



JOSÉ LUIS PASQUEL REÁTEGUI

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DO BAGAÇO DE AMORA-PRETA (*Rubus* sp.)
USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO ASSISITIDO POR ULTRASSOM**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

JOSÉ LUIS PASQUEL REÁTEGUI

**“EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DO BAGAÇO DE AMORA-PRETA (*Rubus sp.*)
USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO ASSISTIDO POR ULTRASSOM”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Julian Martínez

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ LUIS PASQUEL REÁTEGUI E ORIENTADO PELO PROF. DR. JULIAN MARTÍNEZ.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

P265e Pasquel Reátegui, José Luis, 1985-
Extração de compostos do bagaço de amora-preta (*Rubus* sp.) usando CO₂ supercrítico assistido por ultrassom / José Luis Pasquel Reátegui. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Julian Martínez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Amora-preta. 2. Bagaço. 3. Extração supercrítica. 4. Ultrassom. 5. Microscopia. I. Martínez, Julian. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Extração de compostos do bagaço de amora-preta (*Rubus* sp.) usando CO₂ supercrítico assistido por ultrassom

Palavras-chave em inglês:

Blackberry

Bagasse

Supercritical extraction

Ultrasound

Microscopy

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Julian Martínez [Orientador]

Alessandra Lopes de Oliveira

Maurício Ariel Rostagno

Data de defesa: 31-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Julian Martínez

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/ UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira

Membro Titular

Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Dr. Maurício Ariel Rostagno

Membro Titular

POS-DOC Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/ UNICAMP

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Membro Suplente

Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Priscilla Efraim

Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/ UNICAMP

ABSTRACT

Blackberry (*Rubus* sp.) has attracted the attention of producers and consumers in recent years, since it is a good source of bioactive compounds that offers health benefits. Agro-industrial wastes resulting from blackberry processing have demonstrated to be a good source of flavonoids, which are phenolic compounds widely known for their antioxidant activity. The objective of this work was to produce extracts from blackberry bagasse using supercritical fluid extraction assisted by ultrasound. For the supercritical fluid extraction a Box-Behnken design was performed with extraction pressure (15, 20 and 25 MPa), temperature (40, 50 and 60 °C) and ultrasound output power (0, 200 and 400 W) as independent variables. The CO₂ flow rate (2.77×10^{-4} kg/s) was maintained constant for all experiments done with pure CO₂.

The highest yield was found at 50 °C and 25 MPa with an ultrasound output power of 400 W. After selecting the best process condition, a study was done to determine the kinetic parameters of the supercritical extraction process. The composition of the extracts was estimated by spectrophotometry, and the highest quantities of phenolics compounds were observed at 60 °C and 20 MPa without ultrasound. Furthermore, an increase of the antioxidant activity was observed at 60 °C, 15 MPa and 200 W of ultrasound power in comparison to other results obtained by supercritical extraction. With the objective to compare the yield and the composition of the extracts a cosolvent was added in the supercritical extraction process, at the extraction conditions of 60°C, 15 MPa and 200 W; these process conditions were selected based on the antioxidant activity present in the extracts obtained with pure CO₂. An enhancement in the overall yield was observed when ethanol (10 % v/v) was applied as cosolvent. On the other hand, the use of water (10 % v/v) as cosolvent was more appropriate for the recovery of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity from dried milled blackberry bagasse. It was also observed that the raw material without any pretreatment showed higher content of anthocyanins in the extracts obtained by supercritical extraction with water (5 % v/v) as cosolvent. From the UPLC-QTOF-MS analyses, it was possible to identify four anthocyanins, two major anthocyanins (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) and two minor anthocyanins (cyanidin-3-malil-glucoside and cyanidin-3-diaxial-rutinoside), present in the

blackberry bagasse. Finally, when the morphology of the raw material was analyzed before and after the extraction by scanning electron microscopy (SEM), it was observed that the use of ultrasound produced physical changes in the cell walls.

Keywords

Blackberry, bagasse, supercritical extraction, ultrasound, antioxidant activity, microscopy.

RESUMO

A amora-preta (*Rubus* sp.) tem chamado a atenção de produtores e consumidores nos últimos anos, por ser uma boa fonte de compostos bioativos que oferece benefícios para a saúde. Os resíduos agroindustriais do processamento de amora geralmente têm demonstrado ser uma boa fonte de flavonoides, que são compostos fenólicos amplamente conhecidos pela sua atividade antioxidante. O presente trabalho teve como principal objetivo obter extratos a partir do bagaço de amora-preta usando CO₂ supercrítico assistido por ultrassom. Assim, para a extração supercrítica com CO₂ puro foi feito um desenho de tipo Box-Behnken, com três variáveis independentes, sendo elas a temperatura (40, 50 e 60 °C), pressão (15, 20 e 25 MPa) e potência ultrassônica (0, 200 e 400 Watts). A vazão de CO₂ foi mantida constante em $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s, para todos os experimentos feitos com CO₂ puro.

O maior rendimento foi encontrado a 50 °C, 25 MPa e 400 Watts de potência ultrassônica. Após selecionada a melhor condição, foi realizado um estudo para determinar os parâmetros cinéticos do processo de extração supercrítica. A composição dos extratos foi avaliada por espectrofotometria, pela qual os maiores teores de fenólicos foram observados a 60 °C, 20 MPa e sem uso de ultrassom. Além disso, observou-se um aumento da atividade antioxidante a 60 °C, 15 MPa e 200 Watts de potência em relação aos demais resultados obtidos pela de extração supercrítica. A fim de comparar o rendimento e composição dos extratos foi adicionado cossolvente na extração supercrítica, na condição de 60 °C, 15 MPa e ultrassom de 200 Watts, selecionada com base na atividade antioxidante presente nos extratos obtidos com CO₂ puro. Na avaliação do comportamento dos extratos obtidos pela extração supercrítica com cossolvente, observou-se uma melhoria no rendimento global quando foi empregado etanol a (10 % v/v). Por outro lado, o emprego de água a (10 % v/v) como cossolvente foi mais adequado para a recuperação de compostos fenólicos e atividade antioxidante a partir do bagaço de amora-preta seca triturada. Também foi observado que a matéria-prima sem pré-tratamento algum apresentou maior conteúdo de antocianinas nos extratos obtidos pela extração supercrítica com (5 % v/v) de água como cossolvente. A partir da análise por UPLC-QTOF-MS, foi possível identificar quatro antocianinas; duas majoritárias (Cianidina-3-glucosídeo e Cianidina-3-rutinosídeo) e

duas minoritárias (Cianidina-3-malonil-glucosídeo e Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo), presentes no bagaço de amora-preta. Por último, observou-se que o emprego de ultrassom provoca efeitos físicos nas paredes das células quando foi analisada a morfologia da matéria-prima antes e após as extrações por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Palavras-chave: Amora-preta, bagaço, extração supercrítica, ultrassom, atividade antioxidante, microscopia.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	AMORA-PRETA (<i>Rubus sp.</i>)	5
3.2	COMPOSTOS FENÓLICOS	6
3.2.1	Flavonoides.....	8
3.2.1.1	Antocianinas.....	9
3.3	FONTES NATURAIS DE POLIFENOIS	12
3.3.1	Subprodutos agroindustriais como fonte de compostos fenólicos.....	14
3.4	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	16
3.5	ULTRASSOM	21
3.5.1	Ultrassom de baixa intensidade	21
3.5.1.1	Princípios de ultrassom de baixa intensidade.....	21
3.5.2	Ultrassom de alta intensidade	22
3.5.2.1	Princípios de ultrassom de alta intensidade.....	22
3.6	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATÉRIA-PRIMA	30

4.1.1	Origem e preparo da matéria-prima.....	30
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	31
4.2.1	Determinação de umidade (AOAC, 1997; método 925.10)	31
4.2.2	Análise da composição centesimal	31
4.3	EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO.....	31
4.4	UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	34
4.4.1	Preparo do leito de extração.....	38
4.5	RENDIMENTO GLOBAL (X_0).....	39
4.6	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO.....	40
4.7	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	41
4.7.1	Determinação de compostos fenólicos totais.....	41
4.7.2	Atividade antioxidante.....	42
4.7.2.1	Método DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila).....	42
4.7.2.2	Método ABTS (2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolina) 6-ácido sulfônico).....	43
4.8	EMPREGO DE COSSOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	44
4.9	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	46
4.9.1	Teor de Antocianinas Monoméricas	46
4.9.2	Identificação das Antocianinas por UPLC-QTOF-MS.....	47
4.9.3	Separação e quantificação das Antocianinas por HPLC-DAD.....	47
4.10	ANÁLISE DE IMAGEM.....	48
4.10.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	49

5.1.1	Testes preliminares de extração	51
5.2	EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO	54
5.3	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	55
5.3.1	Modelo codificado e ANOVA para o Rendimento Global X_0 (Yld).....	57
5.4	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	61
5.5	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	62
5.5.1	Modelo codificado e ANOVA para o teor de compostos fenólicos	62
5.5.2	Modelo codificado e ANOVA para determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH	66
5.5.3	Modelo codificado e ANOVA para determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS	69
5.6	EMPREGO DE COSSOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	72
5.6.1	Identificação das Antocianinas por UPLC-QTOF-MS.....	79
5.6.2	Separação e quantificação das Antocianinas por HPLC-DA.....	84
5.7	ANÁLISE DE IMAGEM	86
5.7.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	86
6	CONCLUSÕES	89
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9	APÊNDICE	107
9.1	APÊNDICE A: Curvas padrão utilizadas nos experimentos	107
9.2	APÊNDICE B: Dados experimentais dos testes preliminares	109

9.3	APÊNDICE D: Cinética de Extração.....	115
9.4	APÊNDICE E: Curva padrão das Antocianinas	116
9.5	APÊNDICE F: Dados de saída do Software SAS utilizado para o ajuste linear da OEC para o bagaço de amora-preta.....	118

Dedico este trabajo a mi familia:

A mis padres a los cuales debo todo lo que soy ahora.

A mis hermanas, Kristel y Kathia por el cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP pela oportunidade oferecida para crescer profissionalmente com a realização deste trabalho

Ao professor Dr. Julian Martínez por ter me acolhido no programa de Mestrado, obrigado pela orientação no desenvolvimento do meu trabalho.

À professora Dr^a Camila Alves de Rezende pela ajuda na realização das imagens em MEV. Muito obrigado.

Ao professor Dr. Gerardo Fernandez Barbero pelo apoio com as análises de cromatografia. Muito obrigado.

A CAPES pelo apoio econômico para conseguir concluir este trabalho.

Ao CNPq através do projeto 473342/2011-1.

À FAPESP através do projeto 2011/08656-7 e 2013/02203-6.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos, que me fizeram sentir parte do time.

Aos colegas e amigos do Departamento de Engenharia de Alimentos, em especial Juan Felipe e Irene Nolasco.

