

Fernando de Paula Medeiros de Matos

**ANÁLISE DO RENDIMENTO E DA QUALIDADE DOS
EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE PATCHOULI
(*Pogostemon cablin* Benth) SUBMETIDAS À FERMENTAÇÃO E
EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRTICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

FLORIANÓPOLIS
2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Matos, Fernando de Paula Medeiros de

Análise do Rendimento e da Qualidade dos Extratos Obtidos de Folhas de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) Submetidas à Fermentação e Extração com CO₂ Supercrítico / Fernando de Paula Medeiros de Matos ; orientador, Ariovaldo Bolzan. Florianópolis, SC, 2016.

94 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Extração supercrítica. 3. Patchouli. 4. Aspergillus. I. Bolzan, Ariovaldo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Fernando de Paula Medeiros de Matos

**ANÁLISE DO RENDIMENTO E DA QUALIDADE DOS
EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE PATCHOULI
(*Pogostemon cablin* Benth) SUBMETIDAS À FERMENTAÇÃO E
EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de novembro de 2016.

Prof^a. Dra. Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Orientador

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Débora de Oliveira

Prof. PhD. Luismar Marques Porto

Prof. Dr. André Wüst Zibetti

Este trabalho é dedicado ao
Cel. Wanderley de Paula Medeiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram com a realização do trabalho:

Alessandra Marangoni. Daniela Gava Citadin. Ariovaldo Bolzan. André Zibetti. Douglas Cardoso. Admir Giachini. Deise R. C. Mayra Arauco. Ivano de Filippis. Lidiane Rozzo. Flávio Marques da Cunha. Loiva Karnopp. Ângela Borba. Douglas Pereira Rodrigues. Natasha Mantau. Leon Bizzocchi. Ricardo Augusto Grazel Matos. Saulo Marques Pasko. Patricia Cunha. Fátima Beatriz Santos Medeiros de Matos. Vilmar Antônio de Matos. Paulo Vitor de Paula Medeiros de Matos. Eduardo de Paula Medeiros de Matos. Leda Santos Medeiros. Todos os familiares e amigos.

“The mountains are calling and I must go”

*John Muir, 1873.
(engineer, naturalist, philosopher, writer,
botanist, geologist and outdoor enthusiast)*

RESUMO

O óleo essencial de patchouli é um insumo amplamente utilizado na indústria de cosméticos e perfumaria, possuindo papel importante na definição de alguns perfis olfativos utilizados em perfumes de marcas renomadas no comércio internacional. A extração de óleos essenciais, no contexto da produção de perfumes, é realizada, na sua grande maioria, por arraste a vapor. No caso do patchouli, com essa técnica, o rendimento da extração em óleo atinge em média 1,5 a 3% em massa, sendo que alguns fatores podem interferir nesse rendimento. Parâmetros de cultivo e armazenamento podem interferir na quantidade e qualidade do óleo produzido. Uma possibilidade para aumentar o rendimento em massa de óleo, é conseguir extrair todo o óleo presente na folha da planta. Uma das possibilidades é submeter as folhas a um processo de fermentação. A ação de microrganismo adequado, capaz de destruir as estruturas celulares das folhas, nas quais o óleo fica armazenado, permitirá uma ação mais efetiva do calor sobre o óleo, fazendo com que ocorra o arraste pelo vapor de forma mais eficaz. Se, associado à fermentação das folhas, for utilizada a capacidade do CO₂ em estado supercrítico de solvatação do óleo dentro das estruturas porosas das folhas, pode-se obter rendimento em massa superior ao obtido nos processos convencionais. Neste trabalho, testou-se a utilização de duas cepas diferentes do microrganismo *Aspergillus niger* no processo de fermentação das folhas, e obteve-se o extrato de patchouli utilizando um processo com CO₂ a 32°C e pressão de 100 bar por 60 minutos. Foram utilizados testes em triplicata, com granulometria de 1,19 a 2,00 mm, variando-se o tempo de duração do processo de fermentação das folhas de 4 a 20 dias. Os resultados experimentais mostraram que com o microrganismo *Aspergillus niger* nativo (Tratamento 1), com fermentação de quatro dias, obteve-se um rendimento em extrato de 8,05%, o que equivale a um aumento de produção de 42,98%, comparando-se com o mesmo processo de extração com CO₂ supercrítico utilizando-se folhas não fermentadas. Se comparar com o rendimento por arraste a vapor de folhas não fermentadas, o aumento de eficiência é de 270%. A qualidade do óleo obtido foi verificada pelo teor de patchoulol. Na condição de maior rendimento, o teor de patchoulol foi de 38,16%, valor acima dos padrões exigidos pelo mercado desse óleo.

Palavras-chave: Patchouli. Extração supercrítica. Óleo essencial.

ABSTRACT

Patchouli essential oil is an ingredient widely used in the cosmetics and perfumery industry and playing an important role in the definition of some olfactory profiles used in perfumes of important brands in international trade. The extraction of essential oils, in the context of the production of perfumes, is carried out, for the most part, by steam distillation. In the case of patchouli, with this technique, the yield of oil extraction reaches on average 1.5 to 3% of mass, and some factors may interfere with this yield. Culture and storage parameters can interfere with the quantity and quality of the oil produced. One possibility to increase the yield by mass of oil is to be able to extract all the oil present in the plant leaf. One possibility is to subject the leaves to a fermentation process. The proper microorganism action, capable of destroying the cellular structures of the leaves in which the oil is stored, will allow a more effective action of the heat on the oil, causing the drag by the steam to take place more efficiently. If the supercritical CO₂ capacity of the oil to get into the porous structures of the leaves be used in combination with leaf fermentation, a higher yield can be obtained than that in comparison with conventional processes. In this work, the use of two different strains of the *Aspergillus niger* microorganism was tested in the leaf fermentation process, and the patchouli extract was extracted using a CO₂ process at a temperature of 32°C and a pressure of 100 bar for 60 minutes. Triplicate tests with granulometry of 1.19 to 2.00 mm were used, varying the duration of the fermentation process of leaves from 4 to 20 days. The experimental results showed that with native *Aspergillus niger* (Treatment 1), with a four-day fermentation, an extract yield of 8.05% was obtained, which is equivalent to an increase in yield of 42.98%, comparing the same extraction process with supercritical CO₂ using unfermented leaves. If compared to the steam distillation, the efficiency increase is 270%. The quality of the oil obtained was verified by the patchoulol content. In the best yield condition, the patchoulol content was 38.16%, a value above the standards demanded by the oil market.

Keywords: Patchouli. Supercritical fluid extraction. Essencial oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de corte transversal do mesofilo de patchouli. Legenda: gl: glândula produtora de óleo essencial; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; ep: epiderme (SANDES, et al. 2012).....	30
Figura 2: Diagrama de fase do dióxido de carbono. Temperatura - Pressão, SANDERS (1993).....	33
Figura 3: Curva típica de extração com fluído em estado supercrítico. Fonte: Brunner, 1994.....	37
Figura 4: Folhas de patchouli (<i>Pogostemon cablin</i>) em processo de secagem em estufa.....	46
Figura 5: Diagrama de fluxo das atividades realizadas para extração e inoculação da cepa de <i>Aspergillus niger</i> 01 (Tratamento 1).....	48
Figura 6: Diagrama de fluxo das atividades realizadas para extração e inoculação da cepa de <i>Aspergillus niger</i> 02 (Tratamento 2).....	50
Figura 7: Meio de cultura com sabugo moído autoclavado para esterilização do material.	52
Figura 8: Extrator supercrítico modelo HPLC-SC, Jasco Inc. utilizado para a obtenção do extrato de patchouli.	54
Figura 9: Unidade de extração (HPLC-SC). B- bomba HPLC, E- extrator, BP- válvula back pressure, H –aquecimento.....	55
Figura 10: Preparo das folhas para realização da microscopia eletrônica de varredura.....	56
Figura 11: Comparação de rendimento médio de extrato dos Tratamentos 1 e 2.....	58
Figura 12: Distribuição dos rendimentos para diferentes dias de tratamento para a cepa de <i>Aspergillus niger</i> - Tratamento 1.....	59
Figura 13: Distribuição dos rendimentos para diferentes dias de tratamento para a cepa <i>Aspergillus niger</i> - Tratamento 2.....	61
Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli sem tratamento - Testemunha (aumento de 100x).....	66

Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli sem tratamento - Testemunha (aumento de 200x).....	67
Figura 16: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 04 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 100x).....	67
Figura 17: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 04 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 400x). A – esporos do fungo. B – tricoma degradado.....	68
Figura 18: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 12 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 500x).....	68
Figura 19: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 12 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 3000x). A – esporos do fungo.....	69
Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 20 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 200x).....	69
Figura 21: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 20 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 1000x).....	70
Figura 22: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 04 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 100x).....	70
Figura 23: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 04 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 400x).....	71
Figura 24: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 12 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 500x).....	71
Figura 25: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 12 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 1000x).....	72

Figura 26; Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 20 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 400x).....	72
Figura 27: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 20 dias de inoculação de <i>Aspergillus niger</i> (aumento de 1000x).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste de Tukey, com 95% de confiança, para multicomparação das médias indicando quais tratamentos diferem entre si para a cepa de <i>Aspergillus niger</i> - Tratamento 1.....	60
Tabela 2: Rendimento médio de extrato obtido.....	61
Tabela 3: Teste de Tukey, com 95% de confiança, para multicomparação das médias indicando quais tratamentos diferem entre si para a cepa de <i>Aspergillus niger</i> 2.....	62
Tabela 4: Compostos encontrados nas amostras de extrato de patchouli analisadas.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 Patchouli (Pogostemon cablin benth)	27
3.2. Óleo essencial de patchouli.....	28
3.3. Métodos de extração do óleo essencial.....	29
3.4. Secagem e armazenamento	31
3.5. Fluidos supercríticos	31
3.5.1. Processo de extração com fluido supercrítico	35
3.5.2. Curvas de extração	35
3.5.3. Solubilidade e taxa de transferência de massa	37
3.5.4. Efeito da matriz vegetal.....	38
3.5.5. Efeito de parâmetros operacionais da extração supercrítica	39
3.5.6. Efeito da densidade	39
3.5.7. Efeito da Pressão	40
3.5.8. Efeito da Temperatura.....	40
3.5.9. Efeito dos modificadores (cossolventes).....	41
3.6. Fermentação.....	41
3.7. Aspergillus niger.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. Coleta da Matriz Vegetal.....	45
4.2. Cepas de Aspergillus niger.....	46
4.2.1. Aspergillus niger (Tratamento 1)	47
4.2.2. Aspergillus niger ATCC 6205 (Tratamento 2).....	49
4.3. Meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA)	51
4.4. Meio de cultura com sabugo moído	51
4.5. Extração dos esporos.....	52
4.6. Contagem e teste de viabilidade dos esporos.....	53

4.7. Desinfecção das folhas e Inoculação dos esporos.....	53
4.8. Extração com dióxido de carbono (CO ₂) em estado supercrítico....	54
4.9. Microscopia eletrônica de varredura	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1. Rendimento de extrato de patchouli	57
5.1.1. Aspergillus niger - Tratamento 1	57
5.1.2. Aspergillus niger ATCC 6205 - Tratamento 2.....	60
5.2. Análise do óleo essencial por gc-ms.....	62
5.3. Análise das folhas por microscopia eletrônica de varredura.....	65
6. CONCLUSÕES.....	75
7. SUGESTÕES.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	79
ANEXOS I – Relatórios de análises cromatográficas	85
ANEXOS II - Dados experimentais	91

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais cresce a preocupação dos consumidores por produtos ecologicamente corretos que associem qualidade com preservação do meio ambiente. Em virtude disso, novas tecnologias que se preocupam com a qualidade de vida são desenvolvidas, a exemplo dos processos de extração e fracionamento que utilizam fluidos supercríticos. Essas técnicas de separação geralmente utilizam como solvente o dióxido de carbono por ser uma técnica de extração ecologicamente correta, altamente disponível, inerte, não produzir resíduos e poder ser recuperado. Além disso, é um processo flexível devido à possibilidade de uma modulação contínua do poder de seletividade do solvente (ARAUCO, 2013).

O interesse por produtos naturais tem aumentado nos últimos anos, favorecendo o mercado de plantas aromáticas e medicinais, a exemplo do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) (DONELIAN, 2010). O patchouli é uma planta aromática do continente asiático, pertencente à família Lamiaceae, que possui óleos essenciais muito usados na indústria da perfumaria, assim como na produção de medicamentos (SANDES, et. al. 2012).

De acordo com Samuelsson (1999), a fonte mais antiga de medicamentos utilizada pela humanidade é proveniente do reino vegetal, o qual detém as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica em virtude da grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos.

A partir do metabolismo secundário da planta, é produzido o óleo essencial, o qual é altamente concentrado, volátil, hidrofóbico e possui odor característico, sendo composto por terpenóides e seus derivados oxigenados (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013). O óleo é encontrado em todas as partes da planta, incluindo as raízes, porém, experimentos mostram que as folhas superiores e os galhos apresentam óleo de melhor qualidade (VIJYAKUMAR, 2004). Sua alta demanda e valor agregado na indústria da perfumaria podem, em parte, ser considerados pela inexistência de substituto sintético no mercado (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

Esses óleos essenciais são formados nas cavidades secretoras ou nos tricomas glandulares (DICKISON, 2000). Através da anatomia da folha do patchouli, é possível encontrar três principais estruturas responsáveis pela produção do óleo essencial: os tricomas glandulares

capitados, tricomas glandulares peltados e as glândulas de óleo no mesofilo (SANDES, et. al. 2012). Para garantir a boa qualidade e rendimento do óleo, deve-se levar em consideração o estágio fenológico que a planta se apresenta antes que seja feita a colheita (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (Abihpec), o setor de higiene e beleza, em 2015, faturou US\$ 42 bilhões no País. Na avaliação do presidente da entidade, João Carlos Basílio, o mercado brasileiro é promissor no setor, sendo os ingredientes naturais o grande diferencial. O maior desafio dos fornecedores de insumos naturais para a indústria da beleza e higiene é manter a competitividade.

A extração do óleo essencial de patchouli por arraste a vapor, técnica convencional amplamente utilizada nos processos industriais de produção de óleos essenciais, apresenta rendimento médio em torno de 1,5 a 3% (HEATH, 1981).

Uma possibilidade para aumentar esse rendimento, e fazer com que todo o óleo essencial presente nas estruturas celulares da folha seja retirado, é fermentar as folhas. No processo de fermentação, microrganismos agem no sentido de romper as estruturas responsáveis pela produção dos óleos essenciais - tricomas glandulares capitados, tricomas glandulares peltados e glândulas de óleo no mesofilo (SANDES, et. al., 2012) – facilitando, assim, a ação do calor, no caso do arraste a vapor. A fermentação é um processo de reações enzimáticas que usa compostos microbiológicos como meio de degradar os constituintes da parede celular da folha do patchouli (RAHARJO; RETNOWATI, 2012).

A associação da ação de microrganismos e da capacidade de solvatação do CO₂ no estado supercrítico pode aumentar consideravelmente a quantidade de óleo essencial extraída. A literatura especializada classifica o óleo extraído nessas condições de extrato.

Assim, nesse trabalho, pretende-se avaliar os efeitos da fermentação das folhas de patchouli no processo de extração com CO₂ supercrítico na produção de extratos de patchouli.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o rendimento e a qualidade do extrato de patchouli obtido por extração com CO₂ em estado supercrítico após a inoculação de fungos produtores de celulasas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. avaliar a influência do tempo de fermentação das folhas no rendimento em óleo no processo de extração com CO₂ supercrítico;
2. determinar qual tempo de inoculação e qual cepa do fungo *Aspergillus niger* é mais eficiente no aumento do rendimento do óleo essencial de patchouli;
3. analisar cromatograficamente a qualidade dos extratos obtidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PATCHOULI (*POGOSTEMON CABLIN* BENTH)

O gênero *Pogostemon sensu lato* é ecologicamente e economicamente muito importante, sendo composto por aproximadamente 80 espécies, conferindo o maior gênero da família Pogostemoneae. O gênero é distribuído, principalmente, no sul e sudeste da Ásia, assim como na China. Historicamente muitos taxinomistas tratam o gênero em dois grupos distintos, baseados principalmente no habitat: grupo terrestre *Pogostemon sensu stricto* e o grupo aquático e de mangue *Dysophylla* Bl (YAO et al., 2016).

