seca; M*: conteúdo de umidade em base úmida); ³Conteúdo de umidade final dos frutos; ⁴Tempo final de secagem.

Como já mencionado neste trabalho, a secagem é uma etapa primordial no processamento da pimenta-rosa, sendo realizada para evitar o crescimento microbiano e a ação enzimática. Assim, o conteúdo de umidade é um ponto crítico que deve ser monitorado a fim de evitar a degradação do produto, sendo recomendado um conteúdo de umidade o mais baixo possível ($M^* \leq 12\%$) (BRASIL, 2005). Como exposto na Tabela 4.6, inicialmente, os

frutos da *S. terebinthifolius* apresentavam conteúdo de umidade, em base úmida, variando entre 61,8% a 62,1%. Após a secagem, o conteúdo de umidade variou de 2,1% (75 °C e 0,6 m/s) a 13,6% (35 °C e 0,6 m/s). Desse modo, verificou-se que a secagem realizada à temperatura de 35 °C resultou em um produto com conteúdo de umidade acima de 12%, sendo observado também que para esta temperatura foi necessário um elevado tempo de secagem, o que, em termos econômicos, é uma desvantagem.

Como observado na Tabela 4.6, o tempo final de secagem (tempo para alcançar a umidade de equilíbrio) variou de 4 horas (75 °C e 0,6 m/s) a 14 horas (35 °C e 0,6 m/s). Assim, estes resultados mostram que o aumento da temperatura de 35 °C para 75 °C, e a consequente diminuição da umidade relativa do ar de secagem de 31% para 5%, reduziu a umidade final dos frutos (conteúdo de umidade de equilíbrio), bem como o tempo necessário para a secagem devido ao aumento das taxas de secagem. Assim, os efeitos padronizados das condições operacionais da secagem em camada delgada sobre o conteúdo de umidade em base seca, e, também, sobre o tempo final da secagem, são exibidos nos diagramas de Pareto da Figura 4.6.

Figura 4.6 – Diagrama de Pareto: a) conteúdo de umidade final em base seca (M_e); b) tempo final de secagem (t_e)

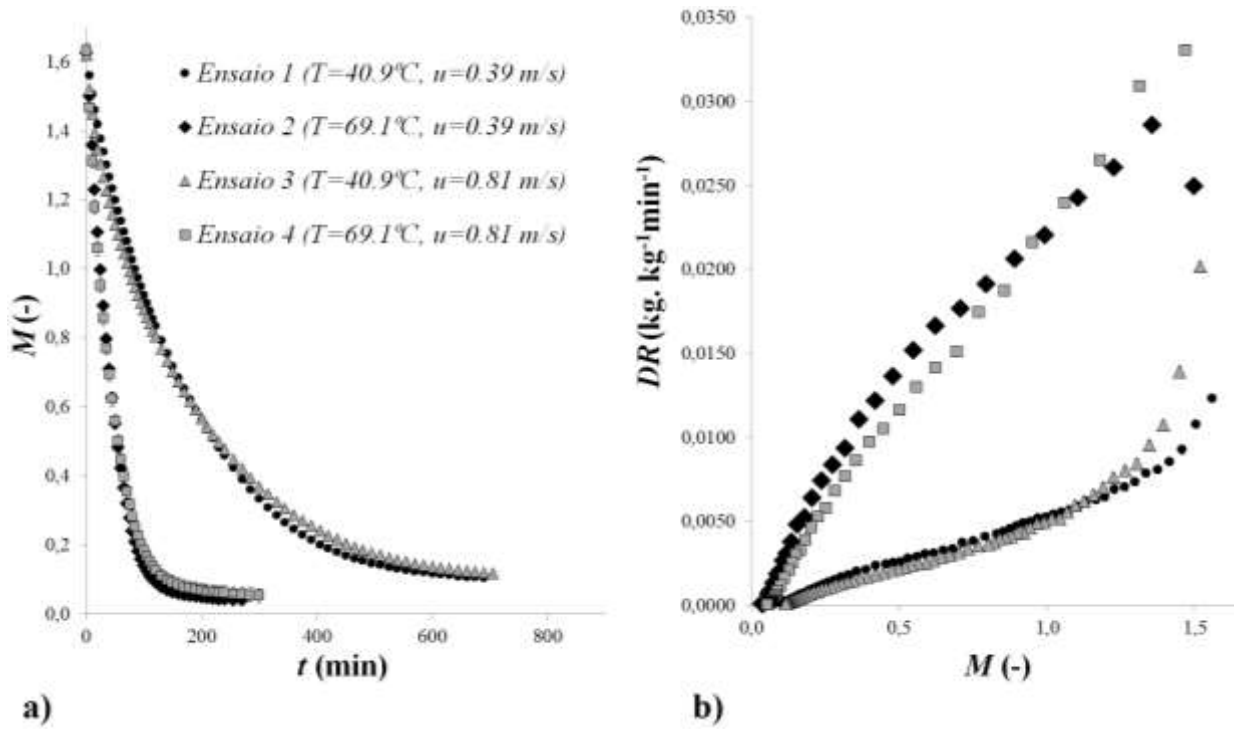


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: T: temperatura; u: velocidade do ar de secagem.

Conforme observado na Figura 4.6, apenas a temperatura do ar de secagem apresentou efeitos significativos (negativo) sobre as respostas analisadas, com um nível de confiança de 95%. Estes resultados indicam que o aumento da temperatura resultou em frutos com menor conteúdo de umidade, como já esperado. Além disso, o aumento da temperatura resultou em menor tempo de secagem devido ao aumento das taxas de secagem a elevadas temperaturas. Esses efeitos podem ser observados também nas curvas da cinética de secagem nas Figuras 4.7 e 4.8.

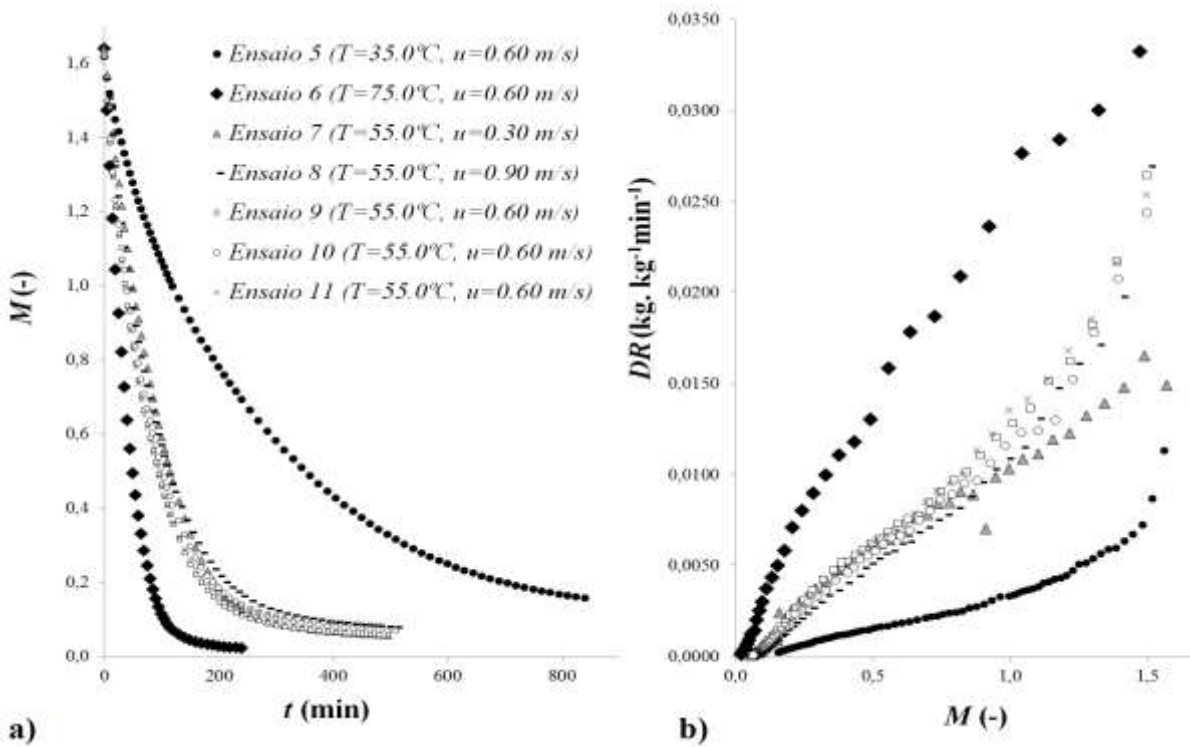
Figura 4.7 – Resultados experimentais para os ensaios de 1 a 4 (Tabela 4.2): a) cinética de secagem; b) taxas de secagem (DR)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: M : conteúdo de umidade em base seca; t : tempo; T : temperatura; u : velocidade do ar de secagem.

Figura 4.8 – Resultados experimentais para os ensaios de 5 a 11 (Tabela 4.2): a) cinética de secagem; b) taxas de secagem (DR)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: M : conteúdo de umidade em base seca; t : tempo; T : temperatura; u : velocidade do ar de secagem.

Como ilustram as Figuras 4.7 e 4.8, nas temperaturas mais elevadas, evidenciaram-se as maiores taxas de secagem, o que possibilitou que a umidade de equilíbrio do sólido fosse alcançada mais rapidamente. Além disto, ao final da secagem, foram obtidos frutos com menor conteúdo de umidade em função da baixa umidade relativa do ar de secagem a altas temperaturas. O aumento da taxa de secagem está relacionado ao aumento da difusividade da umidade a temperaturas mais elevadas, assim, promovendo maior e mais rápida remoção de água no sólido. Desse modo, o aumento da temperatura proporcionou um aumento na quantidade de calor transferida para o leito, assim, aumentando a taxa de evaporação de água na superfície e também a velocidade com que a umidade do interior da amostra migra para a superfície. É interessante mencionar que, na secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, o que está sendo analisado é um conjunto de frutos (leito fixo), e não apenas um fruto, sendo que o transporte de umidade, além de ocorrer no interior do fruto, dá-se nos interstícios entre os frutos até alcançar a superfície do leito de secagem.

De acordo com o observado nas Figuras 4.7 e 4.8, a velocidade do ar de secagem apresentou pouca influência em comparação ao grande efeito da temperatura do ar de secagem sobre a redução da umidade dos frutos da *S. terebinthifolius*. Durante os períodos iniciais da secagem, quando os frutos tinham alto conteúdo de umidade, maiores taxas de secagem foram observadas nas maiores velocidades do ar de secagem. Porém, à medida que o processo de secagem foi sendo realizado, o efeito da velocidade do ar não foi mais significativo, pois, provavelmente, a resistência interna à transferência de massa foi o fator controlador do processo de secagem.

Com relação aos períodos característicos da secagem, nas curvas apresentadas nas Figuras 4.7 e 4.8, é observado apenas o período de taxa decrescente de secagem. Desse modo, a transferência de massa foi controlada pela difusão da umidade no interior do fruto, que é uma característica comum na secagem de produtos agrícolas. Tal comportamento é consistente com a literatura publicada anteriormente sobre a secagem dos frutos de *S. terebinthifolius* (SILVA; FILETI; TARANTO, 2015) e também com outros frutos e sementes (JAYAS; SOKHANSANJ, 1989; ARAL; BESE, 2016; PANDIAN; RAJKUMAR, 2016). Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que nos alimentos as moléculas de água tendem a ser firmemente mantidas pelo sólido (MAZZA; LEMAGUER, 1980).

Na Figura 4.8, é possível observar a repetibilidade dos dados experimentais de secagem no ponto central do planejamento (ensaios 9, 10 e 11). Assim, foi observado que tanto as curvas da cinética como as curvas da taxa de secagem se sobrepuseram ou apresentaram comportamentos próximos, dessa maneira, convalidando os dados

experimentais. Lembrando que o desvio padrão médio relacionado à medida de conteúdo de umidade em base seca é 0,02.

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 4.6 e com o auxílio do *software* STATISTICA[®], foi avaliado o ajuste de um modelo matemático para o conteúdo de umidade dos frutos da *S. terebinthifolius* (Equação 4.19) em função da temperatura do ar de secagem (T), variável codificada segundo a Tabela 4.2.

$$M^* = 6,48 - 3,43T + 0,675T^2 \quad (4.19)$$

Para avaliar a qualidade de ajuste do modelo, na Tabela 4.7 são apresentados os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para o modelo, sendo que os valores indicados foram gerados pela tabela ANOVA do *software* STATISTICA[®].

Tabela 4.7 – ANOVA para o modelo preditivo para o conteúdo de umidade (Equação 4.19)

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	96,83	2	48,42	41,78	4,459
Resíduos	9,271	8	1,159		
Falta de ajuste	6,495	6	1,082	0,7797	19,33
Erro puro	2,776	2	1,388		
Total	106,1	10	-	-	-
R=0,9553					

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda:

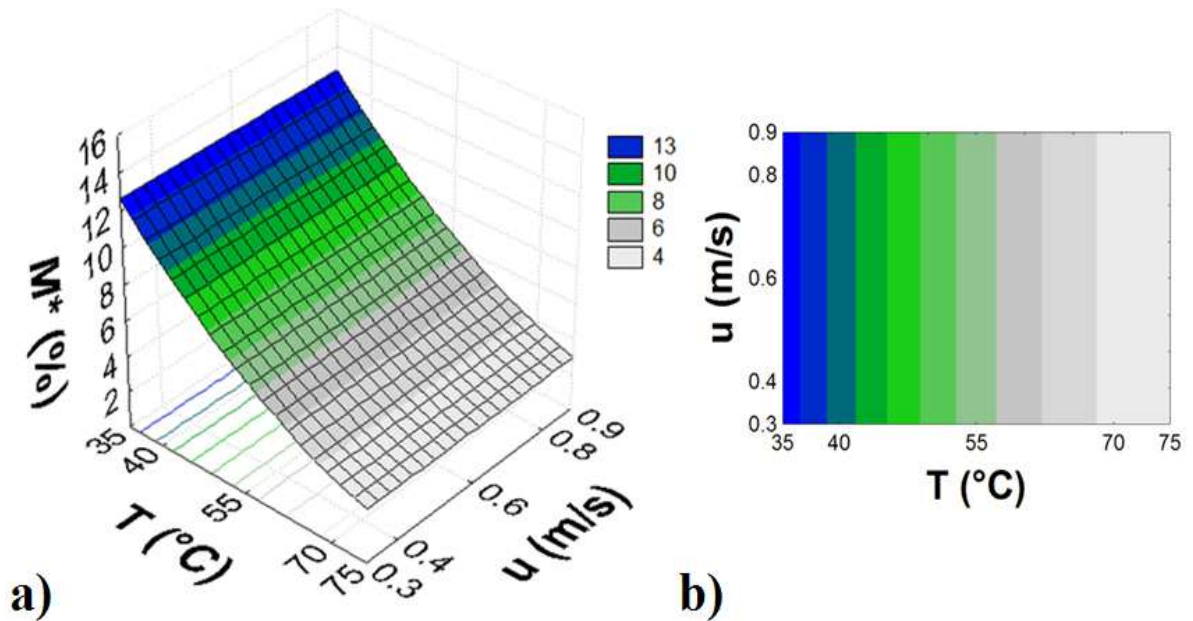
F_{cal} : Distribuição de Fischer calculada.

F_{tab} : Distribuição de Fischer tabelada.

R: Coeficiente de correlação.

Mediante a análise dos resultados da Tabela 4.7, é possível inferir que o modelo pode ser considerado válido devido às seguintes análises: o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} ; o F_{cal} da falta de ajuste em relação ao erro puro é inferior ao F_{tab} ; e o coeficiente de correlação é maior que 0,9. Portanto, ao ajustar aos dados experimentais, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos, com isso, satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta e da curva de nível (Figura 4.9).

Figura 4.9 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para o conteúdo de umidade em base úmida (M^*) em função da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u)



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 4.9, é possível verificar novamente que temperatura do ar de secagem foi a variável mais influente na secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*. Conforme abordado anteriormente, para a preservação de produtos naturais, recomenda-se um conteúdo de umidade, em base úmida, igual ou menor a 12% (BRASIL, 2005). Assim, como ilustrado na Figura 4.9, temperaturas do ar de secagem entre 40 $^{\circ}\text{C}$ e 75 $^{\circ}\text{C}$ devem ser utilizadas para garantir uma umidade adequada ao produto ($M^* \leq 12\%$). Entretanto essa faixa de temperatura deve ser investigada no tocante a outros parâmetros de qualidade, como a integridade, a coloração do produto e a perda de compostos voláteis durante a secagem a temperaturas elevadas.

4.3.3.2 Efeitos sobre a integridade dos frutos

Na Tabela 4.8, são apresentados os resultados dos parâmetros físicos dos frutos da *S. terebinthifolius* determinados após o processo de secagem (ensaios de 1 a 11 nas condições de secagem indicadas na Tabela 4.2).

Tabela 4.8 – Parâmetros físicos dos frutos de *S. terebinthifolius* (Lote B)

Ensaio	ρ_{bulk} (g/cm ³) ¹	W_{1000} (g) ²	d_{ps} (mm) ³	ρ_p (g/cm ³) ⁴	ϵ_b (-) ⁵
1	0,277	27,06	4,92	0,433	0,360
2	0,260	25,00	4,92	0,401	0,351
3	0,280	27,11	4,91	0,438	0,362
4	0,259	25,01	4,90	0,407	0,364
5	0,299	29,30	4,96	0,460	0,350
6	0,252	25,31	4,96	0,397	0,365
7	0,263	24,82	4,90	0,403	0,348
8	0,260	25,30	4,96	0,395	0,342
9	0,269	25,42	4,92	0,407	0,339
10	0,259	24,04	4,90	0,391	0,337
11	0,269	25,43	4,92	0,407	0,339
Frutos <i>in natura</i>	0,543	54,57	4,96	0,852	0,358

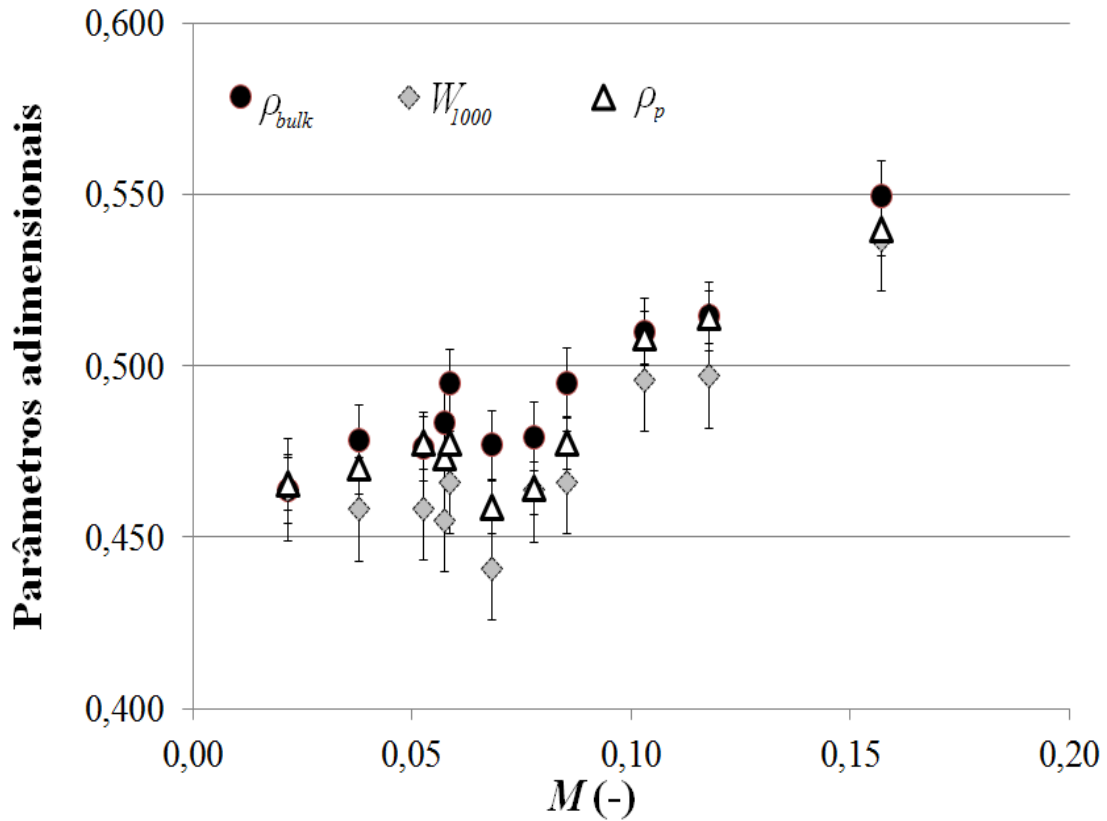
Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Massa específica *bulk*; ²Peso de 1000 frutos; ³Diâmetro médio dos frutos; ⁴Massa específica aparente de um fruto; ⁵Porosidade *bulk*.

Os resultados apresentados na Tabela 4.8 indicam que os frutos foram mantidos inteiros (sem cascas quebradas) em todas as condições de secagem investigadas neste trabalho, pois o diâmetro médio dos frutos (d_{ps}) e a porosidade do leito de secagem (ϵ_b) não revelaram mudanças significativas após o processo de secagem. De fato, isso foi possível verificar visualmente após a secagem, sendo que não foi observado encolhimento do material. Lembrando que, na produção de pimenta-rosa, a integridade dos frutos é um dos parâmetros de qualidade fundamentais para a aceitabilidade comercial do produto. Nesse sentido, o que permitiu assegurar a integridade dos frutos foi a utilização do secador de bandeja (leito fixo). É válido mencionar que, nos ensaios preliminares deste estudo, foi investigada a utilização de um secador em leito de jorro. Porém os resultados mostraram que os frutos não suportaram o movimento contínuo e circular desse tipo de leito, uma vez que foi observada grande quantidade de frutos quebrados ao final da secagem. Ademais, é interessante mencionar que, na indústria, a secagem dos frutos da *S. terebinthifolius* comumente é realizada em secadores de tambor rotativo e de bandejas.

Diferentemente do diâmetro dos frutos, um aumento da temperatura de secagem resultou em diminuição nas massas específicas (aparente e *bulk*) e no peso de 1000 frutos, conforme observado na Tabela 4.8. Esses efeitos são decorrentes, principalmente, da influência do conteúdo de umidade dos frutos da *S. terebinthifolius* (Figura 4.10).

Figura 4.10 – Parâmetros adimensionais (em relação aos frutos *in natura*) em função do conteúdo de umidade em base seca



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: M : conteúdo de umidade em base seca; ρ_{bulk} : massa específica *bulk*; W_{1000} : peso de 1000 frutos; ρ_p : massa específica aparente de um fruto.

Na Figura 4.10, ilustra-se a dependência não linear dos parâmetros físicos com o conteúdo de umidade dos frutos de *S. terebinthifolius*. Além do conteúdo de umidade e a integridade dos frutos da *S. terebinthifolius*, o monitoramento de parâmetros como coloração e compostos voláteis é fundamental para assegurar a qualidade do produto. Nas próximas seções deste trabalho, os efeitos da secagem sobre tais parâmetros são discutidos detalhadamente.

4.3.3.3 Efeitos sobre a coloração

Na produção de pimenta-rosa, a aparência é um dos critérios de qualidade mais importantes e que influencia fortemente na aceitabilidade comercial do produto. A pimenta-rosa deve apresentar uma coloração vermelha e brilhante, e não pode ter frutos com cascas quebradas. Na Tabela 4.9, são apresentados os resultados da análise colorimétrica dos frutos da *S. terebinthifolius*, que foram secos sob as condições operacionais listadas na Tabela 4.2.

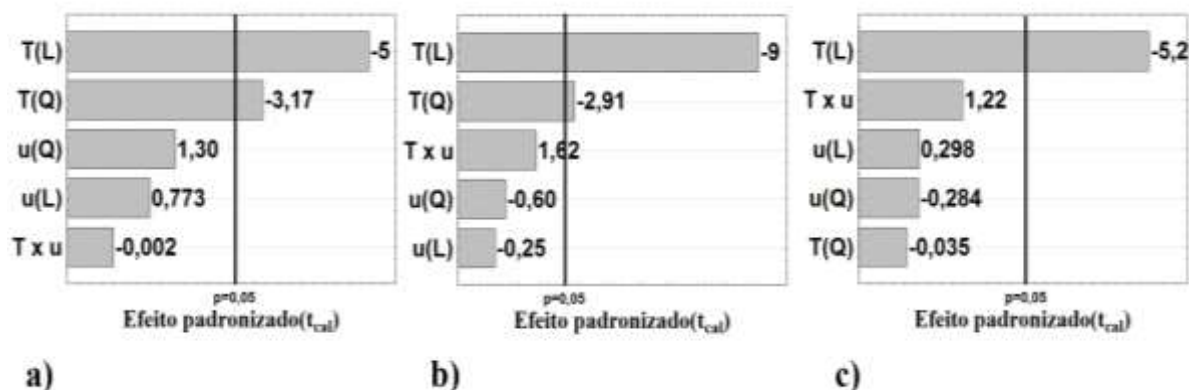
Tabela 4.9 – Análise colorimétrica (sistema CIELAB) dos frutos da *S. terebinthifolius* (secos sob as condições operacionais da Tabela 4.2)

Ensaio	L^*	a^*	b^*	ΔE
1	25,72	34,17	22,45	3,16
2	23,90	26,97	16,42	6,91
3	26,52	32,65	21,62	1,41
4	24,70	27,95	18,04	5,01
5	26,41	32,19	21,03	0,698
6	21,12	26,61	17,43	8,19
7	26,50	30,91	19,00	1,74
8	26,49	30,90	19,04	1,72
9	25,83	32,01	20,24	0,773
10	26,16	31,53	19,89	0,781
11	25,23	30,77	18,41	2,68
Pimenta-rosa comercial	26,59	31,94	20,40	-

Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo os dados da Tabela 4.9, os frutos secos tinham cor vermelha-escura (L^* baixo e a^* positivo), como esperado para pimenta-rosa. A cor da pimenta-rosa pode ser devida aos carotenoides formados no fruto de *S. terebinthifolius* durante a maturação: Pagani et al. (2014) relataram a concentração de carotenoides na pimenta-rosa de 27,5 $\mu\text{g/g}$. Além disso, a coloração pode ser devido à presença de compostos fenólicos, tais como a flavona apigenina (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004). No entanto estudos específicos são necessários para determinar a relação definitiva entre esses compostos e a cor dos frutos da *S. terebinthifolius*. Conforme observado na Tabela 4.9, o parâmetro L^* variou de 26,52 (40,9 °C e 0,81 m/s) a 21,12 (75 °C e 0,6 m/s), com isso, indicando menor luminosidade com aumento da temperatura de secagem. O parâmetro a^* variou de 34,17 (40,9 °C e 0,39 m/s) a 26,61 (75 °C e 0,6 m/s); e o parâmetro b^* variou de 22,45 (40,9 °C e 0,39 m/s) a 16,42 (69,1 °C e 0,39 m/s), o que indica uma coloração mais avermelhada para as menores temperaturas. Os efeitos padronizados da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u) sobre os parâmetros colorimétricos são mostrados nos diagramas de Pareto (Figura 4.11).

Figura 4.11 – Diagramas de Pareto para os parâmetros de cor do sistema CIELAB: a) L^* ; b) a^* ; c) b^*



Fonte: Dados da pesquisa.

Como ilustrado na Figura 4.11, a temperatura do ar de secagem exerceu efeitos estatisticamente significativos (negativos) sobre todos os parâmetros de cor, com um nível de confiança de 95%. Assim, estes dados indicam que, a temperaturas elevadas, ocorre a degradação de pigmentos dos frutos da *S. terebinthifolius*. Estes resultados podem ser em consequência às reações de escurecimento não enzimático ou, também, devido à degradação dos carotenoides e compostos fenólicos a altas temperaturas. Na literatura, não foram encontrados trabalhos relacionados com a degradação de cor dos frutos da *S. terebinthifolius*. Entretanto é interessante citar que, para o pimentão-vermelho, Lee et al. (1991) relataram que o escurecimento do produto se dá em virtude da reação de *Maillard*. Já Klieber (2000), cita que os carotenoides são vulneráveis aos efeitos do calor, da luz e do oxigênio do ar de secagem. De acordo com Malchev et al. (1982), a taxa de degradação dos carotenoides aumenta à medida que a temperatura de secagem aumenta. Ademais, altas temperaturas podem resultar na degradação de compostos fenólicos (MOURE et al., 2001; BERTOLDI, 2006). No entanto estudos específicos são necessários para identificar a relação definitiva entre esses fenômenos e a degradação da coloração dos frutos da *S. terebinthifolius*.

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 4.9 e com o auxílio do *software* STATISTICA[®], foi avaliado o ajuste de um modelo codificado para a diferença de cor total (ΔE) em função da temperatura do ar de secagem (T), conforme a Equação 4.20.

$$\Delta E = 1,80 + 2,24T + 1,65T^2 \quad (4.20)$$

Para avaliar a qualidade de ajuste do modelo, na Tabela 4.10 são apresentados os resultados da ANOVA.

Tabela 4.10 – ANOVA para o modelo preditivo para a diferença de cor total (Equação 4.20)

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	57,13	2	28,56	22,40	4,459
Resíduos	10,20	8	1,275		
Falta de ajuste	7,785	6	1,298	1,075	19,33
Erro puro	2,414	2	1,207		
Total	67,33	10	-	-	-

R=0,9211

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda:

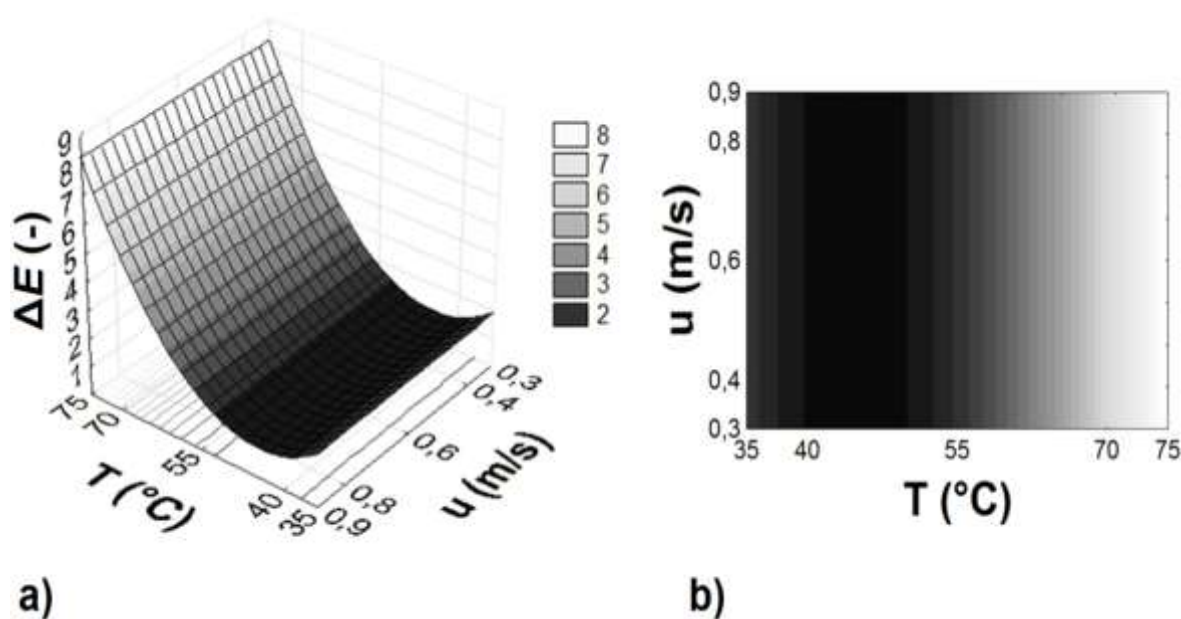
F_{cal} : Distribuição de Fischer calculada.

F_{tab} : Distribuição de Fischer tabelada.

R: Coeficiente de correlação.

De acordo com os resultados da Tabela 4.10, é possível inferir que o modelo pode ser considerado válido devido às seguintes análises: o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} ; o F_{cal} da falta de ajuste em relação ao erro puro é inferior ao F_{tab} ; e o coeficiente de correlação é maior que 0,9. Por conseguinte, ao ajustar aos dados experimentais, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos, dessa maneira, satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta e curva de nível (Figura 4.12).