A mis amigos Irwin, Boris y Michello, que partieron prontamente de esta vida. Que papá Dios les tenga en su gloria.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Aspecto geral do fruto de amora-preta.....	5
Figura 3.2 Estrutura da cianidina-3-glucosídeo.....	12
Figura 3.3 Diagrama de fases de uma substância pura.....	16
Figura 3.4 Curva global apresentando as três etapas de extração.	20
Figura 3.5 Cavitação ultrassônica.	23
Figura 3.6 Colapso da bolha de cavitação e liberação de material vegetal.	24
Figura 3.7 Efeito piezoelétrico.	25
Figura 4.1 Diagrama de fluxo com as atividades realizadas no projeto.....	29
Figura 4.2 Etapas de pré-tratamento da matéria-prima.	30
Figura 4.3 Sistema de extração pelo método Soxhlet.	32
Figura 4.4 Unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom.....	34
Figura 4.5 Diagrama de operação da unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom.....	35
Figura 4.6 Célula de extração supercrítica assistida por ultrassom.....	38
Figura 4.7 Diagrama de operação da unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom com cossolvente.	45
Figura 5.1 Curvas de SFE com e sem adição de ultrassom para as condições relatadas na tabela 5.3, para bagaço de amora-preta seca triturada.....	53
Figura 5.2 Efeito das condições de extração supercrítica sobre o rendimento global.....	59
Figura 5.3 Superfícies de resposta para o rendimento global em função da pressão x temperatura, potência x temperatura e potência x pressão.	60
Figura 5.4 OEC do bagaço de amora-preta a 25 MPa, 50 °C com adição de ultrassom a 400 Watts.....	61
Figura 5.5 Efeito das condições de extração supercrítica sobre o teor de compostos fenólicos.	64
Figura 5.6 Superfícies de resposta para o teor de compostos fenólicos em função da pressão x temperatura, potência x temperatura e potência x pressão.	65
Figura 5.7 Efeito das condições de extração supercrítica sobre a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH.	67

Figura 5.8 Superfícies de resposta para a atividade antioxidante medida pelo método DPPH em função da pressão x temperatura, potência x temperatura e potência x pressão. 68	
Figura 5.9 Efeito das condições de extração supercrítica sobre a atividade antioxidante medida pelo método ABTS. 70	70
Figura 5.10 Superfícies de resposta para a atividade antioxidante medida pelo método ABTS em função da pressão x temperatura e potência x pressão. 71	71
Figura 5.11 Rendimento dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração. 74	74
Figura 5.12 Teores de antocianinas monoméricas obtidos pelos diferentes métodos de extração..... 75	75
Figura 5.13 Teor de compostos fenólicos obtidos pelos diferentes métodos de extração... 76	76
Figura 5.14 Valores de atividade antioxidante determinados por DPPH e ABTS a partir dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração. 77	77
Figura 5.15 Espectro de massa do íon molecular m/z 449 (Cianidina-3-glucosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B). 80	80
Figura 5.16 Espectro de massa do íon molecular m/z 595 (Cianidina-3-rutinosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B). 81	81
Figura 5.17 Espectro de massa do íon molecular m/z 535 (Cianidina-3-malonil-glucosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B). 82	82
Figura 5.18 Espectro de massa do íon molecular m/z 593 (Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B). 83	83
Figura 5.19 Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas a partir do bagaço de amora-preta com aumento de 10.000 vezes, onde: (A) amostra extraída a 40 °C, 15 MPa com adição de ultrassom de 200 Watts; (B) amostra extraída a 50 °C, 25 MPa e 400 Watts de potência ultrassônica e (c) amostra extraída a 50 °C, 25 MPa sem adição de ultrassom. 86	86
Figura 9.1 Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação do teor de fenólicos totais. 107	107
Figura 9.2 Curva padrão de trolox para método de atividade antioxidante DPPH. 107	107
Figura 9.3 Curva padrão de trolox utilizada na determinação de capacidade antioxidante ABTS. 108	108
Figura 9.4 Curva padrão da cianidina-3-glicosídeo (C3G). 116	116
Figura 9.5 Curva padrão da cianidina-3-rutinosídeo (C3R). 116	116

Figura 9.6 Curva padrão da cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG).....	117
Figura 9.7 Curva padrão da cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG).....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Teor de compostos fenólicos de algumas frutas.....	7
Tabela 3.2 Antocianidinas que ocorrem naturalmente.....	10
Tabela 3.3 Exemplos de Antocianinas glicosiladas encontradas em alimentos.....	11
Tabela 3.4 Fontes de compostos fenólicos.....	13
Tabela 3.5 Exemplos de resíduos como fontes de compostos fenólicos.....	15
Tabela 3.6 Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica.....	17
Tabela 3.7 Resumo de publicações sobre aplicações de CO ₂ em na indústria de alimentos.	18
Tabela 3.8 Compostos bioativos extraídos por diferentes solventes.....	19
Tabela 3.9 Vantagens e desvantagens das técnicas de extração.....	26
Tabela 3.10 Condições operacionais de extração com CO ₂ supercrítico assistido por ultrassom.....	27
Tabela 4.1 Valores codificados e reais para o desenho de Box-Behnken.....	39
Tabela 4.2 Desenho Box-Behnken com os valores codificados e reais.....	40
Tabela 4.3 Parâmetros adotados na extração supercrítica com cossolvente.....	44
Tabela 5.1 Teor de umidade e composição centesimal do bagaço de amora-preta.....	49
Tabela 5.2 Caracterização físico-química de três cultivares de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.)...	50
Tabela 5.3 Condições de extração empregadas nos testes preliminares com bagaço de amora-preta seca triturada.....	52
Tabela 5.4 Extratos obtidos por extração a Soxhlet e maceração empregando éter de petróleo e etanol como solvente.....	54
Tabela 5.5 Resultados obtidos por extração supercrítica com e sem ultrassom a partir do bagaço de amora-preta seca triturada.....	56
Tabela 5.6 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de rendimento global X ₀	58
Tabela 5.7 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de compostos fenólicos.	63
Tabela 5.8 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de atividade antioxidante DPPH.....	66

Tabela 5.9 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de atividade antioxidante ABTS.....	69
Tabela 5.10 Extratos obtidos pela extração supercrítica com água e etanol como cossolventes.....	73
Tabela 5.11 Características cromatográficas, espectro UV-visível e espectrometria de massas obtidas por UPLC-QTOF-MS.....	79
Tabela 5.12 Concentração das antocianinas obtidas por HPLC-DAD a partir dos extratos da amora-preta.....	85
Tabela 9.1 Dados do experimento cinco com $5,0291 \pm 0,23$ gramas de matéria-prima seca triturada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	109
Tabela 9.2 Dados do experimento seis com $5,1621 \pm 2,18$ gramas de matéria-prima seca triturada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa, 200 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	110
Tabela 9.3 Dados do experimento sete com $5,0427 \pm 0,42$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	111
Tabela 9.4 Dados do experimento oito com $5,0485 \pm 1,35$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa, 200 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	112
Tabela 9.5 Dados do experimento nove com $5,0827 \pm 0,05$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 MPa e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	113
Tabela 9.6 Dados do experimento dez com $5,0865 \pm 1,87$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 MPa, 200 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	114
Tabela 9.7 Dados da cinética com $5,1452 \pm 0,63$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 25 MPa, 400 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.....	115

LISTA DE SÍMBOLOS

A.M = Antocianinas monoméricas;

H₂O = Água;

TEAA = Atividade antioxidante expressa em equivalente Trolox;

OEC = Curva global de extração (overall extraction curves);

TPC = Compostos fenólicos;

ρ = Densidade;

CO₂ = Dióxido de carbono;

EtOH = Etanol;

MAE = Extração assistida por microondas;

UAE = Extração assistida por ultrassom;

SFE = Extração com fluido supercrítico;

FC = frasco de coleta;

M_{amostra} = Massa da amostra;

M_{extrato} = Massa de extrato;

M_p = Matéria-prima;

MEV = Microscopia eletrônica de varredura;

CER = Período de taxa constante de extração (constant extraction rate period);

DC = Período controlado por difusão (diffusion controlled period);

FER = Período da taxa decrescente de extração (falling extraction rate period);

P = Pressão;

P_a = Pressão acústica;

P_c = Pressão crítica;

X₀ = Rendimento Global;

Y_{ld} = Rendimento global de extração;

S/F = Razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima;

T = Temperatura;

T_c = Temperatura crítica;

W = Watts;

Q_{CO₂} = Vazão de CO₂;

$Q_{\text{Cossolvente}} = \text{Vazão de cossolvente};$

1 INTRODUÇÃO

A Região Sul do Brasil tem se destacado pelo potencial de produção de frutas nativas e de pequenas frutas devido às condições climáticas e adaptação de espécies. Dessa forma observa-se o aumento da produção de frutas e de seus produtos derivados, como sucos, geleias, sorvetes, frutas secas e outros (Raseira et al., 1992, Antunes, 2002). A amora-preta é conhecida por conter níveis apreciáveis de compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, flavonóis, ácido clorogênico e procianidinas, que têm alta atividade biológica e podem fornecer benefícios à saúde como antioxidantes dietéticos.

No mercado mundial há uma série de produtos naturais derivados de plantas. Seus primeiros usos, em tempos antigos, eram para fins nutricionais, mas suas qualidades médicas foram descobertas por povos antigos como os egípcios, hebreus, gregos, romanos, romenos e os chineses. Alguns subgrupos encontrados em frutas e vegetais, tais como isoflavonas de soja, flavonoides, antioxidantes e ácidos orgânicos, têm sido associados a bons efeitos biológicos, como a redução do risco de câncer de mama, de próstata e de cólon, prevenção de sintomas menstruais e osteoporose (Rostagno et al., 2003). Estes compostos têm uma grande perspectiva de uso como alimentos funcionais, a fim de dar um valor adicional com efeito benéfico sobre a saúde do consumidor (Conforti et al., 2009). Neste sentido existe uma especial atenção na extração de compostos de resíduos agroindustriais. Esses subprodutos do processamento de frutas e vegetais podem ser as cascas, resíduos de polpa, sementes e caules. Os subprodutos ainda contêm uma grande quantidade de compostos fenólicos. Alguns estudos têm sido feito em subprodutos que poderiam ser potenciais fontes de antioxidantes.

A qualidade dos extratos obtidos de uma matéria-prima está fortemente relacionada com a técnica de extração empregada, sendo que a qualidade dos extratos é avaliada através do perfil químico do produto. A tecnologia supercrítica tem a capacidade de extrair certos compostos químicos sob determinadas combinações de temperatura e pressão (Brunner, 2005). O processo de extração com fluido supercrítico busca maximizar a recuperação e qualidade do material extraído, enquanto minimiza os custos de energia, porque é mais rápida e seletiva do que os métodos convencionais de separação (Del Valle e Aguilera,

1999). Neste sentido, o ultrassom de alta intensidade (ou potência), baseia-se na formação de ondas ultrassônicas de frequência alta capazes de provocar cavitação devido aos ciclos de expansão e contração, tais ciclos causam ruptura na parede celular da matriz vegetal, favorecendo a penetração do solvente e a transferência de massa. Porém a utilização de ultrassom também tem sido utilizada para acelerar o processo e minimizar os tempos de extração (Jun et al., 1997). A indústria de alimentos está sempre procurando a melhor tecnologia de separação para obtenção de compostos naturais de alta pureza, que são produtos saudáveis de excelente qualidade (Raventós et al., 2002). Assim, há estudos que mostram que o emprego de ultrassom melhora os rendimentos dos processos de extração em meios supercríticos de óleo de gengibre (Balachandran et al., 2006) e óleo de amêndoa (Riera et al., 2004).

Devido ao exposto, o presente estudo visou comparar os extratos obtidos por técnicas convencionais com os extratos obtidos por extração supercrítica com e sem uso de ultrassom usando CO₂ puro e aqueles extratos obtidos a partir da extração supercrítica com cossolvente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- O presente trabalho teve como principal objetivo obter extratos a partir do bagaço de amora-preta usando CO₂ supercrítico assistido por ultrassom.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização físico-química da matéria-prima;
- Realizar extrações por métodos convencionais;
- Realizar extrações por SFE + US;
- Determinação do teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteau;
- Análise da atividade antioxidante dos extratos através dos métodos DPPH e ABTS;
- Determinação o conteúdo de antocianinas pelo método da diferença de pH;
- Identificar e quantificar as antocianinas presentes nos extratos;
- Comparar o rendimento e composição dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração;
- Construir e analisar as curvas de cinética de extração;
- Analisar a estrutura da amostra por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e após as extrações, com e sem ultrassom.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AMORA-PRETA (*Rubus sp.*)

A amoreira-preta faz parte de um grande grupo de plantas do gênero *Rubus* e subgênero *Eubatus*, pertencente à família Rosaceae, na qual existem outros gêneros de importância (*Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, entre outros) (Antunes, 2002). Os frutos de amoreira-preta (Figura 3.1) são delicados e suculentos, saborosos e aromáticos. Contêm 85 % de água e 10 % de carboidratos, elevado conteúdo de minerais como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^{2+} , Ca^{2+} , $(PO_4)^{-3}$ (Thiem, 2003) e vitaminas A e B, além de ser fonte de compostos funcionais, como ácido elágico ($C_{14}H_6O_8$). A fruta pode ser considerada uma boa fonte de antioxidantes naturais e antocianinas (Heinonen et al., 1998). Trata-se, ademais de uma planta rústica, que apresenta frutas de alta qualidade nutricional, constituídas por numerosas pequenas drupas de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido (Antunes et al., 2002).



Figura 3.1 Aspecto geral do fruto de amoreira-preta.