Muitas características têm sido utilizadas para classificação taxonômica do gênero *Pogostemon*, sendo que muitas delas parecem estar associadas com habitats especializados. Por exemplo, diferenças entre cálices pequenos e grandes, como também a presença e ausência de vasos secundários no cálice são comumente encontrados de forma diferente nos *Pogostemon* habituados em via terrestre em comparação com os de ambiente aquático (TANKO et al., 2005).

Além de *Pogostemon cablin*, dentro do gênero *Pogostemon*, outras espécies contêm óleo essencial de patchouli. Sendo assim, é necessária uma análise molecular, que inclua uma amostragem mais abrangente para explorar as relações filogenéticas dentro do gênero, e assim, estabelecer as ligações entre as espécies produtoras de óleo de patchouli, além de promover a proteção eficiente e a utilização dos recursos de germoplasma de patchouli e das outras espécies de *Pogostemon* produtoras de óleo essencial (YAO et al., 2016).

Pogostemon cablin Benth é uma planta dicotiledônea, da família Lamiaceae, a qual possui porte ereto e ramificado, podendo atingir de 0,5 m a 1,0 m de altura. As folhas são ovais e alongadas, possuindo tricomas abaxiais. Sua inflorescência é terminal ou axilar, densa e apresenta flores pequenas e irregulares, bissexuais, de cor branca a roxa (JOY et al., 2001).

A planta foi descrita pela primeira vez em 1845 pelo botânico Pelletier-Sautelet, nas Filipinas, onde se acredita ser o centro de origem da espécie. Na Índia, onde foi introduzida em 1941, a literatura antiga menciona vários usos com outras plantas medicinais, inclusive para rituais religiosos nos tempos pré-históricos (SHARMA, 1996).

A parte aérea da planta é usada para o tratamento de gripe comum, dor de cabeça, febre, vômito, indigestão e diarreia, assim como agente

antifúngico pela medicina chinesa e das regiões do sul da Ásia (China Pharmacopoeia Committee, 2010).

Embora seja uma planta tropical, apresenta bom crescimento em regiões subtropicais, sendo que, atualmente, a planta cresce naturalmente em diversas partes do mundo. É cultivada principalmente na China, Índia, Malásia, Indonésia e América do Sul, apresentando melhor desenvolvimento em ambientes sombreados; temperaturas entre 24°C e 28°C; precipitação pluviométrica de 2.000 a 3.000 mm anuais, e altitude de 0 a 1.200 m, com umidade relativa do ar de 75% (JOY et al., 2001).

Para a obtenção do óleo essencial de excelente qualidade, deve-se levar em consideração diversos fatores importantes, como a correta identificação da espécie; coleta da matriz vegetal em estágio de crescimento adequado; oferecer ótimas condições de cultivo (luz, solo, temperatura e água); secar e armazenar o produto sob temperatura e condições que evitem a redução dos teores de fitoquímicos, assim como utilizar a técnica de extração mais adequada à espécie em questão (TANKO et al., 2005). O pH do solo, para que ocorra ótimo desenvolvimento da planta, deve variar de 5,5 a 7,5 (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

3.2. ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI

A partir do metabolismo secundário da planta, é produzido o óleo essencial, o qual é altamente concentrado, volátil, hidrofóbico - praticamente insolúvel em água - e possui odor característico, sendo composto por terpenóides e seus derivados oxigenados. Atualmente, cerca de 90% dos óleos essenciais produzidos no mundo são usados pelas indústrias de essências para alimentos e de perfumes (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

Os Estados Unidos da América são os maiores consumidores de óleos essenciais, seguidos pelos países da Europa Ocidental, como a França, Alemanha e Reino Unido, assim como pelo Japão (HOLMES, 2005).

O óleo é encontrado em todas as partes da planta, incluindo as raízes, porém, experimentos mostram que as folhas superiores e os galhos apresentam óleo de melhor qualidade (VIJAYKUMAR, 2004).

Sua alta demanda pela indústria da perfumaria, pode, em parte, ser considerada pela inexistência de substituto sintético no mercado, pois esse óleo é considerado um componente chave para diversos perfumes

exóticos, conferindo aroma apimentado (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

Esses óleos essenciais são formados nas cavidades secretoras ou nos tricomas glandulares (DICKISON, 2000). Através da anatomia da folha do patchouli, é possível encontrar três principais estruturas responsáveis pela produção do óleo essencial: os tricomas glandulares capitados, tricomas glandulares peltados e as glândulas de óleo no mesofilo (SANDES et al., 2012). Para garantir a boa qualidade e rendimento do óleo, deve-se levar em consideração o estágio fenológico que a planta se apresenta antes que seja feita a colheita (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

O óleo essencial do patchouli é composto por diversos componentes, sendo os principais: β -elemeno, variando de 0,24 a 1,3%; α -patchouleno, de 2,3 a 20,9%; α -guaiano (3,17 a 22,2%); β -cariofileno (1,88–5,14%); β -patchouleno (0,94–12,12%); seicheleno (4,73–8,94%); α -bulseno (9,86–20,3%), e patchoulol – $C_{15}H_{26}O$ (17,5–54,31%) (BLANK et al., 2011).

Pesquisas recentes demonstram que a aromaterapia, na qual doentes inalaram os componentes do óleo essencial de patchouli, pode prevenir ou até tratar físico e mentalmente doenças, o que tem recebido considerável atenção dos pesquisadores (ITO et al., 2015). Investigações farmacológicas indicam que o óleo essencial de patchouli apresenta significativa atividade antibacteriana, anti-malária, antivírus, anti-inflamatória, e bioatividade imunorregulatória (LIU, J-L et al., 2015). O óleo também é usado para redução de estresse sem causar reações alérgicas e estimulação do sistema nervoso (KONGKATHIP et al., 2009).

3.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Geralmente, a extração do óleo é feita por destilação a vapor, sendo, às vezes, usado solvente orgânico. O método de extração por destilação apresenta melhor resultado na qualidade do óleo, embora as folhas frescas apresentem rendimento mais baixo que a extração feita com folhas secas (KONGKATHIP et al., 2009). O aumento do rendimento da extração do óleo pode ser feito com a quebra da cutícula de cera protetora da parede celular, do tecido das células epidérmicas, do parênquima paliádico e do parênquima lacunoso (Figura 1). A quebra dessas estruturas pode ser feita por fermentação microbiológica, secagem em

estufa ou retirada da cutícula de cera com NaOH (RAHARJO; RETNOWATI, 2012).

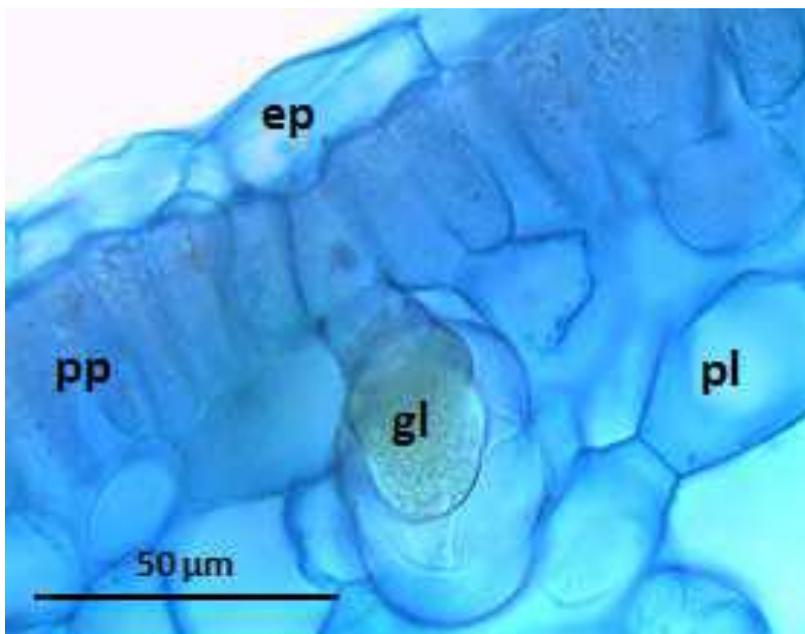


Figura 1: Fotomicrografia de corte transversal do mesofilo de patchouli. Legenda: gl: glândula produtora de óleo essencial; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; ep: epiderme (SANDES, et al. 2012).

A secagem reduz o nível de água nas células, fazendo com que se rompa a parede celular, liberando assim o óleo; e sob condições ideais, faz com que aumente o rendimento da extração sem que haja perdas significativas na qualidade do óleo essencial (AMBROSE; ANNAMALAI; NAIK, 2013). Folhas secas e armazenadas pelo período de quatro a seis meses apresentam óleo com qualidade de aroma superior (RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

A fermentação é um processo de reações enzimáticas que usa compostos microbiológicos como meio de degradar os constituintes da parede celular da folha do patchouli (RAHARJO; RETNOWATI, 2012).

3.4. SECAGEM E ARMAZENAMENTO

Para que se reduzam ao máximo as perdas de princípios ativos, é evidente que o período de armazenagem seja o menor possível, porém, poucos estudos informam a respeito do prazo máximo de conservação das plantas medicinais e aromáticas secas. Com isso, é importante que se conheça bem o comportamento de cada espécie durante o armazenamento (MARTINS et al., 1995). Após a colheita, as principais causas de perda de princípio ativo devem-se à degradação por processos metabólicos, hidrólise, degradação pela luz, perdas enzimáticas, oxidação, fermentação, calor e contaminação microbiológica (SILVA et al., 1999).

Segundo Costa et al. (2009), a comercialização de plantas medicinais, tanto para a extração de óleos essenciais, quanto para a venda *in natura*, na maioria das vezes, é feita na forma desidratada, o que torna indispensável o processo de secagem para a qualidade final do produto. Por meio da redução de água no material, a secagem impede a deterioração do mesmo, atuando negativamente na ação das enzimas (diminuindo as atividades enzimáticas) através da desidratação (MARTINS et al., 1995). Durante o armazenamento, deve-se controlar a umidade e a temperatura do ar do ambiente, evitando assim a ação de fungos, microrganismos e roedores, prevenindo a deterioração do produto final (TANKO et al., 2005).

3.5. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Os fluidos supercríticos têm sido usados como solventes para uma ampla variedade de aplicações, tais como: obtenção de extratos naturais, extração de íons metálicos, síntese de polímeros, nucleação de partículas e síntese de nanopartículas (ÖZEL et al., 2000; REVERCHON e DE MARCO 2006; HONG et al., 2013).

Quando a temperatura e a pressão são maiores que seus valores críticos (T_c e P_c , um componente puro é considerado um fluido supercrítico (BRUNNER, 1994). A pressão crítica é definida como a mais alta pressão na qual um líquido pode ser convertido em um gás em virtude do aumento de temperatura; já a pressão crítica, é a mais alta pressão que um líquido poderá ser convertido em gás com o aumento da temperatura; caracterizando assim o ponto crítico (PC), conforme a Figura 2, a seguir.

A região supercrítica encontra-se acima do ponto crítico, na qual o composto se apresenta como um fluido de uma única fase, não

condensável, exibindo algumas propriedades físico-químicas típicas de gases e outras típicas de líquidos.

Analisando o diagrama tridimensional de pressão-volume-temperatura (P-V-T), podem ser visualizados os diferentes estados físicos de uma substância pura (Figura 2). Quando a temperatura e a pressão estão acima do seu valor crítico, o sistema se encontra na região supercrítica. As propriedades do sistema são altamente sensíveis à pressão e à temperatura quando se encontram nesse ponto crítico. Em condições normais, o solvente supercrítico é aplicado a uma temperatura próxima do seu valor crítico, sob pressão suficientemente alta para tornar sua densidade maior do que a densidade crítica do fluido. Segundo Brunner (1994), o estado supercrítico é caracterizado pelo desaparecimento da interface de separação do estado líquido e gasoso. Isso acontece somente acima de certa pressão e temperatura.

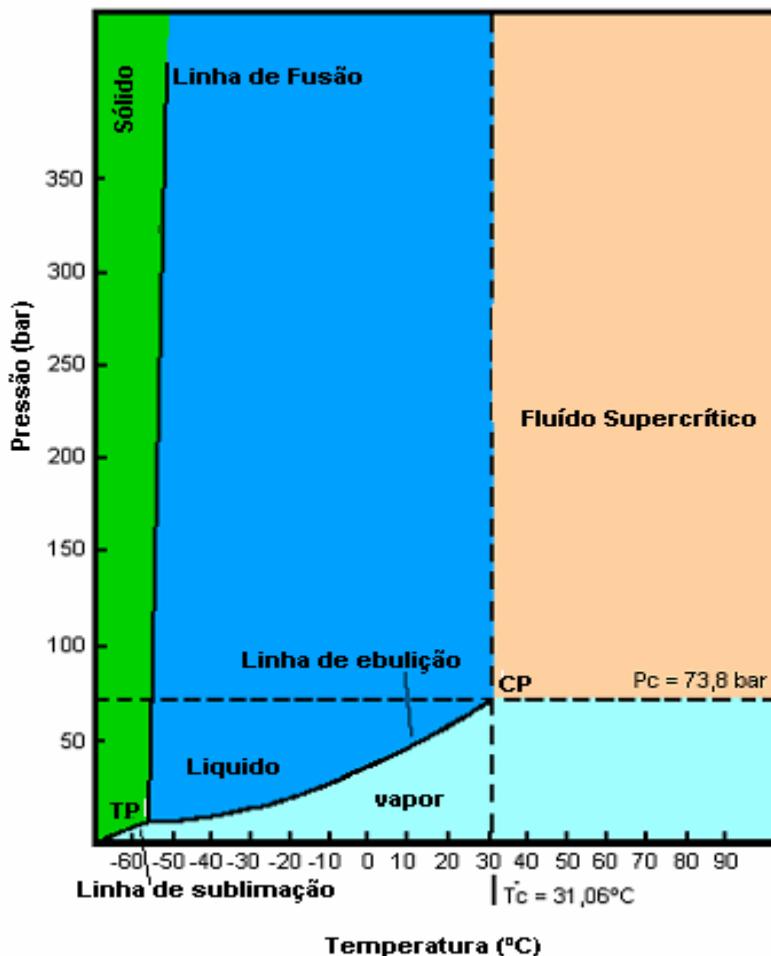


Figura 2: Diagrama de fase do dióxido de carbono. Temperatura - Pressão, SANDERS (1993).

A densidade de um fluido supercrítico determinará seu poder de solvatação, característica que pode ser alterada por pequenas variações na temperatura e pressão, assim, estes fluidos proporcionam uma capacidade única como solvente (BRUNNER, 1994). Assim como a densidade, propriedades de transporte, como difusividade e viscosidade, também são dependentes da temperatura e da pressão, onde as variações são mais

pronunciadas em regiões próximas ao ponto crítico. A viscosidade de um fluido supercrítico diminui com a temperatura até um valor mínimo, após o qual aumenta com a temperatura (ARAUCO, 2013).

De acordo com Cavalcanti (2012), nas temperaturas acima do mínimo, o fluido comporta-se como gás, isto é, a viscosidade aumenta com a temperatura. Estes valores baixos de viscosidade e valores intermediários de difusividade promovem um transporte de massa mais fácil, resultando na diminuição dos custos.

A solubilidade e seletividade do processo são conferidas pelos altos valores de densidade combinados com o poder de solvatação dependente da pressão. A ausência de tensão superficial permite a rápida penetração do solvente na matriz da amostra, aumentando a eficiência da extração. Todos esses fatores combinados têm promovido o grande interesse na aplicação da tecnologia de fluidos supercríticos nos processos de separação (SALGIN; DÖKER; ÇALIMLI, 2006).