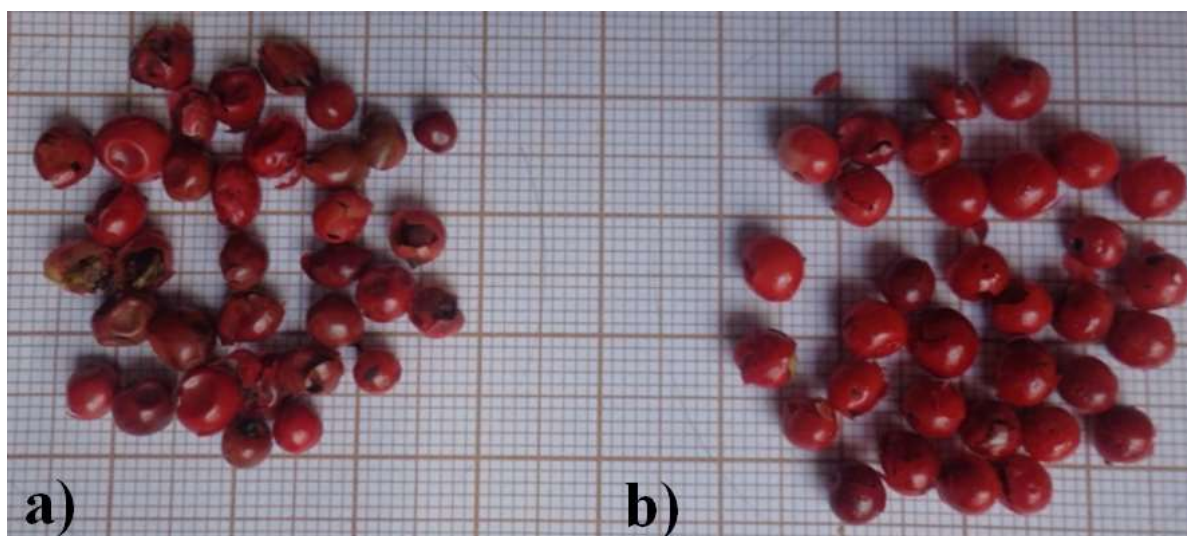
Figura 4.12 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para a diferença total de cor (ΔE) em função da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u)



Fonte: Dados da pesquisa.

Como se visualiza na Figura 4.12, quando a coloração do produto obtido neste trabalho foi comparada aos valores levantados a partir de uma amostra de pimenta-rosa comercial, recomenda-se que a secagem seja realizada em temperaturas na faixa de 35 °C a 55°C. Na Figura 4.13, é apresentada uma amostra de pimenta-rosa comercial e uma do produto obtido neste trabalho, à temperatura de secagem de 55 °C.

Figura 4.13 – Amostras de frutos de *S. terebinthifolius*: a) mercado; b) produto deste trabalho (55 °C)



Fonte: Acervo do autor.

Conforme observado na Figura 4.13, a temperatura máxima de 55 °C assegurou coloração adequada ao produto ($0,77 < \Delta E < 2,68$), sendo obtido também um conteúdo de umidade adequado ($M^* \leq 12\%$). É válido citar que essa temperatura máxima de secagem é próxima da temperatura de 60 °C citada por Carvalho, R. et al. (2015), na secagem de frutos de *S. terebinthifolius* para a produção de pimenta-rosa. Entretanto, se o objetivo for a extração de compostos voláteis, dever-se-á investigar se essas condições de secagem são adequadas para evitar perdas desses compostos durante a operação de secagem.

4.3.3.4 Efeitos sobre compostos voláteis

Na Tabela 4.11, são exibidos os resultados da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* do Lote B (*in natura* e secos nas condições de secagem da Tabela 4.2).

Tabela 4.11 – Composição química (CG-EM) e rendimento do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* (Lote B), *in natura* e secos nas condições operacionais da Tabela 4.2

Composto	IR _i ¹	Área relativa (%) ⁴											FF ²
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
α -pineno	932	3,65	3,52	5,12	2,84	4,87	1,49	5,15	3,61	3,72	5,06	2,86	5,36
Sabineno	969	2,24	2,14	1,89	1,78	2,20	1,28	2,32	2,03	1,52	2,12	1,50	2,45
β -mirceno	988	12,14	10,90	11,61	11,03	12,16	8,12	11,03	11,73	11,21	11,66	10,91	12,75
α -felandreno	1002	18,48	17,84	16,35	16,59	19,64	14,26	19,31	18,69	17,34	17,61	17,16	20,46
δ -3-careno	1008	18,41	16,81	18,37	16,08	18,60	13,67	17,54	17,00	17,43	17,82	17,04	19,14
n.i. ³	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-	-	-	0,39	-
o-cimeno	1022	1,36	0,68	2,04	1,21	0,90	0,69	0,66	0,83	1,26	1,09	1,09	0,73
Limoneno	1024	17,77	16,30	17,42	16,49	17,91	15,19	16,75	17,43	17,12	15,90	17,37	18,28
n.i. ³	-	-	-	-	-	0,46	-	-	-	0,53	-	0,54	-
Terpinoleno	1086	1,38	1,26	1,19	1,29	1,33	1,35	1,24	1,33	1,32	1,20	1,44	1,31
n.i. ³	-	0,68	-	0,74	0,61	0,74	0,58	0,52	0,62	1,00	0,64	1,04	0,68
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	0,61	-	-	-	-	-	-
Cariofileno	1417	4,50	4,72	4,27	5,20	3,99	5,83	4,08	4,71	4,66	4,52	5,42	3,73
germacreno D	1484	8,04	8,91	7,13	9,19	6,83	10,90	7,32	8,34	6,47	7,91	8,17	6,25
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	0,71	-	-	-	-	-	-
δ -cadineno	1522	0,93	1,05	1,10	1,33	1,01	1,45	1,03	1,19	1,65	1,34	1,78	0,94
Elemol	1548	1,38	1,83	1,02	1,82	1,05	6,52	3,50	1,58	1,37	1,55	2,67	0,90
germacreno B	1559	0,64	0,75	-	0,79	0,57	0,99	0,66	0,72	-	0,67	0,76	-
γ -eudesmol	1630	4,01	5,70	5,83	5,97	3,39	6,07	3,48	4,94	5,77	4,90	4,27	3,29
β -eudesmol	1650	1,19	1,75	1,54	1,85	0,96	2,23	1,29	1,47	1,74	1,60	1,38	0,90
α -eudesmol	1652	2,42	3,16	3,28	3,80	2,03	3,15	2,47	2,67	3,62	3,19	2,38	1,96
n.i. ³	-	-	-	-	-	-	1,27	-	-	-	-	-	-
n.i. ³	-	-	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i. ³	-	0,81	1,24	1,09	1,40	0,98	2,81	1,64	1,12	1,59	1,21	1,83	0,86
n.i. ³	-	-	0,65	-	0,73	-	0,85	-	-	0,68	-	-	-
Monoterpenos (%)⁴		76,1	69,5	74,7	67,9	79,2	56,6	74,5	73,3	72,4	73,1	71,4	81,2
Rendimento (%)⁵		5,24	4,87	5,48	4,38	5,38	4,66	5,52	5,64	4,67	5,33	4,90	5,56

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Índice de retenção (ADAMS, 2007); ²Frutos *in natura* (sem o processo de secagem); ³Não identificado; ⁴Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas; ⁵Calculado conforme a Equação 3.1.

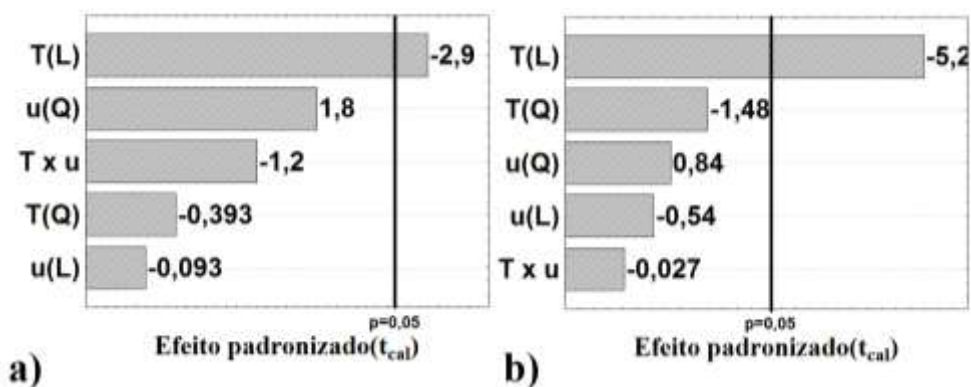
Segundo os dados apresentados na Tabela 4.11, a análise por CG-EM permitiu a detecção de 25 componentes no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* (Lote B), sendo que 16 compostos foram identificados, o que corresponde a aproximadamente 98% da composição química do óleo essencial. Os compostos majoritários do óleo essencial foram o α -felandreno (14,26%-20,46%), δ -3-careno (13,67%-19,14%), limoneno (15,19%-18,28%), β -mirceno (8,12%-12,75%) e germacreno D (6,25%-10,90%). De forma geral, esses cinco componentes majoritários correspondem a mais de 80% da composição química do óleo essencial. Como citado no Capítulo 3 deste trabalho (Tabela 3.4), os principais componentes identificados no óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* do Lote A foram o δ -3-careno, α -felandreno, limoneno, α -pineno e germacreno D. Portanto, comparando com o óleo essencial dos frutos do Lote B, foram observadas diferenças significativas na composição química: enquanto no Lote A, o composto majoritário foi o δ -3-careno (33,78%-36,73%), no Lote B, foram encontrados três compostos majoritários com composição semelhantes (α -felandreno, δ -3-careno e limoneno). Além disso, o Lote B tinha, como um dos compostos

majoritários, o β -mirreno (8,12%-12,75%), sendo que, no Lote A, esse composto indicou uma composição menor (2,96%-3,26%). Cole (2008), Silva, A. et al. (2010) e Dourado (2012), também, citam o β -mirreno como um dos compostos majoritários no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Como referido em precedência, essa variabilidade observada na composição química do óleo essencial obtido de lotes coletados no mesmo local (Aracruz, Espírito Santo), porém em datas distintas (2014 e 2015), pode ter sido causada pelas mudanças climáticas ocorridas na região de produção dos frutos da *S. terebinthifolius*, dessa maneira, afetando a produção dos metabólitos secundários dos frutos. Conforme já mencionado, do final de 2014 até 2016, o estado do Espírito Santo enfrentou uma das maiores secas de sua história. Por causa dessa estiagem, a produção agrícola do estado foi afetada, o que inclui a produção dos frutos de *S. terebinthifolius* (SEAG, 2016). Portanto, estes resultados evidenciam a importância da padronização de insumos para a obtenção de produto derivado de uma espécie vegetal, com o estabelecimento de parâmetros importantes que atendam aos pré-requisitos de segurança, eficácia e reprodutibilidade.

Na Figura 4.14, são apresentados os diagramas de Pareto que descrevem os efeitos padronizados da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u) sobre o rendimento e teor de monoterpenos do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Figura 4.14 – Diagramas de Pareto: a) rendimento de óleo essencial; b) teor de monoterpenos



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 4.14, vê-se que a velocidade do ar de secagem não exerceu efeitos sobre o teor de monoterpenos do óleo essencial. Em contrapartida, a temperatura do ar de secagem apresentou efeitos estatisticamente significativos (negativos), com um nível de confiança de 95%, sobre o teor de monoterpenos e rendimento do óleo essencial dos frutos da *S.*

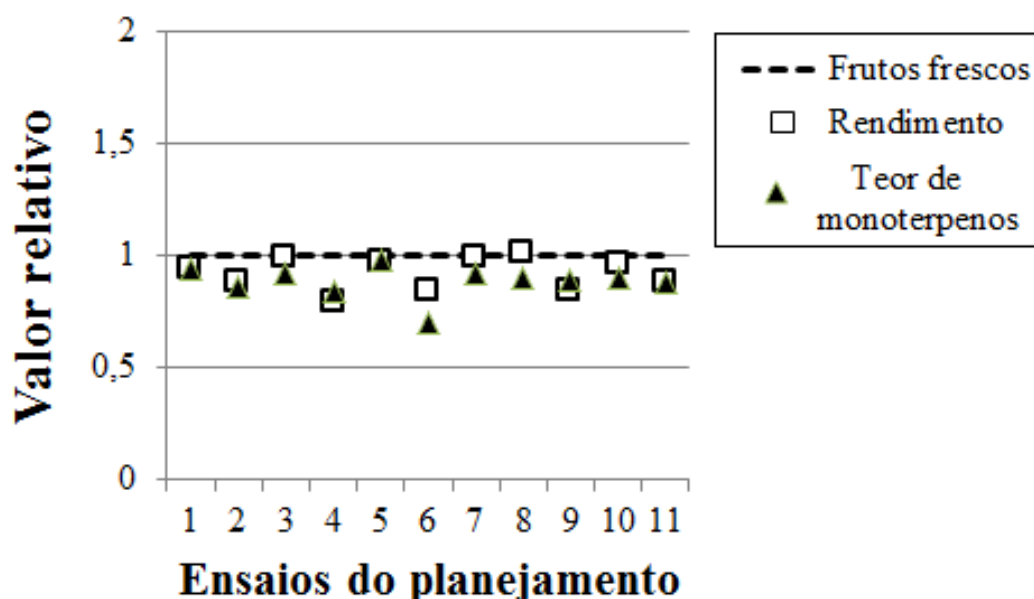
terebinthifolius. Estes dados indicam que um aumento na temperatura do ar de secagem reflete em uma diminuição no rendimento de óleo essencial e também no seu teor de monoterpenos. Tais resultados, provavelmente, estão relacionados com a volatilização de alguns compostos do óleo essencial durante o processo de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*. Pinheiro (2015) refere que o arraste de componentes orgânicos por vapor, durante processos de secagem, é baseado na operação de destilação por arraste a vapor (quando uma mistura de dois líquidos imiscíveis é destilada). Por isso, levanta-se a hipótese de que, durante a secagem, ocorra a liberação de compostos orgânicos presentes no leito de secagem por arraste a vapor. De fato, Figiel et al. (2010) observaram que, durante a secagem, as perdas de compostos voláteis foram fortemente associadas à quantidade de água que estava sendo evaporada do sólido.

Na Figura 4.15, são apresentados o rendimento da extração e o teor de monoterpenos que foram adimensionalizados em relação aos frutos *in natura* (sem o processo de secagem), segundo a Equação 4.21.

$$VR = \frac{V}{V_{FF}} \quad (4.21)$$

Em que VR é o valor relativo da variável V (rendimento da extração e teor de monoterpenos) e V_{FF} é o valor medido a partir dos frutos *in natura*.

Figura 4.15 – Valor relativo, em relação aos frutos *in natura*, para cada ensaio de secagem (ensaios de 1 a 11 nas condições operacionais da Tabela 4.2)



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com o que ilustra a Figura 4.15, as condições operacionais do processo de secagem podem ser avaliadas como ótimas quando tal rendimento relativo aproximar-se de 1. Logo, o rendimento e o teor de monoterpenos estavam pertos da unidade quando a secagem foi realizada a temperaturas mais amenas (ensaios 1, 3 e 5). Em contraste, as temperaturas mais elevadas (ensaios 2, 4 e 6) provocaram perdas no rendimento de extração e de monoterpenos ao comparar com os valores obtidos a partir dos frutos *in natura*. Portanto, estes dados mostram que o aumento da temperatura pode ter reduzido o rendimento de extração e o teor de monoterpenos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Mediante os dados experimentais apresentados na Tabela 4.11 e com o auxílio do *software* STATISTICA[®], foi avaliado o ajuste de um modelo matemático para o teor de monoterpenos (*MC*) no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* (Equação 4.22).

$$MC = 73,3 - 5,67T - 2,23T^2 \quad (4.22)$$

Para avaliar a qualidade de ajuste do modelo codificado, na Tabela 4.12 são apresentados os resultados da ANOVA.

Tabela 4.12 – ANOVA para o modelo preditivo para o teor de monoterpenos (Equação 4.22)

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	288,0	2	144,0	20,27	4,459
Resíduos	56,83	8	7,104		
Falta de ajuste	55,37	6	9,228	12,64	19,33
Erro puro	1,460	2	0,7300		
Total	344,8	10	-	-	-
			R=0,9139		

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda:

F_{cal} : Distribuição de Fischer calculada.

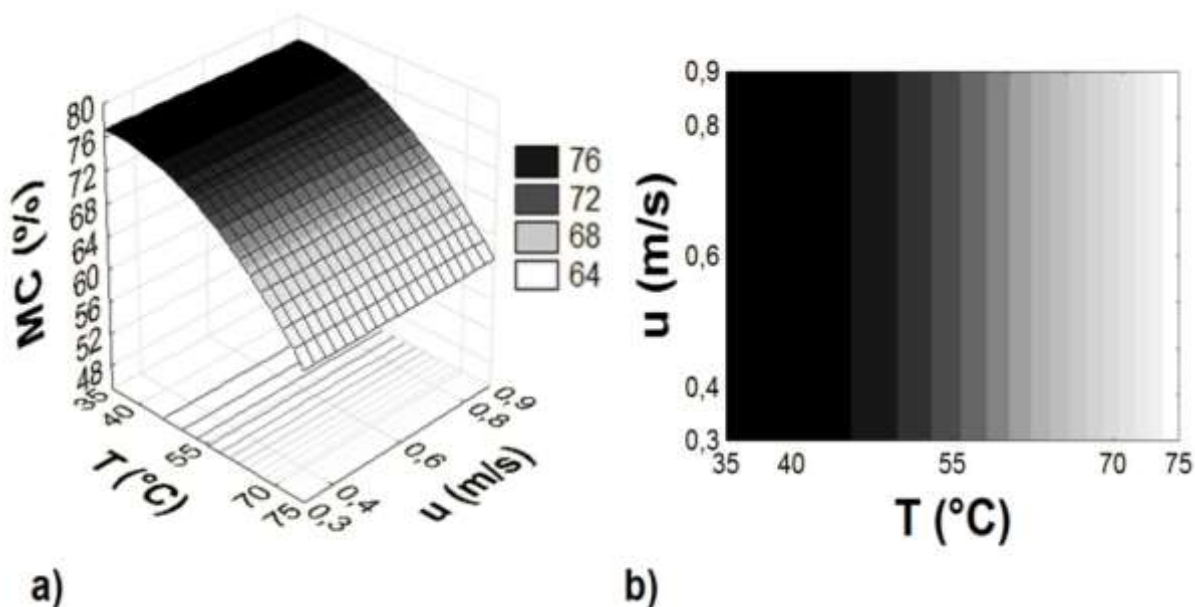
F_{tab} : Distribuição de Fischer tabelada.

R^2 : Coeficiente de correlação.

Segundo os resultados da Tabela 4.12, observa-se que o modelo pode ser considerado válido devido às seguintes análises: o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} ; o F_{cal} da falta de ajuste em relação ao erro puro é inferior ao F_{tab} ; e o coeficiente de correlação é maior que 0,9. Portanto, ao ajustar aos dados experimentais, o modelo pode ser

utilizado para fins preditivos, dessa forma, satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta e curva de nível (Figura 4.16).

Figura 4.16 – Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para o teor de monoterpenos (MC) no óleo essencial em função da temperatura (T) e da velocidade do ar de secagem (u)



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 4.16, para minimizar a perda de compostos voláteis durante a secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, recomenda-se que a secagem seja realizada nos níveis mais baixos de temperatura do ar de secagem. Para essa finalidade, como mostrado na Figura 4.16, temperaturas do ar de secagem na faixa de 35 °C a 55 °C são recomendadas. Assim, nessas condições, será obtido um produto com alto teor de monoterpenos (>70%). Entretanto, se o objetivo da secagem dos frutos da *S. terebinthifolius* for a produção da especiaria pimenta-rosa, outra faixa de operação deverá ser definida. Para tanto, como base nos dados exibidos nas Figuras 4.9 (conteúdo de umidade) e 4.12 (cor), temperaturas do ar de secagem na faixa de 40 °C a 55 °C são recomendadas para a secagem. Assim, tais condições fornecem um conteúdo de umidade adequado ($M^* \leq 12\%$) e sem degradação elevada da coloração e do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Como mencionado anteriormente, a temperatura máxima de 55 °C está próxima da temperatura de 60 °C, referida por Carvalho, R. et al. (2015) para a produção de pimenta-rosa. Por sua vez, Karam et al. (2016) citam que temperaturas na faixa de 55 °C a 60 °C são consideradas adequadas para a secagem de frutas e vegetais, pois asseguram a qualidade do produto (coloração, princípios ativos, etc.) com um tempo de secagem relativamente baixo.

4.3.4 MODELOS CLÁSSICOS DE SECAGEM

Na Tabela 4.13, são apresentados os valores dos parâmetros ajustáveis de todos os modelos clássicos (Tabela 2.1) que foram ajustados aos dados experimentais da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, nas condições operacionais indicadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.13 – Parâmetros ajustáveis para todos os modelos clássicos de secagem

Ensaio	<i>Difusão</i> ¹	<i>Lewis</i>	<i>Page</i>		<i>Henderson e Pabis</i>		<i>Henderson (Dois termos)</i>			
	D_{ef} ($10^{-5} \cdot \text{cm}^2$ min^{-1})	K ($10^{-3} \cdot$ min^{-1})	K_1 ($10^{-3} \cdot$ min^{-1})	n (-)	K_o ($10^{-3} \cdot$ min^{-1})	a (-)	K_2 ($10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$)	a_1 (-)	K_3 ($10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$)	b (-)
1	5,069	6,251	5,972	1,009	6,158	0,9885	6,158	0,4939	6,158	0,4945
2	17,57	23,25	10,72	1,196	25,32	1,092	25,32	0,4963	25,32	0,5957
3	5,403	6,555	12,11	0,8785	5,855	0,9192	5,855	0,4650	5,854	0,4542
4	17,82	23,35	18,79	1,055	23,90	1,023	23,90	0,5117	23,90	0,5117
5	3,676	4,441	6,047	0,9433	4,194	0,9581	4,194	0,5062	4,192	0,4518
6	18,99	25,05	15,90	1,117	26,43	1,057	26,43	0,5283	26,43	0,5283
7	8,670	11,09	7,130	1,097	11,50	1,032	11,50	0,5164	11,50	0,5159
8	9,890	12,53	17,77	0,9217	11,78	0,9486	13,93	0,2596	11,12	0,6912
9	10,87	13,91	15,92	0,9692	13,48	0,9725	13,48	0,4863	13,48	0,4862
10	10,09	12,86	15,07	0,9642	12,43	0,9708	12,42	0,4854	12,43	0,4854
11	11,29	14,47	16,53	0,9693	14,08	0,9763	14,08	0,4805	14,08	0,4958

Fonte: Dados da pesquisa.

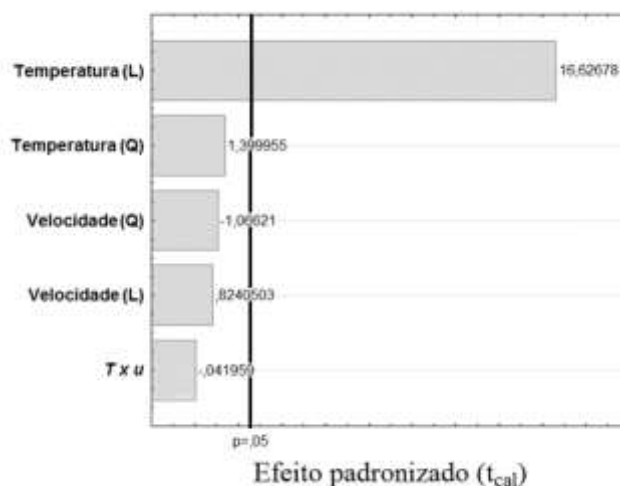
Nota: ¹Modelo truncado no segundo termo da série.

De acordo com os dados da Tabela 4.13, de forma geral, os parâmetros dos modelos variaram em função das condições operacionais da secagem, principalmente da temperatura do ar de secagem. Por exemplo, para o modelo de Lewis, o maior valor da constante de secagem (K) foi próximo de $2,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, observado na maior temperatura investigada (75°C), e o menor valor foi de $4,44 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, observado no menor nível de temperatura investigado (35°C). Estes resultados indicam a dependência da constante de secagem com a temperatura. Na Tabela 4.13, observa-se, também, que os valores do parâmetro K_o do modelo de Henderson e Pabis são muito próximos da constante de secagem do modelo de Lewis, pois o valor do parâmetro a do modelo de Henderson e Pabis é próximo da unidade. E, ainda, os valores dos parâmetros K_2 e K_3 do modelo de Henderson (Dois termos) também são próximos aos valores da constante de secagem.

Assim como observado para a constante de secagem do modelo de Lewis, na Tabela 4.13 também é observada a dependência da difusividade efetiva (D_{ef}) com a temperatura do ar de secagem: o maior valor da difusividade efetiva foi próximo de $1,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$, revelado na maior temperatura investigada (75°C); e o menor valor foi de $3,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{min}$, observado no menor nível de temperatura investigado (35°C). Desse modo, os valores estimados para a difusividade efetiva apresentaram resultados esperados em relação a sua dependência com a

temperatura, conforme o diagrama de Pareto da Figura 4.17, que descreve o efeito padronizado da temperatura do ar de secagem sobre a difusividade efetiva.

Figura 4.17 – Diagrama de Pareto para a difusividade efetiva



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 4.17, apenas a temperatura do ar de secagem exerceu efeito significativo (positivo) sobre a difusividade, em nível de confiança de 95%. Assim, o aumento na temperatura acarretou aumento da difusividade da umidade e, como consequência, altas taxas de secagem foram observadas, assim, menores tempos de secagem foram necessários para alcançar o conteúdo de umidade de equilíbrio. Na Tabela 4.14, são assinalados os resultados dos desempenhos de todos os modelos clássicos de secagem utilizados para simular a cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Tabela 4.14 – Critérios de validação para os modelos clássicos de secagem

Modelo	R ²	Equação da Reta ($y=ax+b$) ¹	RMSE (-) ^{2*}
Difusão	0,9814	$y = 0,8487x + 0,0375$	0,062
Lewis	0,9966	$y = 0,9897x - 0,0002$	0,027
Page	0,9986	$y = 0,9977x - 0,0023$	0,011
Henderson e Pabis	0,9987	$y = 1,0084x - 0,0046$	0,011
Henderson (Dois termos)	0,9987	$y = 1,0085x - 0,0047$	0,011

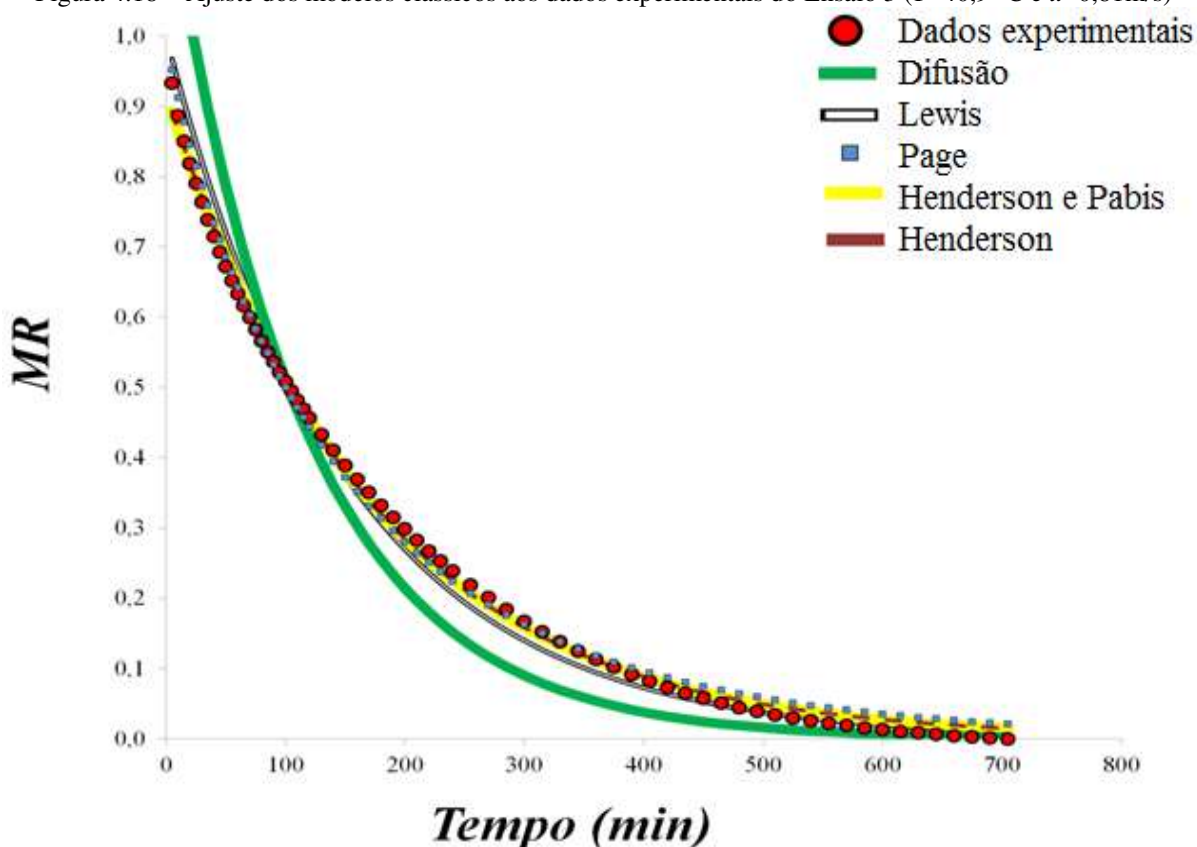
Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Dados experimentais *versus* os dados preditos pelo modelo; ^{2*}Raiz do Erro Médio Quadrático.

Dos dados da Tabela 4.14, é possível detectar que, de forma geral, todos os modelos foram adequados para a descrição da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, pois, nos gráficos de dispersão (dados experimentais *versus* os dados preditos pelo modelo), foi verificado que os dados se apresentam na forma de uma reta coincidente com a diagonal e

os valores de R^2 foram próximos da unidade. Entretanto os resultados mostraram melhor desempenho dos modelos semiempíricos de Henderson (Dois termos), de Page e de Pabis e Henderson, sendo que para esses modelos os valores da Raiz do Erro Médio Quadrático ($RMSE$), que indica a precisão do modelo, foram menores que o desvio padrão da unidade adimensional (0,019). Os modelos de Lewis e de Difusão foram os que obtiveram os piores ajustes aos dados experimentais, provavelmente, devido ao fato de esses modelos apresentarem apenas um parâmetro ajustável (difusividade efetiva para o modelo de difusão e constante de secagem para o modelo de Lewis). Ademais, foi observado um desempenho superior do modelo de Lewis em relação ao modelo de Difusão. Provavelmente, isso ocorreu devido ao modelo de Difusão apresentar muitas considerações teóricas e suposições que, na prática, não se aplicam. Lembrando que o modelo de Difusão utilizado neste trabalho foi obtido por meio da solução analítica da segunda lei de Fick, que foi truncada no segundo termo, sendo que este modelo não representa adequadamente materiais com alto conteúdo de umidade, como é o caso dos frutos de *S. terebinthifolius*. Nas Figuras 4.18 a 4.20, são apresentados os ajustes dos modelos clássicos aos dados dos ensaios 3, 4 e 11, ensaios utilizados para a validação das RNAs.

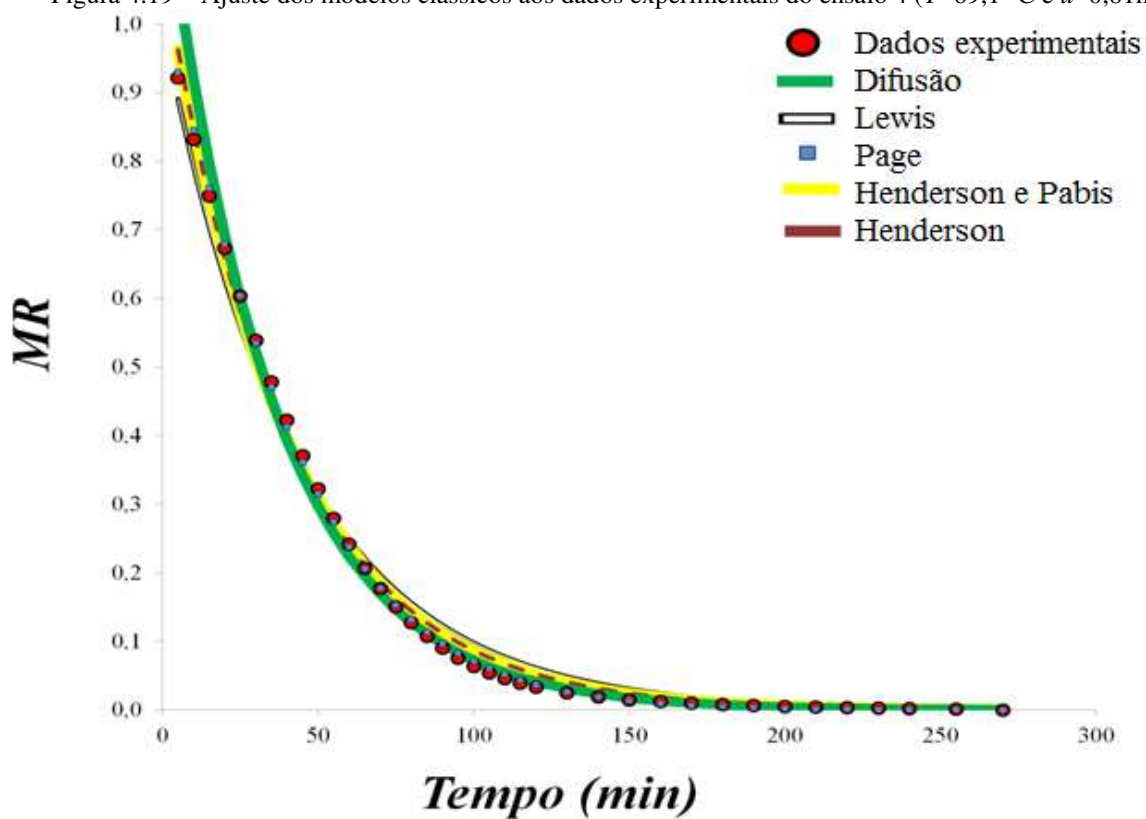
Figura 4.18 – Ajuste dos modelos clássicos aos dados experimentais do Ensaio 3 ($T=40,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $u=0,81\text{m/s}$)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MR : umidade adimensional.