Estudos demonstram que extratos de amora-preta apresentam efeitos antimutagênicos (Tate et al., 2006) e anticarcinogênicos como: câncer de útero, de cólon (Lazze et al., 2004), oral, de mama, de próstata (Seeram et al., 2006) e de pulmão (Ding et al., 2006). Ainda, esta fruta atenua os riscos e sintomas do diabetes e do mal de Alzheimer (Abdille et al., 2005, Ishige et al., 2001), o efeito benéfico desta fruta se deve aos compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico, antocianinas e carotenoides (Heinonen et al., 1998).

O cultivo de amora-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde tem o nome de blackberry. No Brasil, a cultura da amoreira-preta foi introduzida pela estação experimental de Pelotas, atual Embrapa, no Rio Grande do Sul, na década de 1970 (Antunes, 2002). Os primeiros cultivares introduzidos foram Brazos, Comanche e Cherokee, oriundas da Universidade de Arkansas, Estados Unidos (Raseira et al., 1992) e desde então seu cultivo vem crescendo nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, onde a ocorrência de períodos de frio favorece o desenvolvimento da planta. Atualmente a cultivar Tupy é a mais cultivada no Brasil a qual resultou do cruzamento das cultivares Uruguai e Comanche (Antunes, 2002).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas que compreendem uma grande variedade de moléculas que têm uma estrutura de polifenóis (ou seja, vários grupos hidroxila no anel aromático). Existe uma variedade diversa de compostos fenólicos, classificados em dois grupos, flavonoides e não flavonoides, e que se apresentam amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas. Porém, sua maior concentração está nas frutas, hortaliças e também em produtos industrializados derivados desses (Naczki e Shahidi, 2006). Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa do produto. Além disso, têm sido associados com os benefícios para a saúde, atribuídos à sua atividade antioxidante (Heim et al., 2002) e poderiam, portanto, ser uma fonte natural de antioxidantes.

Segundo Seeram (2006), as substâncias fenólicas são classificadas de acordo com sua estrutura. Entre eles temos os flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavanóis), taninos (elagitaninos, proantocianidinas e galotaninos), estilbenos (resveratrol), ácidos fenólicos

(ácido hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico) e lignanas. A Tabela 3.1 mostra o teor de fenóis totais presente em algumas espécies frutíferas, que depende da época de crescimento, variedade, condições climáticas e ambientais, localização geográfica e práticas agronômicas, e considerando o tratamento da amostra, dependem da luz, temperatura e método de extração (Benvenuti et al., 2004, Kapasakalidis et al., 2006). A extração de compostos fenólicos é influenciada pela natureza química do método de extração utilizado e pelo tamanho de partícula. Por conseguinte, os extratos fenólicos são sempre uma mistura de diferentes classes destes compostos. Portanto, não existe um processo uniforme ou completamente satisfatório que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe específica de substâncias fenólicas em vegetais, embora o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e em menor grau o propanol são frequentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos (Antolovich et al., 2000).

Tabela 3.1 Teor de compostos fenólicos de algumas frutas.

Fruto	Teor de fenólicos totais	Referência
Ameixa preta	143,5 ± 40,6 ^b	(Karakaya et al., 2001)
Amora-preta (<i>Rubus sp.</i>)	26,7 - 452,7 ^a	(Deighton et al., 2000)
Cereja	105,4 ± 27,0 ^b	(Karakaya et al., 2001)
Framboesa	114 – 178 ^a	(De Ancos et al., 2000)
Maçã	296,3 ± 6,4 ^a	(Sun et al., 2002)
Mirtilo (<i>Vaccinium</i>)	171 – 961 ^a	(Moyer et al., 2002)
Uva vermelha	201,0 ± 2,9 ^a	(Sun et al., 2002)

Fonte: adaptado de (Naczk e Shahidi, 2006).

^a Equivalente de ácido gálico/100 g de peso fresco.

^b Equivalente de catequina/100 g de peso fresco.

3.2.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos distribuídos nas plantas, sendo responsáveis por mais de 8000 polifenóis, incluindo mais de 4000 flavonoides identificados que ocorrem naturalmente (Harborne et al., 1999). Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, constituídos por quinze átomos de carbono dispostos em C₆-C₃-C₆ e podem ser subdivididos em antocianidinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis (Tsao e Yang, 2003) e os não flavonoides que compreendem: taninos, estilbenos, ligninas e os ácidos fenólicos que constituem uma classe importante de compostos fenólicos com funções bioativos, geralmente encontrados em plantas. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com sua estrutura: ácido hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico (Bravo, 1998). A classificação do tipo de flavonoides presente em um extrato de planta se baseia inicialmente no estudo das propriedades de solubilidade e nas reações de coloração. Os flavonoides podem ser separados por procedimentos cromatográficos e os componentes individuais identificados quando possível, por comparação com padrões (Heim et al., 2002). As duas classes de flavonoides consideradas como os mais importantes são os flavonóis e as antocianinas.

Os flavonoides e outros polifenóis são antioxidantes de plantas especialmente importantes por causa de seu alto potencial redox, que lhes permite atuar como agentes redutores e doadores de hidrogênio e oxigênio (Tsao e Yang, 2003). Também são os fotoquímicos mais comumente encontrados em café, maçã, uva, vinho tinto e especialmente chá, que contém, sobretudo, catequinas em sua composição (Graham, 1992, VAN ACQUIRE, 1996). Além disso, ajudam a proteger a planta contra a luz, fungos, patógenos e danos celulares oxidativos (Cook e Samman, 1996). Nos últimos anos, os flavonoides têm sido associados à redução na incidência de algumas doenças tais como: doenças do coração, certos tipos de câncer e diabetes (Cook e Samman, 1996, Kim et al., 2009) e (Conforti et al., 2009). Devido a estas características benéficas para a saúde humana, na atualidade há um grande interesse em pesquisas sobre os flavonoides, com o objetivo de encontrar frutas, plantas e resíduos agroindustriais como fonte de compostos fenólicos. Os flavonoides são normalmente extraídos a partir de plantas com metanol, etanol, água ou a sua combinação, mas em alguns casos estes solventes são acidificados (Naczki e Shahidi, 2006).

3.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água e bem conhecidos pela sua capacidade de proporcionar as cores vermelho, azul e violeta de uma grande variedade de flores e frutos, dependendo do pH. (Seeram et al., 2006), a quantidade de antocianinas presentes em frutos está relacionada a fatores climáticos, em particular à temperatura (Fennema, 2010) e a degradação, o que dificulta a comparação entre diferentes cultivos de um mesmo fruto e mais fácil ainda, comparar cultivos de frutos de diferentes espécies. As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, proteção contra a ação da luz, atração em mecanismos de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes. Apesar de existirem, aproximadamente 400 tipos de antocianinas presentes em diferentes plantas como cereja (*Prunus avium*), morango (*Fragaria vesca L.*), uva (*Vitis vinífera L.*), jabuticaba (*Plinia trunciflora*), repolho roxo (*Brassica oleracea*), entre outros. Poucos delas apresentam-se como fonte comercial desse corante (Kong, 2003; Mallacrida e Motta, 2006).

Benvenuti et al. (2004) avaliaram o teor de antocianinas pelo método pH diferencial em diversas cultivares de amora-preta (*Rubus fruticosus L.*) encontraram 67,4 a 126,9 mg/100 g, em framboesa (*Rubus idaeus L.*) na faixa de 29,2 a 41,2 mg/100 g e em groselha (*Ribes nigrum L.*) de 152,6 a 281,3mg/100 g. Os autores determinaram também a atividade antioxidantes dos extratos destas frutas *in natura* baseada na capacidade de sequestrar o radical DPPH e concluíram que o resultado demonstra claramente um efeito sinérgico das antocianinas e demais compostos presentes.

As antocianidinas são as estruturas básicas das antocianinas, das quais algumas são importantes fontes de corantes, até o momento há 17 antocianidinas conhecidas que ocorrem naturalmente, e que estão listadas na Tabela 3.2. As antocianinas se localizam principalmente na casca e ocasionalmente na polpa de frutas podendo, em alguns casos, conter um único tipo de pigmento, como foi observado em maçã (*Pyrus mallus*) e groselha roxa (*Ribes rubrum*), que contêm unicamente cianidina (Simóm et al., 2002).

Tabela 3.2 Antocianidinas que ocorrem naturalmente.

Nome	Padrão de substituição							Cor
	3	5	6	7	3	4	5	
Apigeninidina	H	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Aurantinidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Laranja
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Vermelho-azul
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Vermelho-alaranjado
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho-azul
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Vermelho-azul
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Vermelho-azul
6-Hydroxycianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Vermelho
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Vermelho-azul
5-Metilcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Vermelho-alaranjado
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Vermelho-alaranjado
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Vermelho-azul
Pulchellidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho-azul
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelho
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho

Fonte: adaptado de (Kong et al., 2003a).

H= hidrogênio; OH= hidroxila; O= oxigênio; OMe= grupo metila.

Kong et al. (2003b), relatam que as principais diferenças entre as antocianinas são o número de grupos hidroxilados, a natureza e o número de açúcares ligado à sua estrutura. Os açúcares geralmente ligados a antocianidinas são monossacáridos: glucose, galactose, ramnose e arabinose (Bureau et al., 2009). Além disso, as antocianinas diferem uns dos outros pelo seu grau de hidroxilação e metoxilação, onde apenas seis antocianidinas são as mais comuns na natureza: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina (Gross, 1987). A Tabela 3.3 mostra algumas destas antocianinas glicosiladas encontradas nos alimentos. As antocianinas são, provavelmente, o maior grupo de

compostos fenólicos presente na dieta humana e proporcionam uma vasta gama de benefícios para a saúde, tais como a prevenção de doenças do coração, atividade antiinflamatória (Bagchi et al., 2004, Galli et al., 2006, Tsang et al., 2005), e possuem conhecidas propriedades farmacológicas e fortes funções biológicas (Kong et al., 2003b).

Tabela 3.3 Exemplos de Antocianinas glicosiladas encontradas em alimentos.

Antocianinas glicosiladas	Principais fontes
Cianidina-3-glucosídeo	Uva, morango, cereja, jabolão, amora, maçã, vinho
Cianidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, cereja, figo, marmelo
Peonidina-3-glucosídeo	Uva, vinho, cereja, jabuticaba
Malvidina-3-glucosídeo	Uva, vinho
Malvidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, feijão, inhame
Cianidina-3-glactosídeo	Maçã, cacau
Cianidina-3-p-cumarilsoforosídeo-5-glucosídeo	Repolho roxo
Pelargonidina-3-soforosídeo-5-glucosídeo	Rabanete
Pelargonidina-3-glucosídeo	Morango, tamarindo
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjela, feijão, uva, romã
Delfinidina-3-cafeoilglucosídeo-5-glucosídeo	Berinjela
Petunidina-3-glucosídeo	Uva, vinho, mirtilo, laranja

Fonte: adaptado de (Mallacrida e Motta, 2006.)

Um estudo realizado em 18 cultivares de amora-preta, selecionadas no México e Chile apresentaram antocianinas monoméricas na faixa de 70,3 a 201 mg/100 g e identificaram a cianidina-3-glucosídeo (Figura 3.2) como a antocianina majoritária (Wang, 2000), além de algumas minoritárias como: cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-malonil-glucosídeo, cianidina-3-dioxalil-glucosídeo (Fan-Chiang e Wrolstad, 2005).

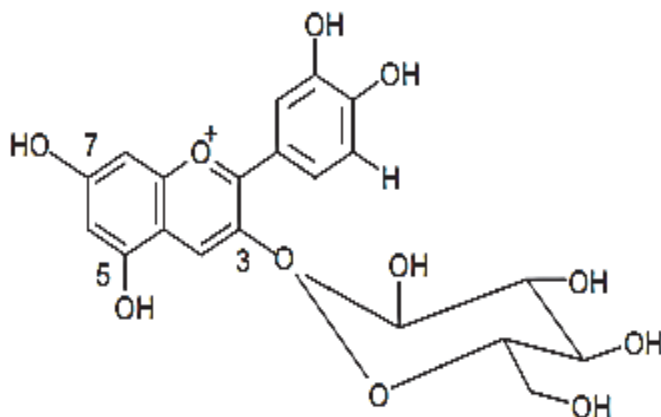


Figura 3.2 Estrutura da cianidina-3-glucosídeo.