O processo de extração supercrítica tem sido visto como uma alternativa às técnicas tradicionais de extração de compostos naturais, devido às vantagens que possui, visto ser um processo flexível, com a possibilidade de uma modulação contínua do poder de seletividade do solvente, além da vantagem da não utilização de solventes orgânicos, que além de elevar o custo, podem contaminar os extratos. Trabalhos recentes relatam maior atividade biológica dos extratos quando comparados aos obtidos pelas técnicas tradicionais de extração (POURMORTAZAVI; HAJMIRSADEGHI, 2008; HERZI et al., 2013; MOUAHID et al., 2013; SAJFRTOVA et al., 2013).

A extração supercrítica apresenta vantagem especial para a obtenção de extratos naturais, visto que não ocorre a degradação dos componentes termo sensíveis, o que conduz a um produto final com alta pureza. Aliado a isso, a competitividade da área de compostos com atividade terapêutica, que tem como fatores fundamentais a conquista de mercados, a qualidade, a disponibilidade e o preço, sinaliza para o emprego de técnicas modernas de extração, como a extração supercrítica, que se destaca por representar uma tecnologia que minimiza danos ao meio ambiente e que vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (DANIELSKI et al., 2007; MACHMUDAH et al., 2006)

Mais de 90% das extrações com fluidos supercríticos utilizam dióxido de carbono como solvente, principalmente na indústria farmacêutica e de alimentos. Esse fato ocorre devido ao CO₂ possuir valores críticos relativamente baixos, como a temperatura de 32°C e

pressão de 72 bar, além de ser inodoro, atóxico, não inflamável e por poder ser removido facilmente do produto final sem deixar resíduos, além de ser facilmente encontrado em estado puro e valor de custo relativamente baixo (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Segundo Arauco (2013), a facilidade de extração de compostos com CO₂ supercrítico depende da presença de grupos funcionais individuais nesses compostos, do seu peso molecular e de sua polaridade. Hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos com polaridade relativamente baixa, como, por exemplo, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e lactonas são extraídos com CO₂ supercrítico com pressões em torno de 75 e 100 bar, onde substâncias moderadamente polares, como derivados de benzeno com um grupo carboxílico e dois grupos hidroxilas, são moderadamente solúveis. Compostos altamente polares, com um grupo carboxílico e três ou mais grupos hidroxilas são pouco solúveis. Para a extração de certa classe de compostos, o uso de cossolvente junto ao CO₂ supercrítico é necessário para aumentar a polaridade e poder de solvatação do solvente. Etanol, acetato de etila e água são os cossolventes mais utilizados para obter produtos para a indústria de alimentos (MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

3.5.1. Processo de extração com fluido supercrítico

Basicamente duas etapas dividem a extração com fluido supercrítico de matrizes sólidas ou semissólidas: extração e separação. Na extração, o fluido supercrítico escoia através de um leito fixo de partículas sólidas dissolvendo os componentes extraíveis. O solvente é alimentado no extrator e uniformemente distribuído no interior do leito fixo. A mistura de solvente e componente extraídos deixa o extrator e passa para o separador (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000). No separador, a pressão da solução é reduzida, acarretando na vaporização do solvente, o qual poderá ser recirculado, e na precipitação do soluto, o qual será coletado e analisado (SOVOVÁ, 2005).

3.5.2. Curvas de extração

Os processos de extração com fluido supercrítico podem ser representados por uma curva típica de extração (BRUNNER, 1994). Essa curva expressa a taxa de extração (dw/dt), isto é, a massa de extrato acumulada ($w(t)$) em função do tempo (t) ou massa de solvente utilizada.

A taxa de extração não é uma função linear do tempo e, por esta razão, diversos comportamentos podem ser observados para as curvas globais de extração (CAVALCANTI; MEIRELES, 2012).

A Figura 3 representa a curva típica de extração com fluido em estado supercrítico, caracterizada por três etapas:

I. Na primeira etapa da curva, conhecida com período de taxa de extração constante (CER), o soluto está presente em grandes quantidades na superfície das partículas da matriz. A inclinação da curva é dada pela solubilidade do soluto no solvente.

Nesta fase predomina o processo de transferência de massa controlado por convecção, ou seja, o processo é controlado pelo fluxo do solvente.

II. Na segunda etapa da curva (FER), a camada de soluto facilmente acessível sobre a superfície das partículas está se esgotando. Nem todas as partículas estão revestidas pelo soluto e, portanto, a taxa de transferência de massa diminui rapidamente. Nesta etapa ocorre uma resistência à transferência de massa e os processos de difusão e convecção se tornam importantes para a extração.

III. Na fase final, chamada de difusão controlada (DC), é caracterizada pela ausência de soluto facilmente acessível à superfície da partícula; aqui, a taxa de extração é controlada principalmente pela difusão do solvente para o interior das partículas sólidas, seguido pela dispersão da mistura do soluto e do solvente na superfície das partículas.

A resposta da curva depende dos parâmetros do processo e todos os fenômenos acontecidos dentro do leito fixo (BRUNNER,1994).



Figura 3: Curva típica de extração com fluido em estado supercrítico. Fonte: Brunner, 1994.

3.5.3. Solubilidade e taxa de transferência de massa

A solubilidade é definida como a concentração, a fração de massa, ou a fração molar de uma determinada substância que pode ser dissolvida no fluido supercrítico. Além de temperatura e pressão, as propriedades do soluto, a massa molecular, polaridade, e da pressão do vapor, afetam a solubilidade. O conhecimento sobre o comportamento da solubilidade de solutos em um fluido supercrítico requer uma compreensão das interações intermoleculares do soluto-solvente e soluto-soluto (POURMORTAZAVI et al., 2008; CAVALCANTI e MEIRELES, 2012).

O desenvolvimento de processos de extração com fluido supercrítico depende marcadamente do poder solvente do fluido, da volatilidade do soluto e da variação destas propriedades com as condições de operação. Porém, as condições operacionais têm que ser escolhidas de modo a se obter a extração seletiva de compostos de interesse, reduzindo, a um mínimo, a coextração de compostos indesejáveis (REVERCHON, 1997).

O poder solvente dos fluidos supercríticos pode ser relacionado diretamente com a sua densidade, que aumenta à medida que a pressão se incrementa e a temperatura diminui (DEL VALLE et al., 1999).

Gaspar, et al. (1999) testaram a solubilidade de duas boragináceas e uma *Lunaria annua* em CO₂ supercrítico. Variaram pressão e temperatura de 60 a 300 bar e 10°C a 50°C. Observaram que a solubilidade aumenta com o incremento da pressão, como resultado direto de um aumento na densidade do solvente. A temperatura apresentou comportamento similar. Mas, a baixas pressões (60 a 100 bar) um aumento de temperatura resultou na diminuição da solubilidade.

Berna et al., (2000) testaram a solubilidade do limoneno e linalool puros a temperaturas de 45°C e 55°C com pressões de 69 a 111 bar. Mostraram que ao aumentar a pressão, aumenta a solubilidade, porém, ao aumentar a temperatura, nas mesmas condições, o aumento da solubilidade não foi significativo.

Estes estudos revelam que as condições de solubilidade dependem da interação do solvente com o soluto.

3.5.4. Efeito da matriz vegetal

Diferentes fatores, tais como o tamanho da partícula, forma, superfície, porosidade, umidade, nível de solutos extraíveis e a natureza da matriz vegetal afetam o resultado em uma extração com fluido supercrítico. A matriz pode exigir condições de extração específica (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A estrutura física da matriz é um ponto importante e a eficiência da extração está relacionada com a habilidade do fluido supercrítico em difundir-se dentro desta. Por essa razão, as condições de extração de um mesmo composto podem diferir de uma matriz a outra (SALGIN, 2007).

Como regra geral, tem-se que: diminuindo o tamanho da partícula da matriz, se dá uma maior área de contato, tornando assim mais eficiente a extração. No entanto, a moagem excessiva pode prejudicar o

processo devido à reabsorção dos compostos de interesse dentro da superfície da matriz, e pode acontecer uma queda de pressão dentro do extrator, devido à formação de caminhos preferenciais no interior do leito e parte do solvente flui pelos canais formados sem ter contato com o solvente. Geralmente, partículas com diâmetros médios aproximadamente entre 0,25 e 2,0 mm são utilizadas. A dimensão ótima deve ser escolhida caso a caso considerando o conteúdo de água na matriz vegetal e a quantidade de compostos líquidos extraíveis que podem produzir fenômenos de coalescência entre as partículas, favorecendo, assim, a extração irregular ao longo do extrator. Adicionalmente, a produção de partículas muito pequenas pela moagem poderia favorecer a perda de compostos voláteis (REVERCHON & DE MARCO, 2006; SALGIM, 2007; SALGIN, 2013).

3.5.5. Efeito de parâmetros operacionais da extração supercrítica

A seleção das condições de operação depende de compostos ou famílias de compostos específicos a serem extraídos. Peso molecular e polaridade devem ser levados em consideração, com algumas regras gerais a serem seguidas (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Por esse motivo, devem ser levados em conta os efeitos dos outros parâmetros observados no processo de extração com fluido supercrítico.

3.5.6. Efeito da densidade

Conforme descrito no item 3.5.1, um aumento na solubilidade implica em uma maior eficiência da extração. Como regra, tem-se que: um aumento da densidade do fluido supercrítico implica em um aumento na solubilidade do soluto (MUKHOPADHYAY, 2000).

A solubilidade do soluto no fluido supercrítico é função da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto, além da natureza química dos compostos. Nas vizinhanças do ponto crítico, grandes mudanças de densidade podem ser produzidas por pequenas mudanças na pressão e temperatura de operação. Esta propriedade é mais sensível a temperaturas próximas à do ponto crítico do que em pressões elevadas (BRUNNER, 1994).

Em uma isoterma, o aumento da pressão aumenta a densidade do solvente, diminuindo a distância intermolecular, aumentando assim a

interação entre as moléculas de soluto e solvente. Já em uma isóbara, o aumento da temperatura acarreta uma diminuição da densidade do solvente e um aumento da pressão de vapor do soluto. Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação ou condensação retrógrada, resultado da competição entre esses efeitos (densidade do solvente e pressão de vapor do soluto) e da predominância de um dos dois. Assim, abaixo da pressão de inversão das isotermas o efeito da densidade do solvente é dominante, logo a solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Acima da pressão de inversão, o efeito da pressão de vapor do soluto é dominante e a solubilidade aumenta com a temperatura (MICHIELIN et al., 2005; GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG & TEMELLI, 2005).

3.5.7. Efeito da Pressão

A pressão representa outro fator importante no processo de extração supercrítica, tanto quanto a temperatura, dado que pode ser utilizada para ajustar a seletividade do fluido supercrítico. Um aumento na pressão resulta em um aumento na densidade do fluido supercrítico. Tem-se como regra: quanto mais elevada é a pressão, maior é o poder do solvente e menor a seletividade da extração (BRUNNER, 1994).

A densidade no caso do CO₂ supercrítico pode variar aproximadamente entre 0,15 a 1,00 g/cm³, e está relacionada diretamente com a temperatura e a pressão (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

3.5.8. Efeito da Temperatura

A influência da temperatura sobre a solubilidade de uma substância em um solvente supercrítico é mais difícil de prever do que a da pressão.

O aumento da temperatura acarreta dois efeitos contrários em relação à solubilidade. Em um primeiro momento, o aumento da temperatura reduz a densidade do CO₂ supercrítico a uma pressão constante, reduzindo assim o poder solvente do fluido. Em um segundo momento o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos, aumentando a solubilidade.

Quando se tem padrões de pressão elevados, o efeito que predomina é o aumento da solubilidade, e em pressões pouco acima do

ponto crítico predomina a redução da solubilidade (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006; ARAUS et al., 2009).

3.5.9. Efeito dos modificadores (cossolventes)

O uso de cossolvente ou modificador foi proposto como um método para melhorar a solubilidade da extração, permitindo operações com pressões não tão elevadas. Estes atuam aumentando o rendimento e alterando a solubilidade do processo, por meio de mudanças das características de polaridade do solvente, promovendo interações específicas com o soluto, como são, por exemplo, as pontes de hidrogênio. Este tipo de interação resulta em um aumento da seletividade do processo (TEBERIKLER et al., 2001; DAUKSAS et al., 2002; TONTHUBTHIMTHONG et al., 2004).

3.6. FERMENTAÇÃO

A transformação de compostos orgânicos por culturas microbianas tem sido de grande interesse para as indústrias farmacêutica, química e de alimentos, devido às inúmeras vantagens em comparação com a síntese química. O produto resultante pode ter uso farmacológico ou outra atividade bioquímica, pode ser menos tóxico que o material inicial, ou pode ter valor para futuras sínteses químicas para o desenvolvimento de novos compostos (PARSHIKOV; SUTHERLAND, 2014).

Muitos microrganismos, incluindo fungos e bactérias, são potenciais degradadores da celulose (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009), com isso, esses microrganismos podem produzir enzimas capazes de degradar os componentes da parede celular, e, conseqüentemente, aumentar o rendimento da extração de óleo essencial.

A celulose é um polímero formado por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) entre moléculas de β -D-glicose (AGUIAR; LUCENA, 2011). Durante o crescimento de alguns microrganismos em material celulósico, é produzida a celulase, enzima que hidrolisa a ligação glicosídica β (1 \rightarrow 4) (LEE; KOO, 2001). A lignocelulose é um conjunto de macromoléculas orgânicas complexas que compõe a maior parte dos componentes estruturais das plantas, constituindo basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, sendo este o componente mais recalcitrante da lignocelulose (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009).

A espécie *Aspergillus niger* é capaz de produzir as enzimas celulase, hemicelulase, pectinase, entre outras, sendo essa, uma das espécies com maior capacidade de produção de celulasas (RAHARJO; RETNOWATI, 2012) além de causar a biodeteriorização de lubrificantes derivados de óleo (PARSHIKOV; SUTHERLAND, 2014). O rendimento e a disponibilidade da enzima podem ser melhorados com o estabelecimento dos métodos de cultivo do fungo e da otimização das condições de fermentação (HAQ et al., 2005).

A produção de celulase por *Aspergillus niger* apresenta melhor rendimento em temperatura de 20°C, pH 6,0, salinidade 50 ppt e a partir de 48 horas de incubação (SAKTHI; SARANRAJ; RAJASEKAR, 2011).

Devido às características da celulose, antes do material ser posto para fermentar, devem ser feitos pré-tratamentos alcalinos, os quais aumentarão sua digestibilidade e serão eficazes na solubilização de lignina, expondo assim a celulose. O tratamento com NaOH provoca inchaço, aumentando a superfície interna da celulose e causando diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca a desestruturação da lignina. Assim, pode-se afirmar que a fibra lignocelulósica, após tratamento alcalino, torna-se mais favorável à colonização fúngica e melhora a hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010).

3.7. ASPERGILLUS NIGER

Em 1867, van Tieghem descreveu a espécie *Aspergillus niger* como sendo um fungo aeróbico capaz de crescer numa grande variedade de substratos (PARSHIKOV; SUTHERLAND, 2014).

O fungo pertence ao filo Ascomycota, sendo capaz de causar doenças em humanos, animais e vegetais; nesses últimos, causa a doença chamada de mofo-preto ou bolor-negro. A espécie é capaz de produzir as enzimas hemicelulase, pectinase, entre outras, apresentando-se como potencial para celulasas, sendo a produção enzimática mais elevada, se comparada com outras espécies fúngicas (RAHARJO; RETNOWATI, 2012). O rendimento e a disponibilidade da enzima podem ser melhorados com o estabelecimento dos métodos de cultivo do fungo e da otimização das condições de fermentação (TAKAO; KAMAGATA; SASATRI, 1985).

A otimização da taxa de fermentação da fonte de carbono como substrato e do pH do meio constitui papel fundamental para a produção

de celulases por *Aspergillus niger* (HAQ et al., 2005). Raharjo e Retnowatt (2012) observaram melhor rendimento na extração de óleo essencial de patchouli com a retirada da cera protetora da folha e concentração de 3% de *Aspergillus niger* incubado por oito dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os insumos, equipamentos e procedimentos utilizados na obtenção, fracionamento e na caracterização dos extratos de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth), assim como a metodologia utilizada para a determinação do rendimento de extrato retirado das folhas de patchouli.