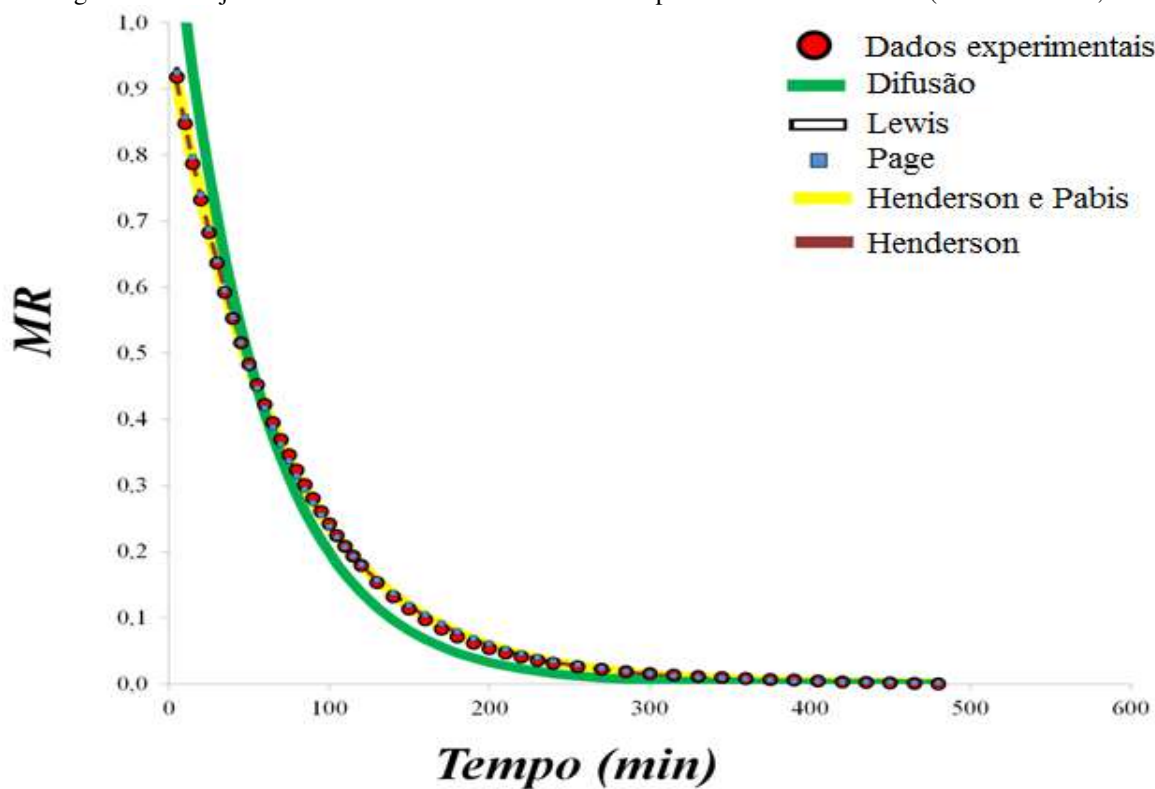
Figura 4.19 – Ajuste dos modelos clássicos aos dados experimentais do ensaio 4 ($T=69,1\text{ °C}$ e $u=0,81\text{m/s}$)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MR : umidade adimensional.

Figura 4.20 – Ajuste dos modelos clássicos aos dados experimentais do ensaio 11 ($T=55\text{ °C}$ e $u=0,6\text{m/s}$)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MR : umidade adimensional.

Conforme observado nas Figuras de 4.18 a 4.20 e citado anteriormente, os modelos semiempíricos de Henderson (Dois termos), de Page e de Henderson e Pabis alcançaram os melhores resultados no ajuste aos dados experimentais. Assim, os resultados mostram que esses modelos representaram bem o comportamento não linear da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, nas condições operacionais analisadas neste trabalho. Estes resultados podem estar relacionados ao maior número de parâmetros ajustáveis desses modelos. Por exemplo, o modelo de Henderson (Dois termos) estabeleceu um bom ajuste aos dados experimentais, sendo que esse modelo possui quatro parâmetros ajustáveis. Todavia é de inferir que modelos com apenas dois parâmetros, como os modelos de Page e de Henderson e Pabis, também, apresentaram ajuste adequado aos dados experimentais, sendo que, em termos práticos, esses modelos são mais simples para o uso.

4.3.5 MODELOS POR REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS

Na Tabela 4.15, indicam-se as configurações e os desempenhos de todas as topologias de RNAs investigadas neste trabalho.

Tabela 4.15 – Resultados dos treinamentos das RNAs e da simulação com os dados de verificação

Topologia ³	Treinamento			Verificação		
	Parâmetros originais/ Parâmetros efetivos	Iterações	RMSE (-) ¹	R ²	Equação da Reta (y=ax+b) ²	RMSE (-) ¹
A (4x4x1)	25/ 22,3	196	0,025	0,995	y=0,99x-0,0014	0,0165
B (3x4x1)	21/ 19,3	681	0,030	0,996	y=0,98x-0,0002	0,0161
C (3x3x1)	16/ 14,4	508	0,011	0,999	y=1,00x-9.10 ⁻⁶	0,0064
D (3x3x1)	16/ 14,3	154	0,051	0,992	y=0,87x+0,0013	0,0549

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas:

¹Raiz do Erro Médio Quadrático;

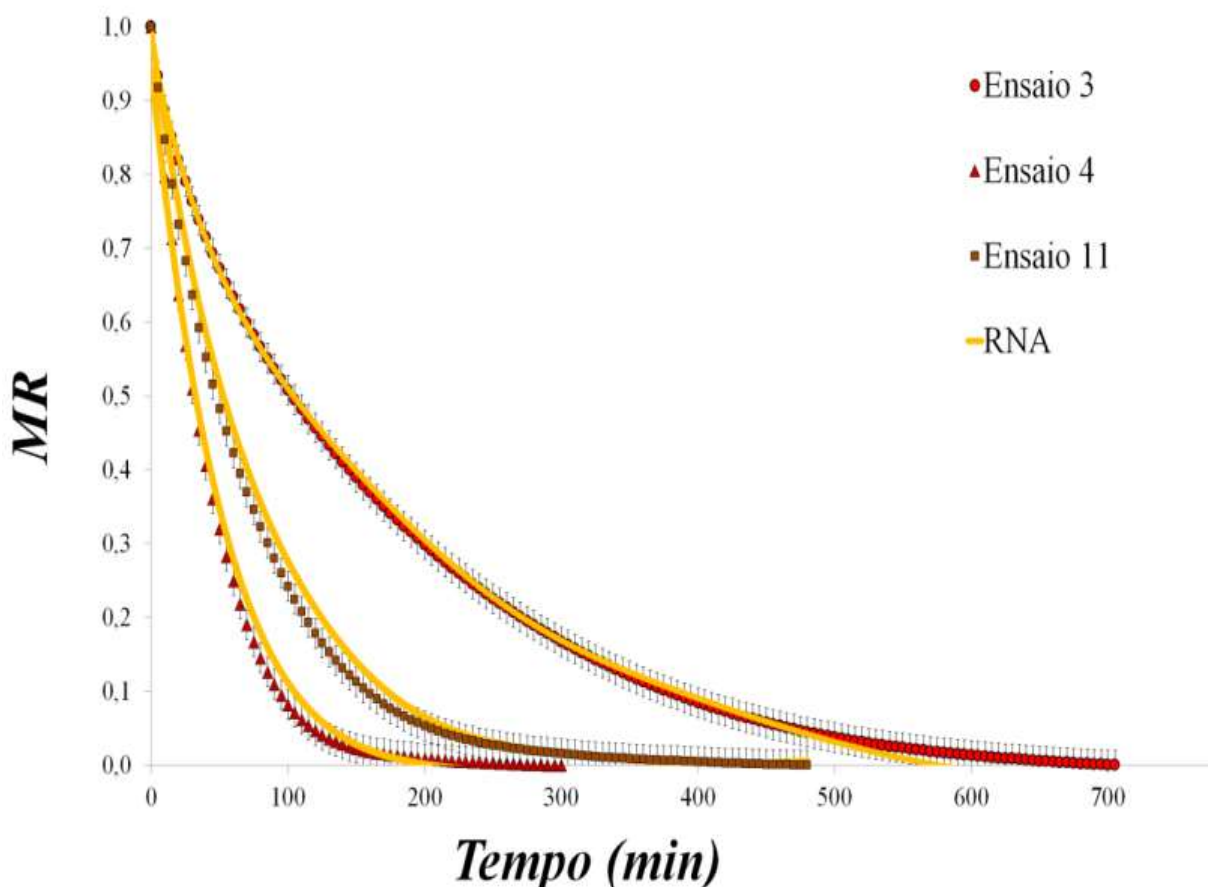
²Dados experimentais *versus* os dados preditos pelo modelo;

³ (neurônios de entrada x **neurônios ocultos** x neurônios de saída).

De acordo com os dados da Tabela 4.15, os resultados das topologias A e B foram bem similares, o que indica que a umidade relativa do ar de secagem (UR), que foi utilizada como neurônio de entrada na topologia A, não apresentou influência significativa na qualidade da modelagem por RNAs da cinética de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, nas condições investigadas neste trabalho (5% a 31%). Por conseguinte, essa variável não foi utilizada como neurônio de entrada nas topologias C e D.

Na Tabela 4.15, pode-se observar que, de forma geral, todas as topologias foram adequadas para a descrição da cinética de secagem, pois, nos gráficos de dispersão, verifica-se que os dados se apresentaram na forma de uma reta coincidente com a diagonal e os valores de R^2 foram próximos da unidade. E, ainda, os valores da Raiz do Erro Médio Quadrático ($RMSE$), que indica a precisão do modelo, foram menores que o desvio padrão da umidade adimensional (0,019), sendo que a única exceção foi para a topologia D, que teve um $RMSE$ maior. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras de 4.21 a 4.24, que mostram os ajustes dos modelos neurais aos dados de verificação (ensaios 3, 4 e 11).

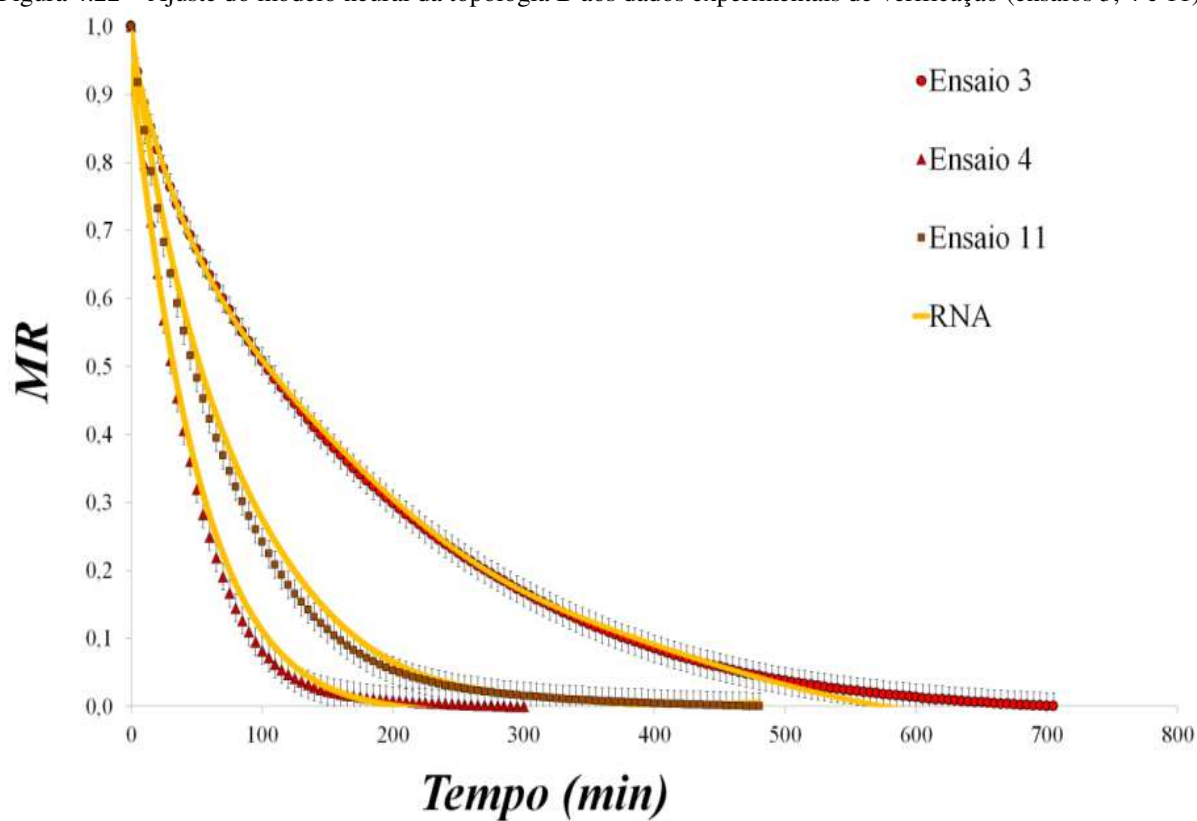
Figura 4.21 – Ajuste do modelo neural da topologia A aos dados experimentais de verificação (ensaios 3, 4 e 11)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MR : umidade adimensional.

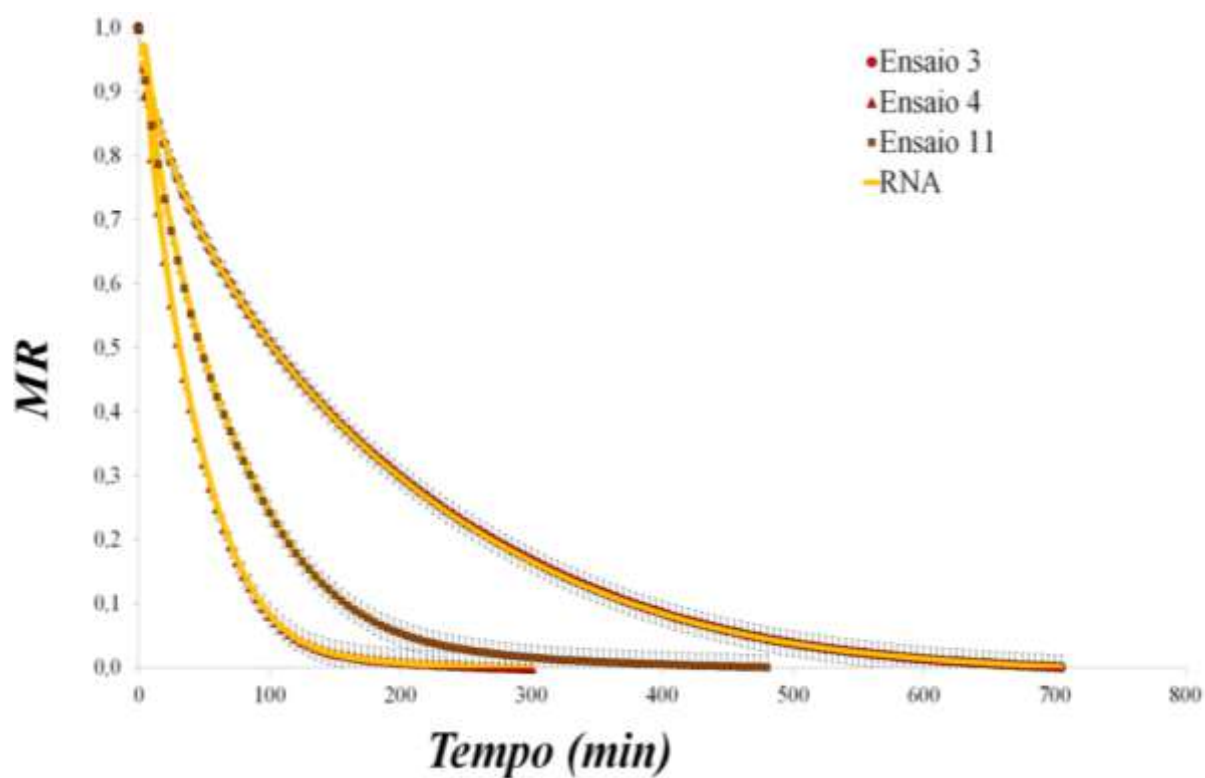
Figura 4.22 – Ajuste do modelo neural da topologia B aos dados experimentais de verificação (ensaios 3, 4 e 11)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *MR*: umidade adimensional.

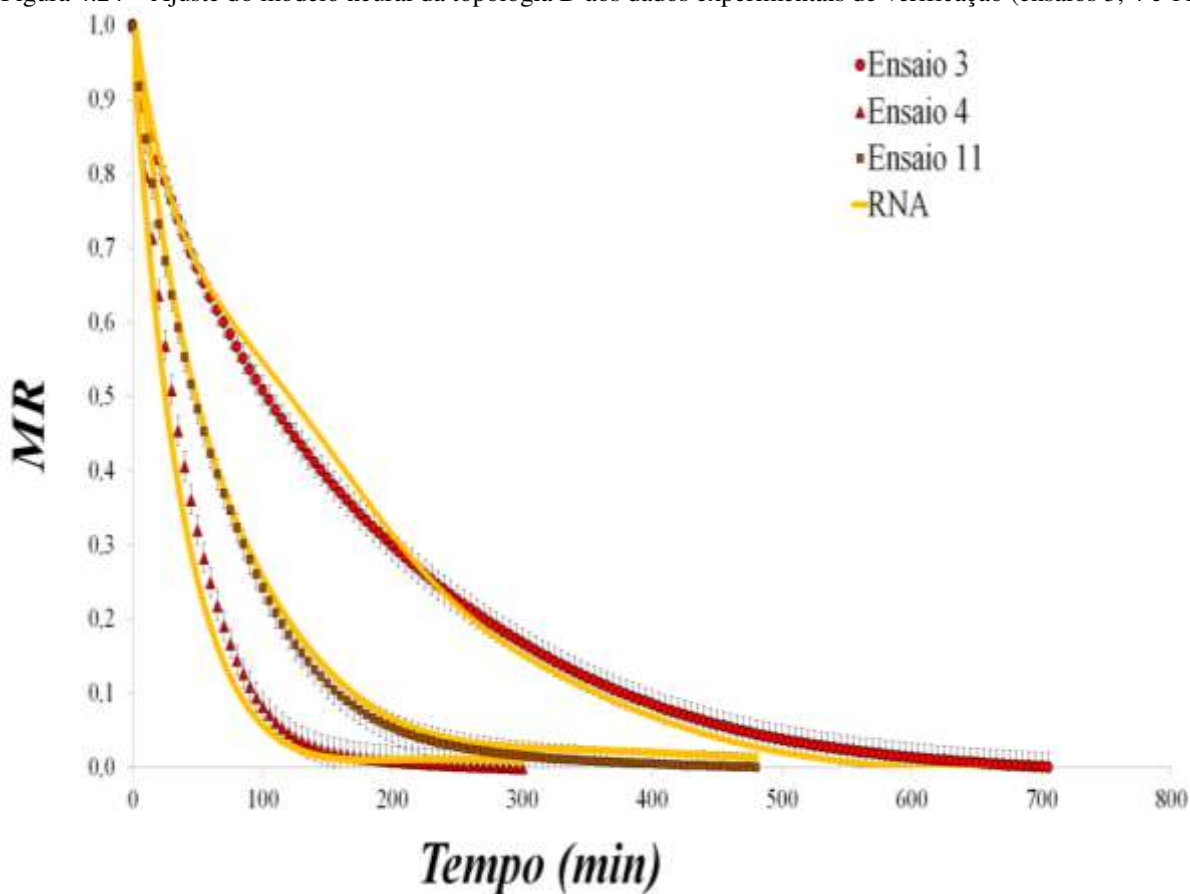
Figura 4.23 – Ajuste do modelo neural da topologia C aos dados experimentais de verificação (ensaios 3, 4 e 11)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *MR*: umidade adimensional.

Figura 4.24 – Ajuste do modelo neural da topologia D aos dados experimentais de verificação (ensaios 3, 4 e 11)

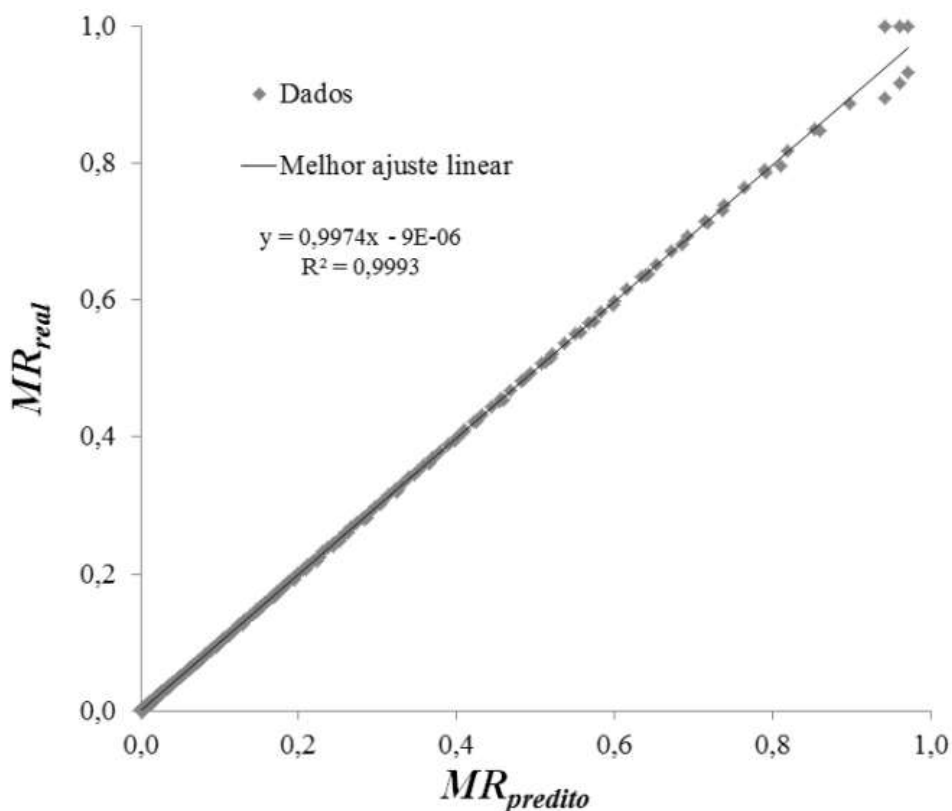


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *MR*: umidade adimensional..

Conforme observado na Figura 4.24 e nos dados da Tabela 4.15, a topologia D apresentou os piores critérios de qualidade no ajuste aos dados experimentais, pois a precisão da modelagem (*RMSE*) foi próxima de 0,055, valor esse superior ao desvio padrão da umidade adimensional (0,019). Em contrapartida, conforme observado na Figura 4.23, a topologia C foi a mais adequada no ajuste aos dados experimentais, entre todas as modelagens investigadas, pois a saída desejada (dados pontuais) é muito próxima da saída da rede neural (linha contínua). Bem como listado na Tabela 4.15, a modelagem assinalou uma precisão (*RMSE*) próxima de 0,0064, ou seja, menor que o desvio padrão médio. Na Figura 4.25, são apresentados todos os dados experimentais *versus* os dados preditos pelo modelo neural da topologia C.

Figura 4.25 – Dados experimentais (verificação) *versus* dados preditos pelo modelo neural (topologia C)

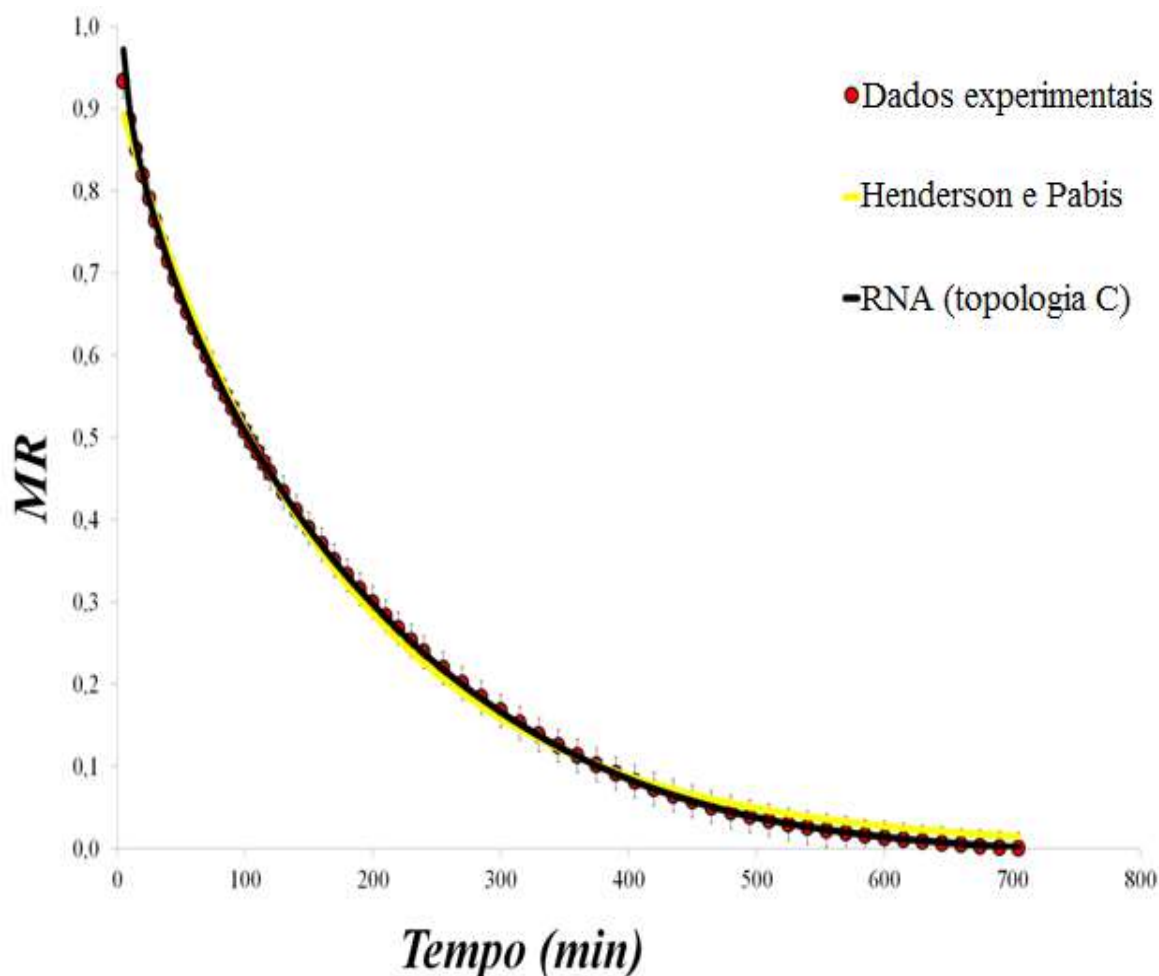


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MR : umidade adimensional.

Na Figura 4.25, aponta-se que o valor de R^2 foi 0,9993 (aproximadamente um), o coeficiente linear foi de -9×10^{-6} (próximo de zero) e coeficiente angular foi de 0,9974 (próximo de um). Assim, como já citado, o ajuste desta topologia de RNA foi o mais adequado no ajuste aos dados experimentais entre todos os modelos investigados, pois os dados estão na diagonal; e o modelo neural proposto conseguiu uma boa medida de desempenho de previsão, com 99,93% de certeza. Os ajustes da topologia C e do modelo semiempírico de Henderson e Pabis aos dados de verificação (ensaio 3) são mostrados na Figura 4.26.

Figura 4.26 – Ajuste do modelo de Henderson e Pabis e da RNA (topologia C) aos dados do ensaio 3



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MR : umidade adimensional.

Conforme observado na Figura 4.26, o modelo de Henderson e Pabis e o modelo neural da topologia C ajustaram-se de forma efetiva aos dados experimentais da cinética de secagem. Entretanto o modelo neural apresentou precisão um pouco superior ao modelo de Henderson e Pabis. É importante ressaltar que, apesar das várias qualidades das RNAs na modelagem de processos de secagem, uma desvantagem observada nos modelos neurais foi a falta de conhecimento fenomenológico que este tipo de abordagem proporcionou, pois os parâmetros das RNAs não possuem significado físico do processo. Assim como os modelos empíricos e semiempíricos tradicionais. Todavia foi observado, ainda, que, além da alta precisão, uma vantagem das RNAs é a sua capacidade de prever o comportamento da cinética de secagem para uma faixa operacional, e não apenas para só uma condição experimental. As RNAs foram capazes de descrever uma série de experiências com precisão, não sendo limitada a um ensaio específico. Ademais, outras características observadas foram a

simplicidade e a rapidez nas simulações por RNAs, uma vez que a estimativa da saída da RNA é realizada por simples operações aritméticas. Logo, os resultados promissores da utilização de um modelo baseado em RNAs para simular processos de secagem indicam a potencialidade da aplicação dessa ferramenta na modelagem de processos industriais de secagem. Os modelos neurais podem ser implementados em planilha eletrônica a ser usada para monitoramento e ajustes das condições de secagem durante a batelada. Além disso, podem ser utilizados para estimar o conteúdo de umidade em tempo real, o que é de grande utilidade em processos de secagem, pois a determinação de umidade em laboratório é um procedimento trabalhoso e demorado.

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que o óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, coletados no mesmo local (Aracruz, Espírito Santo), porém em datas distintas (2014 e 2015), apresentaram variações na atividade antiproliferativa em função da composição química do óleo essencial. Essas diferenças observadas podem ter sido causadas pelas mudanças climáticas ocorridas na região de produção dos frutos, isso afetando a produção dos metabólitos secundários pela espécie vegetal, o que justifica o melhor controle da qualidade da matéria-prima.

Quanto à secagem da matéria-prima, os resultados revelaram que, para as condições operacionais estudadas neste trabalho, a temperatura do ar de secagem exerceu influência maior no processo de secagem. A cinética de secagem foi controlada pelo período de taxa decrescente, o que indica que a secagem foi governada pela remoção da umidade interna do sólido. Verificou-se, também, o desempenho adequado da modelagem estatística para o processo de secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, sendo que um planejamento fatorial se mostrou útil para avaliação das variáveis do processo de secagem. Os resultados apontam que a secagem em um secador de bandeja assegurou a integridade do produto, sendo que temperaturas na faixa de 40 °C a 55 °C asseguraram uma umidade adequada ao produto (<10%), sem degradação da cor e perdas consideráveis de compostos voláteis. Portanto, estes resultados evidenciam a importância do monitoramento das condições de secagem, sendo que este estudo pode servir de base para a melhoria da qualidade do produto pimenta-rosa e, assim, satisfazer os requisitos de qualidade impostos pelos consumidores. Sugere-se, para trabalhos futuros, realizar a análise sensorial da pimenta-rosa.

Os resultados da modelagem da cinética de secagem revelaram um melhor desempenho dos modelos semiempíricos (Page, Henderson e Pabis, Henderson) e do modelo via Redes Neurais Artificiais (RNAs). Entretanto foi observado que, além da alta precisão, uma vantagem das RNAs é a sua capacidade de prever o comportamento da cinética de secagem para uma faixa operacional, e não apenas para uma única condição experimental. Portanto, os resultados promissores da utilização de um modelo baseado em RNAs para simular processos de secagem indicam a potencialidade da aplicação dessa ferramenta na modelagem de processos industriais de secagem. Os modelos neurais podem ser utilizados para estimar o conteúdo de umidade em tempo real, o que é de grande utilidade em processos de secagem, visto que a determinação de umidade em laboratório é um procedimento trabalhoso e demorado.

CAPÍTULO 5

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO: efeitos das condições operacionais sobre rendimento global, compostos voláteis, cinética de extração e atividade antiproliferativa em células tumorais humanas

Neste capítulo, expõe-se a extração supercrítica de compostos, utilizando CO₂ supercrítico como solvente, em que foram analisados os efeitos das variáveis operacionais da extração, bem como a atividade antiproliferativa dos extratos obtidos.