As antocianinas podem se degradar devido a diferentes fatores, incluindo pH, luz, oxigênio, enzimas, ácido ascórbico e o tratamento térmico (Francis, 1989, Wang e Xu, 2007). Além de compostos fenólicos, como as antocianinas, outros compostos bioativos como os carotenoides estão presentes em *Rubus* sp, porém em quantidades menos expressivas.

3.3 FONTES NATURAIS DE POLIFENOIS

Os polifenóis, compostos que geralmente apresentam alta capacidade antioxidante, são amplamente distribuídos em plantas, como frutas, legumes, chá verde, tabaco e outros. Além dos polifenóis o reino vegetal oferece uma ampla gama de antioxidantes naturais que têm se tornado uma parte essencial da preservação e cuidados de saúde contemporânea. A toxicidade potencial de alguns antioxidantes sintéticos, contudo, intensificou esforços de investigação para descobrir e utilizar antioxidantes a partir de fontes naturais, tais como frutas e vegetais (Popa, 2007, Zhang et al., 2009). Os compostos fenólicos mais comumente encontrados em plantas estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Fontes de compostos fenólicos.

Compostos fenólicos	Fontes alimentares
<u>Ácidos fenólicos</u>	
Ácidos hidroxicinâmicos	Damascos, mirtilos, cenoura, cereais, peras, cerejas, frutas cítricas, sementes oleaginosas, pêssegos, ameixas, espinafre, tomate, berinjelas.
Ácidos hidroxibenzóico	Mirtilos, cranberries, cereais, semente oleaginosas.
<u>Flavonóides</u>	
Antocianinas	Mirtilos, groselhas negras e vermelhas, amoras, cerejas, uvas, morangos.
Chalconas	Maçãs.
Flavanoil	Maçãs, mirtilos, uvas, cebolas, alface.
Flavanonoil	Uvas.
Flavanonas	As frutas cítricas.
Flavonois	Maçãs, feijão, trigo mourisco, mirtilos, cranberries, escarola, alho-poró, alface, azeitona, pimenta, tomates.
Flavonas	Frutas cítricas, aipo, salsa, espinafre.
Isoflavonas	Soja .
Xantonas	Manga, mangostão.
<u>Taninos</u>	
Condensado	Maçãs, uvas, pêssegos, ameixas, peras, mangostão.
Hidrolisável	Romã, framboesas.

Fonte: adaptado de (Naczk e Shahidi, 2006).

3.3.1 Subprodutos agroindustriais como fonte de compostos fenólicos

As frutas, hortaliças, diferentes ervas, resíduos agrícolas e industriais são fontes atraentes de antioxidantes naturais (Moure et al., 2001, Volf e Popa, 2004). Especial atenção está focada, atualmente na extração de compostos de resíduos das agroindústrias. Grande quantidade desses materiais, incluindo sementes, cascas, bagaço, entre outros, são gerados a cada ano na forma de resíduos (Martins et al., 2011). Tais subprodutos, após o processamento geram em torno de 20 % de resíduo que é composto basicamente de cascas e sementes e que ainda contém uma grande quantidade de compostos fenólicos (antocianinas). Alguns estudos têm sido feitos em subprodutos provenientes de sucos e derivados, que poderiam ser potenciais fontes ricas de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos (Ignat et al., 2011).

Nas cascas de vários frutos foram encontrados maiores quantidades de compostos fenólicos que nas partes carnudas comestíveis. Por exemplo, as cascas das maçãs contêm (catequinas, ácido caféico, ácido clorogênico, rutina e derivados de quercetina), tomates contêm (licopeno), uvas, romãs, pêssegos e pêras encontraram-se o dobro da quantidade de fenólicos totais do que na polpa (Balasundram, Sundram e Samman, 2006). O bagaço de uva representa aproximadamente 20 % do peso de uvas processadas, de forma que a composição varia consideravelmente, dependendo do tipo de uva condições climáticas, período do ano e forma de processamento (destinado a suco, vinhos, etc.). O conteúdo fenólico presente no bagaço de uva é composto de antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, alcoóis e estilbenos (Igartuburu et al., 1997, Bravo e Saura-Calixto, 1998, Nurgel e Canbas, 1998). Por outro lado, os resíduos de romã, por exemplo, contêm uma quantidade significativa de antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina) e taninos hidrolisáveis (catequina, epicatequina e ésteres de ácido gálico) (Cuccioloni et al., 2009, Gil et al., 2000).

Em cascas e sementes de outros resíduos de origem vegetal também foram encontradas grandes quantidades de compostos fenólicos (Tabela 3.5). Em particular, na maioria dos casos, os subprodutos podem apresentar teores semelhantes ou mesmo mais altos de compostos bioativos que o produto final (Ayala-Zavala et al., 2011). Alguns dos princípios ativos de alguns medicamentos são compostos polifenólicos. Flavonas, por exemplo possuem atividade antimutagênica (Nakasugi e Komai, 1998) e flavanonas e

xantonas exibem atividades antivirais, antimicrobianas e antiinflamatórias. Além disso, os polifenóis têm muitas aplicações industriais. Por exemplo, eles podem ser utilizados como conservantes de alimentos, ou na produção de tintas, papel, e cosméticos. Por estas razões, grande esforço tem sido feito para caracterizar os fenóis que ocorrem em diferentes tecidos vegetais (Pinelo, Fabbro et al. 2005). Segundo Fachinello (2008), o crescente interesse na extração de antocianinas da casca e bagaço das frutas vermelhas surgiu devido a suas inúmeras propriedades a favor da saúde.

Tabela 3.5 Exemplos de resíduos como fontes de compostos fenólicos.

Resíduo	Solvente	Compostos identificados	Referência
Casca de batata	Água (100°C)	CA, GA, PA	(Rodriguez de Sotillo et al., 1994a)
Bagaço de maçã	70% de acetona	EC, CA, 3-hPhlz, Phl-2-x, Phlz, Q-3-gal, Q-3-glu, Q-3-xyl, Q-3-ara, Q-3-rha	(Lu e Foo, 1997)
Casca de limão	Metanol- Água	Cumarina (8-geranyloxypsolaren, 5-geranyloxypsolaren, 5-geranyloxy 7-metoxicumarina	(Miyake e Shibamoto, 1998)
Sementes de limão	Metanol	CaA, pCA (cis e trans), FA, SA, Eri, NAr, Neh	(Bocco et al., 1998)
Sementes de uva	95% de etanol	pCA, GA, CaA, C, EC, procianidinas (B1-B8)	(N. Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1999)

Fonte: adaptado de (Moure et al., 2001)

CA = ácido clorogênico; GA = ácido gálico; PA = ácido protocatecuico; EC = epicatequina; 3-hPhlz = 3-hydroxyphloridzin; Phl-2-x = phloretin-2-xyloglucoside; Phlz = phloridzin; Q-3-gal = quercetina-3-galactoside; Q-3-glu = quercetina-3-glicosídeo; Q-3-xyl = quercetina-3-xyloside; Q-3-ara = quercetina-3-arabinoside; Q-3-rha = quercetina-3-rhamnoside; CaA = ácido caféico; pCA = ácido p-coumárico; FA = ácido ferúlico; AS = ácido síringico; Eri = eriocitrin; NAr = naringina; Neh = neo-hesperidina; pCA = p-coumárico; C = catequina; EC = epicatequina.

3.4 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Quando uma substância é levada a uma pressão e temperatura acima do seu ponto crítico ele se torna um fluido supercrítico. Na Figura 3.3 é apresentado o diagrama de fases de uma substância pura. Neste diagrama observa-se que a fase gasosa se concentra na região de menor pressão e maior temperatura, ao contrário da fase sólida. A fase líquida surge neste entremeio, a partir do ponto triplo. As linhas de separação dos estados físicos são definidas pela descontinuidade de algumas propriedades físicas. Entre elas, destacam-se a densidade, a viscosidade e o coeficiente de compressibilidade. Para a maioria das substâncias, a fase gasosa em relação à fase líquida possui densidade de 10^2 a 10^3 vezes menor; a viscosidade de 10 a 10^2 vezes menor; e compressibilidade de 10^4 a 10^5 vezes maior. Nestas condições à medida que a pressão aumenta, a compressibilidade da fase gasosa diminui, e a densidade aumenta, da mesma forma, à medida que a temperatura aumenta, a viscosidade e a densidade da fase líquida diminuem (Herrero et al., 2006).

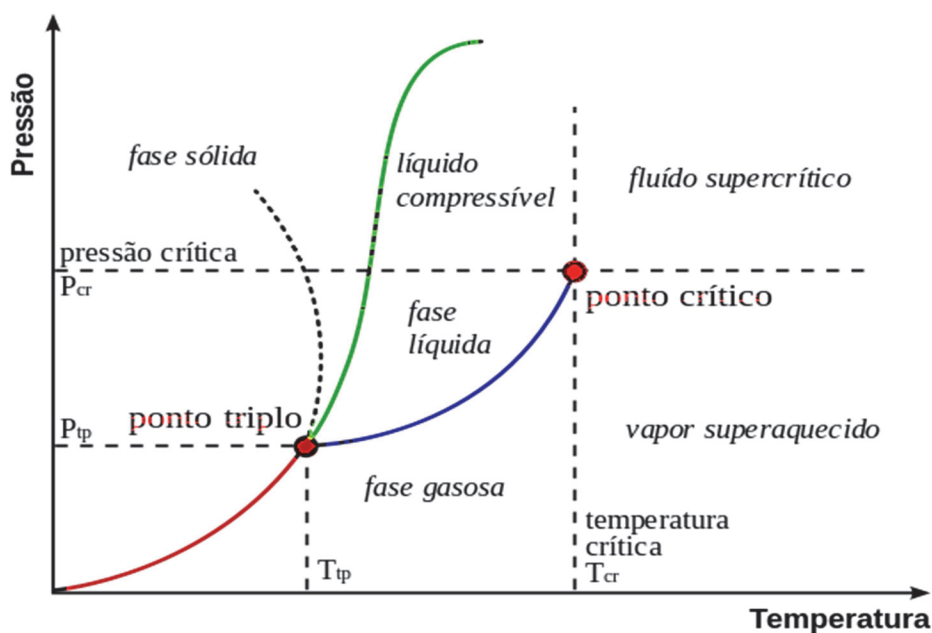


Figura 3.3 Diagrama de fases de uma substância pura.

Devido às suas diferentes propriedades físico-químicas, o fluido supercrítico oferece várias vantagens operacionais sobre os solventes tradicionais (Anklam et al., 1998). Também por ter baixa viscosidade e difusividade relativamente elevada, fluidos

supercríticos têm melhores propriedades de transporte do que os líquidos e podem difundir-se facilmente através de materiais sólidos. Uma das principais características de um fluido supercrítico é a possibilidade de alterar sua densidade, alterando a sua pressão e temperatura. Uma vez que a densidade está diretamente relacionada com a solubilidade (Del Valle e Aguilera, 1999, Raventós et al., 2002), o poder de solubilização do fluido supercrítico pode ser alterado pela modificação de sua temperatura e pressão. Outras vantagens, em comparação com outras técnicas de extração, são a utilização de solventes geralmente conhecidos como seguros, a maior eficiência do processo de extração (em termos de aumento do rendimento e tempos menores de extração), e a possibilidade de uma associação direta com técnicas cromatográficas tais como a cromatografia gasosa (GC) ou a cromatografia de fluido supercrítico (SFC) (Raventós et al., 2002).

Alguns solventes normalmente usados como fluidos supercríticos são mostrados na Tabela 3.6. O dióxido de carbono supercrítico é a substância mais usada por suas propriedades termodinâmicas e físico-químicas, tais como propriedades críticas moderadas (304,25 K e 7,38 MPa) e para obter extratos naturais, como é mostrado na Tabela 3.7. O dióxido de carbono também não é tóxico, quimicamente estável, não inflamável e facilmente removido do material extraído (Castro-Vargas et al., 2011, Reverchon e De Marco, 2006).

Tabela 3.6 Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica.