4.1. COLETA DA MATRIZ VEGETAL

As plantas de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) foram coletadas na empresa Technessentia Compostos Naturais Ltda, em Santo Amaro da Imperatriz/SC.

Após a colheita, foram separados 300 gramas de folhas e levadas para o Departamento de Microbiologia, Imonologia e Parasitologia (MIP) da UFSC; o restante das plantas foi deixado no Laboratório de Controle de Processos (LCP), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram colocadas para secar em estufa com renovação de ar, a temperatura de 37°C, durante 96 horas (Figura 4).

Imediatamente à secagem, foi feita a desfolha das plantas. As folhas secas pesaram 800 gramas, as quais foram armazenadas em freezer (Electrolux, modelo FE26) a -20°C.



Figura 4: Folhas de patchouli (*Pogostemon cablin*) em processo de secagem em estufa.

4.2. CEPAS DE ASPERGILLUS NIGER

Para a realização do trabalho, foram utilizadas duas cepas distintas de *Aspergillus niger*. A primeira cepa foi isolada da amostra de 300 gramas de folha de patchouli deixada no laboratório do MIP/UFSC,

retirada durante a coleta das plantas em Santo Amaro da Imperatriz (Tratamento 1). A outra cepa foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), de Rio de Janeiro/RJ, que doou três ampolas contendo a cepa de *Aspergillus niger* ATCC 6205 (Tratamento 2).

O material utilizado durante as etapas de isolamento e ativação das cepas liofilizadas de *Aspergillus niger* foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e com pressão de 1 atm para que não ocorresse problemas com contaminação (foi utilizada a autoclave da Primatex, modelo CS18).

4.2.1. *Aspergillus niger* (Tratamento 1)

As cepas de *Aspergillus niger* utilizadas no Tratamento 1 foram retiradas das plantas de patchouli coletadas na empresa Technessentia Compostos Naturais Ltda em Santo Amaro da Imperatriz. Foram retiradas amostras fúngicas de 300 gramas de folha de patchouli, de onde foram isoladas as cepas em questão.

Os processos de isolamento, identificação e replicação do fungo foram feitos no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com auxílio de técnicos especializados na área. A Figura 6, a seguir, demonstra o diagrama de fluxo das atividades realizadas durante o experimento para a extração e inoculação da cepa de *Aspergillus niger* 01 (Tratamento 1).

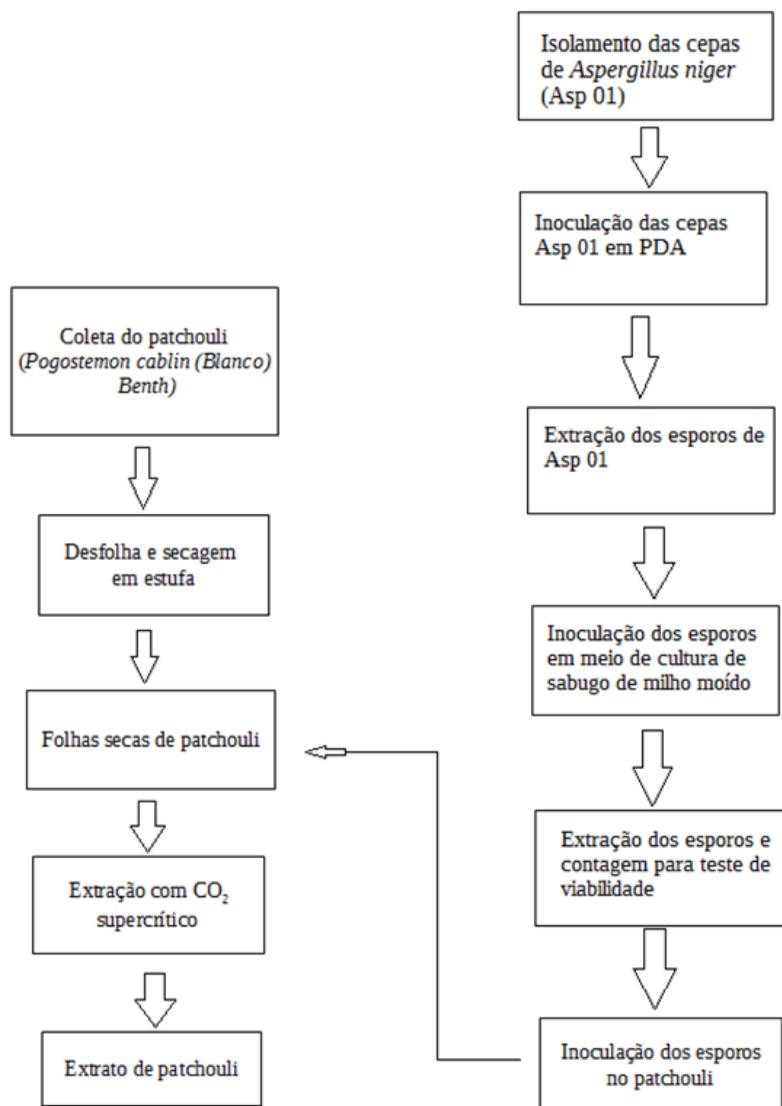


Figura 5: Diagrama de fluxo das atividades realizadas para extração e inoculação da cepa de *Aspergillus niger* 01 (Tratamento 1).

4.2.2. *Aspergillus niger* ATCC 6205 (Tratamento 2)

As cepas de *Aspergillus niger* ATCC 6205 foram ativadas em concentração salina, onde os esporos foram deixados por 40 minutos para quebra de dormência. Logo após, foram inoculados 100 µl da solução de esporos em cinco *Erlenmeyer*, contendo 20 mL de meio de cultura Potato Dextrose Agar - PDA, para cultivo e crescimento do fungo.

A Figura 5, a seguir, demonstra o diagrama de fluxo das atividades realizadas para extração e inoculação da cepa de *Aspergillus niger* 02 (Tratamento 2).

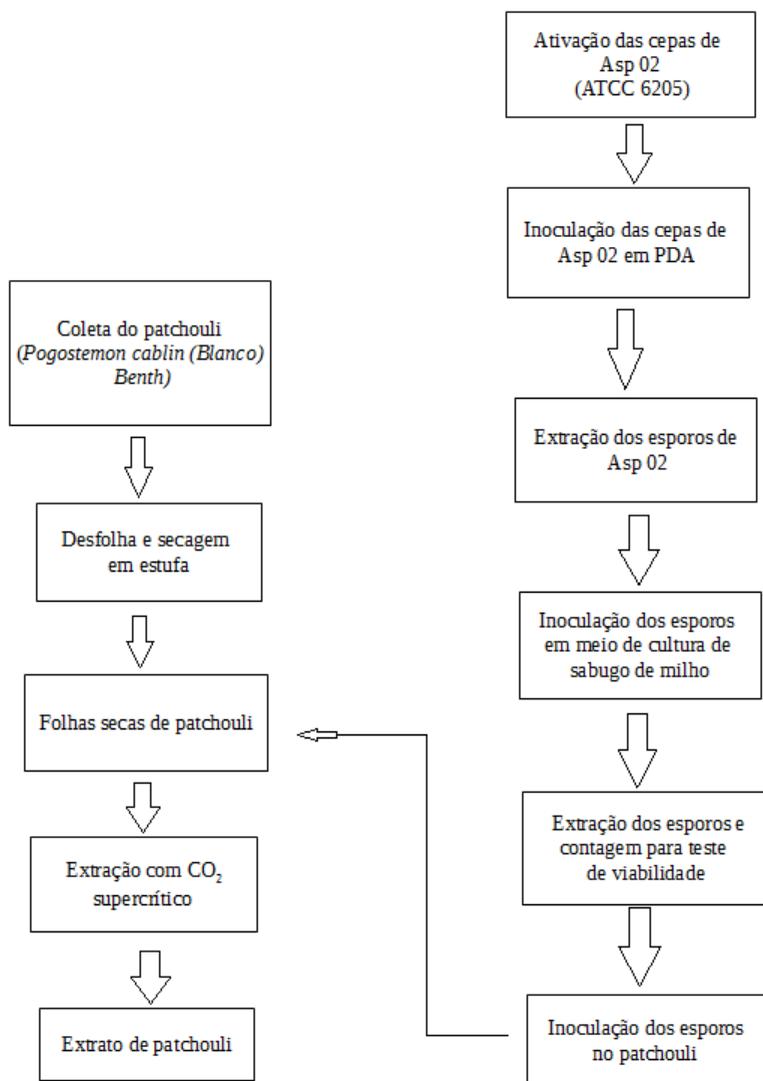


Figura 6: Diagrama de fluxo das atividades realizadas para extração e inoculação da cepa de *Aspergillus niger* 02 (Tratamento 2).

4.3. MEIO DE CULTURA POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)

O crescimento dos fungos foi feito em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), preparado com um frasco de 500 gramas de PDA Himedia M096.

Para o preparo do PDA, foram utilizados 10 *Erlenmeyer* de 250 mL; um Becker de 1 L; uma pipeta de 10 mL, e um *Erlenmeyer* de 1 L. Em um litro de água destilada, aquecida em micro-ondas por um minuto – em alta potência, foram adicionados 39 gramas de PDA.

Após o preparo do meio de cultura, esse foi esterilizado por 15 minutos em autoclave (Primatec, modelo CS18) a 121°C, com 1 atm de pressão. 500 mL do PDA foram distribuídos em um *Erlenmeyer* de 1 L, 300 mL foram colocados em 30 tubos Falcon de 10 mL, e 200 mL do meio foram divididos em 10 *Erlenmeyer* de 250 mL, 20 mL de meio de cultura para cada *Erlenmeyer*.

A inoculação das cepas de *Aspergillus niger* nas folhas secas de patchouli foi feita dentro de uma câmara de fluxo esterilizada com álcool 70% e 15 minutos em radiação UV.

4.4. MEIO DE CULTURA COM SABUGO MOÍDO

Para o preparo do meio de cultura, os sabugos de milho foram coletados em Anita Garibaldi/SC, onde foram moídos em forrageira; o material resultante foi separado com peneira de malha de 3,36 mm.

Após a classificação, 210 gramas do sabugo moído foram secados em estufa a 90°C por quatro horas. Por fim, o material foi dividido em 20 *Erlenmeyer*, de capacidade de 250 mL (10,5 gramas de sabugo por frasco). Em cada *Erlenmeyer* foram adicionados 13,65 mL de peptona 5,6% (Figura 7).

Para o preparo da peptona, foram aquecidos em micro-ondas 300 mL de água destilada e misturados 16,8 gramas de peptona.

Os 20 *Erlenmeyers* foram autoclavados por 30 minutos, a 121°C e pressão de 1 atm e então colocados em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 37°C.



Figura 7: Meio de cultura com sabugo moído autoclavado para esterilização do material.

4.5. EXTRAÇÃO DOS ESPOROS

O procedimento de extração dos esporos foi feito em câmara de fluxo. Os frascos *Erlenmeyer* contendo os cultivos crescidos de *Aspergillus niger* foram esterilizados com álcool 70% e colocados sob luz UV por 15 minutos.

Após a esterilização, foram colocados 20 mL de solução *tween* em cada *Erlenmeyer* e feita agitação para extração dos esporos. O processo foi repetido duas vezes (60 mL por frasco de cultivo). Foram retirados 40 mL da solução e transferidos para oito tubos Falcon, os quais foram vedados com tampa e filme de PVC, e postos para centrifugar em velocidade máxima (3000 rpm) por 30 minutos.

O material foi retornado à câmara de fluxo esterilizada e o sobrenadante de cada tubo Falcon foi vertido em béquer de descarte. Os

esporos no fundo de cada tubo foram agitados em *vórtex* com solução salina.

Todos os processos descritos foram repetidos por quatro vezes, até que se obteve os esporos concentrados na menor quantidade possível de tubos para que fosse feita a contagem em câmara de Neubauer e o teste de viabilidade dos esporos.

4.6. CONTAGEM E TESTE DE VIABILIDADE DOS ESPOROS

A contagem dos esporos para teste de viabilidade foi feita através de câmara de Neubauer. A solução contendo esporos de *Aspergillus niger* foi posta em lamínulas especiais com profundidade ideal para a câmara de contagem.

A suspensão foi homogeneizada e 0,1 mL foi transferido para um tubo de ensaio. Foram então adicionados 0,3 mL de corante azul de tripano 0,2% ao tubo, obtendo assim a diluição de $\frac{1}{4}$. Após feita a mistura dos conteúdos, 0,5 mL foi transferido para a lamínula, onde se esperou 2 minutos para sedimentação.

Como a suspensão inicial foi diluída a $\frac{1}{4}$, o número de células contadas foi igual à média multiplicada pelo fator de diluição, no caso, quatro.

Para a obtenção do número de células/mL, foi modificado e corrigido o valor obtido por 10.000. Na câmara de Neubauer obtém-se o número celular por $0,1 \text{ mm}^3$, então se multiplica por 10.

Assim obteve-se:

$$n^\circ \text{ de células/ml} = \frac{n^\circ \text{ total de células}}{\text{quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10.000}$$

4.7. DESINFECÇÃO DAS FOLHAS E INOCULAÇÃO DOS ESPOROS

Antes de ser realizada a inoculação dos esporos, foi feita a lavagem de 540 gramas de folhas de patchouli com hipoclorito 0,4%. As folhas foram postas para secagem em estufa a 50°C por 6 horas.

Após secagem das folhas, foram inoculados 5 mL de solução salina contendo esporos nas seguintes concentrações: *Aspergillus niger*

(tratamento 1) $4,5 \times 10^6$ esporos/mL; *Aspergillus niger* (tratamento 2) $7,2 \times 10^6$ esporos/mL, em virtude da viabilidade dos esporos.

4.8. EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) EM ESTADO SUPERCRÍTICO

Para a obtenção do extrato de patchouli, foi utilizado o equipamento HPLC-SC da Jasco Inc., localizado no LCP, conforme a Figura 8. A extração foi realizada com dióxido de carbono em estado supercrítico. As condições de extração utilizadas foram: temperatura de 32°C, pressão de 100 bar e tempo de 60 minutos.



Figura 8: Extrator supercrítico modelo HPLC-SC, Jasco Inc. utilizado para a obtenção do extrato de patchouli.

De acordo com a Figura 9, o HPLC-SC é composto por três bombas: bomba de CO₂ (B1), bomba de cossolvente (B2) e bomba de
Figura 9: Extrator supercrítico modelo HPLC-SC, Jasco Inc. utilizado para a obtenção do extrato de patchouli.

eluente (B3); forno de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-Vis em linha, válvula *back pressure* automatizada (BP), e sistema de aquecimento (H) controlado para amenizar o efeito de resfriamento provocado pela expansão do CO₂ (Efeito Joule-Thompson).

Foi utilizado o vaso de extração (E) com volume interno de 0,010 L ($1,0 \times 10^{-6} \text{ m}^3$), para evitar a contaminação com partículas sólidas na linha, com filtro de 10 μm na saída do extrator. O equipamento possui uma interface de comunicação LC-net II (Jasco Inc.) com o computador onde, através do uso do software ChromNAV, podem ser controladas as variáveis operacionais (temperatura, vazão de solvente, cossolvente e eluente, além da pressão mediante a *back pressure* automatizada).

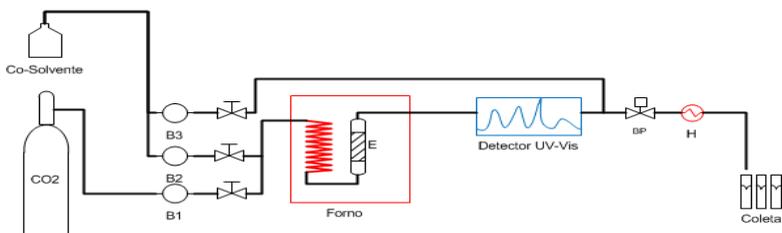


Figura 10: Unidade de extração (HPLC-SC). B- bomba HPLC, E- extrator, BP- válvula back pressure, H –aquecimento.

4.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após ser realizada a extração supercrítica, foram separados alguns exemplares de folha de patchouli (Tratamentos 1 e 2 com quatro, 12 e 20 dias de inoculação, e Testemunha) para ser feita a microscopia eletrônica para identificação das estruturas celulares.