5.1 INTRODUÇÃO

Técnicas de extração, como hidrodestilação (COLE et al., 2014), Soxhlet (JAIN et al., 1995), maceração dinâmica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004) e extração por arraste a vapor (SARTORELLI et al., 2012) foram as mais utilizadas para a extração de compostos dos frutos da *S. terebinthifolius*. Apesar da simplicidade desses processos convencionais de extração, essas tecnologias apresentam uma série de desvantagens, por exemplo: na hidrodestilação, o uso de temperaturas elevadas pode degradar compostos termolábeis do óleo essencial; e, na extração em sistema Soxhlet e maceração dinâmica, o uso de solventes orgânicos pode contaminar o extrato vegetal e o meio ambiente com substâncias tóxicas. Desse modo, como processo alternativo, figura a extração com fluido supercrítico. É importante mencionar que o uso de solventes orgânicos e fluido supercrítico também possibilita a extração de compostos não voláteis, tais como ceras, compostos fenólicos, carotenoides, ácidos graxos, pigmentos, etc. Assim, se o composto de interesse é um composto volátil, a extração de compostos de maior massa molecular elevará os custos de produção devido ao fracionamento necessário para a obtenção dos compostos de interesse.

A aplicação da tecnologia supercrítica é bastante vantajosa, pois permite, por exemplo: a utilização de solventes com pouca agressividade ao meio ambiente, como o CO₂ (gás não inflamável, inerte e de toxicidade reduzida); e a obtenção de produtos de alta qualidade e funcionalidade, pois é possível a preservação de compostos termolábeis em função do uso de temperaturas amenas durante a extração. Outra vantagem observada é a facilidade na separação do solvente do produto final e também a alta seletividade, pois, ao modificar a

massa específica do fluido supercrítico, manipula-se o seu poder de solvatação e, assim, diferentes produtos são obtidos (BRUNNER, 1994; RIZVI, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Na literatura, poucos trabalhos investigaram a extração de compostos dos frutos da *S. terebinthifolius* utilizando a tecnologia supercrítica (LIVIA, 2013; ANDRADE, 2015). Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar a extração de compostos bioativos dos frutos da *S. terebinthifolius* utilizando CO₂ supercrítico como solvente, dessa maneira, visando à sua utilização como recurso terapêutico para o tratamento de alguns tipos de câncer. Apesar de vários estudos indicarem que os frutos de *S. terebinthifolius* são fonte promissora de compostos bioativos, não foi encontrado artigo científico sobre a atividade antiproliferativa de extratos supercríticos contra um painel de células tumorais, o que justifica ainda mais a realização deste estudo. Assim, a ênfase deste estudo deu-se na análise dos efeitos das condições operacionais da extração supercrítica sobre rendimento global, compostos voláteis, cinética de extração e atividade antiproliferativa em nove linhagens de células tumorais humanas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 MATÉRIA-PRIMA

Neste estudo, os frutos de *S. terebinthifolius* do Lote A foram utilizados como matéria-prima. Detalhes da coleta e das características da matéria-prima são descritos, respectivamente, nas Seções 3.2.1 e 4.3.1 deste trabalho. Os frutos *in natura* da *S. terebinthifolius* apresentaram conteúdo de umidade, em base úmida, próximo de 41%. Desse modo, a matéria-prima foi submetida à secagem em uma estufa com circulação de ar forçada (QUIMIS[®]), à temperatura de 40 °C. Segundo Meireles (2003), matérias-primas contendo mais de 10% de umidade, em base úmida, requerem um processo de secagem antes da extração com fluido supercrítico. Além de garantir a umidade adequada para a extração, a secagem permite um melhor manuseio das amostras e também evita a formação de aglomerados de partículas. Para determinar o tempo correto para a secagem, foi realizado um estudo preliminar da cinética de secagem na estufa, em triplicata. Nos ensaios, aproximadamente 30 g dos frutos (2 cm de espessura) foram colocados em uma bandeja metálica. A amostra foi mantida na estufa à temperatura de 40 °C, sendo a massa da amostra determinada, ao longo do tempo, até a massa constante, em uma balança analítica (BEL[®],

precisão de 0,0001 g). O conteúdo de umidade da amostra foi determinado segundo o método descrito na Seção 4.2.2.1 deste trabalho.

Após a secagem, a matéria-prima foi triturada em um liquidificador industrial (Waring Commercial[®]) durante 1 minuto e em bateladas de aproximadamente 200 g. Segundo Reverchon e de Marco (2006), as extrações de produtos naturais com fluido supercrítico, geralmente, são realizadas com partículas variando de 0,25 a 2,0 mm. E, para que o diâmetro médio das partículas esteja incluído nessa faixa, todo o material triturado foi classificado com o auxílio de uma peneira metálica de abertura de 1,68 mm (Granutest[®]). O peneiramento foi realizado por meio de agitação manual, sendo que o material retido na peneira foi novamente triturado no liquidificador. Após as operações de preparo da matéria-prima, essa foi armazenada em embalagens de plástico herméticas, sendo que o material foi mantido em *freezer* (-18 °C) até o início dos ensaios de extração.

5.2.1.1 Granulometria

Para determinar a granulometria da matéria-prima utilizada na extração supercrítica, amostras representativas foram classificadas de acordo com a série padrão de peneiras Tyler de 10 a 42 mesh (Granutest[®]), utilizando um agitador de peneiras (Bertel[®]). O peneiramento foi realizado por meio de uma agitação mecânica utilizando o agitador de peneiras, em frequência máxima e por um tempo de 20 minutos. As massas retidas em cada peneira foram determinadas em uma balança semianalítica (SHIMADZU[®], precisão de 0,01 g). O diâmetro médio geométrico da partícula (d_{mg}) foi determinado de acordo com o método recomendado pela *American Society of Agricultural Engineers* (ASAE, 1998), conforme a Equação 5.1.

$$d_{mg} = \log^{-1} \left(\frac{\sum_{i=1}^n (m_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n m_i} \right) \quad (5.1)$$

Em que m_i é massa do material retido na i -ésima peneira e \bar{d}_i é o diâmetro médio das partículas retidas na i -ésima peneira, calculado conforme a Equação 5.2.

$$\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i-1})^{0,5} \quad (5.2)$$

Em que: d_i é abertura nominal da i -ésima peneira, pela qual a partícula ficou retida; e d_{i-1} é abertura nominal de uma peneira maior que a i -ésima peneira, pela qual a partícula passou. Para comparação, foi calculado o diâmetro médio de Sauter (d_{ps}) conforme a Equação 4.4.

5.2.1.2 Massa específica e Porosidade

A **massa específica real da partícula (ρ_r)** foi determinada por picnometria com gás hélio na Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. Nas análises, foi utilizado um picnômetro de gás hélio (Picnômetro automático Ultrapyc 1200e, Quantachrome), sendo que foram realizados 10 ensaios para calcular o desvio padrão. A **massa específica do leito da extração supercrítica (ρ_l)** foi determinada a partir das medidas de massa da matéria-prima utilizada no empacotamento da coluna de extração (m_l) e o volume da coluna de extração (V_l), conforme a Equação 5.3.

$$\rho_l = \frac{m_l}{V_l} \quad (5.3)$$

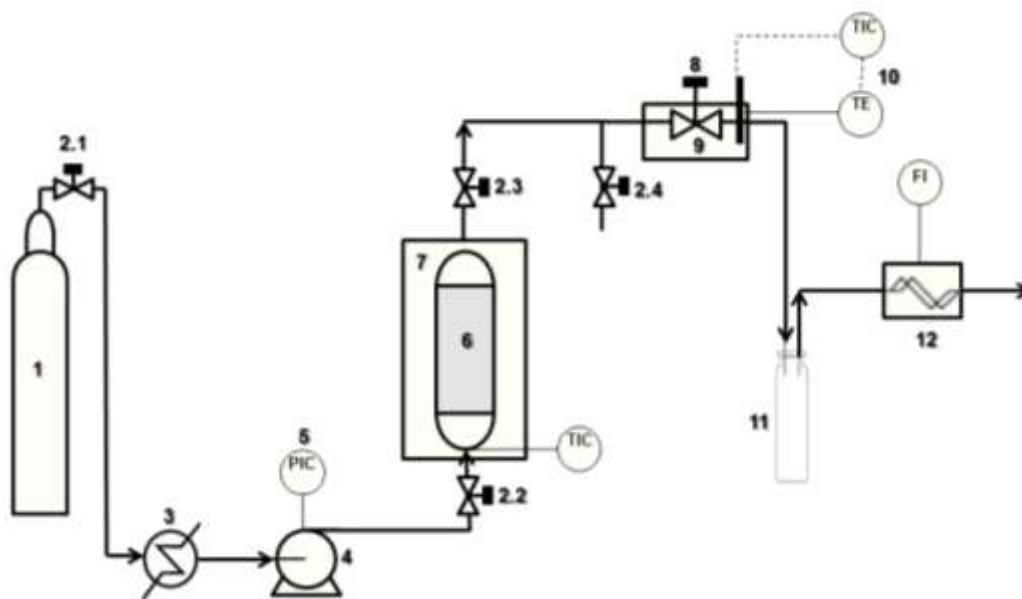
O volume do leito (cilindro) foi determinado pelas medidas de altura e diâmetro da coluna de extração, com o uso de um paquímetro digital (Digimess[®]), sendo que o diâmetro da coluna de extração é igual a 2 cm. A **porosidade do leito de extração (ε)** foi determinada por meio da Equação 5.4.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_l}{\rho_r} \quad (5.4)$$

5.2.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Na Figura 5.1, expõe-se o diagrama esquemático do sistema experimental utilizado para a extração com fluido supercrítico. O equipamento está instalado no Laboratório de Tecnologias Supercríticas (LTS) do Instituto de Química (IQ) da UNICAMP e foi gentilmente cedido para a realização deste trabalho.

Figura 5.1 – Diagrama esquemático do sistema de extração com fluido supercrítico



(1) Cilindro de CO₂; (2) Válvulas agulha; (3) Banho ultratermostatizado; (4) Bomba de alta pressão; (5) Controlador indicativo de pressão; (6) Coluna de extração; (7) Estufa de aquecimento com controle de temperatura; (8) Válvula micrométrica; (9) Sistema de aquecimento; (10) Sistema de controle de temperatura; (11) Coletor de extrato; (12) Medidor de vazão Coriolis.

Fonte: Acervo do autor.

O extrator supercrítico (Figura 5.1) é alimentado com CO₂ (99,5%, White Martins[®]) estocado em um **Cilindro de CO₂** (1). Em todo o equipamento, para o bloqueio da vazão de CO₂, são utilizadas **Válvulas do tipo agulha** (2) (Autoclave Engineers[®]). Para garantir que o CO₂ chegue à bomba no estado líquido, evitando a cavitação da mesma, o CO₂ é resfriado no **Banho Ultratermostatizado** (3) (Marconi[®], modelo MA184). A **Bomba de alta pressão** (4) (Thar SFC, modelo P-50A) pressuriza o solvente até a pressão de extração desejada por meio de um **Controlador Indicativo de Pressão** (5).

Antes do início da extração, a matéria-prima foi compactada no interior da **Coluna de extração** (6). Para evitar a formação de caminhos preferenciais, a amostra foi colocada em pequenas porções que foram acomodadas com o auxílio de um bastão cilíndrico.

Nos ensaios para determinar o rendimento global da extração supercrítica, foram utilizadas 20 g da matéria-prima. Já no estudo da cinética da extração supercrítica, foram utilizadas 30 g da matéria-prima. Como essas quantidades não foram suficientes para preencher o volume total da coluna (45 mL), o espaço remanescente foi completado com pérolas de vidro (na entrada do leito). Após o empacotamento, a coluna foi fechada e conectada ao sistema de extração, sendo que a coluna de extração foi instalada dentro de uma **Estufa com controlador de temperatura** (7) (QUIMIS[®]).

Após deixar a coluna de extração, a fase fluida (CO₂ e extrato) passa por uma **Válvula micrométrica (8)** (Autoclave Engineers[®]) que permite ajustar a vazão do solvente e reduzir a pressão. Para evitar o congelamento e a obstrução da linha, causados pelos efeitos da expansão Joule-Thomson, a válvula micrométrica possui um **Sistema de aquecimento elétrico (9)** conectado a um **Sistema de controle de temperatura (10)**. Esse sistema é formado por uma estrutura de alumínio que reveste a válvula micrométrica, e uma resistência elétrica que está ligada a um controlador de temperatura (COEL[®], modelo HW500). O controlador recebe informações de um indicador digital de temperatura posicionado na válvula micrométrica.

Após passar pela válvula micrométrica, ocorre a separação entre extrato e solvente devido à redução da pressão, sendo o extrato recolhido no **Coletor de extrato (11)** (frasco penicilina de 100 mL). O frasco de coleta, previamente tarado, foi ajustado na saída do extrator parcialmente imerso em banho de gelo seco para minimizar perdas de compostos voláteis. Nos ensaios cinéticos, foram utilizados vários frascos para a coleta dos extratos ao longo do tempo: os frascos foram coletados em intervalos de 5, 10 e 30 minutos até o final da extração.

Antes de ser liberado para o meio ambiente, o CO₂ passa pelo **Coriólis (12)** (SIEMENS, SITRANS F C MASS 6000) que permite acompanhar a vazão mássica do CO₂ durante todo o processo. Em todos os ensaios, foi utilizada uma vazão de 6 g/min, que foi definida em ensaios preliminares, de acordo com as limitações do equipamento de extração supercrítica. Após a extração, o frasco de coleta foi retirado do equipamento e, em seguida, a linha entre a coluna e a válvula micrométrica foi lavada, com o auxílio de uma seringa de vidro, com diclorometano anidro P.A (Sigma-Aldrich[®]) por três vezes, para recuperar o extrato aderido ao sistema de extração. Para a remoção do diclorometano, foi utilizado o rotaevaporador (Buchi[®], modelo B-490) a 40 °C e pressão reduzida. O rendimento de extrato em base seca (X_o) foi calculado de acordo com a Equação 5.5.

$$X_o = \frac{m_E}{m_{ss}} 100 \quad (5.5)$$

Em que m_E é a massa do extrato e m_{ss} é a massa seca da matéria-prima utilizada na extração. Após os procedimentos de extração, os extratos foram colocados em frascos de vidro e mantidos em *freezer* (-18 °C) até o momento de sua utilização nas análises.

5.2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho, a extração com CO₂ supercrítico foi avaliada por meio de um planejamento fatorial de experimentos. Foram investigadas as influências da pressão (y_1) e temperatura (y_2) do fluido supercrítico sobre o rendimento global e a composição química dos extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius*. Na Tabela 5.1, coloca-se os valores dos níveis das variáveis investigadas neste trabalho.

Tabela 5.1 – Níveis das variáveis da extração supercrítica utilizados no planejamento fatorial

Variável	Nível		
	-1	0	+1
Pressão (bar)	100	200	300
Temperatura (°C)	40	50	60

Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 5.2 apresenta a matriz do planejamento experimental, sendo desenvolvido um planejamento fatorial completo (2^2) com três repetições no ponto central, totalizando sete ensaios. O planejamento experimental possibilitou, com poucos experimentos, uma ampla faixa de massa específica do CO₂ supercrítico (0,298 a 0,928 g/cm³), que é fundamental para a produção de extratos com características variadas.

Tabela 5.2 – Planejamento fatorial completo para a extração supercrítica

Ensaio	Pressão (bar) ¹	Temperatura (°C) ¹	Massa específica do CO ₂ (g/cm ³)
1	100 (-1)	40 (-1)	0,562
2	300 (+1)	40 (-1)	0,928
3	100 (-1)	60 (+1)	0,298
4	300 (+1)	60 (+1)	0,831
5	200 (0)	50 (0)	0,762
6	200 (0)	50 (0)	0,762
7	200 (0)	50 (0)	0,762

Fonte: Dados da pesquisa.

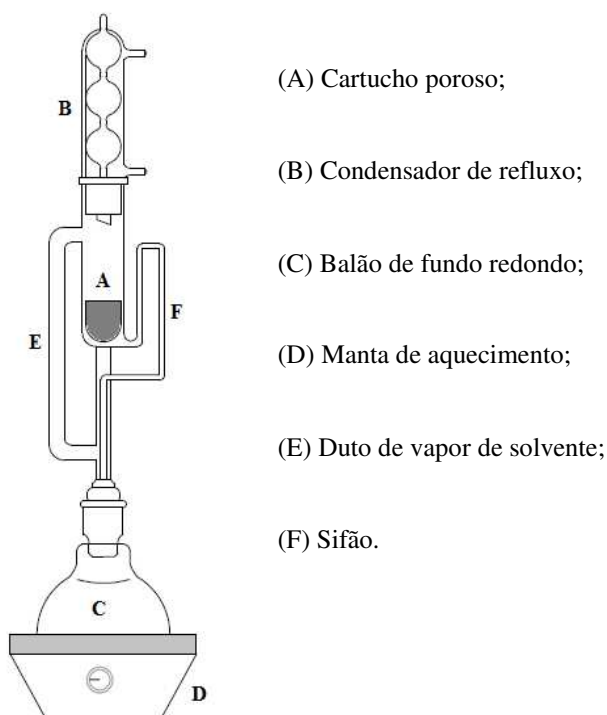
Nota: ¹Valores codificados entre parênteses.

Todos os ensaios apresentados na Tabela 5.2 foram realizados em duplicata e em ordem aleatória. Os dados experimentais foram analisados com o auxílio do *software* STATISTICA[®], utilizando um nível de significância de 5%. Para definir o tempo de extração, utilizado nos ensaios para determinar o rendimento global, foi realizado um estudo preliminar da cinética da extração nas condições operacionais do ensaio 3 da Tabela 5.2 (100 bar e 60 °C), condição esta que garante a menor massa específica do CO₂ supercrítico (0,298 g/cm³) nas condições avaliadas neste trabalho.

5.2.4 EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS

Para comparar os produtos da extração com CO₂ supercrítico com alguns processos convencionais de extração, a matéria-prima utilizada na extração supercrítica também foi submetida às técnicas de extração em sistema Soxhlet e hidrodestilação. A hidrodestilação foi realizada em aparelho Clevenger, conforme a metodologia descrita na Seção 3.2.2 deste trabalho (razão sólido/água de 97,4 g/L e 4,5 horas de extração). A extração em sistema Soxhlet (Figura 5.2) foi realizada em duas etapas sequenciais: na primeira etapa, foi utilizado diclorometano como solvente; e na segunda etapa de extração, foi utilizado o etanol como solvente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 5.2 – Diagrama esquemático do sistema de extração tipo Soxhlet



Fonte: Acervo do autor.

Inicialmente, para a obtenção do extrato diclorometânico (ED), 10 g da matéria-prima foram colocadas no cartucho poroso do aparelho de Soxhlet (A). O aparelho foi acoplado a um condensador de refluxo (B) e a um balão de fundo redondo de 500 mL (C), contendo 200 mL de diclorometano (Merck®) e pérolas de vidro. O balão foi aquecido em uma manta de aquecimento de 500 mL (Fisaton®, modelo 102) (D) e o sistema foi mantido em refluxo de solvente por 4 horas (ANVISA, 2010). Nesse período, o solvente foi vaporizado e condensado por várias vezes, enchendo o cartucho poroso e sendo sifonado (F) para o balão por várias vezes, assim, transpondo o extrato em um processo contínuo de extração. Após o período de extração, a mistura resultante do balão foi filtrada em papel. Para a remoção do diclorometano, o filtrado foi levado ao rotaevaporador (Buchi®, modelo B-490) a 40 °C, com pressão reduzida, resultando no extrato diclorometânico (ED). O rendimento em base seca foi calculado conforme a Equação 5.5. Para a obtenção do extrato etanólico (EE), o resíduo vegetal, resultante do processo de extração com diclorometano, foi retomado e submetido a uma segunda extração com 200 mL de etanol (CHEMCO®) por um período de 4 horas (ANVISA, 2010).

5.2.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Para a caracterização química da fração volátil dos extratos, foi utilizada a **Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)**. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, modelo HP-6890) com espectrômetro de massas (Agilent Technologies, modelo HP-5975). As amostras também foram monitoradas qualitativamente por **Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**. As condições das análises cromatográficas (CG-EM e CCD) foram as mesmas descritas na Seção 3.2.4 deste trabalho. As amostras analisadas foram preparadas por meio da diluição de 20 mg do produto em 1 mL de acetato de etila. Para quantificar o teor em massa do composto volátil majoritário nos extratos, foi utilizado o **método do padrão externo**. O padrão analítico utilizado foi o δ -3-careno (Sigma-Aldrich®, 97% de pureza), que é o composto majoritário do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*, conforme observado no Capítulo 3 deste trabalho. Para obtenção da curva analítica, foi preparada uma solução-mãe de 2317 μ g de δ -3-careno/mL de acetato de etila. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas para obter as seguintes concentrações: 1558 μ g/mL; 579 μ g/mL; 290 μ g/mL; 145 μ g/mL; 72 μ g/mL; e 36 μ g/mL. As diluições foram realizadas com pipeta automática em balões volumétricos de 5 mL.

5.2.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

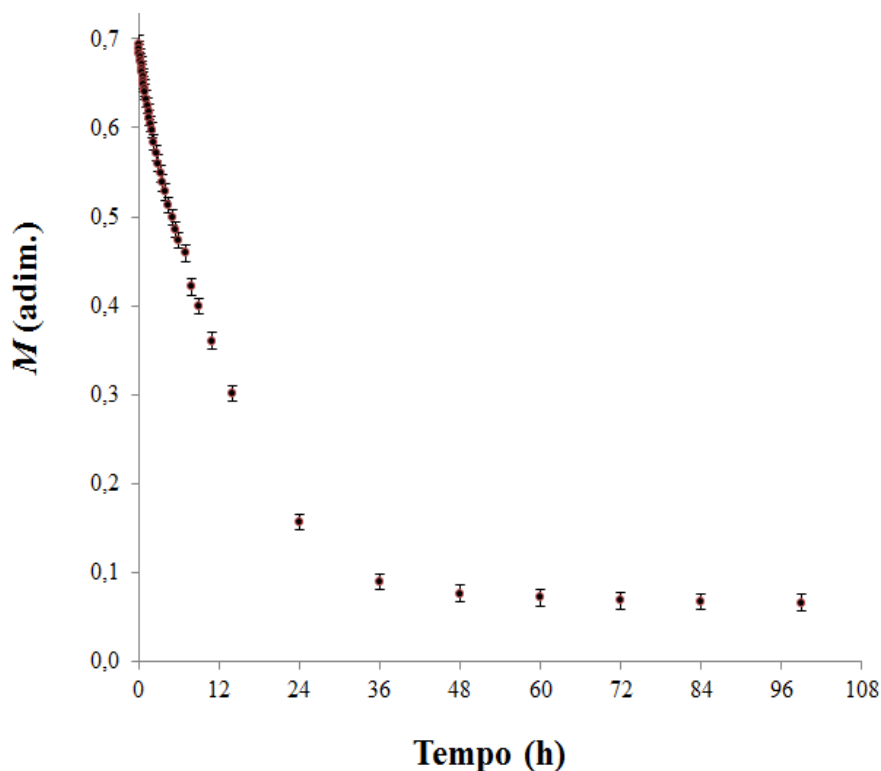
Como referido anteriormente, o objetivo deste estudo foi investigar a extração de compostos bioativos dos frutos de *S. terebinthifolius* utilizando CO₂ supercrítico como solvente, com isso, visando à sua utilização como recurso terapêutico para o tratamento de alguns tipos de câncer. E, nesse sentido, foi investigada a atividade antiproliferativa dos produtos obtidos em todas as condições operacionais da extração supercrítica (Tabela 5.2) frente a células tumorais humanas [glioma (U251), mama (MCF7), ovário com fenótipo de resistência (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460), rim (786-0), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT29) e leucemia (K562)]. Os experimentos foram realizados segundo a metodologia descrita na Seção 3.2.5 deste trabalho.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 MATÉRIA-PRIMA

Na Figura 5.3 é apresentada a cinética de secagem dos frutos de *S. terebinthifolius* (Lote A) em estufa de secagem com circulação de ar forçada, à temperatura de 40 °C.

Figura 5.3 – Cinética de secagem dos frutos de *S. terebinthifolius* (Lote A) em estufa à 40 °C

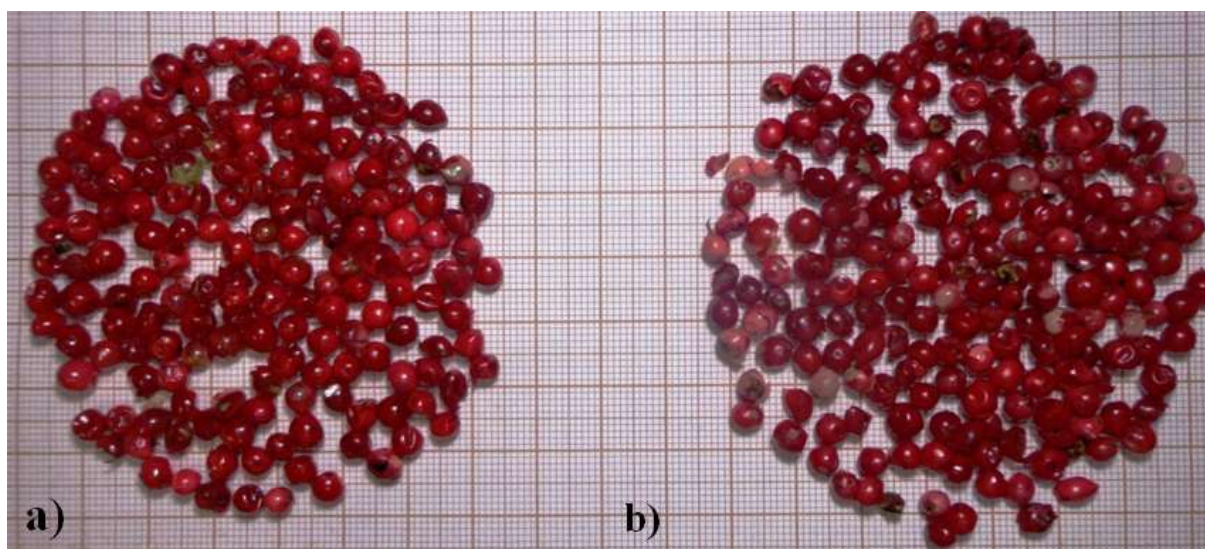


Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: O desvio padrão médio relacionado ao conteúdo de umidade em base seca (M) foi igual a 0,009.

Pela análise da curva de cinética de secagem da Figura 5.3, determinou-se um tempo de secagem de três dias (72 horas) para a matéria-prima, pois, a partir desse período de secagem, não se observou perda de massa significativa no processo. A Figura 5.4 apresenta amostras dos frutos da *S. terebinthifolius* antes e após a secagem em estufa.

Figura 5.4 – Amostras dos frutos da *S. terebinthifolius* (Lote A): a) antes da secagem; b) e após a secagem



Fonte: Acervo do autor.

Na Figura 5.4, pode-se observar que não houve encolhimento dos frutos de *S. terebinthifolius* durante a secagem, sendo que os frutos, após o processo de secagem, continham um conteúdo de umidade, em base úmida, próximo de $6,4 \pm 0,9\%$. Portanto, essa umidade é considerada adequada ($M^* < 10\%$) para a extração com fluido supercrítico (MEIRELES, 2003). Segundo Sahena et al. (2009), o alto conteúdo de umidade reduz o contato da matriz sólida com o fluido supercrítico e atua como uma barreira para a difusão do fluido na amostra, reduzindo o rendimento da extração.

Outra etapa de pré-tratamento fundamental para a extração supercrítica é a moagem da matéria-prima. Na Tabela 5.3, indica-se a distribuição granulométrica obtida a partir do peneiramento de amostras representativas da matéria-prima utilizada na extração supercrítica.

Tabela 5.3 – Especificações das faixas de diâmetro médio da partícula e distribuição granulométrica obtida a partir do peneiramento de amostras representativas da matéria-prima utilizada na extração supercrítica

Faixa	Tyler (mesh)	Abertura da peneira ¹		\bar{d}_i (mm) ²	x_i (%) ³
		$-d_{i-1}$	$+d_i$ (mm)		
f_1	-10 +12	-1,680	+1,410	1,539	0,48
f_2	-12 +14	-1,410	+1,190	1,295	4,12
f_3	-14 +16	-1,190	+1,000	1,091	16,23
f_4	-16 +20	-1,000	+0,841	0,917	26,84
f_5	-20 +24	-0,841	+0,707	0,771	32,07
f_6	-24 +28	-0,707	+0,595	0,649	9,51
f_7	-28 +32	-0,595	+0,500	0,545	10,16
f_8	-32 +35	-0,500	+0,420	0,458	0,36
f_9	-35 +42	-0,420	+0,354	0,386	0,22

Fonte: Dados da pesquisa.

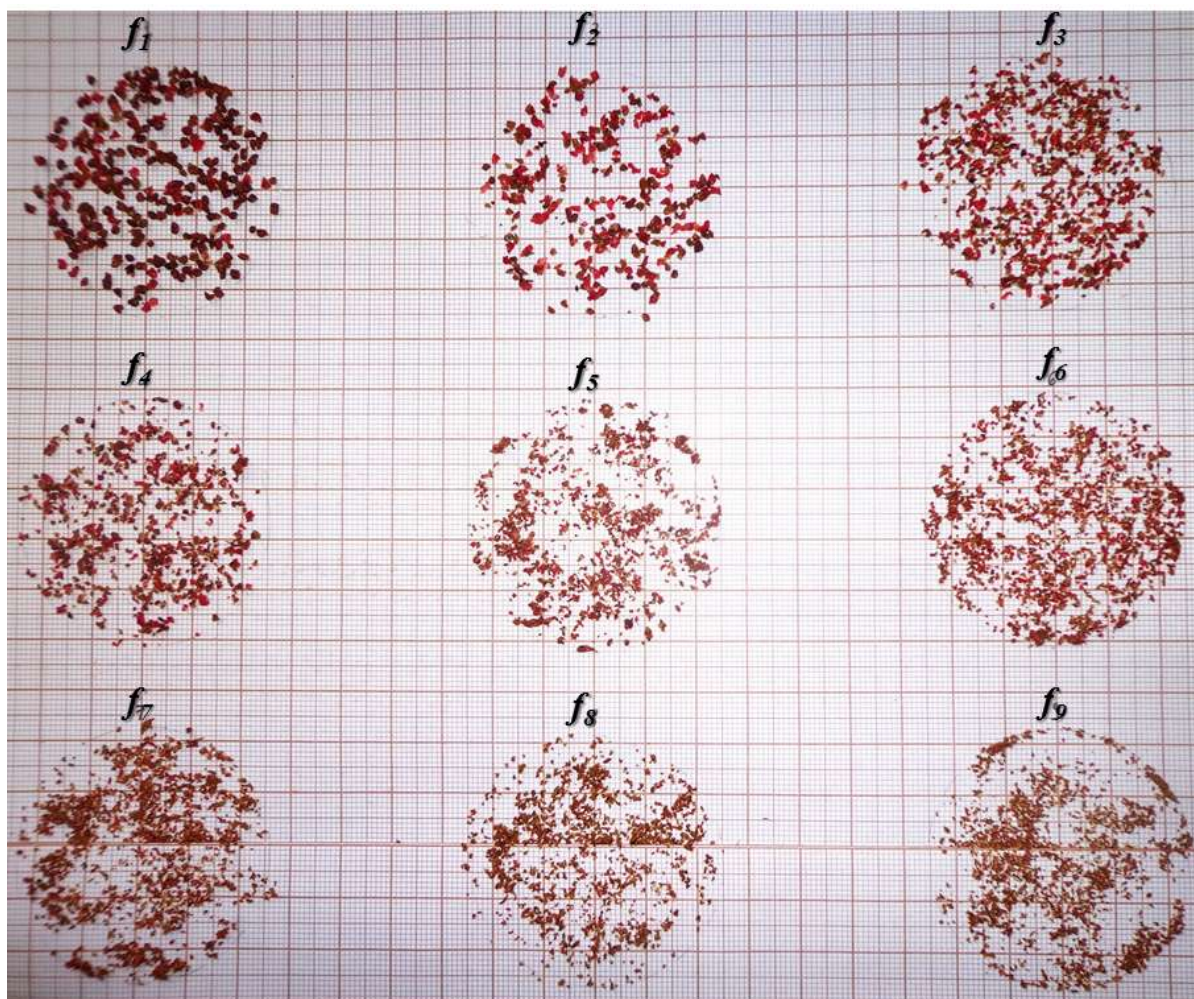
Notas:

¹ $+d_i$ é abertura nominal da i-ésima peneira, pela qual a partícula ficou retida; e $-d_{i-1}$ é abertura nominal de uma peneira maior que a i-ésima peneira, pela qual a partícula passou.

²Diâmetro médio das partículas retidas na i-ésima peneira, calculado conforme a Equação 5.2.