Nome	Tc (°C)	Pc (MPa)	ρ (g/cm ³)
Dióxido de carbono	31	7,38	0,469
Etileno	9	5,04	0,218
Tolueno	319	4,10	0,292
Etanol	241	6,14	0,276
Água	374	22,12	0,323
Benzeno	289	4,89	0,218

Tc = temperatura crítica; Pc = pressão crítica; ρ = densidade.

Fonte: adaptado de (Mendes et al., 2003).

Tabela 3.7 Resumo de publicações sobre aplicações de CO₂ em na indústria de alimentos.

Amostra	Analito (s)	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Referência
<i><u>Extração de cor natural</u></i>				
Cenoura	Carotenos	34,2-57,0	30-50	(Vega et al., 1996)
Folha de alfafa	Caroteno e luteína	10,0-70,0	40	(Favati et al., 1998)
Batata doce	β-caroteno	13,8-41,4	38-48	(Spanos et al., 1993)
Sementes de Bixa Orellana	Bixina	20,7-48,3	40-55	(Degnan et al., 1991)
Resíduos de tomate	β-caroteno e licopeno	20,0-30,0	35-65	(Baysal et al., 2000)
Pele do tomate	Licopeno	40,5	60-110	(Ollanketo et al., 2001)
Pele da uva vermelha	Antocianinas	7,0-15,0	80	(Blasco et al., 1999)
<i><u>Extração de aromas naturais</u></i>				
Óleo de casca de laranja amarga	Terpenos	7,7-12,0	40	(Chouchi et al., 1996)
Casca de laranja seca	Óleos essenciais	10,0-28,0	40-50	(Blasco et al., 1999)
Suco de frutas cítricas	Limonin	20,7-41,4	30-60	(Kimball, 1987)
Plantas aromáticas	Óleos essenciais	20,0	40	(Blasco et al., 1999)
<i><u>Extração de antioxidantes</u></i>				
Semente de tamarindo	Antioxidante	10,0-30,0	40-80	(Tsuda et al., 1995)
Folhas de eucalipto	Óleo com alta atividade antioxidante	20,0	50	(Fadel et al., 1999)
<i><u>Descafeinação de café e chá</u></i>				
Café	Cafeína	16,0-22,0	90	(Williams, 1981)
Chá	Cafeína	25,0-35,0	50-80	(Calabuig Aracil, 1998)

Fonte: adaptado de (Sahena et al., 2009).

A extração de compostos a partir de matérias-primas naturais com fluido supercrítico, efetivamente, resolve questões associadas com altas temperaturas e ao uso de solventes orgânicos empregados em extrações convencionais (Pellerin, 1991) (Tabela 3.8).

As temperaturas empregadas no processo de extração são moderadas e o único solvente usado, o dióxido de carbono, é totalmente separado após a descompressão, no final da extração. Todas essas características fazem que o CO₂ pareça o solvente ideal. Sua principal desvantagem é sua apolaridade, o que torna ideal para lipídeos, gorduras e substâncias não polares. A utilização dessa substância/CO₂ pura não é apropriada em menor eficiência para a extração de compostos polares e matrizes com alto poder de retenção, fazendo-se necessário o uso de modificadores (cossolventes) para aumentar seu poder de solvatação (Cortesi et al., 1999, Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007). A adição de cossolventes orgânicos como etanol, metanol, acetona, entre outros solventes polares, aumenta o poder de solvatação do CO₂ e o rendimento da extração (Adil et al., 2007).

Tabela 3.8 Compostos bioativos extraídos por diferentes solventes.

Água	Etanol	Metanol	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Alcalóides	Flavonoides
Taninos	Polifenóis	Terpenóides	Terpenóides	
Saponinas	Flavonol	Saponinas		
	Terpenóides	Taninos		
	Alcalóides	Flavonas		
		Polifenóis		

Fonte: adaptado de (Cowan, 1999).

O processo de extração supercrítica de produtos naturais pode ser analisado a partir das curvas globais de extração (OEC – overall extraction curves). As condições utilizadas para obter uma OEC são definidas no melhor ponto obtido na etapa de rendimento global. A análise da melhor condição neste ponto leva em conta fatores de gasto de energia como pressão e temperatura, quantidade de solvente utilizado, vazão e o rendimento (Prado,

2009). Uma curva cinética pode contar com até três etapas distintas durante o processo, conforme é mostrado na Figura 3.4.

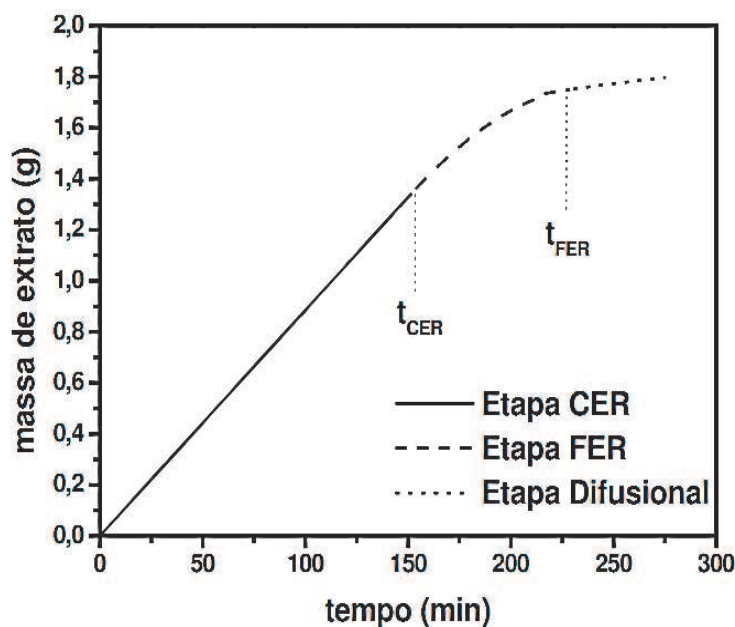


Figura 3.4 Curva global apresentando as três etapas de extração.

Fonte: adaptado de (Martínez, 2005).

Na Figura 3.4 a curva de extração é dividida nos seguintes períodos: Período de taxa constante de extração CER (*Constant Extraction Rate period*), período decrescente de extração FER (*Falling Extraction Rate period*) e período de taxa controlada pela difusão DC (*Diffusion-Controlled rate period*). No período de CER, a extração ocorre principalmente por convecção, a uma taxa constante. O soluto está principalmente na superfície do material de alimentação e é facilmente solubilizado pelo dióxido de carbono supercrítico. O período FER começa quando a taxa de extração de soluto sofre uma diminuição causada por paredes celulares não uniformemente quebradas ou até esgotar o soluto distribuído sobre a superfície das paredes. O período de transferência de massa DC é regido, principalmente, pela difusão, e não há mais soluto na superfície dos sólidos. Os parâmetros de processo que podem ser determinados a partir de uma OEC são: a duração do período de CER (t_{CER}), a duração do período de FER (t_{FER}), o rendimento do período CER (R_{CER}), a taxa de transferência de massa durante o período de CER (M_{CER}) e a

proporção em massa de soluto na corrente de solvente na saída do extrator, durante o período CER (Y_{CER}) (Meireles, 2008).

3.5 ULTRASSOM

Ultrassom é definido como ondas de som com frequência que excede o limite de audição do ouvido humano, e compreende ondas mecânicas que necessitam de um meio para se espalhar. A diferença entre som e o ultrassom é a frequência da onda. Alguns animais utilizam ultrassom para navegação (golfinhos) ou caça (morcegos). O ultrassom é uma das tecnologias emergentes que foram desenvolvidas para maximizar a qualidade e garantir a segurança dos produtos alimentares, e também é aplicado para conferir efeitos positivos no processamento de alimentos, tais como a melhoria na transferência de massa (Knorr et al., 2011). Com base na gama de frequências, as aplicações de ultrassom podem ser divididas em baixa e alta intensidade.

3.5.1 Ultrassom de baixa intensidade

Durante muitos anos o ultrassom de baixa intensidade esteve envolvido em análises não destrutivas, especialmente para avaliação da qualidade. Esta técnica é mais frequentemente aplicada como uma técnica analítica para fornecer informação sobre as propriedades físico-químicas dos alimentos (firmeza, maturação, teor de açúcar e acidez) (McClements, 1997).

3.5.1.1 Princípios de ultrassom de baixa intensidade

O som se propaga como ondas mecânicas que causam compressões e descompressões alternadas (Blitz, 1963, Blitz, 1971). Estas ondas de ultrassom têm características de comprimento de onda, velocidade, frequência, pressão e período. A velocidade do som é o produto da frequência e comprimento de onda, assim, ondas sonoras de alta frequência têm comprimento de onda curto, enquanto ondas de baixa frequência têm comprimento de onda longo. A velocidade de ultrassom (V) é determinada pela densidade (ρ) e elasticidade (E) do meio, de acordo com a equação de Newton-Laplace (Blitz, 1963).

$$\left(V = \sqrt{\frac{E}{\rho}} \right) \quad \text{Equação 3.1}$$

Outros parâmetros de ultrassom que se correlacionam com muitas propriedades físico-químicas é o coeficiente de atenuação e da impedância acústica.

3.5.2 Ultrassom de alta intensidade

O ultrassom de alta intensidade pode alterar as propriedades físicas, mecânicas e químicas dos alimentos (Awad et al., 2012, Mason et al., 1996). Esta tecnologia emergente tem sido utilizada como alternativa para as operações de processamento de alimentos convencionais para controlar a microestrutura e modificar as características de texturas de produtos com gordura, emulsificação, modificar as propriedades funcionais das proteínas de diferentes alimentos e facilitar a extração de vários componentes bioativos (Gallego-Juárez et al., 2010).

3.5.2.1 Princípios de ultrassom de alta intensidade

Em geral, a energia, a intensidade da pressão, velocidade e temperatura são os parâmetros mais importantes que afetam o ultrassom de energia. O ultrassom de alta potência pode ser descrito pela seguinte equação (Patist e Bates, 2008).

$$P_a = P_{amax} \cdot \sin(2\pi ft) \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde: P_a pressão acústica é (uma onda sinusoidal), que é dependente do tempo (t), da frequência (f) e a amplitude da pressão máxima da onda (Muthukumarán et al., 2006). P_{amax} está relacionada com a entrada de energia ou intensidade (I) do transdutor:

$$I = \frac{P_{amax}}{2\rho v} \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde ρ é a densidade do meio e v é a velocidade do som no meio.

3.6 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)

A extração assistida por ultrassom (Ultrasound-assisted extraction) é uma tecnologia emergente que pode acelerar a transferência de calor e massa, e tem sido usada sucessivamente no campo da extração de compostos ativos. Durante o processo de aplicação de ultrassom, ondas longitudinais são criadas quando uma onda sonora encontra um meio líquido, criando regiões alternadas de compressão e expansão induzidas sobre as moléculas (Figura 3.5) (Soria e Villamiel, 2010b). Nestas regiões de mudança de pressão a cavitação ocorre e bolhas de gás são formadas. Estas bolhas têm uma maior área de superfície durante a expansão do ciclo, o que aumenta a difusão do gás, fazendo que a bolha se expanda. Um ponto crítico é alcançado durante o ciclo de compressão em que a energia ultrassônica fornecida não é suficiente para manter a fase de vapor dentro da bolha. Como consequência, ocorre a condensação rápida e grandes quantidades de energia são liberadas (Soria e Villamiel, 2010a, Pico, 2012) e (Chemat et al., 2011a).

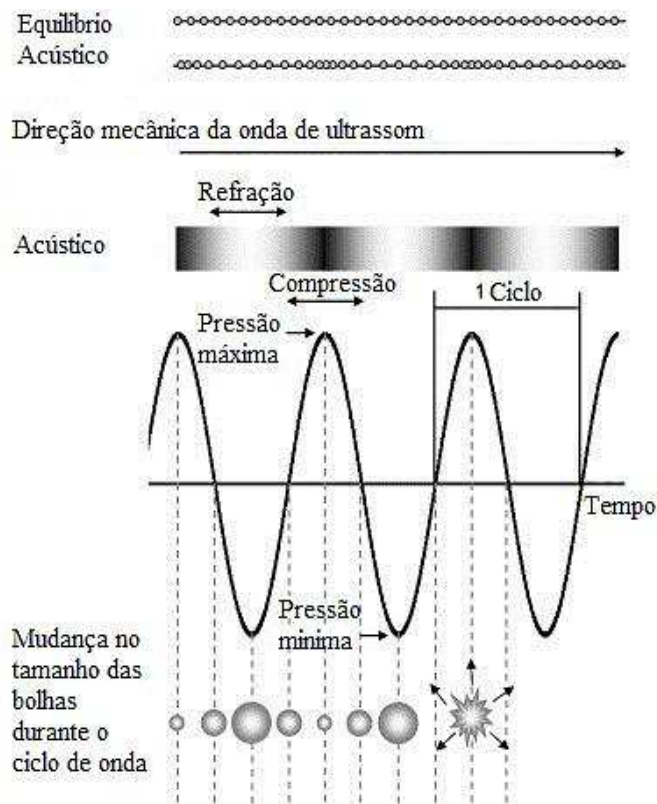


Figura 3.5 Cavitação ultrassônica.
Fonte: adaptado de (Soria e Villamiel, 2010a).