As micrografias foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV, modelo JEOLJSM-6390LV, com auxílio dos técnicos especializados na área do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, na Universidade Federal de Santa Catarina.

As folhas foram cortadas e dispostas em estruturas de metal de 1 cm de diâmetro, conforme demonstra a Figura 10, a seguir.

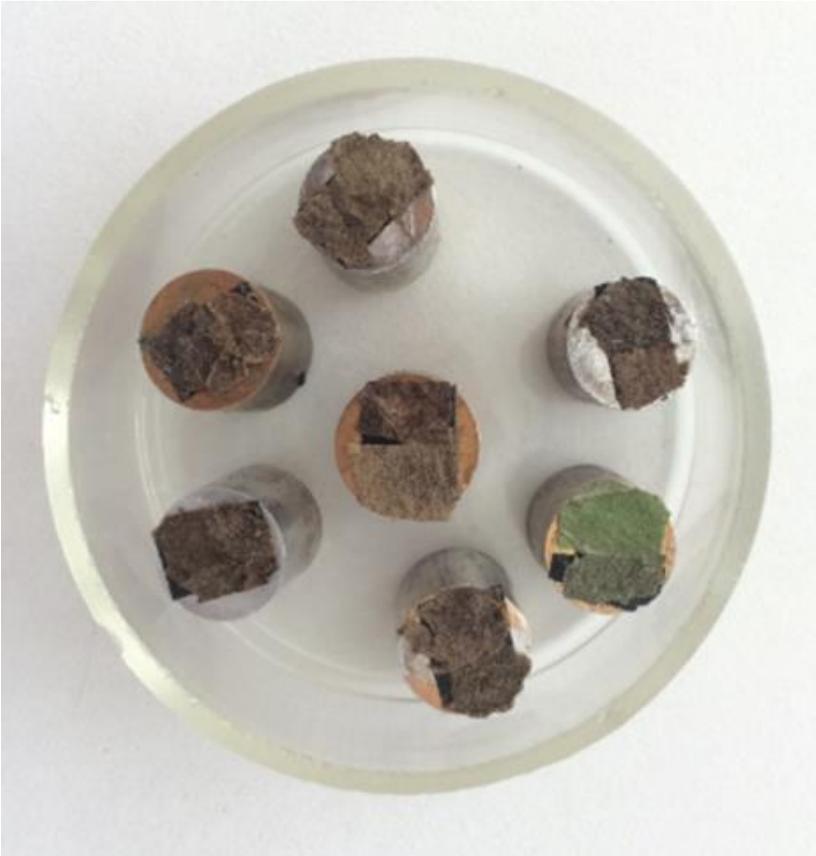


Figura 11: Preparo das folhas para realização da microscopia eletrônica de varredura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir dos experimentos descritos no capítulo Material e Métodos.

5.1. RENDIMENTO DE EXTRATO DE PATCHOULI

Após as inoculações, foram obtidos os extratos das amostras de patchouli. As duas cepas do fungo - *Aspergillus niger* nativo (Tratamento 1) e *Aspergillus niger* ATCC 6205 (Tratamento 2) - foram inoculadas nas folhas de patchouli e deixadas para fermentação por quatro, seis, oito, 12 e 20 dias. Depois desses períodos, foram realizadas as extrações. Para cada dia de fermentação foram feitas três extrações, resultando em três amostras de extrato para cada tratamento e três amostras de extrato das folhas sem tratamento (Testemunha).

5.1.1. *Aspergillus niger* - Tratamento 1

No Gráfico 1 pode-se observar que o Tratamento 1 (*Aspergillus niger* isolado das folhas de patchouli) apresentou melhores resultados quanto ao rendimento de extrato - 8,05%, enquanto a testemunha (sem tratamento) apresentou rendimento médio de 5,63% de extrato. O que representa um ganho de rendimento de, aproximadamente, 270% se comparado às técnicas convencionais de extração de óleo essencial de patchouli, que atingem em torno de 1,5 a 3% de rendimento em massa de óleo extraído, de acordo com Heath, 1981.

O rendimento do extrato após quatro dias de inoculação foi de 8,05%, apresentando queda de rendimento nos outros tempos de inoculação, seis dias (6,25%); oito dias (6,69%); doze dias (5,21%); e vinte dias (5,85%) - Gráfico 1 - provavelmente devido ao consumo do óleo pelo fungo.

Araujo (2008), através de ensaios de tempo de extração, obteve rendimento de extrato de 4,31% com 60 minutos de extração com CO₂ supercrítico, o que representa 53,59% a menos de óleo que o melhor rendimento obtido após quatro dias de inoculação das folhas com o Tratamento 1.

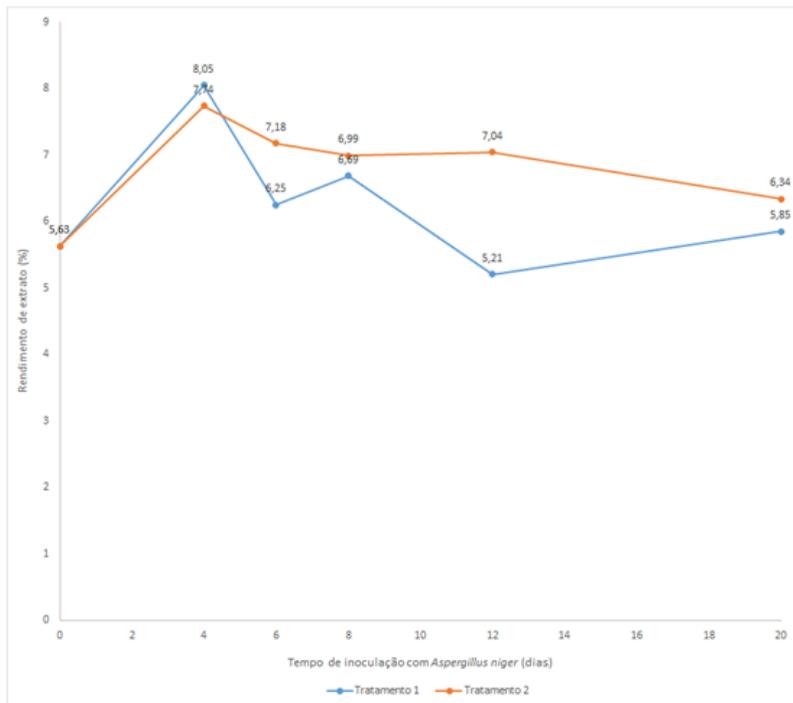


Figura 12: Comparação de rendimento médio de extrato dos Tratamentos 1 e 2.

Usando a análise de variância (ANOVA) pode-se constatar que há diferença significativa no rendimento do extrato do patchouli após análise dos cinco diferentes tempos de inoculação com a cepa de *Aspergillus niger* 1, (valor de $p = 0,0001188$), conforme demonstra o diagrama de caixa a seguir, Gráfico 2.

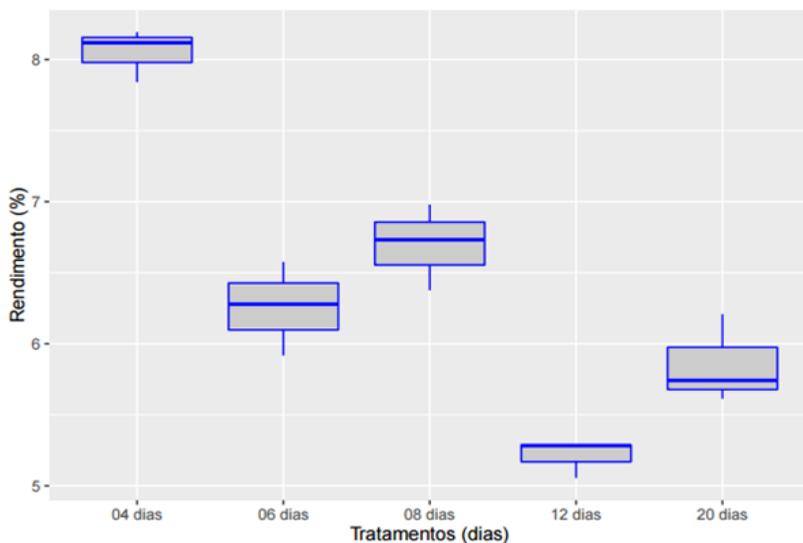


Figura 12: Distribuição dos rendimentos para diferentes dias de tratamento para a cepa de *Aspergillus niger* - Tratamento 1.

Após ser feita a aplicação da análise de variância, foi realizado o teste de Tukey, com nível de confiança de 95%, para comparação múltipla das médias, confirmando assim, que após quatro dias de inoculação, a média de extrato foi significativamente superior à média de extrato após seis, oito, doze e vinte dias de inoculação. De acordo com os valores de p apresentados na Tabela 1, pode-se observar que o tratamento com quatro dias de fermentação apresentou média de extrato significativamente diferente às médias dos outros tratamentos.

Teste de comparação de médias Tukey

Fermentação	Valor de p
06 dias - 04 dias	0,0000658
08 dias - 04 dias	0,0006923
12 dias - 04 dias	0,0000010
20 dias - 04 dias	0,0000107
08 dias - 06 dias	0,3197386
12 dias - 06 dias	0,0048044
20 dias - 06 dias	0,3944498
12 dias - 08 dias	0,0003271
20 dias - 08 dias	0,0198128
20 dias - 12 dias	0,0814252

Tabela 1: Teste de Tukey, com 95% de confiança, para multicomparação das médias indicando quais tratamentos diferem entre si para a cepa de *Aspergillus niger* - Tratamento 1.

5.1.2. *Aspergillus niger* ATCC 6205 - Tratamento 2

De acordo com o Gráfico 1, pode-se observar que o Tratamento 2 (*Aspergillus niger* ATCC 6205) apresentou resultados superiores quanto ao rendimento de extrato (7,71%), quando comparado à testemunha - sem tratamento, (5,63% de extrato). Com o mesmo, obteve-se, aproximadamente, 260% a mais de rendimento que o valor máximo extraído por Heath em 1981 (3% de rendimento em massa) com as técnicas convencionais de arraste a vapor.

O rendimento do extrato após quatro dias de inoculação foi de 7,71%, apresentando queda de rendimento nos outros tempos de inoculação, seis dias (7,18%); oito dias (6,99%); doze dias (7,04%); e vinte dias (6,34%), conforme Tabela 2.

Rendimento %			
Tempo (dias)	Tratamento 1	Tratamento 2	Testemunha (sem tratamento)
4	8,05	7,74	
6	6,25	7,18	
8	6,69	6,99	5,63
12	5,21	7,04	
20	5,85	6,34	

Tabela 2: Rendimento médio de extrato obtido.

Usando a análise de variância (ANOVA) pode-se constatar que há diferença significativa no rendimento de extrato de patchouli após análise dos cinco diferentes tempos de inoculação com a cepa de *Aspergillus niger* – Tratamento 2, (valor de $p = 0,0228$).

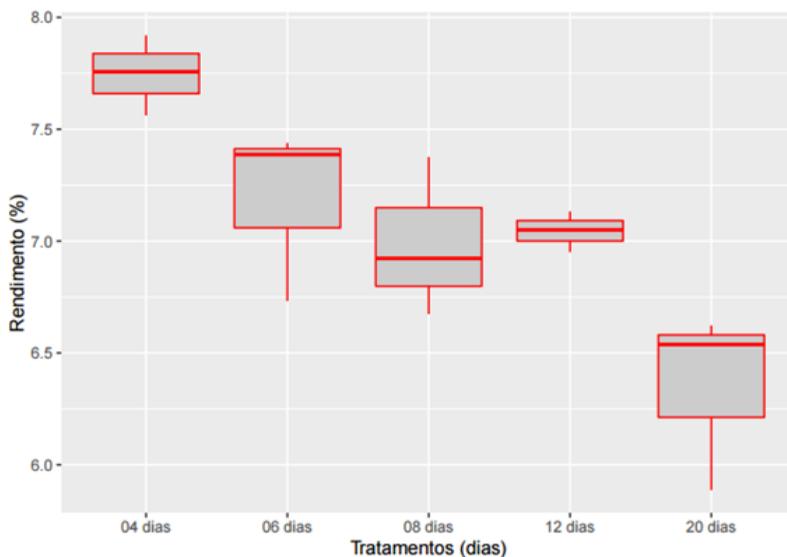


Figura 13: Distribuição dos rendimentos para diferentes dias de tratamento para a cepa *Aspergillus niger* - Tratamento 2.

Após ser feita a aplicação da análise de variância, foi realizado o teste de Tukey, com nível de confiança de 95%, para comparação múltipla das médias, confirmando que após quatro dias de inoculação, a média de óleo essencial extraído foi significativamente superior à média de óleo extraído após seis, oito, doze e vinte dias de inoculação. A Tabela 3 compara as médias dos tempos de extração para o Tratamento 2.

Teste de comparação de médias Tukey

Fermentação	Valor de p
06 dias - 04 dias	0,2528568
08 dias - 04 dias	0,0818901
12 dias - 04 dias	0,1129648
20 dias - 04 dias	0,0018960
08 dias - 06 dias	0,9344340
12 dias - 06 dias	0,9786242
20 dias - 06 dias	0,0499377
12 dias - 08 dias	0,9994750
20 dias - 08 dias	0,1605366
20 dias - 12 dias	0,1172900

Tabela 3: Teste de Tukey, com 95% de confiança, para multicomparação das médias indicando quais tratamentos diferem entre si para a cepa de *Aspergillus niger* 2.

5.2. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL POR GC-MS

As análises dos extratos obtidos foram realizadas pelo Laboratório de Cromatografia da Universidade de Blumenau FURB em agosto de 2016. Foram analisados os extratos que apresentaram melhores resultados de rendimento (ASP 01 com quatro dias (Tratamento 1) e ASP 02 com quatro dias (Tratamento 2); assim como a Testemunha – sem tratamento). Os resultados foram obtidos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

Com a análise da Tabela 4, pode-se observar que apesar do rendimento de extrato obtido pelo Tratamento 1, após quatro dias de fermentação, ter sido mais elevado, o mesmo apresentou menores

quantidades de patchoulol, 38,16% - se comparado à amostra do Tratamento 2 após quatro dias de inoculação (41,07%) e da testemunha (58,91%).

A qualidade do extrato quanto ao teor de patchoulol, conforme demonstra a Tabela 4, obtido nos três tratamentos encontra-se dentro dos valores de padrão exigidos pelo mercado, que é em torno de 35% (HOLMES, 1997). Araujo (2008), após ensaios de extração de extrato de patchouli em diferentes tempos, obteve 28,40% de patchoulol com 50 minutos de extração supercrítica (tempo aproximado ao realizado no presente experimento, que foi de 60 minutos), valor inferior a menor quantidade obtida nos três tratamentos (38,16% - Tratamento 1 com quatro dias de inoculação). Da mesma forma, Donelian (2010) obteve o rendimento de 28,32% de patchoulol em extrato obtido com extração supercrítica.

Por outro lado, conforme demonstra a Tabela 4, a faixa detectada de todos os outros compostos foi superior nos dois tratamentos que utilizaram inoculação com o fungo *Aspergillus niger*, se comparado à Testemunha, inclusive a porcentagem do composto α -bulneseno, o qual possui grande interesse na área médica (ARAUJO, 2008).

% de composto sugerido (CG-MS)	Testemunha	Tratamento 1 (4 dias de fermentação)	Tratamento 2 (4 dias de fermentação)
β -patchouleno	0,37	1,02	0,88
β -Cariofileno	1,13	1,63	2,11
α -Guaieno	8,86	13,7	13,93
α -patchouleno	3,31	5,43	5,11
Allo-Aromadendreno	1,05	1,64	1,72
γ -Gurjuneno	0,09	0,29	0,25
β -Salineno	Não identificado	0,14	0,11
Valenceno	1,85	3,15	3,19
α -Bulneseno	11,33	17,48	18,98
Óxido de cariofileno	0,65	0,65	Não identificado
Patchoulol	58,91	38,16	41,07

Tabela 4: Compostos encontrados nas amostras de extrato de patchouli analisadas.