³Fração mássica do material retido na i-ésima peneira.

A Figura 5.5 ilustra imagens das faixas de diâmetro de partícula presentes na amostra utilizada na extração supercrítica.

Figura 5.5 – Faixas de diâmetro de partícula (f_i) presentes na amostra utilizada na extração supercrítica

Fonte: Acervo do autor.

Nota: As especificações das faixas de diâmetro médio da partícula (f_i) são descritas na Tabela 5.3.

Com base nos dados exibidos na Tabela 5.3, pode-se inferir que a matéria-prima utilizada na extração supercrítica tratava-se de um material heterogêneo do ponto de vista dos tamanhos de suas partículas, uma vez que o diâmetro variou entre 0,545 e 1,295 mm. Portanto, de acordo com Cremasco (2014), a matéria-prima pode ser classificada como sólidos finos. Estes resultados estão dentro da faixa recomendada por Reverchon e de Marco (2006) para a extração supercrítica, com partículas de diâmetro médio variando de 0,25 a 2 mm.

Na Tabela 5.4, são apresentados todos os resultados da caracterização física da matéria-prima que foi utilizada na extração supercrítica.

Tabela 5.4 – Caracterização física do leito de extração supercrítica

	M (-)	M^* (%)	d_{mg} (mm)	d_{pS} (mm)	ρ_r (g/cm ³)	ρ_l (g/cm ³)	ε (-)
Valor	0,0680	6,37	0,828	0,809	1,36	0,673	0,505
Desvio padrão	0,009	0,9	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02
Livia (2013)	-	8,90	1,24	-	1,38	0,80	0,42
Andrade (2015)	-	20,08	-	-	1,32	0,37	0,72

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: M : conteúdo de umidade em base seca; M^* : conteúdo de umidade em base úmida; d_{mg} : diâmetro médio geométrico; d_{pS} : diâmetro médio de Sauter; ρ_r : massa específica real; ρ_l : massa específica do leito; ε : porosidade do leito.

Ao comparar os dados experimentais com os valores determinados por Livia (2013) e Andrade (2015), observa-se (Tabela 5.4) que a massa específica real apresenta valores próximos dos encontrados nestes trabalhos. Entretanto foram detectados desvios significativos para os outros parâmetros da matéria-prima. Tais desvios podem ser consequência das diferenças nas etapas de pré-tratamento da matéria-prima, como a moagem e a secagem. Ademais, as condições de cultivo dos diferentes lotes, o local de coleta, a variabilidade genética da espécie vegetal, entre outros fatores, podem ter influenciado nessa variabilidade das características físicas da matéria-prima.

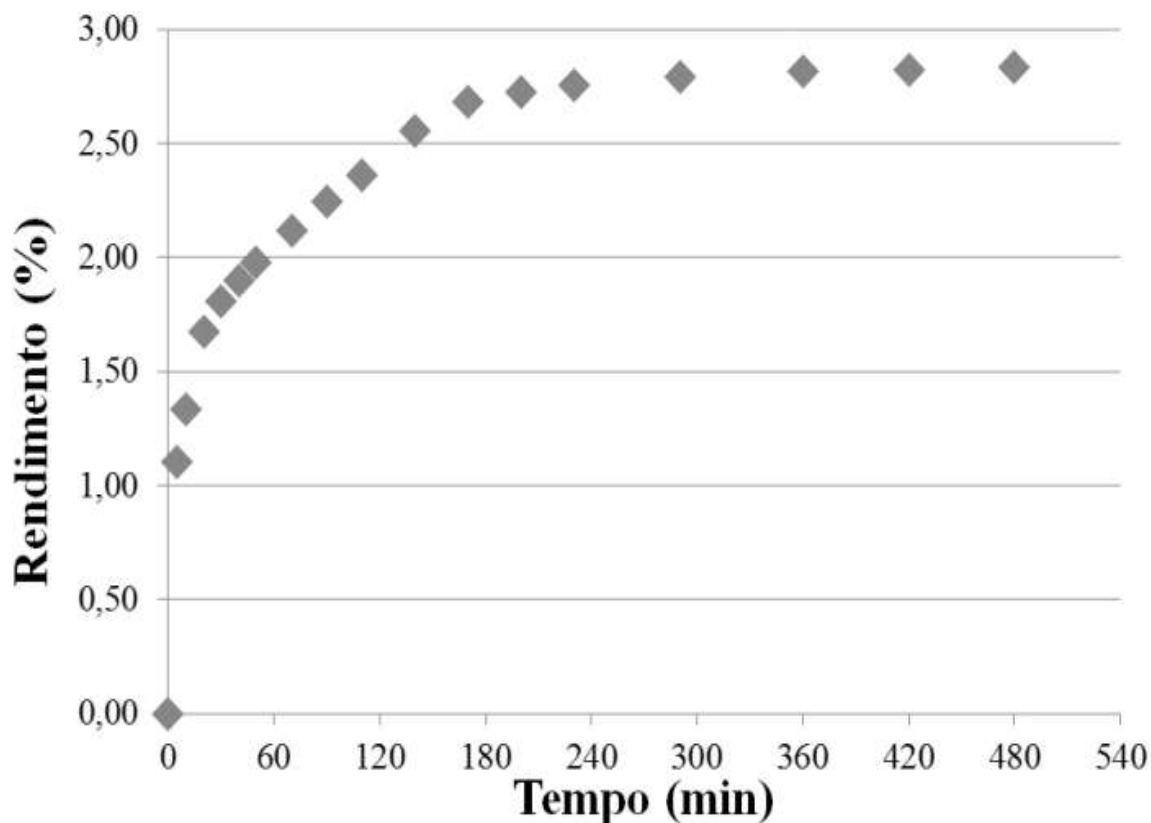
Segundo os dados da Tabela 5.4, a porosidade do leito está na faixa de valores citados na literatura para a extração supercrítica (LIVIA, 2013; ANDRADE, 2015). Além disso, foi observado que o diâmetro médio geométrico da partícula foi de 0,828 mm; e o valor do diâmetro médio de Sauter, de 0,809 mm. Em consonância ao mencionado anteriormente, estes resultados estão dentro da faixa (0,25 a 2,0 mm) recomendada para a extração supercrítica (REVERCHON; DE MARCO, 2006). O diâmetro da partícula é um fator determinante na extração supercrítica, sendo que menores diâmetros podem resultar em maiores rendimentos da extração. Isso ocorre porque, quando a extração supercrítica é controlada pela resistência interna à transferência de massa, partículas menores ocasionam menor caminho difusivo do solvente para o interior da partícula e da mistura solvente-soluto para a superfície dessa. E, ainda, as partículas menores irão garantir maior área de contato do sólido, de forma que isso irá promover mais soluto em contato direto com o solvente.

5.3.2 ENSAIOS PRELIMINARES

A Figura 5.6 apresenta a cinética da extração supercrítica nas condições operacionais do ensaio 3 da Tabela 5.2 (100 bar e 60 °C). Lembrando que este estudo preliminar foi

realizado para estimar o tempo de extração utilizado nos ensaios para determinar o rendimento global em todas as condições do planejamento fatorial apresentado na Tabela 5.2.

Figura 5.6 – Cinética da extração supercrítica para as condições operacionais de 100 bar e 60 °C



Fonte: Dados da pesquisa.

A partir da análise da cinética de extração (Figura 5.6), definiu-se um tempo de extração de 360 minutos (6 horas) para todas as extrações do planejamento experimental (Tabela 5.2). Esse período resultou em uma razão entre massa de solvente e a massa seca da matéria-prima (S/F) de aproximadamente 121, assim, garantindo taxas de extração insignificantes ao final de todas as extrações. Estes dados indicam que a massa de solvente foi suficiente para garantir que todas as extrações indicadas na Tabela 5.2 fossem consideradas exaustivas.

5.3.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS

Na Figura 5.7, apresentam-se amostras dos extratos supercríticos obtidos nas condições operacionais indicadas na Tabela 5.2, além dos produtos das extrações convencionais (hidrodestilação e Soxhlet).

Figura 5.7 – Amostras de extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7, nas condições operacionais da Tabela 5.2), óleo essencial (OE), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE) dos frutos de *S. terebinthifolius*



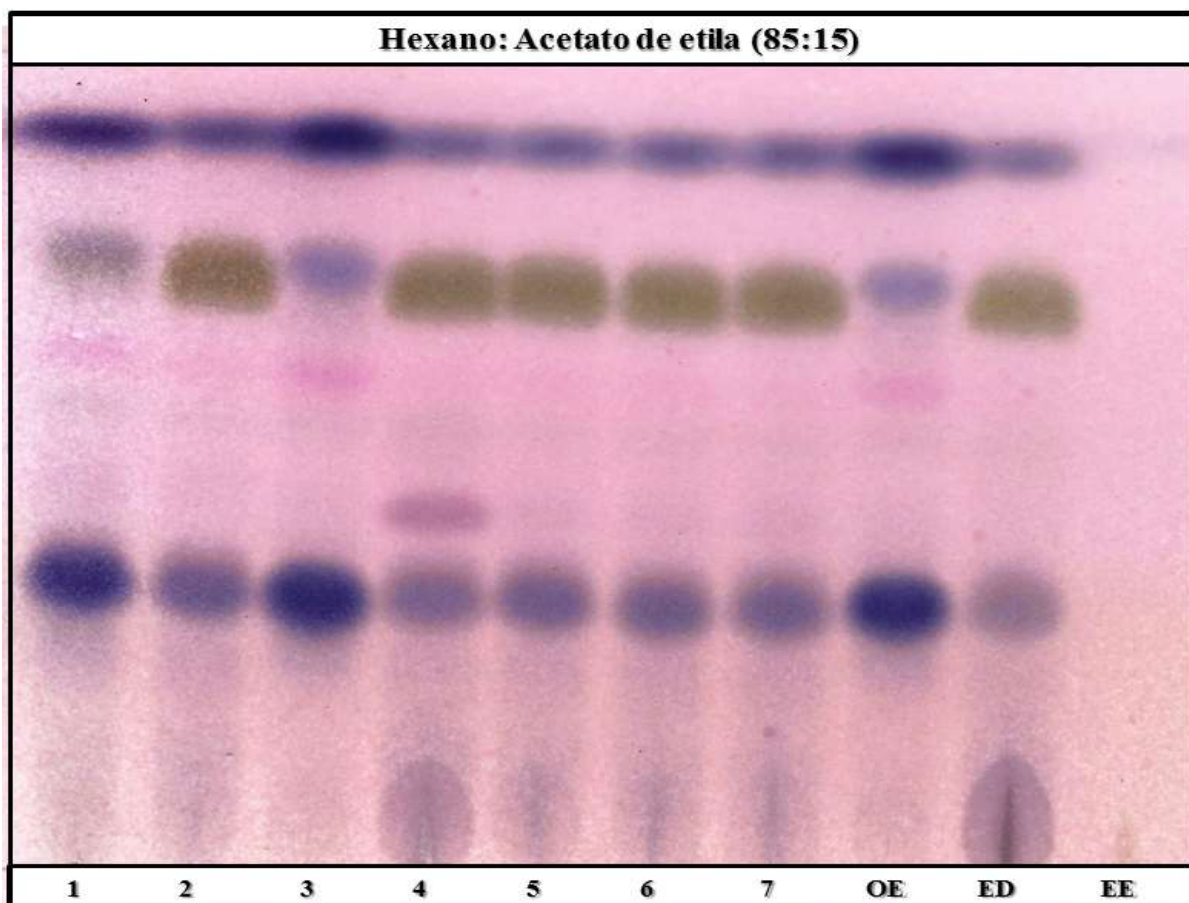
Fonte: Acervo do autor.

Conforme a Figura 5.7, foram detectadas diferenças significativas entre os produtos obtidos a partir dos diferentes métodos de extração (extração supercrítica, hidrodestilação e Soxhlet) e solventes utilizados, e também das variadas condições operacionais utilizadas na extração com CO₂ supercrítico. A amostra 3 foi visualmente semelhante ao produto obtido na hidrodestilação (OE), ou seja, caracterizado como um óleo essencial sem coloração, translúcido e de baixa viscosidade. Lembrando que esta amostra foi obtida em baixa pressão do CO₂ supercrítico (100 bar). Em contraste, em altas pressões (200 e 300 bar), os produtos obtidos (amostras 2 e 4-7) apresentaram coloração com maior intensidade e também maior viscosidade quando comparados ao óleo essencial (OE) e extratos obtidos em baixas pressões (amostras 1 e 3). A coloração amarelada observada em algumas amostras, especialmente aquelas obtidas com altas pressões do CO₂ supercrítico, pode ser devido à presença de compostos fenólicos, tais como a flavona apigenina (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004). Além disso, esta coloração pode ser em função dos carotenoides presentes nos frutos de *S. terebinthifolius* (PAGANI et al., 2014). No entanto são necessários estudos específicos para estabelecer uma relação definitiva entre estes compostos e a cor dos extratos dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Já o extrato diclorometânico (ED) apresentou uma coloração verde-escura e na extração subsequente com etanol (EE), foi observado um extrato semissólido e com uma coloração ainda mais escura. Essas diferenças qualitativas entre os diferentes produtos se deram devido à extração de compostos de elevada massa molecular, durante a extração com os solventes orgânicos e em pressões elevadas na extração supercrítica, sendo que, na hidrodestilação, os componentes não voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius* (ceras, ácidos graxos, pigmentos, etc.) não são extraídos, o que facilita o posterior fracionamento do

produto. A Figura 5.8 apresenta o perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos produtos apresentados na Figura 5.7.

Figura 5.8 – Perfil cromatográfico por CCD das amostras de extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7, nas condições operacionais da Tabela 5.2), óleo essencial (OE), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE)



Fonte: Acervo do autor.

Nota: A fase móvel utilizada foi o sistema hexano:acetato de etila (85:15) e os compostos foram revelados com solução ácida de anisaldeído.

Segundo Jork et al. (1990), a solução ácida de anisaldeído, utilizada como revelador neste trabalho, permite a revelação de terpenos. Dessa maneira, o perfil por CCD (Figura 5.8) revelou a presença de terpenos nos extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius* (ensaios de 1 a 7, nas condições operacionais da Tabela 5.2), bem como no óleo essencial (OE) e no extrato diclorometânico (ED). De forma geral, são observadas três bandas semelhantes em todos os produtos analisados. Porém verificaram-se diferenças significativas entre os perfis cromatográficos devido às distintas técnicas de extração utilizadas (extração supercrítica, hidrodestilação e Soxhlet) e também às condições operacionais da extração supercrítica (Tabela 5.2).

Ao comparar os extratos supercríticos com os produtos obtidos nas extrações convencionais, observou-se na Figura 5.8 que, em baixas pressões do CO₂ supercrítico (ensaios 1 e 3), o produto apresentou um perfil cromatográfico semelhante ao óleo essencial (OE). Estes resultados indicam uma maior solubilidade e seletividade para os terpenos quando se utilizou a pressão de 100 bar na extração supercrítica. De fato, Reverchon e de Marco (2006) citam que a extração de compostos voláteis pode ser realizada de forma mais seletiva ao utilizar pressões na faixa de 90 a 100 bar, uma vez que nestas condições todos os compostos do óleo essencial são altamente solúveis em CO₂ supercrítico e os compostos não voláteis são insolúveis. Conforme observado na Figura 5.8, em altas pressões (ensaios 2 e 4-7), o perfil foi semelhante ao extrato diclorometânico (ED). Além disso, detectou-se que todos os terpenos foram extraídos quando se utilizou o diclorometano, pois, no extrato etanólico (EE), não foram observados terpenos.

Os resultados qualitativos da CCD são melhores discutidos mediante os resultados da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) (Tabela 5.5), que fornece dados quantitativos da composição química dos compostos voláteis dos produtos obtidos neste trabalho.

Tabela 5.5 – Composição química (CG-EM) da fração volátil dos extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7), óleo essencial (OE) e extrato diclorometânico (ED)

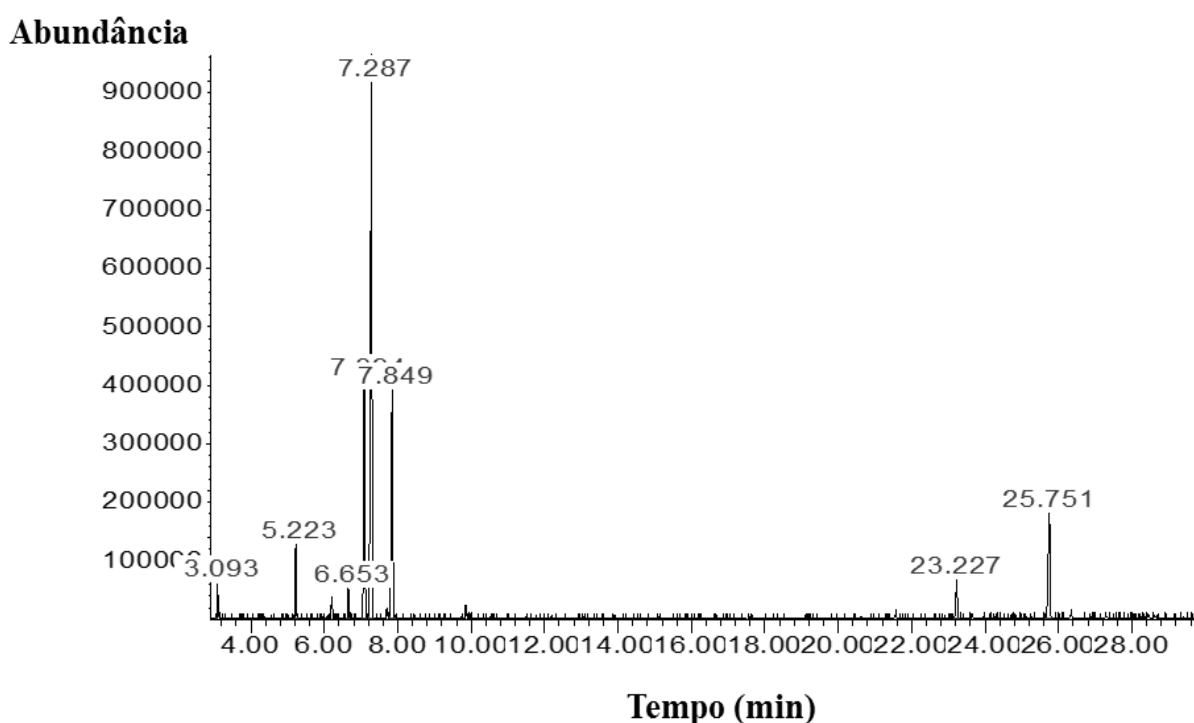
Composto	Área relativa (%) ¹								
	Extratos supercríticos ³							OE	ED
	1	2	3	4	5	6	7		
n.i. ²	0,56	-	-	1,32	1,71	1,57	1,35	-	3,74
α -pineno	3,41	5,33	2,77	5,23	2,85	4,54	3,66	5,09	1,87
Sabineno	1,18	-	1,09	-	-	-	-	1,32	-
β -mirceno	1,96	-	1,93	1,74	1,67	1,83	1,77	2,33	1,68
α-felandreno	15,82	18,04	14,64	16,93	16,54	16,89	17,09	14,45	1,27
δ-3-careno	40,53	49,21	38,94	45,87	44,07	48,02	44,47	45,92	51,78
n.i. ²	-	-	-	-	-	-	-	2,00	-
Limoneno	17,91	19,05	17,79	18,37	18,87	19,59	18,71	19,42	23,85
Terpinoleno	1,05	-	1,26	-	-	-	-	1,00	-
n.i. ²	-	-	-	-	-	-	-	-	2,50
n.i. ²	-	-	-	-	-	-	-	-	1,68
Cariofileno	4,17	-	5,37	2,48	3,45	-	3,08	2,75	3,51
germacreno D	13,43	8,37	16,21	8,05	10,84	7,56	9,88	5,72	8,13
<i>Total identificado (%)</i>	99,44	100,00	100,00	98,68	98,29	98,43	98,65	98,00	92,09
Monoterpenos (%)	82,40	91,63	78,42	89,47	85,71	92,44	87,04	91,53	84,19
Sesquiterpenos (%)	17,60	8,38	21,58	10,53	14,29	7,56	12,96	8,47	15,82

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas; ²Não identificado; ³Ensaios de 1 a 7, nas condições operacionais indicadas na Tabela 5.2.

De acordo com os dados da Tabela 5.5, a análise por CG-EM permitiu a detecção de 10 compostos voláteis nos extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius*, sendo que nove compostos foram identificados e representam, em média, 99% da composição química da fração volátil dos extratos. De forma geral, a fração volátil dos extratos supercríticos continha os mesmos componentes majoritários do óleo essencial e do extrato diclorometânico. Todavia os extratos supercríticos apresentaram concentração mais elevada de germacreno D e cariofileno quando comparados ao óleo essencial. Os principais componentes identificados nos extratos supercríticos foram o δ -3-careno (38,94%-49,21%), limoneno (17,79%-19,59%), α -felandreno (14,64%-18,04%), germacreno D (7,56%-16,21%) e cariofileno (2,48%-5,37%). De forma geral, esses cinco componentes majoritários correspondem a mais de 90% da composição química da fração volátil dos extratos supercríticos. A Figura 5.9 ilustra o perfil cromatográfico da fração volátil do extrato supercrítico obtido nas condições operacionais do ponto central do planejamento experimental (50 °C e 200 bar).

Figura 5.9 – Cromatograma (CG-EM) da fração volátil do extrato supercrítico obtido nas condições operacionais de 50 °C e 200 bar (ensaio 7 da Tabela 5.2)



Fonte: Dados da pesquisa.

Notas:

$t_{r,i}$ (tempo de retenção)=5,223 min referente ao α -pineno;

$t_{r,i}$ =6,653 min referente ao β -mirceno;

$t_{r,i}$ =7,091 min referente ao α -felandreno;

$t_{r,i}$ =7,287 min referente ao δ -3-careno;

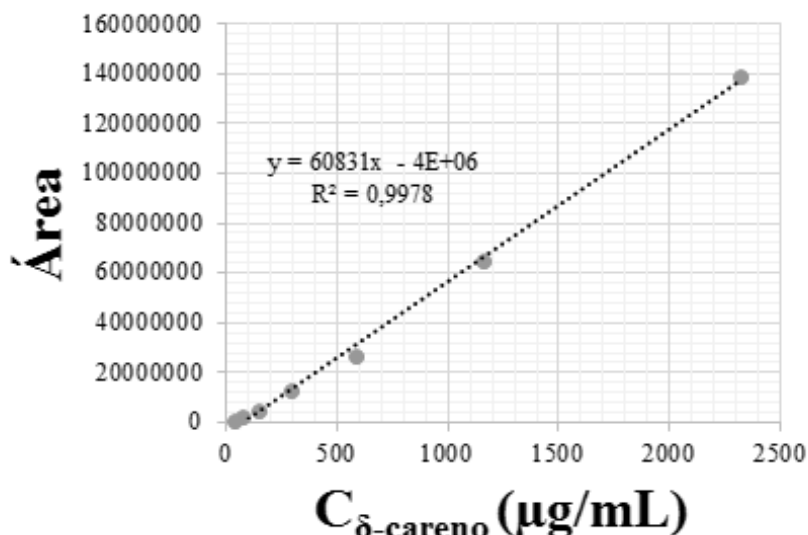
$t_{r,i}$ =7,849 min referente ao limoneno;

$t_{r,i}$ =23,227 min referente ao cariofileno;

$t_{r,i}$ =25,751 min referente ao germacreno D.

Na Figura 5.10, é apresentada a curva analítica que foi utilizada para quantificar o teor mássico de δ -3-careno, composto volátil majoritário nas amostras de extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Figura 5.10 – Curva analítica para o padrão de δ -3-careno



Fonte: Dados da pesquisa.

Verifica-se, na Figura 5.10, que o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9978, que corresponde ao valor do coeficiente de correlação (R) igual a 0,9989, atendendo ao critério mínimo para aceitação ($R \geq 0,99$), estabelecido pela Resolução n.º 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Os resultados da CG-EM discutidos anteriormente são semelhantes, com pequenas variações, aos dados obtidos por Livia (2013), que realizou a extração de compostos dos frutos de *S. terebinthifolius* utilizando CO_2 supercrítico como solvente. A autora caracterizou a fração volátil em duas condições de extração (80 bar e 35 °C; 220 bar e 45 °C), sendo que os principais monoterpenos identificados foram o α -felandreno, δ -3-careno e limoneno. Em contrapartida, a composição química da fração volátil dos extratos supercríticos (Tabela 5.5) difere daquela publicada por Barbosa et al. (2007), que analisaram uma amostra de extrato supercrítico comercial (marca FLAVEX[®]) dos frutos de *S. terebinthifolius*, obtido com CO_2 supercrítico como solvente. A fração volátil do extrato comercial exibiu alto teor de monoterpenos (79,5%), sendo que os principais compostos identificados foram α -felandreno (23,55%), α -pineno (18,82%), β -felandreno (16,88%), germacreno D (11,89%) e δ -3-careno (6,32%). Ao comparar tais dados com os resultados apresentado na Tabela 5.5, o teor de

monoterpenos revelou valores (78,42-92,44%) próximos aos publicados na literatura (79,5%). No entanto observaram-se diferenças significativas entre os principais compostos, provavelmente devido a distintos lotes de frutos de *S. terebinthifolius* e às condições operacionais utilizadas na extração supercrítica. Além disso, fatores como variabilidade genética (quimiotipo), local de coleta diferente, condições de cultivo e processo de pré-tratamento dos frutos (por exemplo, moagem, secagem) podem ter influenciado essa variabilidade no teor de terpenos dos extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius* (BANDONI, 2003; CHAMORRO et al., 2012; KARAM et al., 2016).

5.3.4 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS OPERACIONAIS

Na Tabela 5.6, são apresentados os resultados de rendimento global e teor de δ -3-careno nas amostras de extratos e óleo essencial, além das condições operacionais dos ensaios de extração supercrítica.

Tabela 5.6 – Condições operacionais da extração supercrítica, rendimento global e teor mássico de δ -3-careno nos extratos supercríticos (ensaios de 1 a 7), óleo essencial (OE), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE)

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa específica do CO ₂ (g/cm ³)	Rendimento global (%) ¹	Teor mássico de δ -3-careno (%) ²
1	100	40	0,562	5,70	6,24
2	300	40	0,928	13,0	2,23
3	100	60	0,298	3,08	7,47
4	300	60	0,831	13,7	2,16
5	200	50	0,762	12,5	2,59
6	200	50	0,762	11,8	2,72
7	200	50	0,762	12,8	2,57
OE	-	-	-	4,20	7,29
ED	-	-	-	16,6	1,12
EE	-	-	-	42,6	0,00

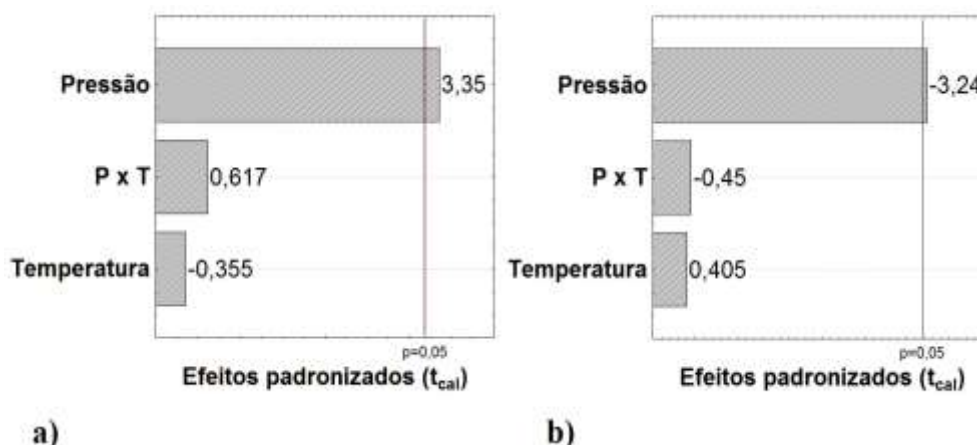
Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹ Calculado conforme a Equação 5.5; ² (kg de δ -3-careno/kg de extrato) \times 100.

De acordo com os dados da Tabela 5.6, a extração por Soxhlet apresentou os maiores rendimentos entre as técnicas de extração investigadas neste trabalho. Na extração com diclorometano, o rendimento foi de 16,6%, enquanto que na extração etanólica subsequente o rendimento foi de 42,6%. Esses altos rendimentos deram-se devido à extração de compostos de elevada massa molecular quando se utilizou solventes orgânicos, sendo que a extração por sistema Soxhlet é um procedimento exaustivo de extração e que leva ao esgotamento dos extratos no material vegetal. Apesar do rendimento mais elevado obtido a partir da extração com solventes orgânicos, os produtos obtidos requerem processos de purificação mais laboriosos, sendo uma desvantagem quando comparados aos óleos essenciais (rendimento de 4,20%) e extratos supercríticos obtidos em baixas pressões (rendimentos de 3,08% a 5,70%). Ademais, na hidrodestilação e na extração supercrítica, são utilizados solventes considerados limpos e que minimizam possíveis prejuízos ambientais. Assim, a escolha do processo de extração deve levar em conta os custos do processo global (extração e fracionamento), os possíveis impactos ambientais e a aplicação do produto.

Conforme observado na Tabela 5.6, o rendimento global para os ensaios com CO₂ supercrítico variou de 3,1% (100 bar e 60 °C) a 13,7% (300 bar e 60 °C), com um desvio padrão de 0,5%. O teor mássico de δ -3-careno nos extratos supercríticos variou de 2,16% (300 bar e 60 °C) a 7,47% (100 bar e 60 °C), com um desvio padrão de 0,08%. Assim, estes resultados indicam que o rendimento e a qualidade dos extratos dos frutos de *S. terebinthifolius* dependem das condições operacionais do processo de extração supercrítica. Portanto, os efeitos padronizados da temperatura e da pressão do CO₂ supercrítico sobre o rendimento global (Figura 5.11a) e o teor mássico de δ -3-careno nos extratos (Figura 5.11b) são indicados nos diagramas de Pareto da Figura 5.11.

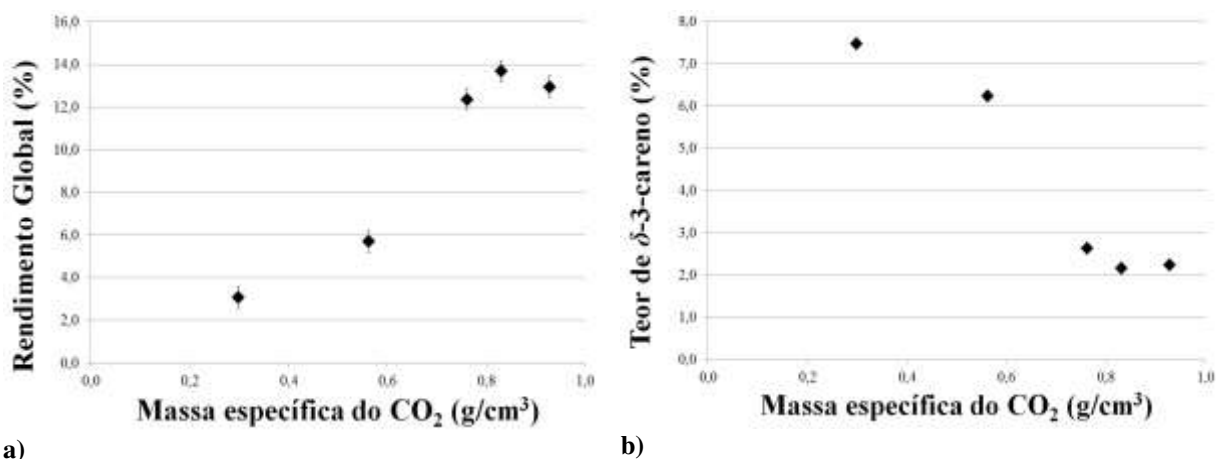
Figura 5.11 – Diagramas de Pareto para as respostas: a) rendimento global; b) teor mássico de δ -3-careno



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 5.11, a **pressão** apresentou efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento global da extração (efeito positivo) e também sobre o teor mássico de δ -3-careno (efeito negativo), em um nível de confiança de 95%. Estes resultados indicam que um aumento na pressão, do nível mais baixo para o mais elevado, ocasionou um aumento no rendimento global da extração e, conseqüentemente, na diminuição do teor mássico de δ -3-careno no extrato supercrítico. Segundo a literatura (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000; BAHRAMIFAR; YAMINI; SHAMSIPUR, 2005; REVERCHON; DE MARCO, 2006), o aumento da pressão no sistema ocasiona o aumento da massa específica do fluido supercrítico (que também varia com a temperatura do sistema) e, por conseguinte, ocorre um aumento no poder de solvatação do fluido supercrítico, que é responsável pela elevação do rendimento global do processo. Esta tendência pode ser observada na Figura 5.12a.