Outra aplicação do ultrassom é durante a extração de compostos vegetais. O uso de ultrassom permite melhor penetração do solvente no corpo da planta e também pode quebrar as paredes celulares (Soria e Villamiel, 2010a). Como se observa na Figura 3.6, uma bolha de cavitação pode ser gerada perto da superfície do material da planta (a); em seguida, durante um ciclo de compressão se produz o colapso da bolha (b) e um microjato é criado na parede da célula da matriz da planta a ser extraída (b e c). A alta pressão e alta temperatura associados a este processo ajudam a destruir as paredes das células da matriz da planta e o seu conteúdo pode ser liberado para o meio (d). Esta é uma ferramenta muito interessante para a extração de ingredientes a partir de produtos naturais (Chemat et al., 2011b). Como consequência, o emprego de ultrassom tem benefícios no aumento de transferência de massa, melhor penetração de solvente, menor dependência de uso de solventes, extração em temperaturas mais baixas, as taxas de extração mais rápidas e maiores rendimentos de produto (Soria e Villamiel, 2010a, Pico, 2012) e (Chemat et al., 2011b).

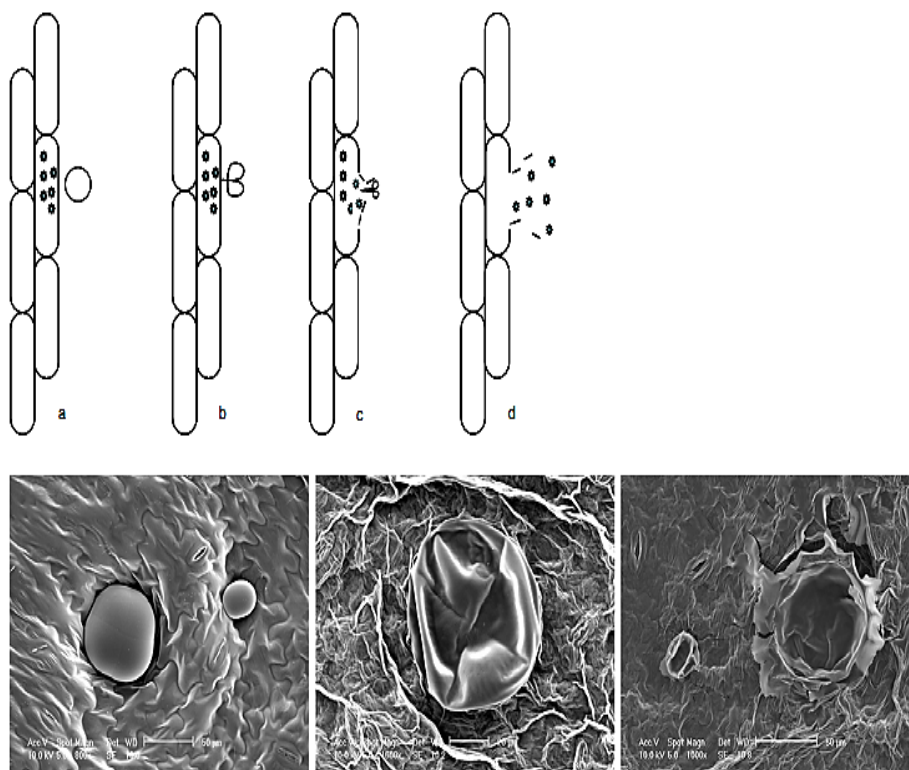


Figura 3.6 Colapso da bolha de cavitação e liberação de material vegetal.

Fonte: adaptado de (Chemat et al., 2011b).

A capacidade do ultrassom em causar cavitação depende das características do ultrassom (frequência e intensidade), das propriedades do produto (viscosidade e tensão superficial) e das condições de ambiente (temperatura e pressão). Esta técnica exige um meio líquido, um gerador de energia e um transdutor, o qual converte energia elétrica, magnética ou cinética em energia acústica (Mulet et al., 2003). Os transdutores são classificados em três grupos: os transdutores operados mediante fluidos, os transdutores magnetoestrictivos e os transdutores piezoelétricos tipo sanduíche, que são os mais utilizados na atualidade. O fundamento de estes transdutores baseia-se no efeito piezoelétrico (Gallego-Juárez et al., 2010) como se mostra na Figura 3.7.

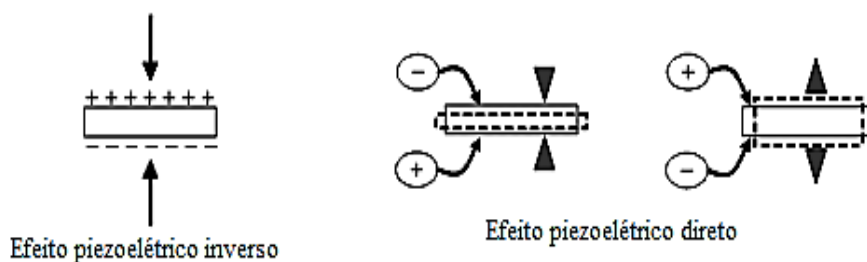


Figura 3.7 Efeito piezoelétrico.
 Fonte: adaptado de (Pérez, 2007).

O ultrassom é bem conhecido por ter um efeito significativo sobre vários processos na indústria química e de alimentos. Muita atenção tem sido dada à aplicação de ultrassom para a extração de produtos naturais. Aromas, pigmentos, antioxidantes, e outros compostos orgânicos e minerais foram extraídos e analisados de forma eficiente a partir de uma variedade de matrizes (principalmente tecidos animais, alimentos e materiais de plantas).

A Tabela 3.9, apresenta as vantagens da UAE em comparação com os novos métodos de extração. A extração assistida por ultrassom pode eventualmente ser mais simples (Luque-García e Luque De Castro, 2003) e mais rápida (Lopez-Avila et al., 1996). Além disso, a extração assistida por ultrassom não é restringida pelo tipo de solvente ou pelo teor de umidade. A utilização de ultrassom representa uma forma potencialmente eficaz de melhorar os processos de transferência de massa.

Tabela 3.9 Vantagens e desvantagens das técnicas de extração.

	UAE	MAE	SFE	ASE
Nome	<i>Extração assistida por ultrassom</i>	<i>Extração assistida por microondas</i>	<i>Extração com fluido supercrítico</i>	<i>Extração por aceleração de solvente</i>
Breve descrição	A amostra é imersa em solvente e submetidas a ultrassom, utilizando uma sonda.	A amostra é imersa em solvente e submetidas à energia de microondas.	A amostra é colocada num recipiente de alta pressão e é atravessado continuamente pelo fluido supercrítico.	A amostra é aquecida por um forno convencional e é atravessada pelo solvente de extração.
Tempo de extração	10-60 min	3-30 min	10-60 min	10-20 min
Uso de solventes	50-200 ml	10-40 ml	2-5 ml (sólido) 30-60 ml (líquido)	15-60 ml
Investimento	Baixo	Moderada	Alto	Alto
Vantagens	Fácil de usar	Rápido, Fácil de usar e consumo moderado de solvente.	Rápido, baixo consumo de solvente, filtração não necessária.	Rápido, filtração não necessária e baixo consumo de solvente.
Inconvenientes	Utiliza grandes quantidades de solventes e etapa de filtração requerida.	Etapa de filtração requerida.	Muitos parâmetros para otimizar.	Possível degradação dos analitos termolábeis.

Fonte: adaptado de (Chemat et al., 2011a).

Ao longo de muitos anos, foi demonstrado que a ação combinada de ultrassom e dióxido de carbono supercrítico para a extração pode ser utilizada para melhorar significativamente a taxa de extração ou rendimento do óleo de sementes de amaranto (Bruni et al., 2002), óleo de semente de chá (Rajaei et al., 2005), óleo de amêndoa (Riera et al., 2004) e gingeróis de gengibre (Balachandran et al., 2006). O rendimento dos compostos pungentes de gengibre é significativamente aumentado devido à influência de ultrassom, com melhorias de até 30 % no final do período de extração. O estudo foi avaliado com base na extração de amostra de gengibre liofilizado. Para melhorar a eficácia do processo deve ser reduzido o tamanho de partícula sem desnaturar o material a ser extraído (Balachandran et al., 2006), como também outras condições mostradas na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 Condições operacionais de extração com CO₂ supercrítico assistido por ultrassom.

Matéria-prima	Amêndoa (<i>Prunus amygdalus</i>)	Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	Coix (<i>Coix lachryma-jobi</i> <i>L. var. Adlay</i>)	Marigold (<i>Tagetes erecta</i> <i>L.</i>)
Temperatura (°C)	55	20 e 40	30 - 55	55
Pressão (MPa)	28	6,8 e 16	10 - 30	25
Partícula (mm)	3-4 e 9-10	4-8	0,3-0,45	0,245-0,35
Potência (W)	50	100 e 300	0-110	0-400
Frequência (KHz)	20	20	20	25 e 33
Rendimento (%)	30	30	14	65
Referência	(Riera et al., 2004)	(Balachandran et al., 2006)	(Ai-jun et al., 2006)	(Gao, 2009)

Fonte: adaptado de (Santos, 2013).

Esta análise mostra que a tecnologia de extração supercrítica com dióxido de carbono assistida por ultrassom, hoje em dia, representa uma forma limpa para acelerar e melhorar os processos de transferência de massa e aumentar a extração de componentes, tais como polifenóis, antocianinas, compostos aromáticos, polissacarídeos, óleos e compostos funcionais (Vilkhu et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados para a determinação das condições dos parâmetros de processo de obtenção dos extratos de bagaço de amora-preta (*Rubus sp.*), assim como a avaliação e o perfil da composição química dos extratos. O Trabalho foi realizado no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA) —DEA/FEA/UNICAMP. A Figura 4.1 mostra o diagrama de fluxo com as atividades realizadas no projeto.