5.3. ANÁLISE DAS FOLHAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Conforme demonstram as Figuras 11 e 12, a seguir, supõe-se que a amostra da folha analisada sem tratamento (Testemunha) apresenta maiores quantidades de tricomas glandulares que as folhas submetidas aos processos de fermentação. Esse resultado, provavelmente, deve-se ao fato de que a espécie *Aspergillus niger* é altamente produtora de enzimas celulasas, fazendo com que haja maior degradação de tecidos do vegetal durante o processo de fermentação.

As Figuras 13 e 14 representam folhas com colonização de *Aspergillus niger* (Tratamento 1) após quatro dias de inoculação. Nas imagens é possível notar a presença de esporos do fungo e a degradação dos tricomas glandulares, possivelmente pela ação de celulasas produzidas pelo fungo, corroborando com a tese de Raharjo (2012) na qual o *Aspergillus niger* é uma das espécies com maior capacidade de produção de celulase, hemicelulase, pectinase, entre outras enzimas.

Após 12 dias de inoculação do fungo *Aspergillus niger* – tanto no Tratamento 1 quanto no Tratamento 2 – é possível notar a alta atividade fúngica através da micrografia das folhas analisadas (Figuras 15, 16, 21 e 22).

As Figuras 19 e 20 demonstram folhas de patchouli depois de quatro dias de inoculação com *Aspergillus niger* ATCC 6205 – Tratamento 2. Com o aumento de 400 vezes (Figura 20), pode-se notar a degradação dos tecidos da planta e a alta atividade fúngica, com grande presença de filamentos e esporos do fungo.

Após 20 dias de inoculação do fungo *Aspergillus niger* – Tratamento 1, é possível notar a alta capacidade de esporulação e de crescimento micelial da espécie (Figuras 17 e 18). A alta concentração de esporos na base do tricoma, quando analisadas imagens após 20 dias de inoculação das cepas do Tratamento 2, Figuras 23 e 24, sugere a degradação dessas glândulas pelo fungo, supondo uma degradação e consumo do óleo, o que explica a diminuição de rendimento de extrato após esse período.

As hipóteses sugeridas anteriormente corroboram os resultados experimentais, onde ficou evidenciado que, após o processo de fermentação das folhas de patchouli com o fungo *Aspergillus niger*, obteve-se um rendimento maior em massa de extrato de patchouli. É evidente que a comprovação definitiva da ação do *Aspergillus niger* nas

estruturas celulósicas dos tricomas glandulares capitados, dos tricomas glandulares peltados e das glândulas de óleo no mesofilo, onde o óleo essencial fica armazenado nas folhas do patchouli, com a consequente liberação do óleo, deve ser objeto de estudos mais aprofundados, seguindo metodologias específicas para a pesquisa em fisiologia vegetal e assuntos correlatos.

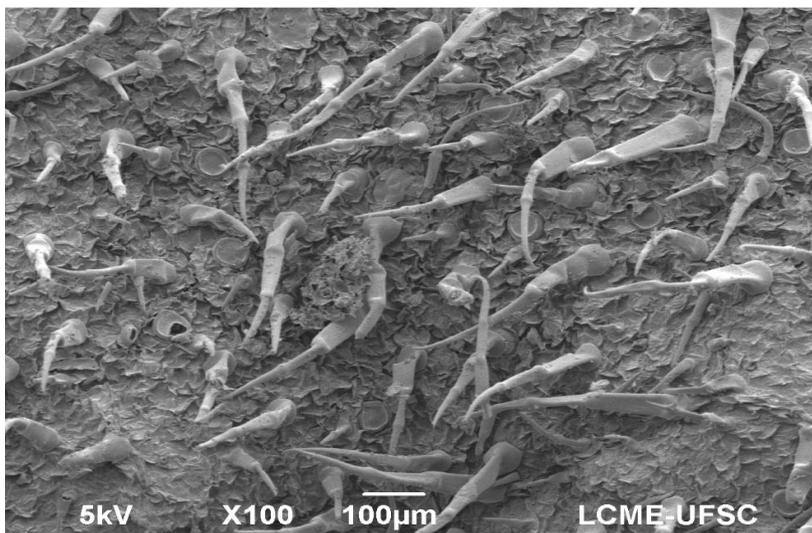


Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli sem tratamento - Testemunha (aumento de 100x).

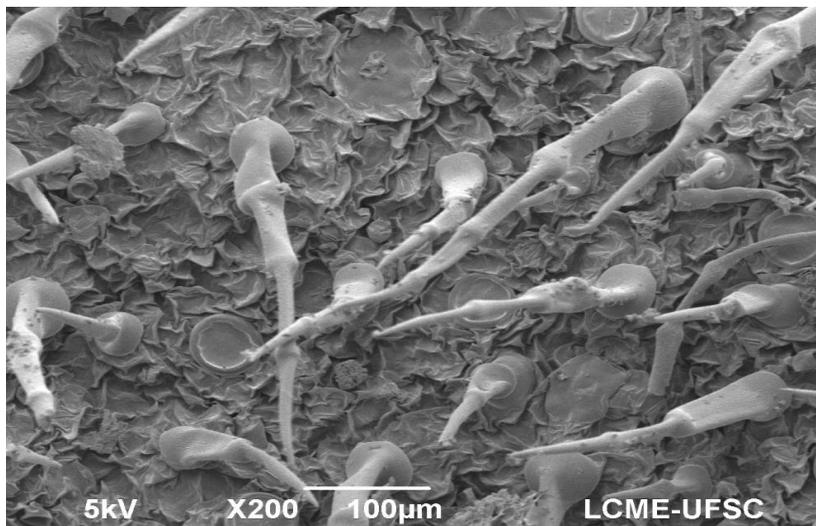


Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli sem tratamento - Testemunha (aumento de 200x).

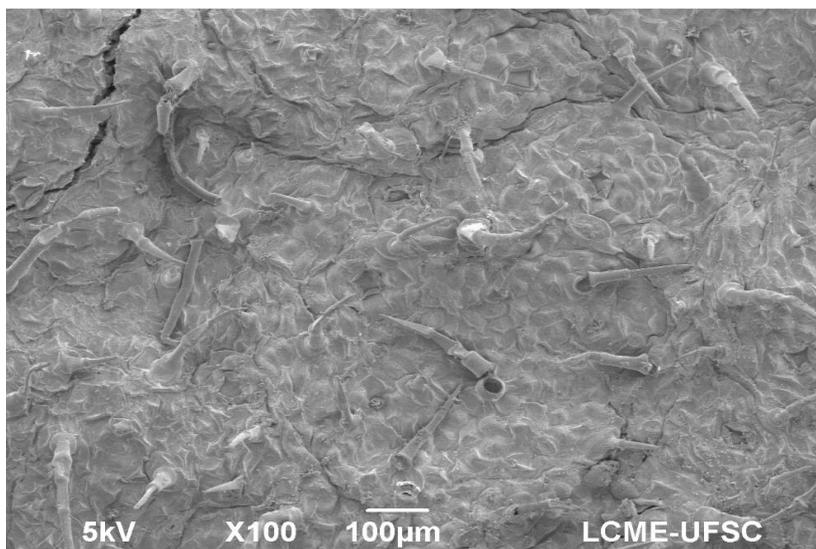


Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 04 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 100x).

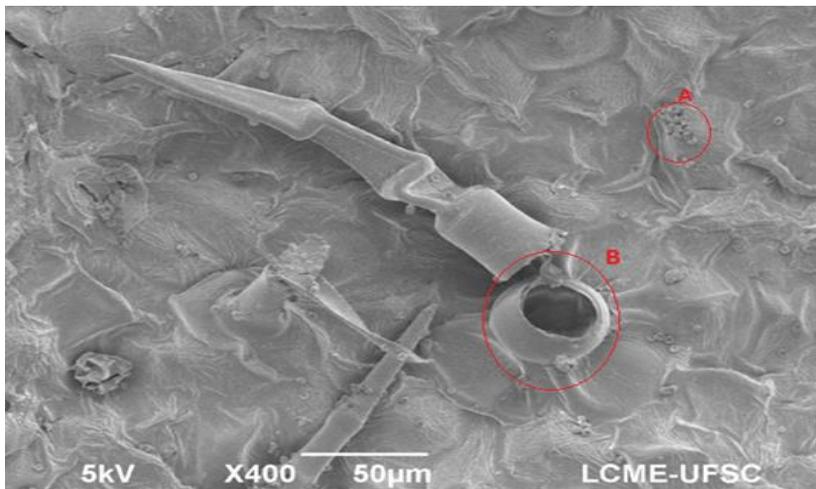


Figura 16: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 04 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 400x). A – esporos do fungo. B – tricoma degradado.

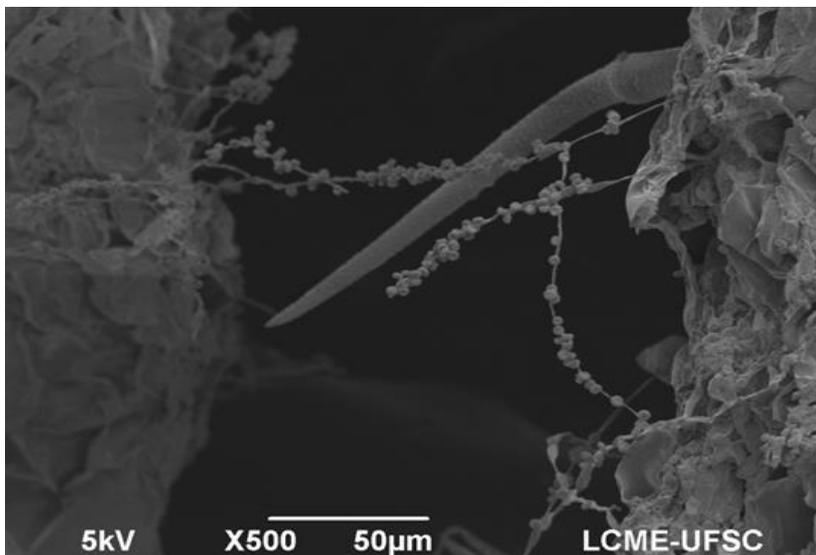


Figura 17: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 12 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 500x).

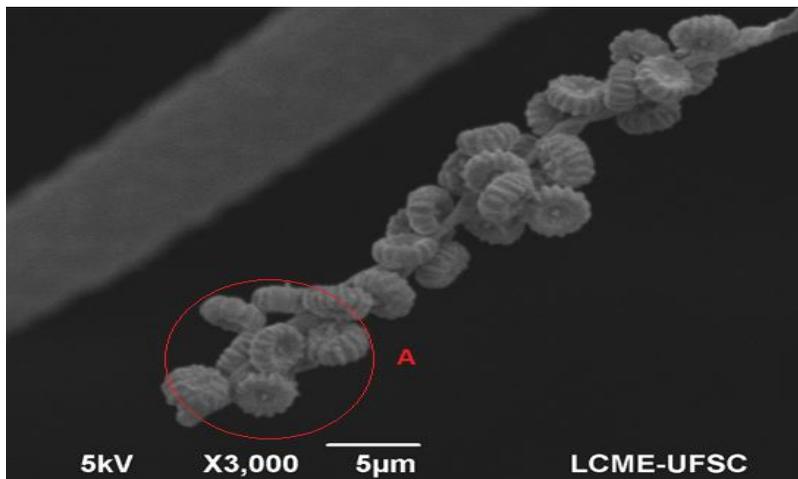


Figura 18: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 12 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 3000x). A – esporos do fungo.



Figura 19: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 20 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 200x).

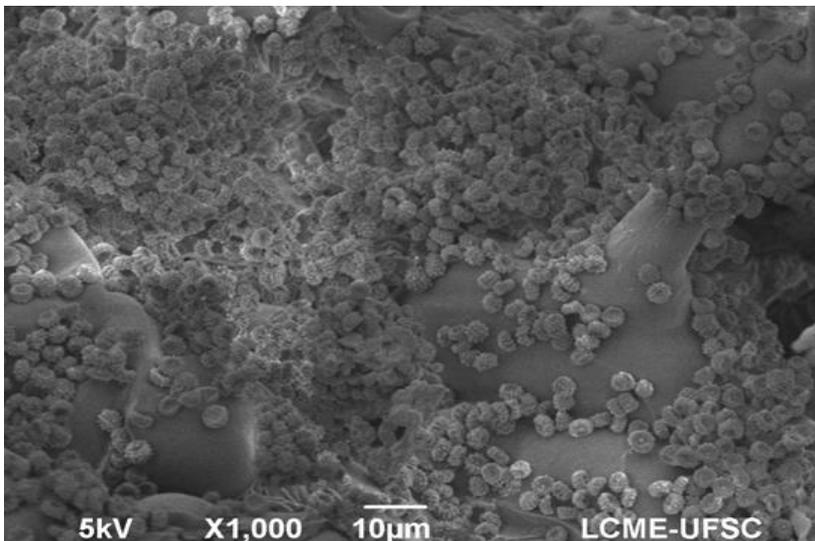


Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 1 com 20 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 1000x).

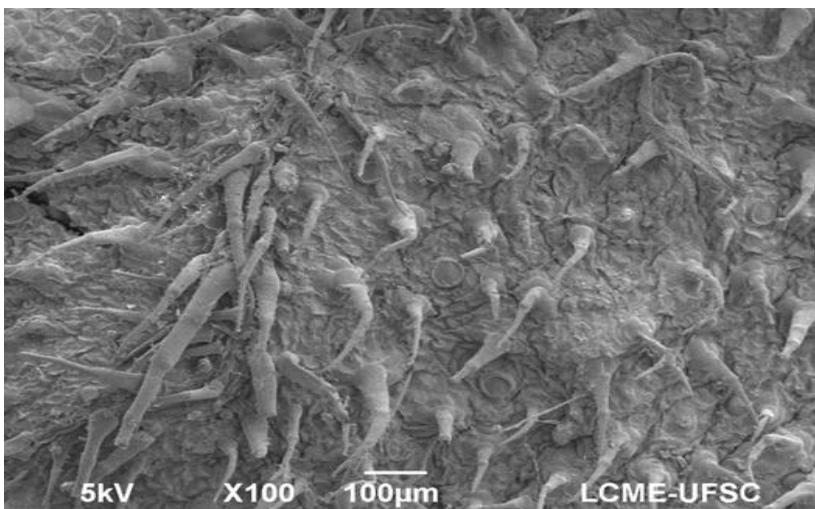


Figura 21: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 04 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 100x).

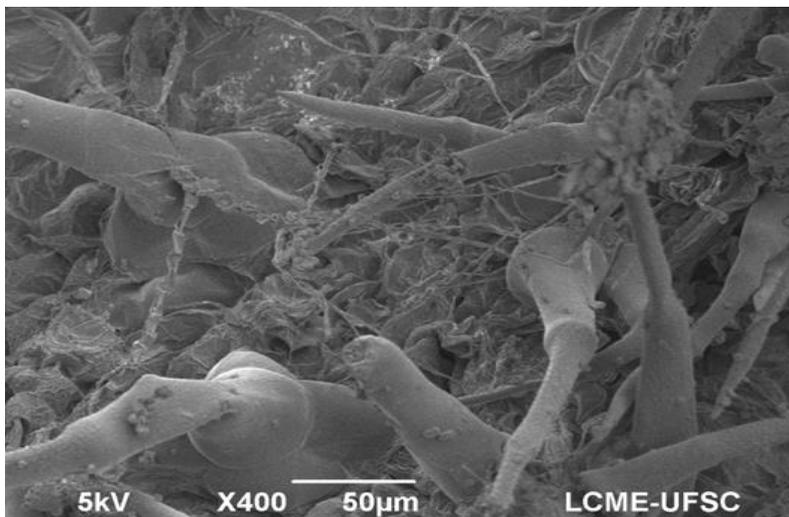


Figura 22: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 04 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 400x).