Figura 5.12 – Efeitos da massa específica do CO₂ supercrítico sobre as respostas do processo: a) rendimento global; b) teor mássico de δ -3-careno



Fonte: Dados da pesquisa.

Portanto, o aumento da massa específica do CO₂ supercrítico também ocasionou uma diminuição no teor de δ -3-careno no extrato supercrítico (Figura 5.12b). Estes resultados podem ser explicados pela extração de um maior número de compostos em altas pressões (componentes não voláteis), ou seja, quando se utilizou uma maior massa específica do CO₂ supercrítico, altos rendimentos foram obtidos devido à extração de compostos de elevada massa molecular. Entretanto elevados rendimentos de extração levam à baixa seletividade em virtude da extração de uma vasta gama de compostos (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Conforme observado na Figura 5.11, a **temperatura** não apresentou efeitos estatisticamente significativos. Provavelmente, isso ocorreu devido aos efeitos opostos da temperatura sobre a pressão de vapor dos solutos e a massa específica do solvente. Como

observado na Tabela 5.6, na extração realizada a 100 bar (ensaios 1 e 3), o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C diminuiu o rendimento global da extração de 5,7% para 3,1%. Estes resultados indicam que, em baixas pressões, o efeito da temperatura na massa específica do CO₂ supercrítico foi mais significativo que o seu efeito na pressão de vapor dos solutos. Com o aumento da temperatura, a massa específica do CO₂ supercrítico diminuiu e, conseqüentemente, o seu poder de solvatação também diminuiu (MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Em contrapartida, nas extrações utilizando 300 bar (ensaios 2 e 4) o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C ocasionou um pequeno aumento do rendimento global de 13% para 13,7%. Apesar da elevação da temperatura diminuir a massa específica do CO₂ supercrítico, provavelmente, ocorreu um aumento da pressão de vapor dos solutos com o aumento da temperatura. Isso acontece porque, a partir de certo ponto da extração, é estabelecida uma competição entre o efeito do aumento da temperatura na diminuição da massa específica do solvente e o seu efeito no aumento da pressão de vapor dos solutos. O comportamento observado neste trabalho é conhecido como efeito da solubilidade retrógrada ou fenômeno *crossover*, sendo comum na extração com fluidos supercríticos (MUKHOPADHYAY, 2000). Esse fenômeno também foi observado por Livia (2013) e Andrade (2015), que investigaram a produção de extratos dos frutos da *S. terebinthifolius* com CO₂ supercrítico. Nos trabalhos, a inversão das isotermas foi verificada na região próxima a 200 bar.

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 5.6 e com o auxílio do *software* STATISTICA[®], foi avaliado o ajuste de modelos matemáticos lineares para o rendimento global da extração (Equação 5.6) e também para o teor mássico de δ -3-careno no extrato supercrítico (Equação 5.7) em função da pressão em valores codificados (y_1) segundo a Tabela 5.1.

$$X_o = 10,4 + 4,48y_1 \quad (5.6)$$

$$\text{Teor mássico de } \delta\text{-3-careno} = 3,71 - 2,33y_1 \quad (5.7)$$

Para avaliar a qualidade de ajuste dos modelos codificados, nas Tabelas de 5.7 e 5.8, são indicados os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os modelos, sendo que os valores foram gerados pela tabela ANOVA do *software* STATISTICA[®].

Tabela 5.7 – ANOVA do modelo preditivo para o rendimento global (Equação 5.6)

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	80,28	1	80,28	15,95	6,61
Resíduos	25,16	5	5,033		
Falta de ajuste	24,64	3	8,212	31,19	19,16
Erro puro	0,5267	2	0,2633		
Total	105,4	6			
$R^2 = 0,7614$					

Fonte: Dados da pesquisa.

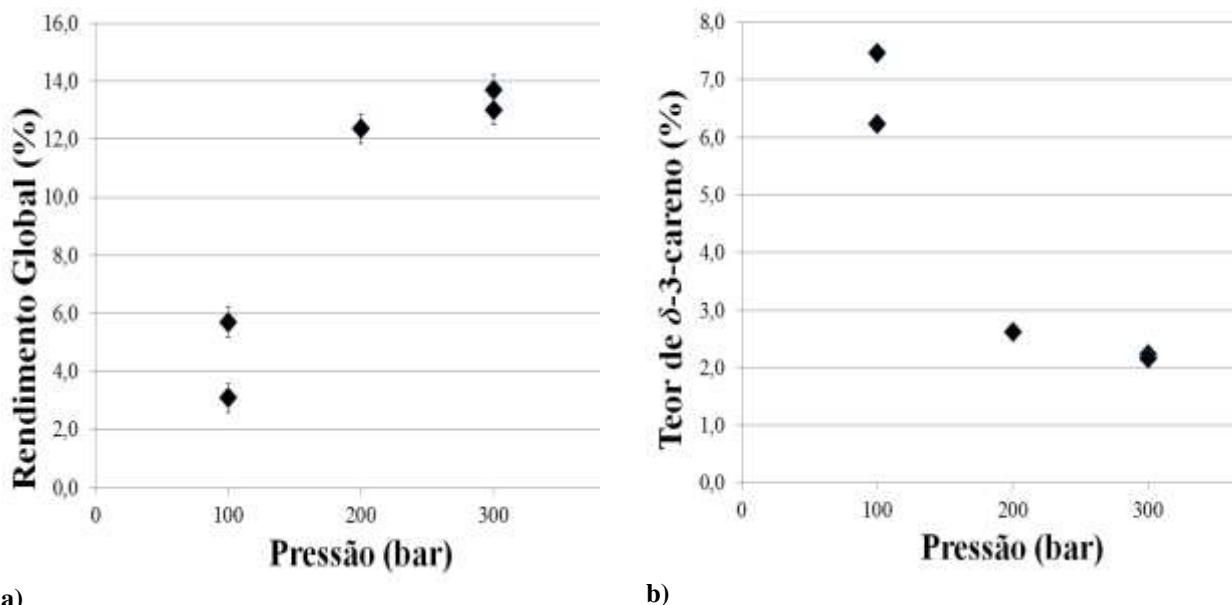
Tabela 5.8 – ANOVA do modelo preditivo para o teor de δ -3-careno (Equação 5.7)

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	21,72	1	21,72	15,62	6,61
Resíduos	6,950	5	1,390		
Falta de ajuste	6,937	3	2,312	348,6	19,16
Erro puro	0,01327	2	0,006633		
Total	28,67	6			
$R^2 = 0,7576$					

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao analisar os resultados apontados nas Tabelas 5.7 e 5.8, observa-se que os modelos não podem ser considerados válidos e adequados para descrever as respostas da extração supercrítica investigadas neste trabalho. E isso devido às seguintes análises: o F_{cal} da falta de ajuste em relação ao erro puro é superior ao F_{tab} ; e o coeficiente de determinação (R^2) é menor que 0,9 para todos os modelos. Desse modo, estes dados indicam que o modelo linear adotado na análise estatística não foi apropriado para descrever os dados da extração supercrítica, pois, conforme a Figura 5.13, tanto o rendimento global como o teor de δ -3-careno não variaram de forma linear com mudanças na pressão do CO₂ supercrítico.

Figura 5.13 – Efeitos da pressão do CO₂ supercrítico sobre as respostas do processo: a) rendimento global; b) teor mássico de δ -3-careno



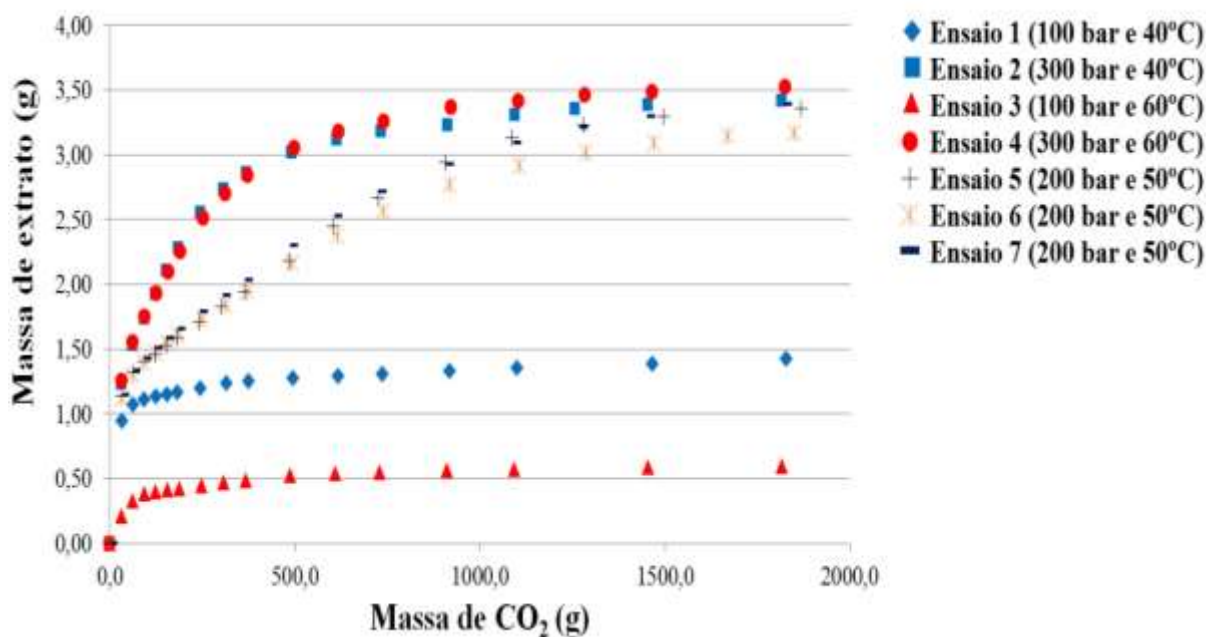
Fonte: Dados da pesquisa.

Como já discutido anteriormente, um aumento na pressão do CO₂ supercrítico acarretou um aumento do rendimento da extração e, por conseguinte, uma diminuição no teor de δ -3-careno, devido à extração de compostos de elevada massa molecular em altas pressões (Figura 5.13). Portanto, para a definição das condições ótimas para a extração supercrítica, é necessário conhecer a finalidade para a qual os extratos serão utilizados. Por exemplo, se o objetivo for obter um produto com alto teor de compostos voláteis (como o óleo essencial), dever-se-á utilizar pressões mais amenas no sistema (≤ 100 bar). Apesar do menor rendimento nessas condições operacionais, os produtos obtidos requerem processos de purificação e caracterização química menos laboriosos, sendo isso uma vantagem quando comparado aos extratos supercríticos obtidos em altas pressões. Além disso, a utilização de temperaturas amenas pode ser uma vantagem em comparação com as extrações convencionais, pois se pode garantir a integridade de substâncias termossensíveis e também diminuir custos com o aquecimento de solventes.

5.3.5 CINÉTICA DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

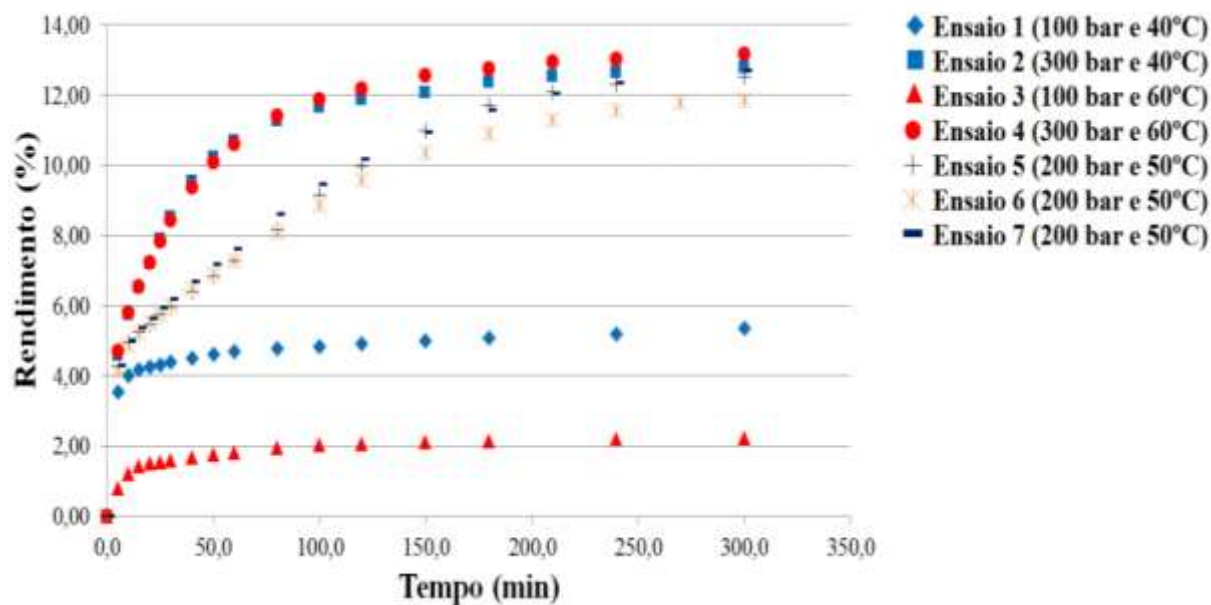
Nas Figuras de 5.14 a 5.16, são apresentados os dados experimentais da cinética de extração supercrítica para todas as condições operacionais do planejamento experimental (Tabela 5.6).

Figura 5.14 – Cinética da extração supercrítica para os ensaios de 1 a 7 (massa de extrato em função da massa de CO₂)



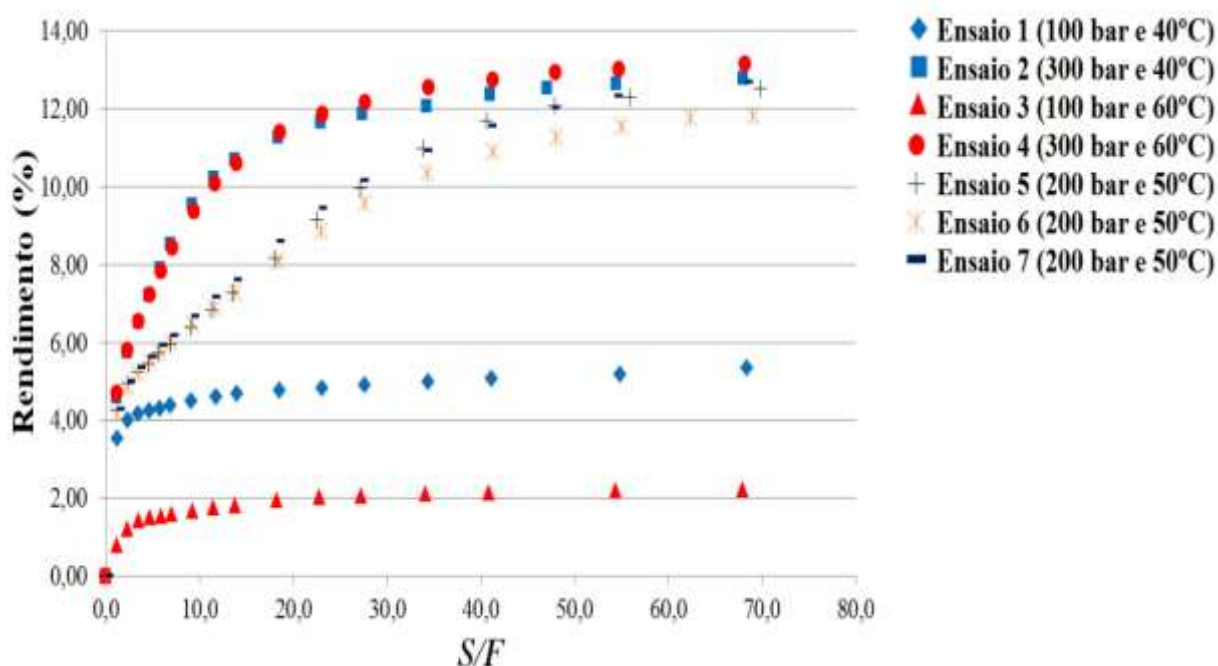
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 5.15 – Cinética da extração supercrítica para os ensaios de 1 a 7 (rendimento em função do tempo de extração)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 5.16 – Cinética da extração supercrítica para os ensaios de 1 a 7 (rendimento em função da razão entre a massa de CO₂ e a massa seca da matéria-prima, S/F)



Fonte: Dados da pesquisa.

Por meio dos dados experimentais do ponto central do planejamento experimental (ensaios 5, 6 e 7), é possível observar a repetibilidade dos dados experimentais da cinética de extração supercrítica. Assim, conforme as Figuras de 5.14 a 5.16, foi observado que as curvas da cinética se sobrepuseram ou apresentaram comportamentos próximos, convalidando os dados experimentais. Lembrando que o desvio padrão médio, relacionado ao rendimento da extração, é igual a 0,5%.

Como observado na Figura 5.16, o rendimento final em cada curva foi um pouco menor do que o rendimento global apresentado na Tabela 5.6, o que se deveu à menor razão S/F utilizada nos ensaios cinéticos (aproximadamente 70 ao final da extração). Lembrando que nos ensaios para determinar o rendimento global a razão S/F foi de aproximadamente 121.

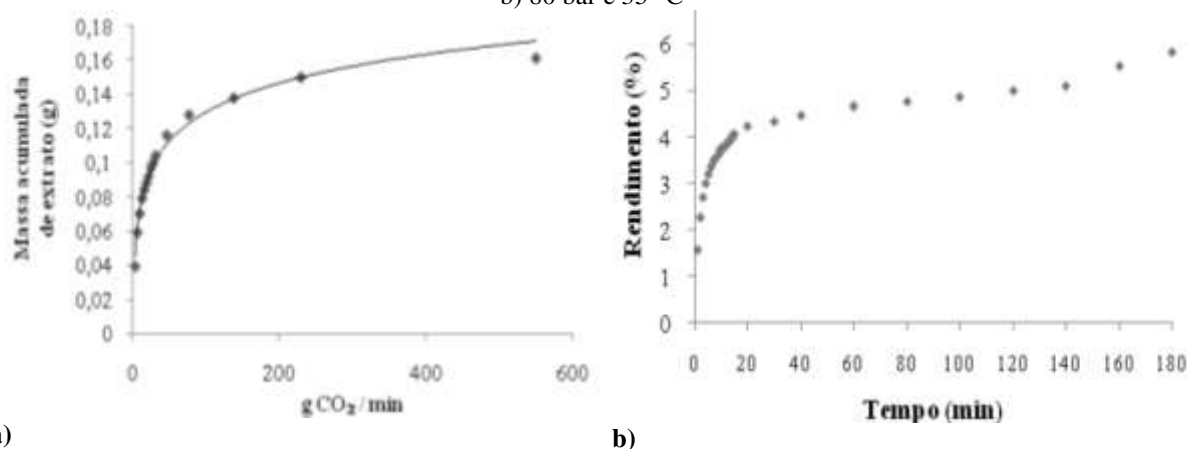
Os efeitos da temperatura e da pressão, descritos anteriormente para o rendimento global, também, foram observados nas curvas da cinética supercrítica. Conforme observado nas Figuras 5.14 a 5.16, e já discutido anteriormente, um aumento na pressão do CO₂ supercrítico acarretou um aumento do rendimento da extração devido ao aumento da massa específica do CO₂ supercrítico. O efeito da temperatura foi mais complexo devido aos seus efeitos opostos sobre a pressão de vapor dos solutos presentes na matriz sólida e a massa específica do solvente: em baixas pressões, o aumento da temperatura acarretou menores

rendimentos de extração, pois a massa específica do CO₂ supercrítico diminuiu e, conseqüentemente, o seu poder de solvatação também; em contrapartida, em pressões elevadas, o aumento da temperatura não foi significativo, sendo observado um leve aumento do rendimento da extração. Conforme já discutido, isso acontece porque, a partir de certo ponto da extração supercrítica, foi estabelecida uma competição entre o efeito do aumento da temperatura na diminuição da massa específica do solvente e no aumento da pressão de vapor dos solutos.

Com relação aos períodos característicos da extração supercrítica (Figuras 5.14 a 5.16), as cinéticas de extração apresentaram um comportamento típico para a extração com fluido supercrítico, ou seja, com três períodos característicos (BRUNNER,1994). Durante o período de taxa de extração constante, denominada de CER (*Constant Extraction Rate*), uma grande quantidade de extrato foi obtida em um tempo de extração muito curto. Por exemplo, para o ensaio 3 (menor massa específica do fluido), detectou-se que aproximadamente 55% da massa final do extrato foi obtida em apenas 10 minutos de extração. Nesse período, ocorreu a extração do soluto de fácil acesso, ou seja, o produto contido na superfície externa das partículas, devido à ruptura das células (o termo “célula” é usado aqui para designar uma cavidade que contém o extrato, e não no sentido biológico da palavra) durante o processo de moagem. No período CER, a transferência de massa é governada pelo mecanismo de convecção na interface entre o sólido e o fluido, sendo que esse mecanismo está diretamente ligado à velocidade com que o fluido escoar no interior do leito de partículas. Logo, maiores velocidades ocasionam a diminuição da espessura da camada limite mássica que envolve a partícula sólida, reduzindo, assim, a resistência externa à transferência de massa e aumentando as taxas de extração (BRUNNER,1994).

Nas curvas cinéticas apresentadas nas Figuras de 5.14 a 5.16, observa-se que a etapa CER merece uma atenção especial. Conforme já citado, em todos os ensaios esta etapa ocorreu em um intervalo de tempo muito curto (menor até que 5 minutos), o que, na prática, dificultou a determinação do seu período final devido às limitações experimentais dos ensaios de extração supercrítica. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Livia (2013), que também investigou a cinética de extração, com CO₂ supercrítico, de compostos dos frutos de *S. terebinthifolius* (Figura 5.17).

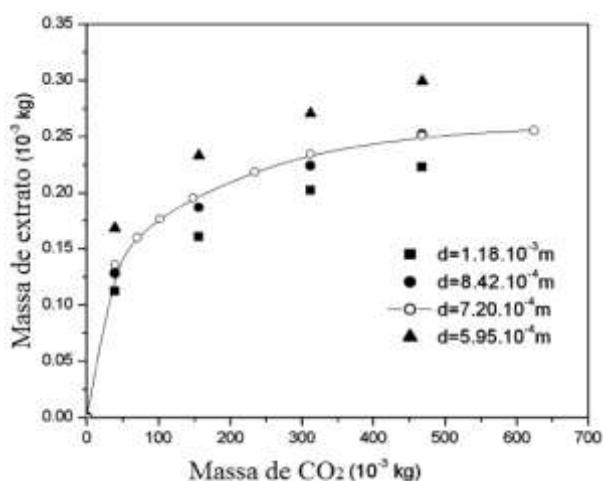
Figura 5.17 – Cinética da extração, com CO₂ supercrítico, para os frutos da *S. terebinthifolius*: a) 100 bar e 55 °C; b) 80 bar e 35 °C



a) Fonte: Livia (2013, p. 81 e p.93).

Na literatura, outros trabalhos também não conseguiram identificar a etapa de período de taxa constante (PIANTINO et al., 2008). Na Figura 5.18, são apresentadas as cinéticas da extração supercrítica obtida por Piantino et al. (2008), que estudaram a extração de compostos do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Os autores citam que a etapa CER ocorreu em um intervalo de tempo baixo, sendo que aproximadamente 50% da massa final do extrato foram obtidos com 20 g de CO₂ supercrítico e os outros 50% com 400 g de CO₂.

Figura 5.18 – Cinética de extração com CO₂ supercrítico (50 °C, 300 bar e vazão de $4,0 \times 10^{-5}$ kg/s) para o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*)



Fonte: Piantino et al. (2008, p. 211, tradução nossa).

Nota: **d** é diâmetro médio da partícula.

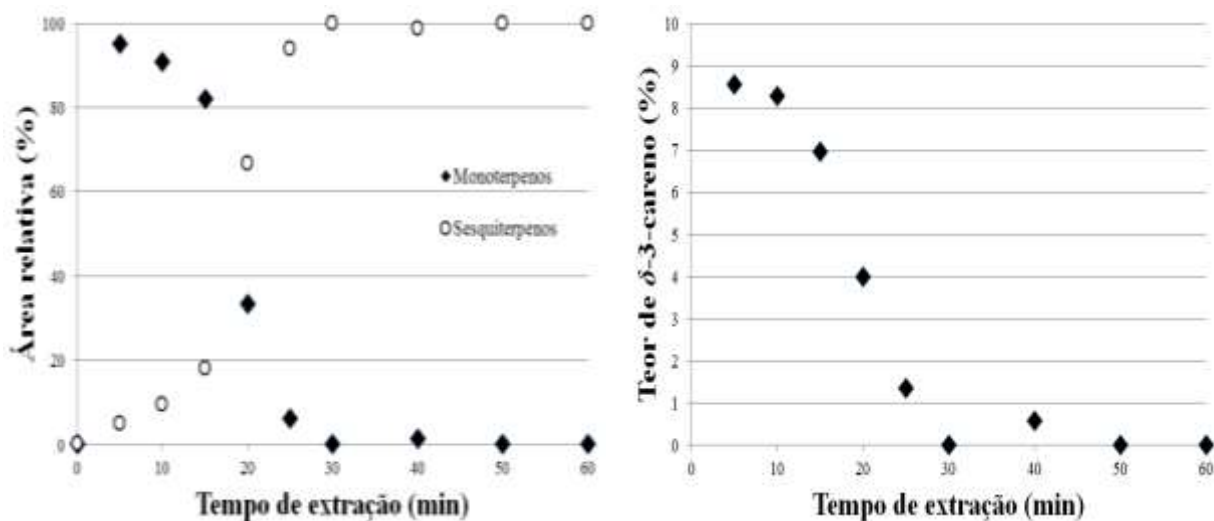
Após o período de taxa constante descrito anteriormente, inicia-se o período de queda na taxa de extração, denominado de FER (*Falling Extraction Rate*), que é uma etapa de transição na qual a taxa de extração muda com o tempo. Neste período, tanto a difusão nas partículas quanto a convecção na fase fluida são importantes para a transferência de massa:

enquanto em uma parte do leito o solvente dissolve o restante de extrato que ainda permanece na superfície do sólido, na outra parte o solvente extrai os solutos contidos no interior das células intactas. Já a última etapa da extração supercrítica é controlada somente pela difusão, sendo conhecida como DCR (*Diffusion Controlled Rate*), sendo representada por uma reta quase horizontal que marca o final do processo de extração. Nesta etapa final, todo o extrato obtido é retirado do interior das partículas e os compostos de maior massa molecular são extraídos, sendo que a taxa de extração é muito baixa se comparada a outras etapas (CER e FER). Assim, a transferência de massa é limitada pela difusão no interior das partículas, sendo que o solvente difunde até o interior das partículas e uma mistura de solvente-solutos retorna por difusão até a superfície do sólido (BRUNNER, 1994).

O tempo de extração não influenciou apenas o rendimento da extração, mas, também, a composição química dos extratos obtidos ao longo da extração. Portanto, de forma geral, foram observadas as seguintes mudanças qualitativas ao longo do tempo de extração: nos períodos iniciais da extração, as amostras retiradas foram visualmente semelhantes aos produtos obtidos na hidrodestilação (OE) e na extração supercrítica em baixas pressões (amostras 1 e 3), ou seja, caracterizado como um produto translúcido e de baixa viscosidade; em contraste, as amostras obtidas em longos períodos de extração, e em altas pressões (200 e 300 bar), apresentaram coloração com maior intensidade e viscosidade mais elevada, sendo que, ao final da extração, foi observado um extrato semissólido e com uma coloração ainda mais intensa (amarelo).

Essas diferenças qualitativas entre as frações retiradas ao longo do tempo de extração são devido à extração de compostos de elevada massa molecular ao longo da extração supercrítica, para as extrações com pressões elevadas (200 e 300 bar). Por outro lado, nos experimentos de menor pressão (100 bar) não foram observadas mudanças significativas na aparência dos extratos retirados ao longo do processo de extração supercrítica. Na Figura 5.19, é apresentada a variação dos compostos voláteis ao longo do tempo para a extração realizada na condição de menor massa específica de CO₂ (100 bar e 60 °C).

Figura 5.19 – Variação na composição química (CG-EM) ao longo do tempo de extração para o ensaio 3 (100 bar e 60 °C: a) variação de terpenos (área relativa); b) variação no teor mássico de δ -3-careno



a)

b)

Fonte: Dados da pesquisa.

Durante a extração supercrítica, cada classe de terpenos apresentou a sua própria cinética de extração (Figura 5.19): de forma geral, os monoterpenos foram extraídos nos períodos iniciais da extração supercrítica, sendo que os sesquiterpenos, e também os compostos não voláteis, foram extraídos principalmente em períodos mais longos da extração. Além disso, foi observado que, em aproximadamente 30 minutos, todos os monoterpenos foram extraídos, o que mostra a alta solubilidade destes compostos no CO₂ supercrítico (100 bar e 60 °C). Resultados semelhantes foram citados por Livia (2013) na extração de compostos voláteis (80 bar e 35 °C) dos frutos de *S. terebinthifolius*. A autora cita que os compostos mais voláteis foram extraídos totalmente nos primeiros 9 minutos da extração supercrítica. Vale ressaltar que esta informação poderá ser utilizada para o fracionamento dos extratos, assim, visando à extração seletiva dos monoterpenos e sesquiterpenos.

5.3.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS

Os valores de TGI calculados para todas as amostras de extratos estão descritos na Tabela 5.9. Lembrando que, no presente trabalho, optou-se pelo TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular) como parâmetro utilizado para mensurar a atividade antiproliferativa dos extratos.

Tabela 5.9 – Concentração efetiva TGI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para extratos supercríticos (ensaios de 1 a 5, nas condições operacionais indicadas na Tabela 5.2), extrato diclorometânico (ED) e extrato etanólico (EE) frente às linhagens investigadas

Amostra	U251 (glioma)	MCF7 (mama)	NCI- ADR/RES (ovário com resistência) ¹	786-0 (rim)	NCI- H460 (pulmão)	PC-3 (próstata)	OVCAR- 03 (ovário)	HT29 (cólon)	K562 (leucemia)	HaCaT (querati nócito) ²
Doxo. ³	9,8	>25	8,1	4,9	>25	7,7	11,0	>25	>25	1,6
1	69,1	103,8	62,2	55,9	76,2	54,7	40,0	41,8	174,6	68,7
2	103,5	224,9	238,9	73,6	250	>250	60,2	142,7	>250	104,9
3	33,9	98,8	28,0	2,1	198,1	32,1	48,7	67,1	112,3	83,9
4	19,7	75,4	7,9	3,9	41,8	29,1	8,7	33,2	176,9	32,4
5	3,9	50,4	1,2	0,80	12,3	4,0	4,4	28,3	148,2	15,1
ED	3,1	14,2	6,4	0,46	15,7	7,1	6,8	13,2	59,1	9,6
EE	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: ¹Ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; ²Linhagem celular não tumoral; ³Doxorrubicina (quimioterápico de referência).

Para Fouche et al. (2008), a atividade antiproliferativa pode ser classificada em quatro categorias: inativo ($\text{TGI} > 50 \mu\text{g}/\text{mL}$); atividade fraca ($15 \mu\text{g}/\text{mL} < \text{TGI} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$); atividade moderada ($6,25 \mu\text{g}/\text{mL} < \text{TGI} < 15 \mu\text{g}/\text{mL}$); e atividade potente ($\text{TGI} < 6,25 \mu\text{g}/\text{mL}$). Portanto, conforme observado na Tabela 5.9, as seguintes atividades são destacadas: o extrato supercrítico obtido a 100 bar e 60 °C (ensaio 3) exibiu atividade potente contra câncer de rim ($\text{TGI} = 2,1 \mu\text{g}/\text{mL}$); o extrato supercrítico obtido a 300 bar e 60 °C (ensaio 4) exerceu atividade potente também contra o câncer de rim ($\text{TGI} = 3,9 \mu\text{g}/\text{mL}$); e o extrato supercrítico obtido a 200 bar e 50 °C (ensaio 5) apresentou atividade potente contra glioma ($\text{TGI} = 3,9 \mu\text{g}/\text{mL}$), câncer de rim ($\text{TGI} = 0,8 \mu\text{g}/\text{mL}$), ovário com resistência ($\text{TGI} = 1,2 \mu\text{g}/\text{mL}$), próstata ($\text{TGI} = 4,0 \mu\text{g}/\text{mL}$) e ovário ($\text{TGI} = 4,4 \mu\text{g}/\text{mL}$). Desse modo, estes resultados revelaram, de forma geral, melhor desempenho dos extratos supercríticos obtidos em temperaturas na faixa de 50 a 60 °C, independente da pressão utilizada (100-300 bar), sendo especialmente potente e seletivo para o câncer de rim (786-0), com valores de TGI inferiores ao controle positivo (doxorrubicina). Além disso, é válido mencionar que nenhuma amostra desempenhou atividade potente para a linhagem não tumoral humana queratinócito.