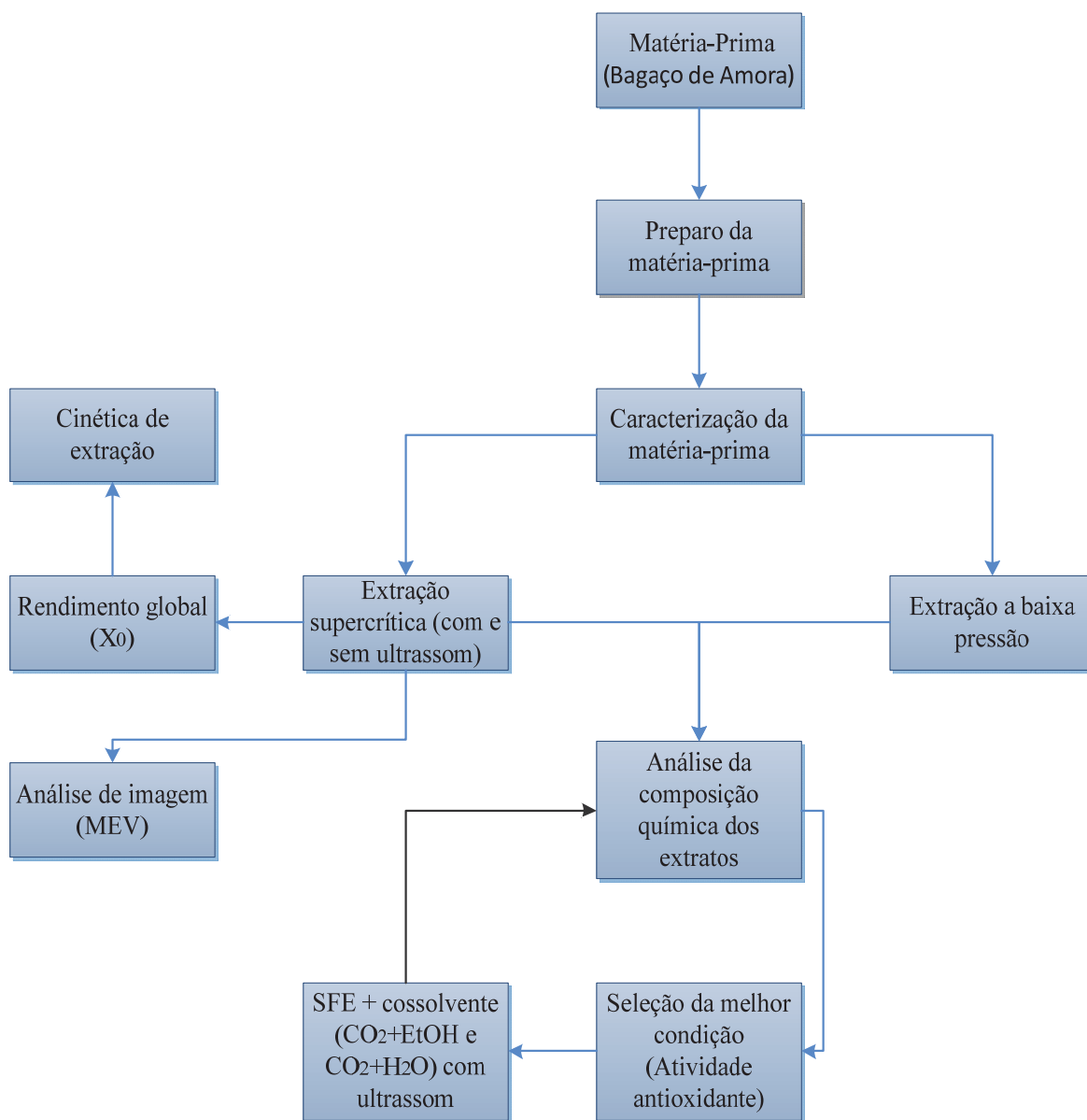


Figura 4.1 Diagrama de fluxo com as atividades realizadas no projeto.

4.1 MATÉRIA-PRIMA

4.1.1 Origem e preparo da matéria-prima

A matéria-prima estudada neste trabalho foi o resíduo do processamento da polpa da amora-preta (*Rubus* sp.) cedido pela empresa Sítio do Bello (Paraibuna, São Paulo, Brasil) cuja coordenada geográfica é 23° 27' 53.94" Sul e 5° 42' 31.88" Oeste. Após o recebimento da matéria-prima no laboratório, e com o objetivo de retirar materiais estranhos, foi feita uma limpeza e seleção manual. A matéria-prima selecionada foi acondicionada em sacos de polietileno de cor preta, para protegê-lo da luz, e armazenado em freezer doméstico (Metalrio, DA420, São Paulo, SP) a uma temperatura de -18 °C, até a realização dos experimentos. O bagaço de amora-preta com umidade inicial de 69 % foi submetido ao processo de secagem em estufa (modelo TE 395-1, Tecnal, São Paulo, SP), conforme (AOAC, 1997; método 925.10). Após a secagem, a matéria-prima foi triturada em liquidificador doméstico por 30 segundos, com a finalidade de fracioná-la e homogeneizá-la, e assim diminuir a resistência à transferência de massa no interior das partículas sólidas e aumentar o rendimento de extração. Costuma-se reduzir o tamanho das partículas para aumentar a área de contato sólido/solvente e diminuir a distância que o soluto deve percorrer no interior da partícula (Brunner, 1994). O material triturado foi acondicionado em embalagem plástica, identificado e armazenado novamente em freezer a -18°C. A Figura 4.2 mostra as etapas de pré-tratamento da matéria-prima.

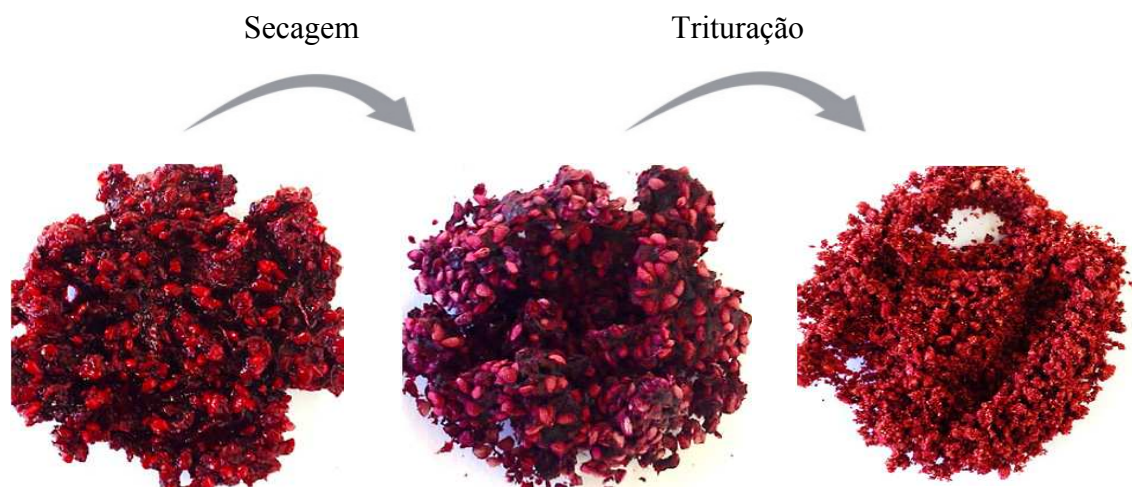


Figura 4.2 Etapas de pré-tratamento da matéria-prima.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A caracterização do bagaço de amora-preta foi realizada seguindo os métodos oficiais da (AOAC, 1997).

4.2.1 Determinação de umidade (AOAC, 1997; método 925.10)

O método utilizado foi o gravimétrico em estufa a 105 °C (modelo TE 395-1, Tecnal, São Paulo, SP). Aproximadamente 5 gramas de amostra foram colocados em cadinhos de alumínio, ficando em estufa até a secagem. Os cadinhos contendo a amostra foram, então, resfriados à temperatura ambiente em dessecador. Uma vez resfriados, os cadinhos foram pesados, obtendo novamente sua massa. Logo após, os cadinhos retornaram à estufa e este procedimento foi repetido até que a massa ficasse constante. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

4.2.2 Análise da composição centesimal

A determinação do teor de resíduo mineral fixo (cinzas) foi realizada pela incineração em mufla a 550 °C segundo o método 972.15 (AOAC, 1997). O teor de proteínas (nitrogênio total) foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando fator de 6,25 para a conversão do nitrogênio em proteína (AOAC, 1997; método 970.22). Os lipídios totais foram determinados com extração da fração etérea por fluxo intermitente, utilizando éter de petróleo (Quemis®, Brasil, Lote 36128) como solvente sob refluxo em aparelho de Soxhlet segundo o método 963.15 (AOAC, 1997).

4.3 EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO.

As extrações convencionais ou extrações a baixa pressão, que incluem o emprego de diferentes solventes orgânicos, foram realizadas a fim de compará-las com o processo de extração supercrítica assistida por ultrassom e a extração supercrítica com co-solvente, quanto ao rendimento dos extratos e composição, em termos de compostos fenólicos, atividade antioxidante e conteúdo de antocianinas. Os extratos obtidos após a extração passaram por um processo de eliminação de solvente, em evaporador rotativo (Heildoph

Instruments modelo Laborota 4001, Viertrieb, Alemanha). As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes utilizados, a fim de evitar alterações do extrato.

A extração por Soxhlet foi realizada segundo o método 963.15 (AOAC, 1997), utilizando álcool etílico P.A. (Êxodo Científica, Brasil, Lote: AE5761RA) como solvente à temperatura de 50 °C. O sistema de extração em Soxhlet é composto de um extrator acoplado na extremidade inferior a um balão de 250 mL, e na parte superior, a um condensador Figura 4.3. Para cada extração, aproximadamente 5 gramas de matéria-prima foram acondicionadas em cartucho de papel filtro e este foi inserido no extrator, enquanto no balão foram adicionados 200 mL de solvente, que era aquecida por uma manta de aquecimento (Fisatom, Mod.52, Brasil). Os processos de extração foram realizados em duplicatas e tiveram duração de 6 horas. Os extratos obtidos após a evaporação do solvente, foram acondicionados em freezer doméstico (Consul, Mod.CRB36, Brasil) a -18 °C até a realização das análises.

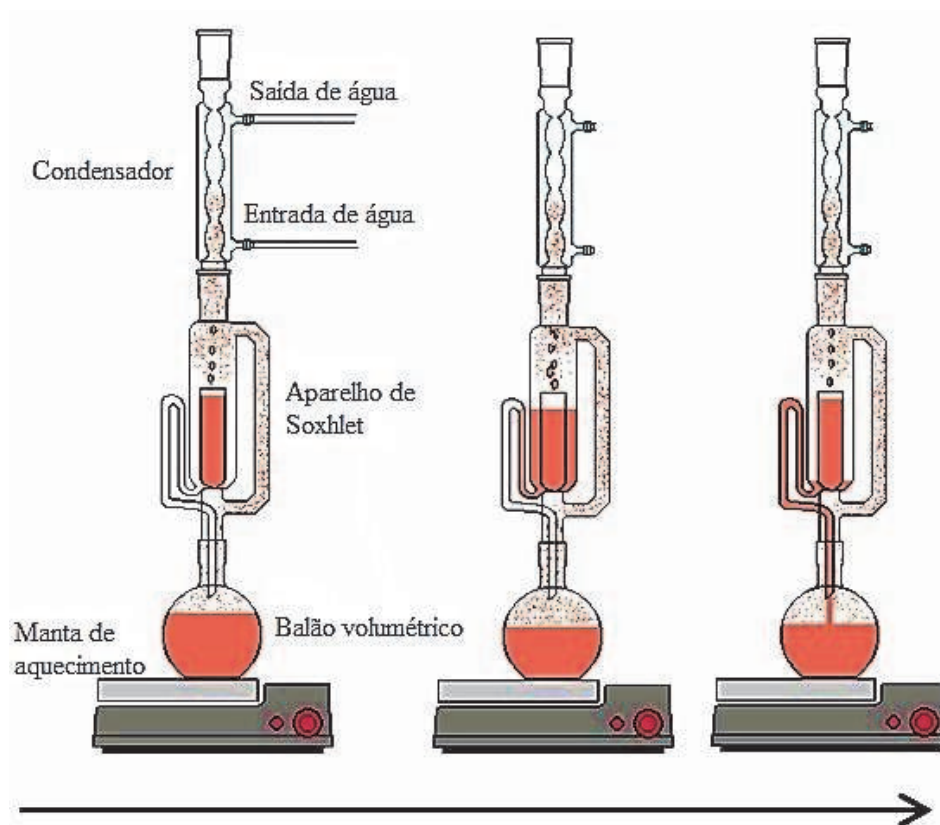


Figura 4.3 Sistema de extração pelo método Soxhlet.

A maceração é um método de extração muito utilizado na qual consiste em por em contato a matéria-prima com a quantidade de solvente preestabelecida á temperatura ambiente em recipiente fechado, durante um período de tempo prolongado (dias ou horas). Além, disso é um processo não seletivo que resulta num equilíbrio de concentração entre a matéria-prima e o solvente e é influenciado por fatores que dependem da matéria-prima (sua natureza, tamanho de partícula, grau de umidade e quantidade em peso), e do solvente (sua seletividade e quantidade em volume) (Melecchi, 2005).

A maceração é o método escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alterações pelo calor ou pelo ar e são solúveis a temperatura ambiente, em um solvente que não deve ser volátil (Miranda *et al.*, 2001). Dentre as desvantagens do processo estão á lentidão, a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da matéria-prima quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas. Apesar dos inconvenientes apresentados, ainda é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à sua simplicidade e custos reduzidos.