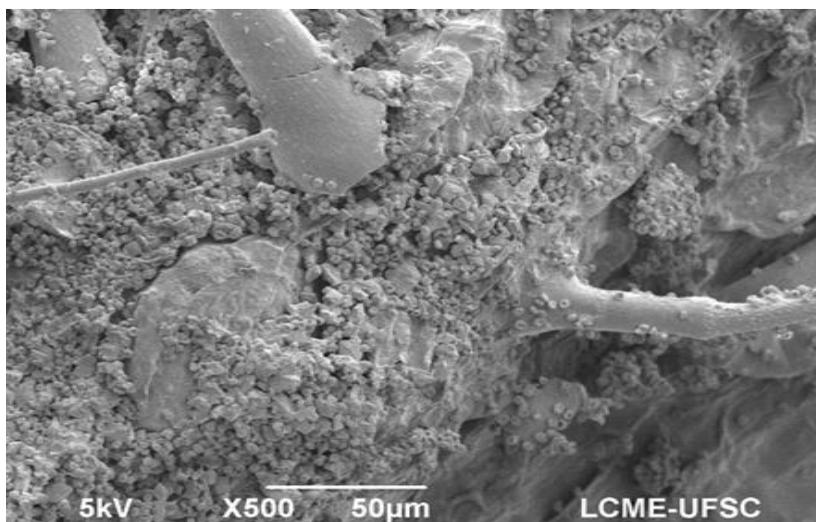


Figura 23: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 12 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 500x).

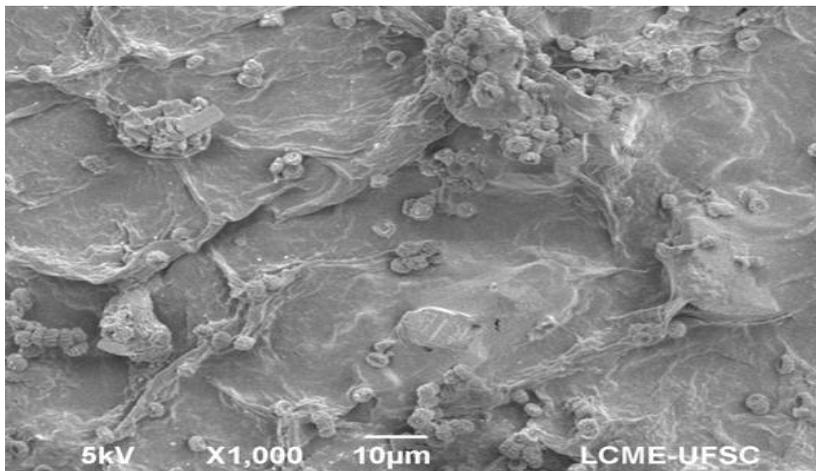


Figura 24: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 12 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 1000x).

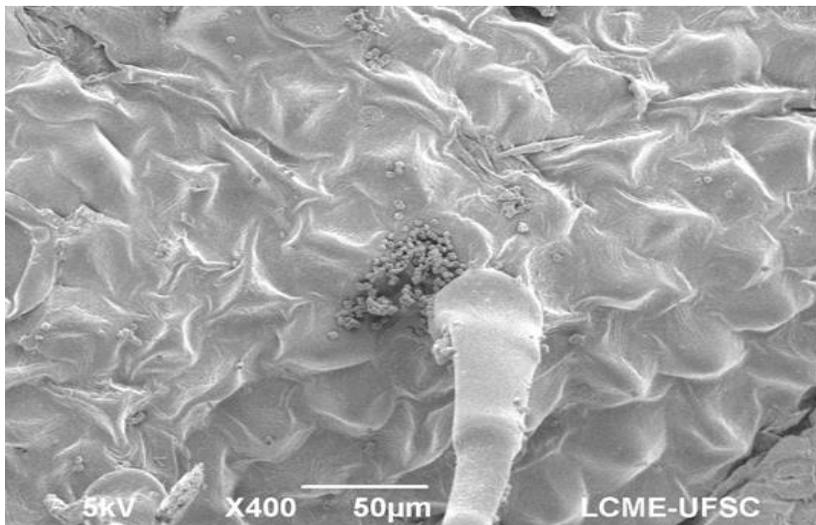


Figura 25; Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 20 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 400x).

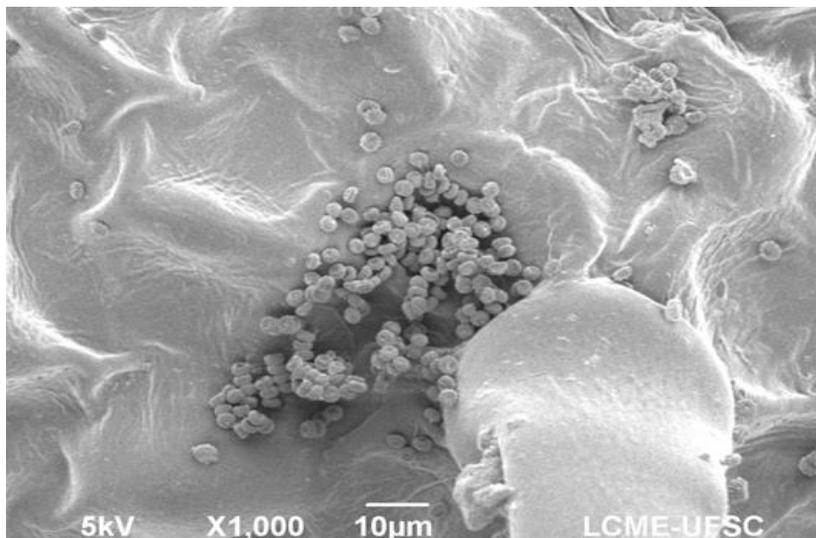


Figura 26: Micrografia eletrônica de varredura de folha de patchouli com Tratamento 2 com 20 dias de inoculação de *Aspergillus niger* (aumento de 1000x).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e a análise estatística dos dados experimentais permitem apresentar as seguintes conclusões:

1. O processo de tratamento das folhas de patchouli por fermentação com *Aspergillus niger*, seguido por extração com CO₂ no estado supercrítico, proporcionou um aumento de rendimento em massa de extrato de 42,98%, quando se utilizou o fungo nativo, ou seja, isolado das próprias folhas da planta e 37,47% para fungo originário da cepa ATCC 6205, fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Esse rendimento foi calculado em relação às folhas submetidas ao processo de extração sem serem submetidas à fermentação com fungos;
2. A qualidade do óleo essencial obtido pode ser considerada como dentro dos padrões exigido pelo mercado em relação ao teor de patchoulol, que é em torno 33%. O teor desse álcool nas amostras obtidas foi de 38,16% e 41,07%, respectivamente para as fermentações com o fungo nativo (Tratamento 1) e o fornecido pela FIOCRUZ (Tratamento 2);
3. O teor de patchoulol presente na amostra obtida sem a fermentação das folhas foi de 58,91%. A comparação desse resultado com os teores de álcool obtido com a fermentação foi de 35,22% e 30,30% inferiores, respectivamente, com os fungos obtidos das folhas e da FIOCRUZ. Esse resultado sugere que durante o processo fermentativo possa ter havido degradação de produtos que compõem o óleo, inclusive o patchoulol;
4. O tratamento das folhas por fermentação com o fungo *Aspergillus niger* durante quatro dias, independente da origem do fungo, apresentou melhores rendimentos em massa de óleo em relação às folhas que não sofreram fermentação;
5. As micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da estrutura celular das folhas sugerem que, durante o processo de fermentação, os fungos degradam as estruturas celulósicas dos tricomas glandulares capitados, dos tricomas glandulares peltados e das glândulas de óleo no mesofilo, onde o óleo essencial fica armazenado nas folhas do patchouli;

6. A cepa natural, obtida diretamente das folhas do patchouli, apresentou melhor resultado em comparação com a cepa ATCC 6205 fornecida pela FIOCRUZ ao final do período de quatro dias de fermentação, 8,05% e 7,74%, respectivamente, de teor de extrato na amostra;
7. Os resultados obtidos com o tempo de fermentação superior aos quatro dias, utilizando-se ambas as cepas, apresentaram rendimento em extrato inferior aos obtidos com quatro dias. Os resultados mostrados no Gráfico 1 evidenciam claramente, em ambos os casos da origem do fungo, uma tendência de diminuição da quantidade de óleo essencial com o aumento do tempo de fermentação que as folhas foram submetidas. Após 20 dias de fermentação, as quantidades de óleo essencial foram de 5,85% e 6,34% para a cepa natural e da FIOCRUZ, respectivamente;
8. Os resultados de diminuição do teor de óleo essencial com o aumento do tempo de fermentação sugerem uma possível degradação do óleo pela ação dos microrganismos presentes na cepa e que se desenvolveram durante o processo fermentativo, o que ratifica a tese de Parshikov (2014), a qual defende que o fungo *Aspergillus niger* é capaz de causar a biodeteriorização de lubrificantes derivados de óleos.
9. Os teores de patchoulol presentes nos extratos obtidos com as folhas fermentadas, em relação às folhas que não foram submetidas à fermentação, também sugerem uma possível degradação desse álcool durante o processo fermentativo.

7. SUGESTÕES

A principal sugestão para trabalhos futuros é a de que seja realizada toda a análise quantitativa e qualitativa para o óleo obtido com tempo de fermentação inferior a quatro dias. A comparação dos resultados obtidos com e sem fermentação das folhas sugere a existência de um ponto de máximo na quantidade de óleo em massa entre o período de zero e quatro dias de fermentação das folhas. Nesse ponto de máximo pode-se supor que o rendimento seja maior que 8,05% obtidos com quatro dias.

Também se sugere analisar o teor de patchoulol para os óleos obtidos com os tempos de fermentação superior a quatro dias. Com isso, pode-se verificar a tendência de haver um consumo de patchoulol pelos microrganismos presentes no processo fermentativo.

BIBLIOGRAFIA

AMBROSE, D. C. P.; ANNAMALAI, S. J. K.; NAIK, R. **Effect of drying on the volatile oil yield of patchouli**. Indian Journal of Science and Technology. Vol 6(12), 5559–5562, 2013

AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. **Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética de desativação celulásica**. Acta Scientiarum. Technology. Maringá, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review**. Bioresource Technology, v. 101, n. 13, p. 4851-486, 2010.

ARAUCO, M. L. **Obtenção e separação de compostos bioativos de *Schinus terebinthifolius raddi* em meio supercrítico e avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

ARAUJO, A. C. **Fracionamento do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) obtido por extração supercrítica**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

China Pharmacopoeia Committee. **Pharmacopoeia of the People's Republic of China**. China Med, Sci. 342-373, 2010.

COSTA, L. C. B.; PINTO J. B. E. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ALVES, P. B.; EVNGELINO, T. S. **Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atroveran (*Ocimum selloi* Benth.) inteiras e moídas sob condições de armazenamento**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 11, n.1, p.43-48, 2009.

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

CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A. **Fundamentals of Supercritical Fluid Extraction. In: Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists**. Campinas-SP, Brazil: Elsevier. v. 2p. 117–133, 2012.

DANIELSKI L, MICHELIN E.M.Z. FERREIRA S.R.S. **Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation.** Journal of Food Engineering. Vol. 78. - pp. 1054–1059, 2007.

DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. **Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives.** International Journal of Biological Sciences, 5(6):578-595, 2009.

DICKINSON, W.C. **Integrative Plant Anatomy.** San Diego: Academic Press, 2000.

DONELIAN, A. **Fracionamento do óleo essencial de patchouli em meio supercrítico.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

HAQ-Ikram-ul; JAVED, M. M; KHAN, T. S; SIDDIQ, Z. **Cotton saccharifying activity of cellulases produced by co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*.** Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 1(3): 241-245, 2005.

HEATH, H. B. **Source book of flavors.** USA: Van Nostrand Reinhold, v. 2, 1981.

HERZI, N.; CAMY, S.; BOUAJILA, J.; DESTAC, P.; ROMDHANE, M.; CONDORET, J. **Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 82, p. 72–82, out. 2013.

HOLMES, P. **Patchouli, the colors within the darkness.** The International Journal of Aromatherapy. Vol. 8, p. 18-22, 1997.

HONG, S.-A.; Kim, S. J.; CHUNG, K. y.; CHUN, M.-S.; LEE, B. G.; KIM, J. **Continuous synthesis of lithium iron phosphate (LiFePO₄) nanoparticles in supercritical water: Effect of mixing tee.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 73, p. 70–79, jan. 2013.

ITO, K; AKAHOSHI, Y; ITO, M; KANEKO, S. **Sedative effects of inhaled essential oil components of traditional fragrance *Pogostemon cablin* leaves and their structure-activity relationships.** Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2015.

KONGKATHIP, N; SAM-ANG, P; KONGKATHIP, B; PANKAEW, Y; TANASOMBAT, M; UDOMKUSONSRI, P. **Development of patchouli extraction with quality control and isolation of active compounds with antibacterial activity.** Kasetsart Journal 43, 519-525, 2009.

LEE, S.M; KOO, Y. M. **Pilot-scale production of cellulose using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode.** Journal of Microbiology and Biotechnology, 11: 229-233, 2001.

LIU, J-L; LI, X-H; PENG, C; LIN, D-S; WANG, Y-N; YANG, Y-T; ZHOU, Q-M; XIONG, L. **4-nor- β -Patchoulene sesquiterpenoids from the essential oil of *Pogostemon cablin*.** Phytochemistry Letters 12, 27-30, 2015.

MACHMUDAH, S.; [SULASWATTY](#), A.; [SASAKI](#), M.; GOTO, M.; HIROSE, T. **Supercritical CO₂ extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling.** J. of Supercritical Fluids. Vol. 39. - pp. 30–39, 2006.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 220p, 1995.

Microscopia Eletrônica. Universidade Federal de Ouro Preto. Disponível em: <http://www.degeo.ufop.br/laboratorios/microlab/facilidades.htm> Acesso em: 08 de novembro de 2016.

MOUAHID, A.; CRAMPON, C.; TOUDJI, S-A.; BADENS, E. **Supercritical CO₂ extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling.** J of Supercritical Fluids, v. 77, p. 7–16, maio. 2013.

MUKHOPADHYAY M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide.** Washington : CRC Press, 2000.

ÖZEL M. Z.; BARTLE, K.; CLIFFORD, A.; BURFORD, M. **Extraction, solubility and stability of metal complexes using stainless steel supercritical fluid extraction system.** Analytica Chimica Acta. 417 : Vol. 2. - pp. 177-184, 2000.

POURMORTAZAVI S. M.; HAJMIRSADEGHI S.S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis Review [Journal] // Journal of Chromatography A. - - Vol. 1163 . - pp. 2–24, 2008.**

PARSHIKOV, I. A; SUTHERLAND, J. B. **The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids.** Process Biochemistry 49, 2086-2100, 2014.

RAHARJO, S. J; RETNOWATI, R. **Yield increasing of patchouli oils of result steam distillation of patchouli leaf of dewaxing, fermentation, and drying process.** Journal Basic Science and Technology, 1(3), 12-18, 2012.

RAMYA, H G; PALANIMUTHU, V.; RACHNA, S. **An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) – A medicinal and aromatic plant: it's importance to mankind.** Agric Eng Int: CIGR Journal, 15(2): 243 – 250, 2013.

REVERCHON E.; DE MARCO, I. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** Journal of Supercritical Fluids. 38. - pp. 146-166, 2006.

SAJFRTOVA, M. [SOVOVA](#), H.; [KARBAN](#), J.; [ROCHOVA](#), K.; [PAVELA](#), R.; [BARNET](#), M. **Effect of separation method on chemical composition and insecticidal activity of Lamiaceae isolates.** Industrial Crops and Products, v. 47, p. 69–77, 2013.

SAKTHI, S. S; SARANRAJ, P; RAJASEKAR, M. **Optimization on cellulase production by *Aspergillus niger* using paddy straw as substrate.** International Journal of Advanced Scientific and Technical Research. Vol.1, 2011.

SALGIN, U.; DÖKER, O.; ÇALIMLI, A. **Extraction of sunflower oil with supercritical CO₂: Experiments and modeling.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 38, n. 3, p. 326–331, out. 2006.

SAMUELSSON. **Gunnar Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy** - Stockholm, 1999.