Especificamente para leucemia (K562), todas as amostras foram inativas com valores de TGI acima de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inviabilizando seu uso como antitumoral para essa linhagem celular (Tabela 5.9). Estes resultados estão parcialmente de acordo com os encontrados por Livia (2013), que também investigou a atividade antiproliferativa dos extratos supercríticos dos frutos de *S. terebinthifolius* na linhagem K562 e para a linhagem de células de Jurkat (leucemia aguda linfoblástica). A autora fracionou o extrato supercrítico (80 bar e 35 °C) ao longo do tempo e encontrou os seguintes resultados: na fração 1 (rica em monoterpenos), foi

observada atividade citotóxica para as duas linhagens investigadas; já na fração 2 (rica em sesquiterpenos), a autora cita que, para a linhagem celular K562, também investigada neste trabalho, foi observado um efeito contrário ao esperado, com um aumento no crescimento celular.

Bendaoud et al. (2010) investigaram a atividade antiproliferativa do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* contra câncer de mama (MCF-7). Esses autores citam uma atividade promissora do óleo essencial e sugerem que os sesquiterpenos são os metabólitos ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa observada. Já os extratos supercríticos obtidos neste trabalho (Tabela 5.9) não foram ativos contra o câncer de mama, apresentando TGI acima de 50 µg/mL. No entanto, conforme observado na Tabela 5.9, o extrato diclorometânico (ED) exibiu atividade moderada contra o câncer de mama (TGI=14,2 µg/mL). Ademais, vale mencionar que o extrato diclorometânico exibiu atividade potente contra glioma (TGI=3,1 µg/mL) e câncer de rim (TGI=0,46 µg/mL).

Já o extrato etanólico (EE) não se mostrou ativo nas concentrações avaliadas, apresentando valores de TGI acima de 50 µg/mL para todas as linhagens de células testadas, inviabilizando seu uso como antitumoral. Lembrando que o extrato etanólico foi obtido a partir do resíduo sólido proveniente da primeira extração com diclorometano, sendo que, nas análises químicas, não foram constatados compostos voláteis no extrato etanólico. Portanto, estes resultados sugerem que os compostos apolares (voláteis e não voláteis) dos frutos da *S. terebinthifolius* são os responsáveis pelas atividades antiproliferativas.

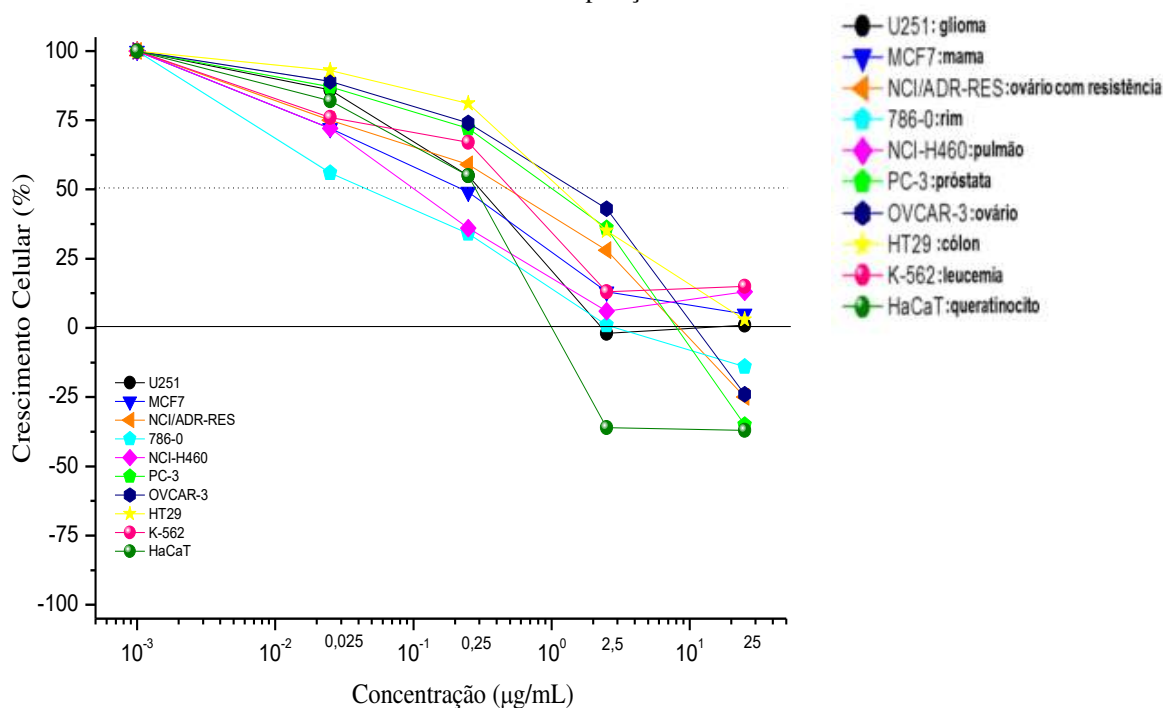
De acordo com os dados da Tabela 5.9, nos ensaios utilizando pressão de 100 bar (ensaios 1 e 3), o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C resultou numa redução do TGI, para o câncer de rim, de 55,9 µg/mL para 2,1 µg/mL. Segundo os dados apresentados na Tabela 5.5, o aumento da temperatura também resultou em um aumento no teor de sesquiterpenos, de 17,60% para 21,58%. Efeito semelhante foi observado na pressão de 300 bar (ensaios 2 e 4): com o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C, o teor de sesquiterpenos aumentou de 10,53% para 14,29% e, conseqüentemente, a atividade antiproliferativa foi mais efetiva. Portanto, estes resultados sugerem que os sesquiterpenos (cariofileno ou germacreno D) dos frutos da *S. terebinthifolius* podem ser os metabólitos ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa destacada anteriormente. De fato, os efeitos citotóxicos dos sesquiterpenos foram previamente descritos em várias linhagens de células tumorais humanas (AHMED et al., 2004; SIBANDA et al., 2004; LEGAULT; PICHETTE, 2007; LOIZZO et al., 2008; HONG et al., 2014). Entretanto ensaios de

fracionamento dos extratos são necessários para estabelecer uma relação definitiva entre esses compostos e a atividade antiproliferativa dos frutos da *S. terebinthifolius*.

Outra informação importante exposta na Tabela 5.5 é que o extrato supercrítico obtido a 300 bar e 40 °C (ensaio 2) não apresentou o sesquiterpeno cariofileno em sua composição química, sendo que este extrato teve TGI acima de 50 µg/mL para todas as linhagens investigadas (Tabela 5.9). De acordo com Loizzo et al. (2008), o cariofileno foi ativo contra uma linhagem de câncer de rim, ACHN (ATCC® CRL-1611). Além disso, esses autores relataram que os padrões de α -pineno, sabineno, α -felandreno, δ -3-careno, limoneno e α -terpineno não exerceram atividade antiproliferativa, o que reforça ainda mais a hipótese da atividade ser atribuída aos sesquiterpenos, especialmente o cariofileno. No entanto estudos adicionais são necessários para estabelecer uma relação definitiva entre o cariofileno e a atividade antiproliferativa em linhagens de câncer de rim.

Nas Figuras de 5.20 a 5.27, são apresentados os resultados do perfil do crescimento das células tumorais para todas as amostras analisadas.

Figura 5.20 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de doxorrubicina após 48 horas de exposição



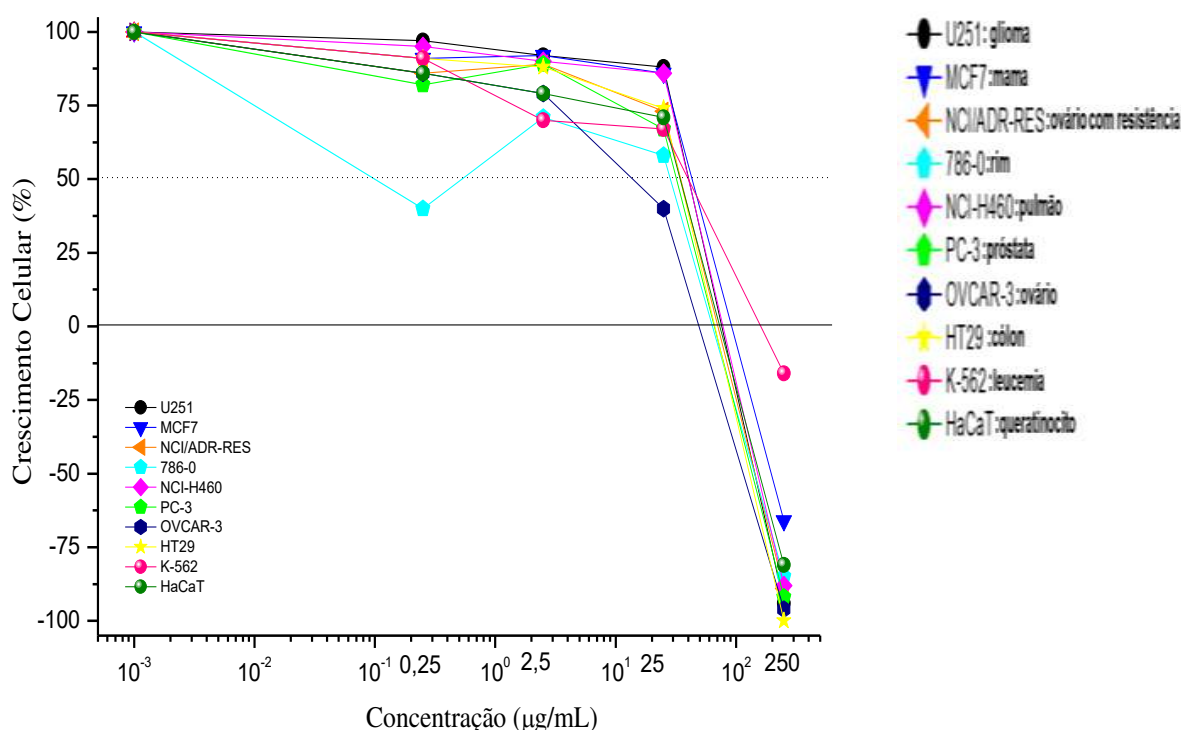
Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 5.20, o quimioterápico doxorrubicina apresentou atividade citostática e seletiva para quase todas as linhagens na concentração de 2,5 µg/mL,

exceto para queratinócito e glioma, que apresentaram atividade citocida. Detectou-se atividade citocida e seletiva na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ para rim, ovário, ovário com resistência, próstata e queratinócito.

De acordo com o TGI (Tabela 5.9), as seguintes atividades são destacadas: atividade moderada para glioma, ovário com resistência, próstata e ovário; e atividade potente para rim (TGI=4,9 $\mu\text{g/mL}$) e para queratinócito (TGI=1,6 $\mu\text{g/mL}$), sendo os melhores resultados entre as linhagens testadas para esta amostra.

Figura 5.21 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 1 (100 bar e 40 °C) após 48 horas de exposição

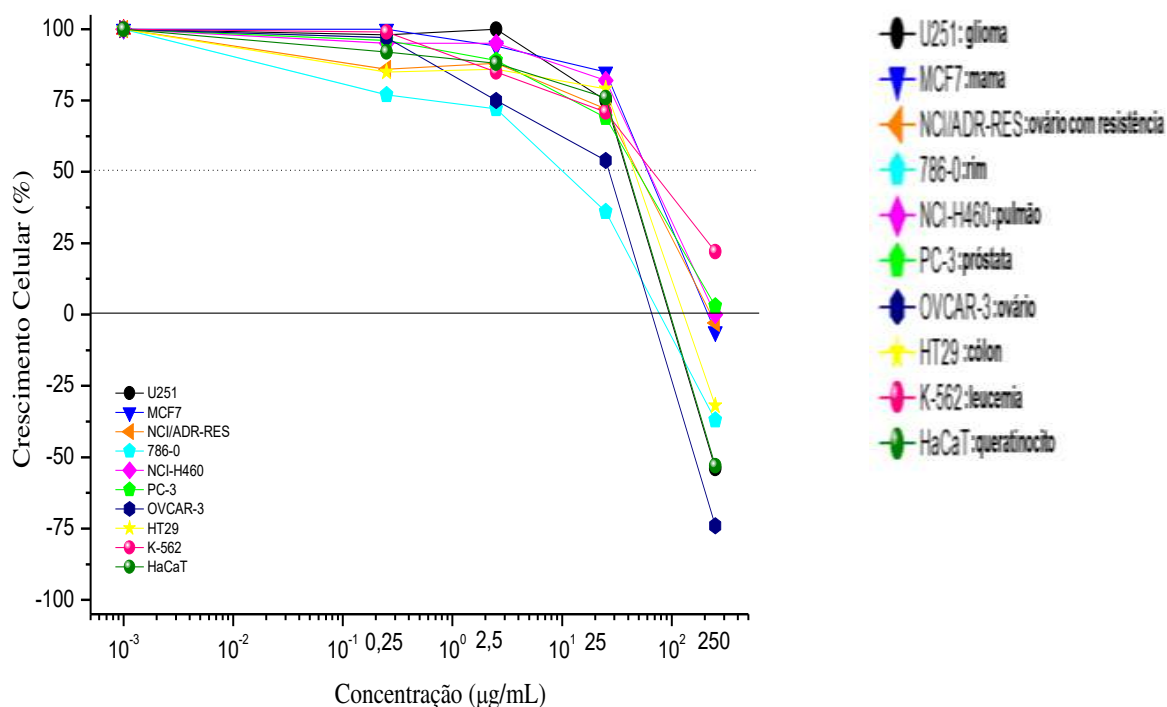


Fonte: Dados da pesquisa.

O extrato supercrítico obtido em 100 bar e 40 °C revelou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa (Figura 5.21): inativo nas concentrações de até 25 $\mu\text{g/mL}$ para glioma e mama; pouca inibição do crescimento celular para rim (0,25 $\mu\text{g/mL}$), ovário (2,5 $\mu\text{g/mL}$) e na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ para queratinócito, leucemia, cólon, ovário com resistência, pulmão e próstata; atividade citostática e seletiva para rim (2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$) e ovário (25 $\mu\text{g/mL}$); atividade citocida e seletiva na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ para queratinócito, leucemia, cólon, ovário, próstata, glioma, mama, ovário com resistência, rim e pulmão. De acordo com o TGI (Tabela 5.9), as seguintes atividades foram observadas: inativo para

glioma, mama, ovário com resistência, rim, pulmão, próstata, leucemia e queratinócito; e atividade fraca para ovário e cólon.

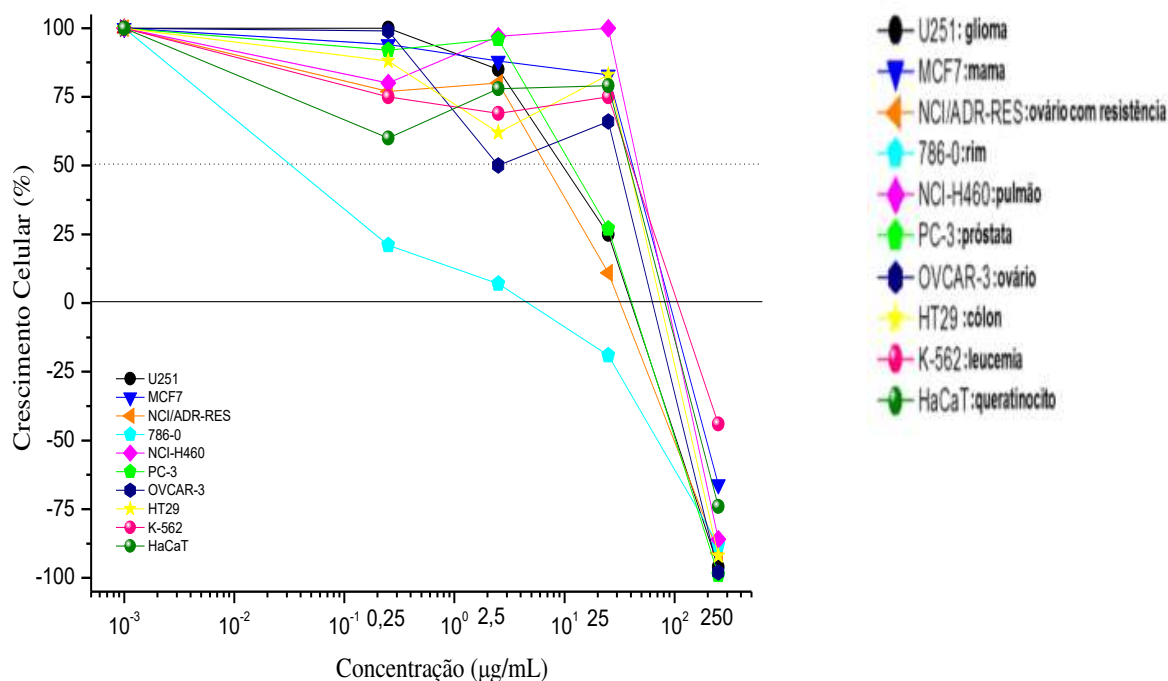
Figura 5.22 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 2 (300 bar e 40 °C) após 48 horas de exposição



Fonte: Dados da pesquisa.

Como se pode perceber na Figura 5.22, o extrato supercrítico obtido em 300 bar e 40 °C apresentou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa: inativo na concentração de 0,25 µg/mL para leucemia, ovário, mama e pulmão e em 2,5 µg/mL para glioma; pouca inibição do crescimento celular na concentração de 2,5 µg/mL para rim e pulmão, e na concentração de 25 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, ovário, próstata, glioma, mama, ovário com resistência e pulmão; atividade citostática e seletiva para rim (25 µg/mL) e na concentração de 250 µg/mL para próstata e leucemia; atividade citocida e seletiva na concentração de 250 µg/mL para queratinócito, cólon, ovário, glioma, mama, ovário com resistência, rim e pulmão. De acordo com o TGI (Tabela 5.9), para todas as linhagens investigadas, a amostra se mostrou inativa.

Figura 5.23 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 3 (100 bar e 60 °C) após 48 horas de exposição

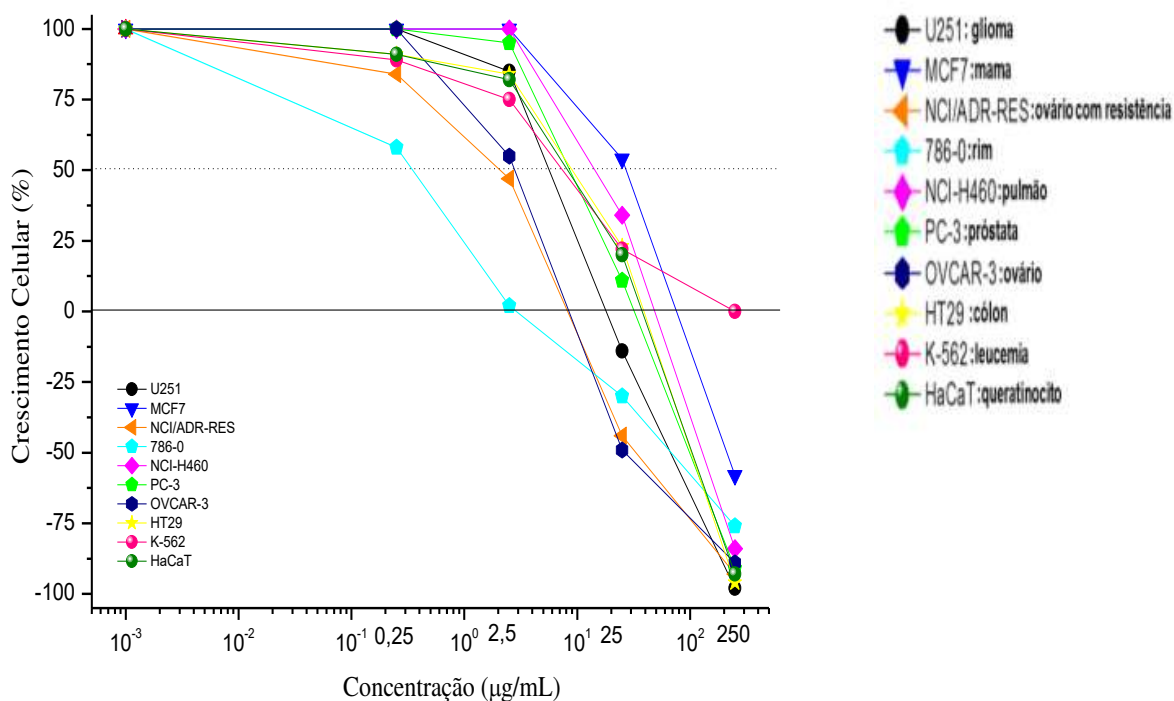


Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 5.23 e nos dados apresentados na Tabela 5.9, o extrato supercrítico obtido em 100 bar e 60 °C apresentou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa: inativo para ovário (0,25 µg/mL), glioma (0,25 µg/mL), próstata (2,5 µg/mL) e pulmão (25 µg/mL); pouca inibição do crescimento celular para ovário com resistência (2,5 µg/mL) e na concentração de 25 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, ovário, glioma e mama; atividade citostática e seletiva para rim (0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL) e na concentração de 25 µg/mL para próstata, glioma e ovário com resistência; atividade citocida e seletiva para rim (25 µg/mL) e na concentração de 250 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, ovário, próstata, glioma, mama, ovário com resistência, rim e pulmão.

De acordo com o TGI (Tabela 5.9), as seguintes atividades foram observadas: inativo para mama, pulmão, cólon, leucemia e queratinócito; atividade fraca para glioma, ovário com resistência, próstata e ovário; e atividade potente para rim (TGI=2,1 µg/mL).

Figura 5.24 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 4 (300 bar e 60 °C) após 48 horas de exposição

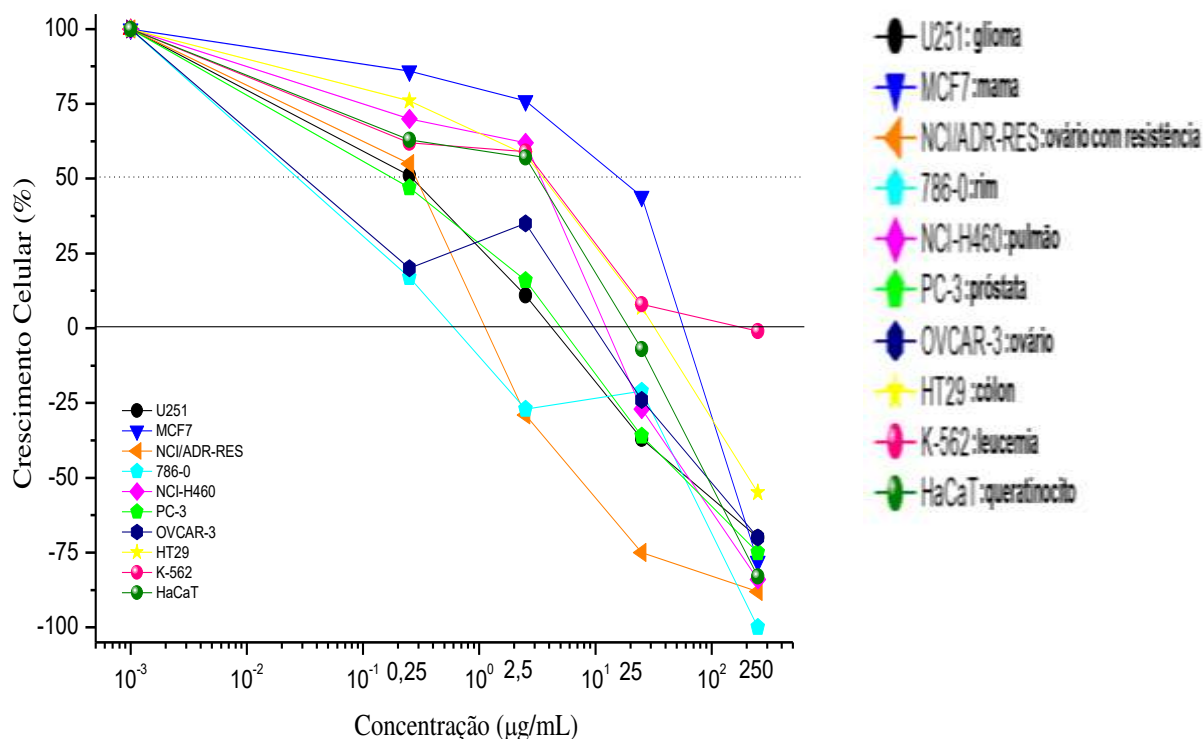


Fonte: Dados da pesquisa.

O extrato supercrítico obtido em 300 bar e 60 °C indicou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa (Figura 5.24): inativo para ovário (0,25 µg/mL) e glioma (0,25 µg/mL) e na concentração de 2,5 µg/mL para mama, pulmão e próstata; pouca inibição do crescimento celular na concentração de 0,25 µg/mL para ovário com resistência e rim, em 2,5 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, ovário e glioma, na concentração de 25 µg/mL para mama; atividade citostática e seletiva pra concentração de 2,5 µg/mL para ovário com resistência e rim, em 25 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, próstata e pulmão e em 250 µg/mL para leucemia; atividade citocida e seletiva na concentração de 25 µg/mL para ovário, glioma, ovário com resistência e rim e na concentração de 250 µg/mL para queratinócito, cólon, próstata, glioma, mama, ovário com resistência, rim e pulmão.

De acordo com o TGI (Tabela 5.9), as seguintes atividades foram observadas: inativo para mama e leucemia; atividade fraca para glioma, pulmão, próstata, cólon e queratinócito; atividade moderada para ovário e ovário com resistência; e atividade potente para rim (TGI=3,9 µg/mL).

Figura 5.25 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato obtido nas condições operacionais do ensaio 5 (200 bar e 50 °C) após 48 horas de exposição

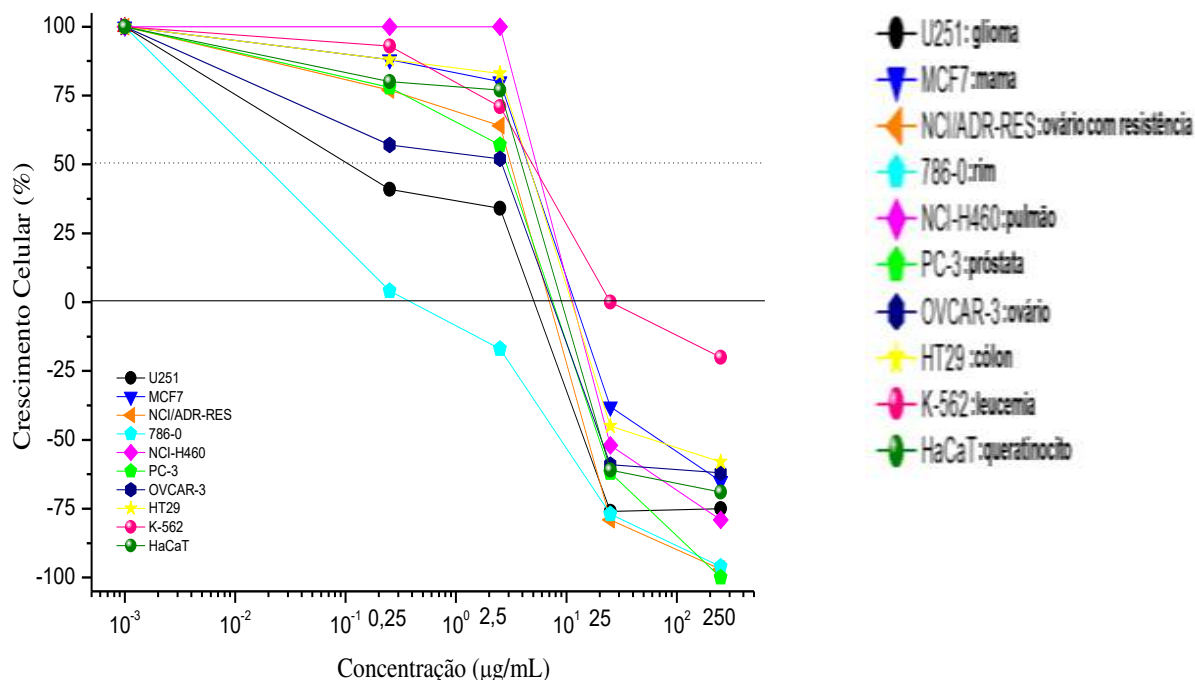


Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme a Figura 5.25 e os dados da Tabela 5.9, o extrato supercrítico obtido em 200 bar e 50 °C apresentou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa: pouca inibição do crescimento celular na concentração de 0,25 µg/mL para ovário com resistência e na concentração de 2,5 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, mama e pulmão; atividade citostática e seletiva na concentração de 0,25 µg/mL para próstata, glioma e rim e na concentração de 2,5 µg/mL para ovário, glioma e próstata e na concentração de 25 µg/mL para leucemia, mama e cólon; atividade citocida e seletiva na concentração de 2,5 µg/mL para ovário com resistência e rim, na concentração de 25 µg/mL para queratinócito, ovário, próstata, glioma, rim e pulmão; na concentração de 250 µg/mL para leucemia, cólon, próstata, glioma, mama, rim e pulmão.

De acordo com o TGI (Tabela 5.9), as seguintes atividades foram observadas: inativo para mama e leucemia; atividade fraca para cólon e queratinócito; atividade moderada para pulmão; atividade potente glioma (TGI=3,9 µg/mL), ovário com resistência (TGI=1,2 µg/mL), rim (TGI=0,8 µg/mL), próstata (TGI=4 µg/mL) e ovário (TGI=4,4 µg/mL).

Figura 5.26 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato diclorometânico (ED) após 48 horas de exposição

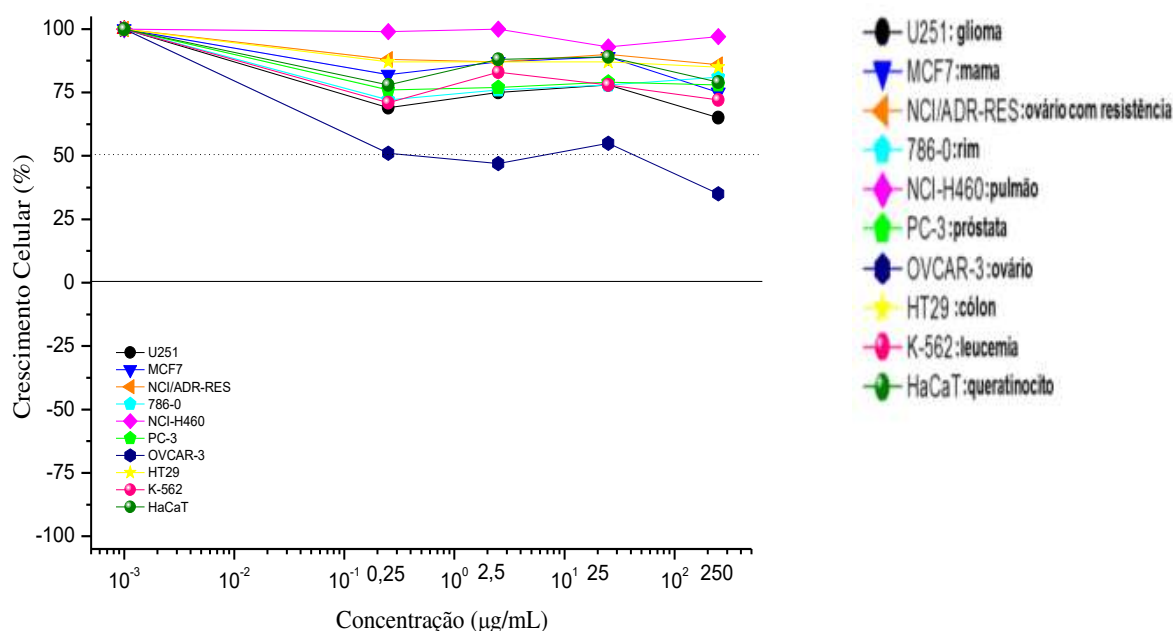


Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo os dados da Figura 5.26, o extrato diclorometânico apresentou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa: inativo para pulmão (2,5 µg/mL); pouca inibição do crescimento celular para concentração de 0,25 µg/mL para ovário e para concentração de 2,5 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, ovário, próstata, mama e ovário com resistência; atividade citostática e seletiva para concentração de 0,25 µg/mL para glioma e rim e na concentração de 2,5 µg/mL para glioma e para concentração de 25 µg/mL para leucemia; atividade citocida e seletiva para rim (2,5 µg/mL), na concentração de 25 µg/mL para queratinócito, cólon, ovário, próstata, glioma, mama, ovário com resistência, rim e pulmão e na concentração de 250 µg/mL para queratinócito, leucemia, próstata, glioma, mama, rim e pulmão.

De acordo com o TGI (Tabela 5.9), as seguintes atividades foram observadas: inativo para leucemia; atividade fraca para pulmão; atividade moderada para mama, ovário com resistência, próstata, ovário, cólon e queratinócito; e atividade potente para glioma (TGI=3,1 µg/mL) e rim (TGI=0,46 µg/mL).

Figura 5.27 – Crescimento celular de cada linhagem celular em função das concentrações de extrato etanólico (EE) após 48 horas de exposição



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 5.27, o extrato etanólico apresentou o seguinte perfil de atividade antiproliferativa: inativo para pulmão (250 µg/mL); pouca inibição do crescimento celular na concentração de 250 µg/mL para queratinócito, leucemia, cólon, próstata, glioma, mama, ovário com resistência e rim; atividade citostática e seletiva para ovário (2,5 µg/mL). Portanto, o extrato etanólico não se mostrou ativo nas concentrações avaliadas, apresentando valores de TGI acima de 50 µg/mL para todas as linhagens de células testadas, inviabilizando seu uso como antitumoral.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que o rendimento global e a composição química dos extratos supercríticos foram influenciados pela pressão e temperatura do CO₂ supercrítico, devido, principalmente, a alterações na massa específica do CO₂ supercrítico e na pressão de vapor dos solutos presentes na matéria-prima. A cinética da extração apresentou um comportamento típico de extração com fluido supercrítico com três períodos característicos, sendo controlada principalmente pelos períodos de queda na taxa de extração (FER) e de taxa controlada pela difusão (DCR). A fração volátil dos extratos supercríticos apresentou, de forma geral, os compostos δ -3-careno, limoneno, α -felandreno, germacreno D e cariofileno. Para a definição

das condições ótimas para a extração supercrítica, é necessário conhecer a finalidade para a qual os extratos serão utilizados. Por exemplo, se o objetivo for obter um produto com alto teor de compostos voláteis (como o óleo essencial), dever-se-á utilizar as menores massas específicas do CO₂ supercrítico. Apesar do menor rendimento nessas condições operacionais, os produtos obtidos requerem processos de purificação menos laboriosos, isso sendo uma vantagem se comparado aos extratos supercríticos obtidos em altas pressões.

Quanto à atividade antiproliferativa, os resultados exibiram melhor desempenho dos extratos supercríticos obtidos em temperatura na faixa de 50 a 60 °C, independente da pressão utilizada (100-300 bar), contra câncer de rim. Ademais, o extrato supercrítico obtido a 200 bar e 50 °C apresentou atividade classificada como potente contra glioma, câncer de rim, ovário com resistência, próstata e ovário. O extrato diclorometânico revelou atividade classificada como potente contra glioma e câncer de rim, sendo que o produto obtido da extração sequencial com etanol do seu resíduo sólido não se mostrou ativo para todas as linhagens de células testadas, o que indica que os compostos apolares dos frutos da *S. terebinthifolius* são os compostos bioativos responsáveis pelas atividades antiproliferativa. Além disso, os resultados sugerem que os sesquiterpenos (cariofileno e germacreno D) dos frutos de *S. terebinthifolius* podem ser os metabólitos ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa previamente destacada. Sugere-se, para trabalhos futuros, o fracionamento dos extratos para o melhor entendimento dos compostos químicos responsáveis por cada atividade antiproliferativa.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho revelaram que, de forma geral, o rendimento e a composição química dos derivados dos frutos da *S. terebinthifolius* (óleo essencial e extratos) foram influenciados pelos seguintes fatores: condições climáticas do local de coleta dos frutos; etapas de pré-tratamento da matéria-prima (secagem); e condições operacionais dos processos extrativos. Portanto, estes resultados mostram a importância da padronização de insumos e também do controle correto das condições operacionais dos processos extrativos utilizados para a obtenção de produto derivado de uma espécie vegetal, com o estabelecimento de parâmetros importantes que atendam aos pré-requisitos de segurança, eficácia e reprodutibilidade.

Ademais, foram observadas diferenças significativas entre os produtos obtidos por meio das distintas técnicas de extração utilizadas neste trabalho (hidrodestilação, Soxhlet e extração com CO₂ supercrítico). Apesar do rendimento mais elevado obtido a partir da extração com solventes orgânicos e extratos supercríticos obtidos a altas pressões, os produtos requerem processos de purificação mais laboriosos, sendo uma desvantagem quando se compara aos óleos essenciais e extratos supercríticos obtidos em baixas pressões. Além disso, na hidrodestilação e na extração supercrítica, são utilizados solventes considerados limpos e que minimizam possíveis prejuízos ambientais. Portanto, a escolha do processo de extração deve levar em conta os custos do processo global (extração e purificação), os impactos ambientais e a aplicação do produto.

Na extração de óleo essencial por hidrodestilação, foi observado que a razão sólido/água e o tempo da extração apresentaram efeitos significativos sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial: as condições ótimas (rendimento maior que 6,8%) foram obtidas utilizando valores de razão sólido/água na faixa de 70 a 130 g/L e tempo de extração entre 4,5 e 8 horas. A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) revelou os seguintes compostos no óleo essencial: δ -3-careno, α -felandreno, limoneno, α -pineno, germacreno D e cariofileno. Quanto à secagem dos frutos da *S. terebinthifolius*, os resultados revelaram que temperaturas na faixa de 40 a 55 °C asseguraram

uma umidade adequada ao produto (<10%), sem degradação da cor e de perdas de compostos voláteis. Os resultados da modelagem da cinética de secagem exibiram melhor desempenho dos modelos de Henderson e Pabis, de Page, de Henderson (Dois termos) e do modelo por RNAs. Desse modo, os resultados promissores da utilização de um modelo baseado em RNAs, para simular processos de secagem, indicam a potencialidade da aplicação dessa ferramenta na modelagem de processos industriais de secagem. Os modelos neurais podem ser utilizados, por exemplo, para estimar o conteúdo de umidade do sólido em tempo real, o que é de grande utilidade em processos de secagem, pois a determinação do conteúdo de umidade em laboratório é um procedimento trabalhoso e demorado.

Na extração utilizando CO₂ supercrítico como solvente, os resultados apontaram que o rendimento e a qualidade dos extratos supercríticos foram influenciados pela pressão e temperatura do CO₂ supercrítico, em função, principalmente, de alterações na massa específica do CO₂ supercrítico e na pressão de vapor dos solutos presentes na matéria-prima. Para a definição das condições ótimas da extração supercrítica, é necessário conhecer a finalidade para a qual os extratos serão utilizados. Por exemplo, se o objetivo for obter um produto com alto teor de compostos voláteis (como o óleo essencial), dever-se-á utilizar os menores valores de massa específica do CO₂ supercrítico.

Quanto à atividade antiproliferativa, os resultados assinalaram atividade potente contra câncer de rim em quase todos os produtos derivados dos frutos da *S. terebinthifolius*: óleo essencial obtido nas condições de maiores rendimentos (TGI=0,04 µg/mL); extratos supercríticos obtidos em temperaturas na faixa de 50 a 60 °C, independente da pressão utilizada (TGI<3,9 µg/mL); e extrato diclorometânico (TGI=0,46 µg/mL). Além disso, é importante ressaltar que: o extrato supercrítico (200 bar e 50 °C) apresentou atividades potentes para ovário com resistência (TGI=1,2 µg/mL), próstata (TGI=4 µg/mL), ovário (TGI=4,4 µg/mL) e glioma (TGI=3,9 µg/mL); o extrato diclorometânico apresentou atividade potente contra glioma (TGI=3,1 µg/mL); e também que o óleo essencial apresentou atividades potentes para todas as linhagens investigadas. Portanto, os resultados sugerem que os compostos voláteis dos frutos da *S. terebinthifolius*, especialmente os sesquiterpenos germacreno D e cariofileno, estão envolvidos com as atividades antiproliferativas destacadas anteriormente.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo com os frutos da *S. terebinthifolius*, as principais sugestões para trabalhos futuros são:

- a) investigar os efeitos da granulometria da matéria-prima e da potência da manta de aquecimento sobre a quantidade e a qualidade do óleo essencial;
- b) determinar dados experimentais de cinética da hidrodestilação em várias condições operacionais e investigar o ajuste de modelos matemáticos aos dados;
- c) investigar a influência de diferentes métodos de secagem sobre a qualidade da matéria-prima;
- d) avaliar a preservação de propriedades de interesse (por exemplo, a estabilidade de princípios ativos e da cor) durante o armazenamento do produto seco;
- e) investigar os efeitos da granulometria da matéria-prima e da vazão do fluido supercrítico sobre a quantidade e a qualidade dos extratos supercríticos;
- f) modelar as curvas cinéticas de extração supercrítica visando ao aumento de escala do processo;
- g) analisar a composição química da fração não volátil dos extratos;
- h) utilizar cossolventes polares na extração supercrítica visando à extração de compostos de maior polaridade;
- i) avaliar a viabilidade econômica dos processos investigados neste trabalho;
- j) fracionar o óleo essencial e extratos visando ao melhor entendimento dos compostos responsáveis pelas atividades antiproliferativas encontradas neste trabalho;
- k) avaliar a atividade antiproliferativa *in vivo* de frações resultantes do óleo essencial e dos extratos;
- l) investigar outras atividades biológicas do óleo essencial e dos extratos; e
- m) investigar outras técnicas de extração, tais como por ultrassom e micro-ondas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AFZAL, T. M.; ABE, T. Simulation of moisture changes in barley during far infrared radiation drying. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 26, n. 2, p. 137-145, 2000.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010. 1 v.
- AHMED, A. F. et al. New β -Caryophyllene-Derived Terpenoids from the Soft Coral *Sinularia nanolobata*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 4, p. 592-597, 2004.
- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS (ASAE). **Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving**. St. Joseph: ASAE, 1998.
- ANDRADE, K. S. et al. Encapsulation of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* R.) extract by SEDS technique. In: IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 5., 2016, Viña del Mar. **Anais...** Viña del Mar, Chile: ProSCiba, 2016.
- ANDRADE, K. S. **Extração e Microencapsulamento de Extratos de Interesse Biológico Provenientes de Pimenta-do-Reino (*Piper nigrum* L.) e de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius* R.)**. 2015. 164 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- ARAL, S.; BESE, A. V. Convective drying of hawthorn fruit (*Crataegus* spp.): Effect of experimental parameters on drying kinetics, color, shrinkage, and rehydration capacity. **Food Chemistry**, v. 210, p. 577-584, 2016.
- ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 17. ed. Gaithersburg: AOAC international, 2000.
- BABINI, M.; MARRANGHELLO, N. **Introdução às redes neurais artificiais**. São José do Rio Preto: Cultura Acadêmica, 2007.
- BAGGIO, A. J. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 17, p. 25-32, 1988.
- BAHRAMIFAR, N.; YAMINI, Y.; SHAMSIPUR, M. Investigation on the supercritical carbon dioxide extraction of some polar drugs from spiked matrices and tablets. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 205-211, 2005.

BALBAY, A.; ŞAHIN, O.; KARABATAK, M. An investigation of drying process of shelled pistachios in a newly designed fixed bed dryer system by using artificial neural network. **Drying Technology: An International Journal**, v. 29, p. 1685-1696, 2011.

BANDONI, A. L. (Ed.). **Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores**. Buenos Aires: CYTED, 2003.

BARBOSA, L. C. A. et al. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p.1959-1965, 2007.

BENDAOUD, H. et al. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 466-472, 2010.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Vicososa, 2006.

BOYD, M. R. Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. **Principles & Practice of Oncology**, v. 10, p. 1-12, 1989.

BRAGA, A. P.; CARVALHO, A. P. L. F.; LUDERMIR, T. B. **Fundamentos de redes neurais artificiais**. Rio de Janeiro: DCC/IM, COPPE/Sistemas, NCE/UFRJ, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n.º 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico para produtos de vegetais, Produtos de frutas e cogumelos comestíveis”. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RE n.º 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 maio. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. New York: Springer, 1994.

BUCHAILLOT, A.; CAFFIN, A.; BHANDARI, B. Drying of Lemon Myrtle (*Backhousia citriodora*) Leaves: Retention of Volatiles and Color. **Drying Technology: An International Journal**, v. 27, n. 3, p. 445-450, 2009.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v. 15, n. 1, p.158-169, 2013.

CARVALHO, R. O. et al. Agroindustry for Drying Pink Pepper (*Schinus terebinthifolius*). **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, Special issue: 18th World Congress of CIGR, p.177-180, 2015.

CAVALCANTE, J. A. **Análise experimental da cinética de secagem da alga marinha *sargassum* sp.** 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CEYLAN, I. Determination of drying characteristics of timber by using artificial neural networks and mathematical models. **Drying Technology: An International Journal**, v. 26, p. 1469-1476, 2008.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.

CHAMORRO, E. R. et al. Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. In: SALIH, B.; ÇELIKBIÇAK, Ö. (Eds.). **Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications**. Rijeka: InTech, 2012. cap. 15. p. 307-324.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 115, n. 3, p. 458-462, 1990.

CHATZOPOULOU, P. S.; KATSIOTIS, S. T. Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from juniperus communis L. berries. **Pharmaceutics Acta Helueriae**, v. 70, p. 247-253, 1995.

COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

COLE, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 821-828, 2014.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J.; DONATE, P. M. **Fundamentos de química experimental**. São Paulo: EDUSP. 2004.

COSTA, A. B. S. et al. Convective drying of regular mint leaves: analysis based on fitting empirical correlations, response surface methodology and neural networks. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 2, p. 271-278, 2014.

CRANK, J. **The Mathematics of diffusion**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1975. 414 p.

CREMASCO, M. A. **Operações Unitárias em Sistemas Particulados e Fluidomecânicos**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2014.

CUBILLOS, F. A. et al. Rotary Dryer Control Using a Grey-Box Neural Model Scheme. **Drying Technology: An International Journal**, v. 29, n. 15, p. 1820-1827, 2011.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.

- DELLA TORRE, A. **Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC.:** estudo fitoquímico e avaliação *in vitro* das atividades antiproliferativa e mutagênica. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- DOURADO, M. T. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi):** propriedades químicas e biológicas. 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.
- EHLERT, P. A. D. et al. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 2, p. 79-80, 2006.
- FIGIEL, A. et al. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 240-247, 2010.
- FILETI, A. M. F. **Controle em Destilação Batelada:** Controle Adaptativo e Controle Preditivo com Modelo Baseado em Redes Neurais Artificiais. 1995. 201 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- FOUCHE, G. et al. In vitro anticancer screening of South African plants. **J. Ethnopharmacol**, v. 119, p. 455-461, 2008.
- FOUST, A. S. et al. **Princípios das Operações Unitárias.** 2.ed. Tradução de Horacio Macedo. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- FRANCISCO, C. F. **Modelagem e simulação de um secador industrial de gelatina através de redes neurais artificial.** 2000. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- FREIRE, F. B. et al. Trends in Modeling and Sensing Approaches for Drying Control. **Drying Technology: An International Journal**, v. 32, n. 13, p. 1524-1532, 2014.
- GEANKOPLIS, G. J. **Transport process and unit operations.** 3. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall PTR, 1993.
- GOMES, M. D. G. et al. Extrativismo e comercialização da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na região do Baixo São Francisco. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO DE SOCIOLOGIA RURAL, 43., 2005, Ribeirão Preto. **Anais...** 2005. Ribeirão Preto: SOBER, 2005. p. 1-13.
- GONÇALVES, E. P. M. **Avaliação do potencial de cicatrização do óleo essencial do fruto de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em ratas com diabetes mellitus.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.
- HENDERSON, S. M. Progress in developing the thin layer drying equation. **Transactions of the ASAE**, v. 17, p. 1167-1168, 1974.
- HENDERSON, S. M.; PABIS, S. Grain drying theory I. Temperature effect on drying coefficient. **Journal of Agriculture Engineering Research**, v. 6, n. 3, p. 169-174, 1961.

- HIMMELBLAU, D. M. Accounts of experiences in the application of artificial neural networks in chemical engineering. **Industrial and Chemical Engineering Research**, v. 47, p. 5782-5796, 2008.
- HONG, S. L. et al. Essential oil content of the rhizome of *Curcuma purpurascens* Bl. (Turmeric) and its antiproliferative effect on selected human carcinoma cell lines. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008.
- INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL (INCAPER). **Boas práticas de cultivo e colheita de pimenta-rosa são tema de pesquisa do Incaper**. 06 jul. 2016. Disponível em: <<http://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/boas-praticas-de-cultivo-e-colheita-de-pimenta-rosa-sao-tema-de-pesquisa-do-incaper>>. Acesso em: 21 set. 2016.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Aromatic natural raw materials - Vocabulary: ISO 9235:1997**. Genebra: ISO, 1997.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). Weight determination. In: **INTERNATIONAL rules for seed testing**. Bassersdorf: ISTA, 2008. cap.10, p.10.1-10.3.
- JAIN, M. K. et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537-547, 1995.
- JANTAN, I. et al. A comparative study of the constituents of the essential oils of three *Cinnamomum* species from Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 387-391, 2003.
- JAYAS, D. S.; SOKHANSANJ, S. Thin-layer drying of barley at low temperatures. **Canadian Agricultural Engineering**, v. 31, p. 21-23, 1989.
- JORK, H. et al. **Thin-Layer Chromatography-Reagents and Detection Methods**. Weinheim: VCH, 1990. v.1a.
- KAMINSKI, W.; TOMCZAK, E.; STRUMILL, P. Neurocomputing approaches to modelling of drying process dynamics. **Drying Technology: An International Journal**, v. 16, p. 967-992, 1998.
- KARAM, M. C. et al. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 32-49, 2016.
- KLIEBER, A. Chilli Spice Production in Australia. **Rural Industries Research and Development Corporation**, v. 33, p. 1-32, 2000.
- KONI, M. et al. Adaptive neuro-fuzzybased control of drying of baker's yeast in batch fluidized bed. **Drying Technology: An International Journal**, v. 28, p. 205-213, 2010.

- KWEKA, E. J. et al. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 129, p. 1-10, 2011.
- LAURIANO, A. C. N. et al. Estudo da cinética de secagem de frutos de aroeira em camada delgada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2005, Campinas. **Anais...**Campinas: UNICAMP, 2005. p. 1-6.
- LEE, D. S. et al. Nonenzymatic browning in dried red pepper products, **Journal of Food Quality**, v. 14, p. 153-163, 1991.
- LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1643-1647, 2007.
- LEWIS, W. K. The Rate of Drying of Solid Materials. **Industrial e Engineering Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 427-32, 1921.
- LIVIA, M. A. **Obtenção e separação de compostos bioativos de *Schinus terebinthifolius* Raddi em meio Supercrítico e avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas.** 2013. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- LOIZZO, M. R. et al. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Prolif.**, v. 41, p. 1002-1012, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MALCHEV, E. et al. Quantitative changes in carotenoids during the storage of dried red pepper and red pepper powder. **Die Nahrung**, v. 26, p. 415-420, 1982.
- MATSUO, A. L. et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 449-454, 2011.
- MAZZA, G; LEMAGUER, M. Dehydration of onion: some theoretical and practical considerations. **Journal of Food Technology**, v. 15, p. 181-194, 1980.
- MEDEIROS, A. C. S.; ZANON, A. Conservação de sementes de aroeira-vermelha (*Schinus Terebinthifolius* Raddi). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 36, p. 11-20, 1998.
- MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 321-330, 2003.
- METTAL, U. et al. Biosynthesis of monoterpene hydrocarbons by isolated chromoplasts from daffodil flowers. **Eur. J. Biochem.** v. 170, p. 613-616, 1988.

- MILOJEVIC, S. Z. et al. Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 547-553, 2008.
- MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.
- MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.
- MOVAGHARNEJAD, K.; NIKZAD, M. Modeling of tomato drying using artificial neural network. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 59, n. 1-2, p. 78-85, 2007.
- MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts Using Supercritical Carbono Dioxide**. Boca raton: CRC Press, 2000.
- NICOLINI, J. V.; PUGET, F. P.; MAZZA, M. G. G. Avaliação da eficiência de extração de óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira vermelha) pelos métodos de hidrodestilação e arraste a vapor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia. **Anais ...** Uberlândia: UFU, 2009. p. 1-5.
- OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G. et al. Fungitoxic effect of essential oil from aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) on *Colletotrichum gloeosporioides* (in Portuguese). **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.
- OWER, E.; PANKHURST, R. C. **The measurement of air flow**. 5. ed. New York: Pergamon Press, 1977.
- PAGANI, A. A. C. et al. Quantification of Bioactive Compounds of Pink Pepper (*Schinus Terebinthifolius*, Raddi), **International Journal of Engineering and Innovative Technology**, v. 4, p. 37-41, 2014.
- PAGE, G. E. **Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers**. 1949. 65 f. Dissertação (Mestrado de Ciência em Engenharia Mecânica) - Purdue University, Indiana, 1949.
- PANDIAN, N. K. S.; RAJKUMAR, P. Sun and mechanical drying and study on drying rate kinetics of tamarind (*Tamarindus indica* L.) at different drying temperatures. **Environment and Ecology**, v. 34, p. 324-328, 2016.
- PENG, T. Y.; DON, M. M.; TAHREL, M. A. Optimisation and Kinetics Studies on the Extraction of Essential Oil from Zingiber Cassumunar. **Journal of Physical Science**, v. 23, n. 1, p. 65-82, 2012.
- PERAZZINI, H.; FREIRE, F. B.; FREIRE, J. T. Drying kinetics prediction of solid waste using semi-empirical and artificial neural network models. **Chemical Engineering & Technology**, v. 36, n. 7, p.1193-1201, 2013.

- PIANTINO, C. R. et al. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 209-214, 2008.
- PINHEIRO, C. L. **Estudo e Identificação de Compostos Orgânicos Voláteis Emitidos durante o Processo de Secagem de Bagaço de Laranja**. 2015. 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- QUEIROZ, E. F. et al. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona spinesces*. **Journal Natural Product Letters**, v. 13, p. 21, 1999.
- RAMASWAMY, H.; MARCOTTE, M. **Food processing: principles and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.
- RIZVI, S. S. H. (Ed.). **Supercritical fluid processing of food and biomaterials**. London: Blackie Academic & Professional, 1994.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Cárita, 2009.
- ROMDHANE, N. G. et al. Effect of air-drying temperature on kinetics of quality attributes of lemon (*Citrus limon* cv. *lunari*) peels. **Drying Technology: An International Journal**, v. 33, p. 1581-1589, 2015.
- PALMA, M. et al. Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. In: ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. (Eds.). **Natural product extraction: principles and applications**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. cap. 2. p. 58-88.
- SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 240-253, 2009.
- SALVI JÚNIOR, A. **Schinus terebinthifolius Raddi: estudo farmacognóstico e investigação da atividade biológica de extratos e frações**. 2013. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2013.
- SANTOS, A. C. A. et al. Chemical Composition of the Essential Oils from Leaves and Fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 1, p. 16-25, 2009.
- SARTORELLI, P. et al. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 743-747, 2012.
- SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO, AQUICULTURA E PESCA (SEAG). Centrais de Abastecimento do Espírito Santo S.A. (CEASA-ES). **Seca no ES: prejuízo de mais de R\$ 3,6 bilhões na agricultura**. 20 set. 2016. Disponível em: <<https://ceasa.es.gov.br/Not%C3%ADcia/seca-no-es-prejuizo-de-mais-de-r-3-6-bilhoes-na-agricultura>>. Acesso em: 29 set. 2016.

SHAHHOSEINI, R. et al. Qualitative and Quantitative Changes in the Essential Oil of Lemon Verbena (*Lippia citriodora*) as Affected by Drying Condition. **Drying Technology: An International Journal**, v. 31, n. 9, p. 1020-1028, 2013.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 813-23, 2006.

SIBANDA, S. et al. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 107-111, 2004.

SILVA, A. G. et al. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 79, p. 1-7, 2010.

SILVA, B. G. **Modelagem e simulação do processo de secagem dos frutos de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolia* Raddi)**. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SILVA, B. G.; FILETI, A. M. F.; TARANTO, O. P. Drying of Brazilian Pepper-Tree Fruits (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Development of Classical Models and Artificial Neural Network Approach. **Chemical Engineering Communications**, v. 202, n. 8, p. 1089-1097, 2015.

SINGH, J. N.; PANDEY, R. K. Neural network approaches for prediction of drying kinetics during drying of sweet potato. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. 13, n. 1, 2011.

SMITH, R.; INOMATA, H.; PETERS, C. **Introduction to supercritical fluids: A spreadsheet-based approach**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Science, 2013. 4. v.

SOUZA, D. C. L. **Diversidade genética, produção de frutos e composição química em *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2012.

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

STRUMILLO, C; KUDRA, T. **Drying: Principles, applications and design**. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1986.

TOPUZ, A. Predicting moisture content of agricultural products using artificial neural networks. **Advances in Engineering Software**, v. 41, p. 464-470, 2010.

TREYBAL. R. E. **Mass-transfer operations**. 3. ed. Auckland: McGraw-Hill, 1981.

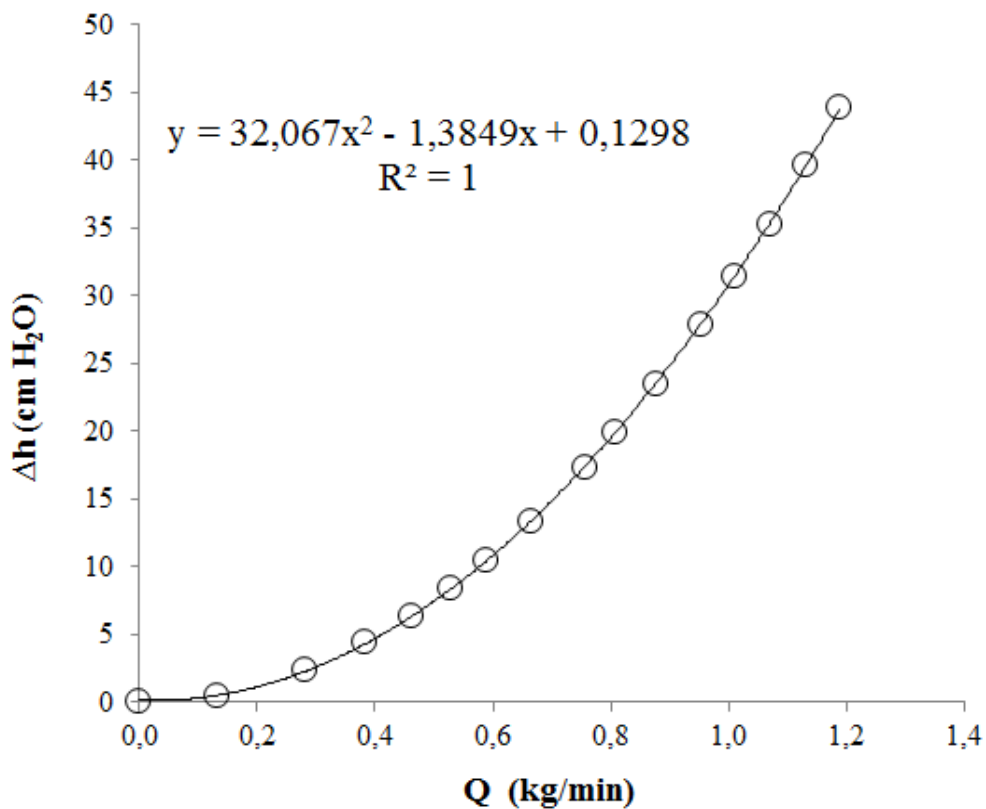
VAN DEN DOOL, H.; KRATZ P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN'T LAND, C. M. **Industrial Drying Equipment: Selection and Application**. New York: Marcel Dekker, 1991.

ZUZARTE, M.; SALGUEIRO, L. Essential oil chemistry. In: SOUZA, D. P. (Ed.). **Bioactive Essential Oils and Cancer**. [S.l.]: Springer, 2015. cap. 2. p. 19-61.

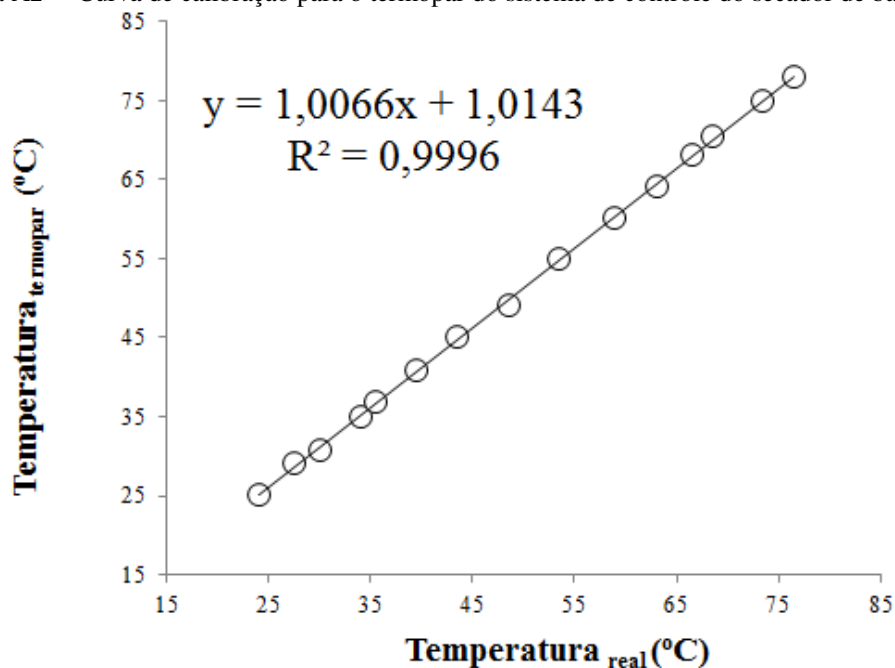
APÊNDICE A – Curvas de calibração

Figura A1 – Curva de calibração para a placa de orifício do secador de bandeja



Legenda: Q: vazão mássica do ar de secagem; Δh: queda de pressão na placa de orifício.

Figura A2 – Curva de calibração para o termopar do sistema de controle do secador de bandeja



Nota: O termopar foi calibrado utilizando os seguintes materiais: um banho termostático; o Paratherm OR[®] como fluido térmico; e um termômetro de mercúrio (calibrado e certificado) utilizado como referência.

APÊNDICE B – Programa de treinamento e verificação das RNAs no *software* MATLAB®

```

%limpa as variáveis do histórico:
clear;

%limpa o prompt:
clc;

%carregamento do arquivo de dados:
M=load('dados.dat');

%definição das variáveis de entrada e saída:
entrada=M(:,1:3);
saida=M(:,4);

%matriz transposta:
entrada=entrada';
saida=saida';

%normalização dos dados entre -1 e 1:
[entradan,minentrada,maxentrada,saidan,minsaida,maxsaida]=premnmx(entrada,saida);

%divisão dos dados:

%%treino:
entradatreina=entradan(:,1:818);
saidatreina=saidan(:,1:818);

%%verificação:
entradaverifica=entradan(:,819:1118);
saidaverifica=saidan(:,819:1118);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%ARQUITETURA DA REDE:

%rede feedforward:
net=newff(minmax(entradatreina),[3,1],{'tansig','purelin'},'trainbr');

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%TREINAMENTO DA RNA:

%definição do número máximo de iterações (épocas):
net.trainParam.epochs=10000;

% define o objetivo de erro quadrático (MSE), definido a partir do desvio padrão da saída:
net.trainParam.goal=0.0001;

%inicialização dos pesos da rede aleatoriamente (chuta valores iniciais para os pesos e bias):
net=init(net);

%treinamento:
[net,tr]=train(net,entradatreina,saidatreina);
%determinados os pesos e bias da rede e arquivados temporariamente em “net”

```

```

%simula com os dados de entrada do arquivo de treinamento:
Y=sim(net,entradatreina);

%desnormaliza os dados:
X=postmnmx(Y,minsaida,maxsaida);
F=postmnmx(saidatreina,minsaida,maxsaida);

%figure(1);
%postreg(F(1,:),X(1,:));

%%%VERIFICAÇÃO DA RNA:

%simulação da variável de saída a partir das entradas do conjunto de verificação;
Z=sim(net,entradaverifica);

%desnormalização da variável de saída;
H=postmnmx(Z,minsaida,maxsaida); %simulada
I=postmnmx(saidaverifica,minsaida,maxsaida); %real

%geração dos gráficos para análise do erro e sse:
erro=I-H
msev=mse(erro)
RMSEv=(msev)^0.5

%figure(2);
%plot(erro);
%xlabel('Experimentos de verificação');
%ylabel('Erro');

%grafico das saída (real x simulada):
figure(3);
postreg(I(1,:),H(1,:));
regress(I(:,1), H(:,1))

%Gráfico para observar o ajuste do modelo aos dados reais:
figure(4);
plot(I,'o') %grafica a saída real do arquivo de verificação
hold on
plot(H,'g'); %grafica a saída calculada
xlabel('Experimentos de verificação');
ylabel('Umidade adimensional');
hold off

%Salvar a rede criada e os parâmetros ajustados:
save 'seca' net;

%gensim(net)

%Para visualizar os pesos e bias finais:
net.IW{1} %pesos entre camadas entrada/intermediária
net.LW{2} %pesos entre camadas intermediária/saída
net.b{1} %bias da camada intermediária
net.b{2} %bias da camada de saída

```