SANDES, S. S.; BLANK, A. F; BOTÂNICO, M. P; BLANK, F. A; VASCONCELOS, J. N. C; MENDONÇA, S. A. D. **Estruturas secretoras foliares em pachouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]** Scientia Plena v.8, 059902, 2012.

SILVA, F. et al.. **Qualidade pós-colheita de *Achillea millefolium* L., *Origanum vulgare* L. e *Petroselinum crispum* (Miller) A.W. Hill em**

três embalagens. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.2, n.1, p.37-41, 1999.

TANKO, H. et al. **Pre- and post-harvest processing of medicinal plants.** Plant Genetic Resources, v.3, n. 2, p. 304-13, 2005.

VIJAYKUMAR, K. **Patchouli and India- A great leaf forward.** In: National Seminar of Prospectus and Potentials of Medicinal and Aromatic Crops, held at Bangalore, 18-19 - 106-107, 2004.

YAO, G; DREW, B. T; YI, T-S; Y, H-F; Y. Y-M; G. X-J. **Phylogenetic relationships, character evolution and biogeographic diversification of *Pogostemon Is.* (Lamiaceae).** Molecular Phylogenetics and Evolution 98, 184-200, 2016.

8. ANEXOS

ANEXOS I – RELATÓRIOS DE ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS



LABORATÓRIO DE CROMATOGRAFIA

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 81384/2016

DQ-137 Revisão: 12 Data: 28/07/2016

DATA DE EMISSÃO : 26/08/2016

ORDEM DE SERVIÇO Nº : 110740

CLIENTE : Technessentia Compostos Naturais Ltda

ENDEREÇO : Rua Nossa Senhora das Dores, 2042 – Vila Santana
Santo Amaro da Imperatriz - SC

1. DADOS DA AMOSTRAGEM

NÚMERO DE AMOSTRAS : 01
 TIPO DE AMOSTRA : Óleo essencial
 DATA DA COLETA : Não informado HORA : Não informado
 DATA DE ENTREGA : 19/08/2016 HORA : 15h:00min
 AGENTE DE ENTREGA : Cliente.
 AMOSTRAGEM : A realização da amostragem é de inteira responsabilidade do cliente.
 OBSERVAÇÕES :

2. DADOS DA AMOSTRA E RESULTADOS

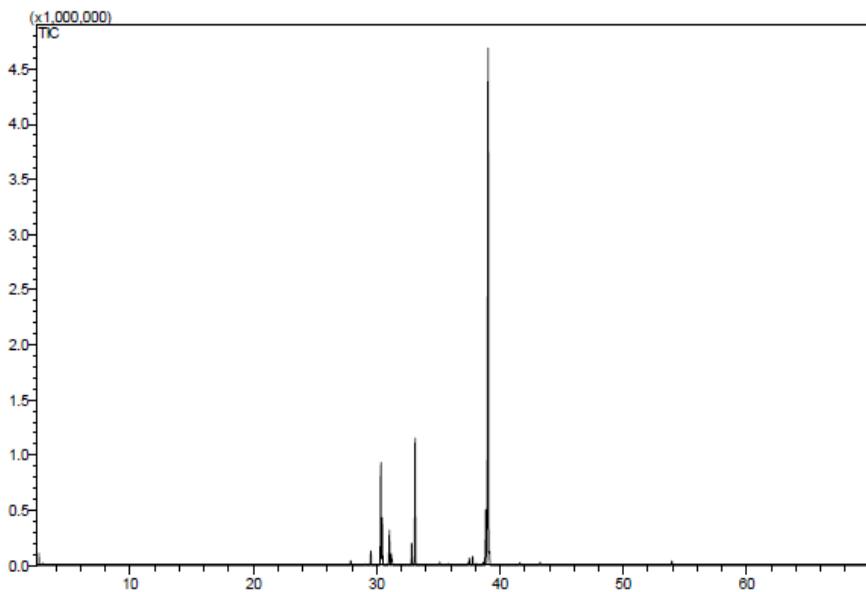
INÍCIO DOS ENSAIOS: 23/08/2016

TÉRMINO DOS ENSAIOS: 24/08/2016

SERVIÇOS SOLICITADOS	MÉTODOS	PROCEDIMENTOS TÉCNICOS
Análise de óleo essencial por GC-MS	GC-MS	---

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:		VOLUME DA AMOSTRA (mL)	TIPO DE FRASCO/ ACONDICIONAMENTO		
Código da amostra	Cliente		<input checked="" type="checkbox"/> Vidro	<input type="checkbox"/> Plástico	<input type="checkbox"/> Refrigerado
81384-1	Testemunha 1 2ª ext. FSC Patchouli	2,0	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Amostra 81384-1





LABORATÓRIO DE CROMATOGRAFIA

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 81383/2016

DQ-137 Revisão: 12 Data: 26/07/2016

DATA DE EMISSÃO : 26/08/2016

ORDEM DE SERVIÇO Nº : 110739

CLIENTE : Technessentia Compostos Naturais Ltda

ENDEREÇO : Rua Nossa Senhora das Dores, 2042 – Vila Santana
Santo Amaro da Imperatriz - SC

1. DADOS DA AMOSTRAGEM

NÚMERO DE AMOSTRAS : 01

TIPO DE AMOSTRA : Óleo essencial

DATA DA COLETA : Não informado

HORA : Não informado

DATA DE ENTREGA : 19/08/2016

HORA : 15h:00min

AGENTE DE ENTREGA : Cliente.

AMOSTRAGEM : A realização da amostragem é de inteira responsabilidade do cliente.

OBSERVAÇÕES :

2. DADOS DA AMOSTRA E RESULTADOS

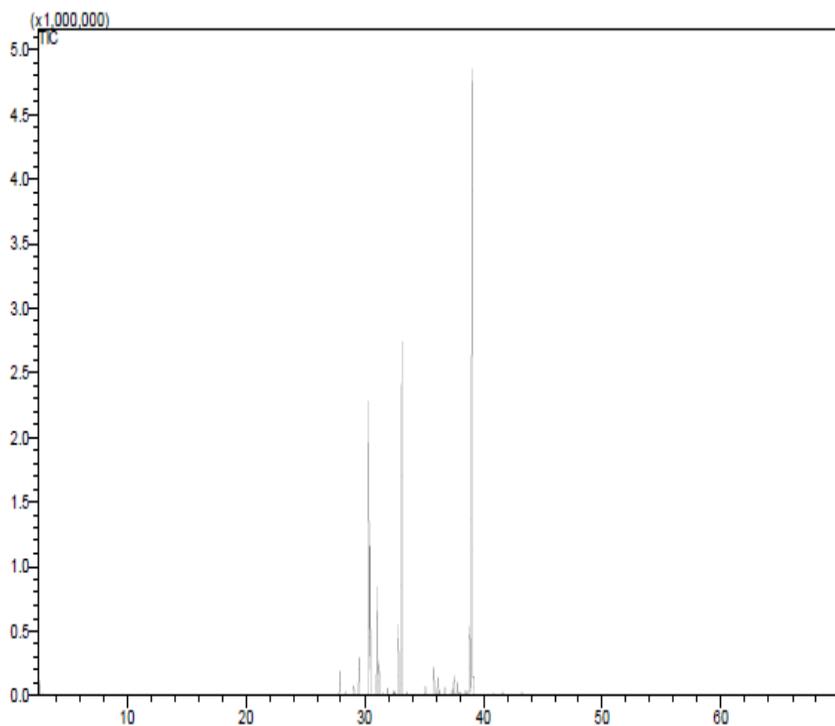
INÍCIO DOS ENSAIOS: 22/08/2016

TÉRMINO DOS ENSAIOS: 26/08/2016

SERVIÇOS SOLICITADOS	MÉTODOS	PROCEDIMENTOS TÉCNICOS
Análise de óleo essencial por GC-MS	GC-MS	---

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:		VOLUME DA AMOSTRA (mL)	TIPO DE FRASCO/ ACONDICIONAMENTO		
Código da amostra	Cliente		<input checked="" type="checkbox"/> Vidro	<input type="checkbox"/> Plástico	<input type="checkbox"/> Refrigerado
81383-1	ASP D1 4 dias 2ª ext. FSC Patchouli	2,0	<input checked="" type="checkbox"/> Vidro	<input type="checkbox"/> Plástico	<input type="checkbox"/> Refrigerado

Amostra 81383-1





LABORATÓRIO DE CROMATOGRAFIA

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 81385/2016

DQ-137 Revisão: 12 Data: 28/07/2016

DATA DE EMISSÃO : 26/08/2016

ORDEM DE SERVIÇO Nº : 110741

CLIENTE : Technessentia Compostos Naturais Ltda
 ENDEREÇO : Rua Nossa Senhora das Dores, 2042 – Vila Santana
 Santo Amaro da Imperatriz - SC

1. DADOS DA AMOSTRAGEM

NÚMERO DE AMOSTRAS : 01
 TIPO DE AMOSTRA : Óleo essencial
 DATA DA COLETA : Não informado HORA : Não informado
 DATA DE ENTREGA : 19/08/2016 HORA : 15h:00min
 AGENTE DE ENTREGA : Cliente.
 AMOSTRAGEM : A realização da amostragem é de inteira responsabilidade do cliente.
 OBSERVAÇÕES :

2. DADOS DA AMOSTRA E RESULTADOS

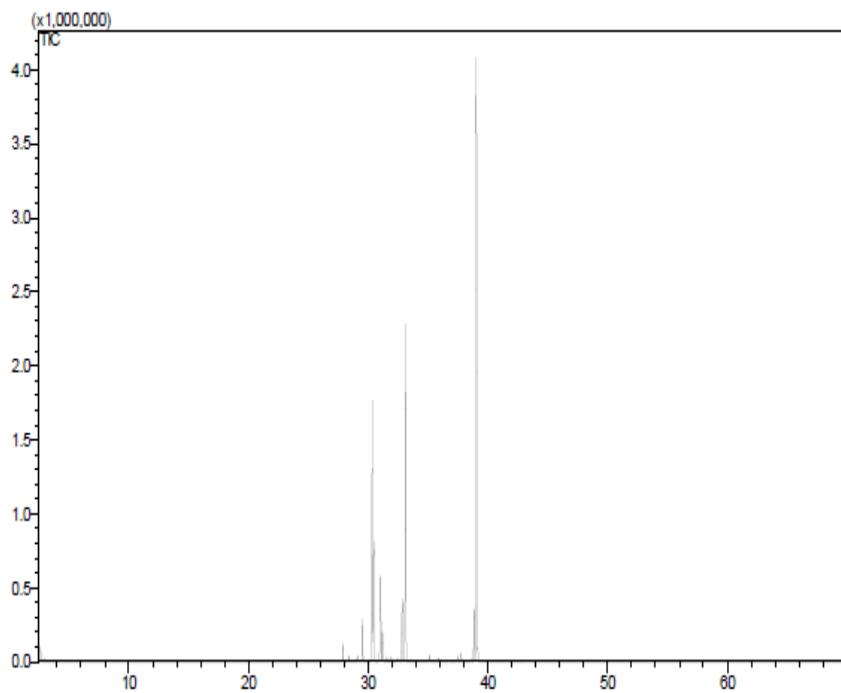
INÍCIO DOS ENSAIOS: 24/08/2016

TÉRMINO DOS ENSAIOS: 26/08/2016

SERVIÇOS SOLICITADOS	MÉTODOS	PROCEDIMENTOS TÉCNICOS
Análise de óleo essencial por GC-MS	GC-MS	---

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:		VOLUME DA AMOSTRA (mL)	TIPO DE FRASCO/ ACONDICIONAMENTO		
Código da amostra	Cliente		<input checked="" type="checkbox"/> Vidro	<input type="checkbox"/> Plástico	<input type="checkbox"/> Refrigerado
81385-1	ASP 02 4 dias 2º ext. FSC	2,0	<input checked="" type="checkbox"/> Vidro	<input type="checkbox"/> Plástico	<input type="checkbox"/> Refrigerado

Amostra 81385-1



ANEXOS II - DADOS EXPERIMENTAIS

Temperatura: 32°C

Pressão: 100 bar

Tempo de extração: 60 minutos.

ASPERGILLUS NIGER 01 - 04 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco vazio (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	21-08-15	406.139	409.698	3.559	8.9017	9.1933	0.2916	8.193
2ª amostra	21-08-15	406.139	409.684	3.545	8.8358	9.1236	0.2878	8.218
3ª amostra	09-09-15	406.139	409.756	3.617	9.1596	9.4432	0.2836	7.841

ASPERGILLUS NIGER 01 - 06 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	04-09-15	406.139	410.105	3.966	9.0942	9.355	0.2608	6.576
2ª amostra	04-09-15	406.139	410.054	3.915	9.2027	9.4485	0.2458	6.278
3ª amostra	21-09-15	406.139	409.254	3.115	8.9955	9.1798	0.1843	5.917

ASPERGILLUS NIGER 01 - 08 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	08-09-15	406.139	410.135	3.996	9.2431	9.4979	0.2548	6.376
2ª amostra	08-09-15	406.139	409.507	3.368	9.075	9.3101	0.2351	6.980
3ª amostra	08-09-15	406.139	409.214	3.075	9.2998	9.5068	0.207	6.732

ASPERGILLUS NIGER 01 - 12 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	09-09-15	406.139	409.342	3.203	9.0749	9.2441	0.1692	5.283
2ª amostra	09-09-15	406.139	409.274	3.135	9.2126	9.3711	0.1585	5.056
3ª amostra	09-09-15	406.139	409.355	3.216	9.0773	9.2475	0.1702	5.292

ASPERGILLUS NIGER 01 - 20 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	10-09-15	406.139	409.535	3.396	9.0029	9.1979	0.1950	5.742
2ª amostra	10-09-15	406.139	409.541	3.402	9.2494	9.4606	0.2112	6.208
3ª amostra	10-09-15	406.139	409.581	3.442	8.9419	9.1351	0.1932	5.613

ASPERGILLUS NIGER 02 - 04 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco vazio (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	24-09-15	406.139	409.693	3.554	9.0372	9.3129	0.2757	7.757
2ª amostra	24-09-15	406.139	409.490	3.351	8.8809	9.1463	0.2654	7.920
3ª amostra	24-09-15	406.139	409.745	3.606	9.1081	9.3808	0.2727	7.562

ASPERGILLUS NIGER 02 - 06 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	24-09-15	406.139	409.790	3.651	8.6754	8.9470	0.2716	7.439
2ª amostra	25-09-15	406.139	409.388	3.249	7.8359	8.0759	0.2400	7.387
3ª amostra	25-09-15	406.139	409.456	3.317	9.1366	9.3599	0.2233	6.732

ASPERGILLUS NIGER 02 - 08 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	21-09-15	406.139	409.972	3.833	9.1273	9.3831	0.2558	6.674
2ª amostra	24-09-15	406.139	410.007	3.868	9.0108	9.2961	0.2853	7.376
3ª amostra	24-09-15	406.139	409.876	3.737	9.1055	9.3642	0.2587	6.923

ASPERGILLUS NIGER 02 - 12 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	25-09-15	406.139	409.722	3.583	7.8474	8.1000	0.2526	7.050
2ª amostra	25-09-15	406.139	409.838	3.699	7.8342	8.0913	0.2571	6.951
3ª amostra	25-09-15	406.139	409.595	3.456	9.2722	9.5187	0.2465	7.133

ASPERGILLUS NIGER 02 - 20 DIAS								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	02-10-15	406.139	410.090	3.951	12.5590	12.7916	0.2326	5.887
2ª amostra	02-10-15	406.139	410.039	3.9	12.7241	12.9824	0.2583	6.623
3ª amostra	02-10-15	406.139	409.96	3.821	12.7719	13.0217	0.2498	6.538

SEM TRATAMENTO								
	Data extração	Cápsula vazia (g)	Cápsula cheia (g)	Patchouli (g)	Frasco vazio (g)	Frasco cheio (g)	Óleo (g)	Óleo (%)
1ª amostra	10-09-15	406.139	410.184	4.045	9.2472	9.4941	0.2469	6.104
2ª amostra	14-08-15	406.139	411.218	5.079	9.1973	9.4540	0.2567	5.054
3ª amostra	20-08-15	406.139	410.247	4.108	9.0062	9.2419	0.2357	5.738