A extração por maceração do bagaço da amora-preta foi feita em duplicata e de acordo com a metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001). O processo envolveu a imersão da matéria-prima (bagaço de amora-preta) em álcool etílico P.A. (Êxodo Científica, Brasil, Lote: AE5761RA). Pesou-se aproximadamente 5 gramas do resíduo de amora em balança analítica (Bel engineering, USA) posteriormente o resíduo foi transferido para um recipiente, onde em seguida adicionou-se 160 mL de álcool etílico. Uma vez fechado o recipiente com o macerado deixou-se repousar durante um dia, agitando-se esporadicamente com um bastão de vidro. A maceração transcorreu à temperatura ambiente (25 °C). Quando visualmente se percebia que a solução estava com cor característica da matéria-prima (avermelhada), então está era filtrada através de um funil normal com papel filtro e coletada num frasco âmbar de volume adequado. O extrato filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo que foi acoplado em um rota-evaporador (Tecnal[®], Mod.TE-211,Brasil) sob vácuo (Tecnal[®], Mod.TE-058, Brasil) em banho termostático a 40 °C (Marconi[®], Mod.MA-1846, Brasil), onde o álcool etílico foi evaporado. Os extratos posteriormente foram armazenados em freezer (Consul, Mod.CRB36, Brasil) a -18 °C até a realização das análises.

4.4 UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Os experimentos de extração foram realizados usando uma unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom Figura 4.4.



Figura 4.4 Unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom.

A unidade de extração supercrítica está composta de uma célula de extração com volume de 300 mL, que suporta pressões de até 45 MPa. A unidade é equipada com um banho de refrigeração (Marconi, modelo MA184, Piracicaba, São Paulo) que controla a temperatura do CO₂ na entrada da bomba, um banho de aquecimento e uma manta de aquecimento que mantém a temperatura do extrator. A unidade ainda conta com uma bomba de cossolvente (modelo serie III, Laballiance, Usa), um totalizador de vazão (Lao, modelo G $0,6 \pm 0,001 \text{ m}^3$, São Paulo), termopar e manômetro. Uma sonda ultrassônica, com macroponta de titânio de 13 mm de diâmetro, ligada a um transdutor (Unique Group,

modelo DES500 (transdutor piezoelétrico)), que está instalada na parte superior do extrator, é acionada por sinais elétricos a partir de um gerador de ultrassom que é a responsável pelo controle da potência do ultrassom, que pode ser ajustada de 10 a 99% da potência total (800 W) (Santos, 2013). A Figura 4.5 apresenta o diagrama de operação da unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom.

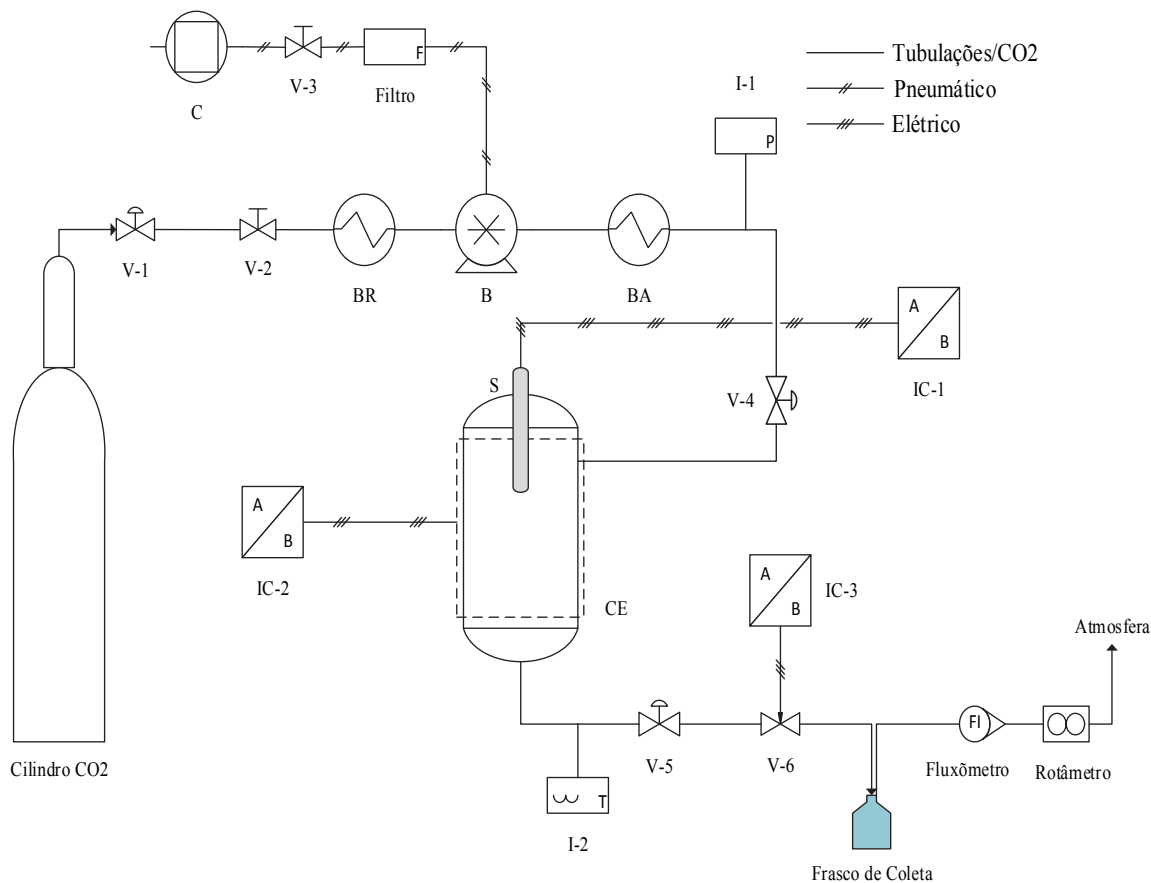


Figura 4.5 Diagrama de operação da unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom.

Fonte: adaptado de (Santos, 2013).

V-1, V-2, V-3, V-4 e V-5 = Válvulas de bloqueio; V-6 = Válvula micrométrica; C = Compressor; F = Filtro de ar comprimido; BR = Banho de refrigeração; B = Bomba (*Booster*); BA = Banho de aquecimento; I-1 e I-2 = Indicadores de pressão e temperatura, respectivamente; IC-1 = Controladores de potência ultrassônica; IC-2 = Temperatura da célula de extração e IC-3 = temperatura da válvula micrométrica; CE = Célula de extração (300mL); S = Sonda ultrassônica. Temperatura da válvula micrométrica; CE = Célula de extração (300 mL); S = Sonda ultrassônica.

O processo tem início quando o dióxido de carbono, com 99,8 % de pureza (White Martins, Campinas/SP), estocado no reservatório, é resfriado a 263 K no banho ultratermostatizado TC (Marconi, modelo MA184, Piracicaba-SP) que opera com etileno glicol. Desta forma, o CO₂ é liquefeito na entrada da bomba pneumática, evitando a cavitação da mesma. A bomba, por sua vez, comprime o solvente até a pressão de extração. O estado supercrítico é atingido por troca térmica através de uma serpentina instalada dentro de um banho de aquecimento, que está regulado em uma determinada temperatura (40 °C). A temperatura do processo é monitorada pelos termopares que se encontram em contato com a parede externa e na saída de solvente/soluto do leito de extração. O solvente escoar através do leito de extração e a vazão é controlada pela válvula micrométrica, que se encontra na saída da linha. Esta válvula possui um sistema de aquecimento elétrico monitorado por um termopar com o objetivo de evitar o congelamento pelos efeitos da expansão Joule-Thomson. Através da válvula micrométrica o solvente é despressurizado até a pressão ambiente e o soluto é precipitado no recipiente de coleta. O CO₂, agora na fase gasosa, passa pelo rotâmetro, que permite medir a vazão do solvente no processo. Antes de ser liberado para o meio-ambiente, o CO₂ atravessa o totalizador de vazão (Lao, modelo G 0,6 ± 0,001 m³; São Paulo) que permite calcular o volume total de solvente usado no processo (Santos, 2013). O procedimento operacional da unidade foi padrão para todas as extrações e é descrito na sequência:

- (1) Verificar que todas as válvulas estão fechadas e se a válvula micrométrica V-6 está aberta ¼ de volta.
- (2) Verificar se o compressor (C) está ligado e se há ar comprimido na linha.
- (3) Ligar o banho de refrigeração (BR) e aguardar que alcance a temperatura de 263 K (-10 °C).
- (4) Ligar o banho de aquecimento (BA) a temperatura de trabalho (verificar o nível de água do banho).
- (5) Conectar a célula de extração (CE) devidamente empacotada – preparo do leito.
 - (5.1) O leito tem capacidade para 400 g de esferas de vidro.
 - (5.2) Preparar o filtro com lã de vidro e acoplar a tampa inferior da célula.
 - (5.3) Introduzir a amostra mais esferas de vidro no interior da célula.
 - (5.4) Rosquear a célula na tampa, com a sonda, até que a conexão de entrada de CO₂ coincida com a tubulação.
 - (5.5) Conectar a tubulação de saída na parte inferior da célula e apertar.
- (6) Conectar a jaqueta de aquecimento da célula de extração; (o extrator foi envolvido por uma camisa de

aquecimento elétrico com um termopar encostado na parede da célula). (7) Programar a temperatura da jaqueta de aquecimento da célula de extração conforme a temperatura do ensaio através do controlador (IC-2). (8) Programar a temperatura da válvula micrométrica (geralmente entre 110 e 130 °C) através do (IC-3). (9) Programar a potência ultrassônica através do controlador (IC-1). (10) Aguardar a estabilização das temperaturas programadas. (11) Conectar o recipiente da coleta na linha. (12) Abrir as válvulas V-1, V-2 e V-4 permitindo a passagem do CO₂ e aguardar a estabilização da pressão. (13) Ajustar a pressão de operação na bomba (B) através da válvula V-3 e acompanhar a pressão no manômetro (I-1). (14) Aguardar a pressurização do sistema até a pressão estabelecida. (15) Ligar a bomba de líquido HPLC e estabelecer as condições de trabalho (*passo a seguir quando trabalhamos com cossolvente*). (16) Abrir lentamente a válvula V-5, permitindo a passagem do líquido que ficara misturado com o CO₂ no extrator (*passo a seguir quando trabalhamos com cossolvente*). (17) Abrir lentamente a válvula V-6, em caso de uso de ultrassom, ligar a geração de ultrassom (IC-1). (18) Controlar a vazão através de a válvula V-7 e verificar a vazão no fluxômetro (FL). (19) Acompanhar o indicador de temperatura (I-2), e em caso de defasagem com a temperatura de trabalho, regular novamente (IC-3). (20) Acompanhar a extração até o fim do tempo determinado ou até o consumo determinado de solvente. (21) Após o fim, fechar a válvula V-3 e V-5 (*passo a seguir quando trabalhamos com cossolvente*), e despressurizar o leito fechando a válvula V-4. (22) Aguardar a despressurização do leito de extração. (23) Desconectar o leito de extração da linha. (24) Fazer a limpeza da linha com etanol (ou o solvente que solubilize o material extraído), para recuperar traços de extratos retidos.

Além disso, Após o procedimento de extração supercrítica com cossolvente, os cossolventes utilizados foram removidos pelos seguintes procedimentos: o etanol foi removido dos frascos de coleta de extrato utilizando rota evaporador (Heildoph Instruments modelo Laborota 4001, Viertrieb, Alemanha) na temperatura de 40 °C e a remoção de água dos extratos foram realizadas através de liofilização em liofilizador (Liotop L101, Liobras, São Carlos, SP). As massas de extratos contidas nos frascos foram medidas utilizando balança analítica. Após pesagem os extratos secos foram armazenados em freezer à -18 °C até as análises.

4.4.1 Preparo do leito de extração

O preparo do leito seguiu um procedimento padrão para todas as extrações. Foi utilizada uma célula de extração de 300 mL. Uma das extremidades da célula foi fechada e depositou-se uma capa de lã de vidro em sua base que serve como um filtro para evitar a passagem de partículas finas que possam causar obstrução da linha. Depois se colocou um pouco de esferas de vidro para adicionar em seguida 5 gramas de amostra e finalmente o volume restante da célula foi preenchido com esferas de vidro. A configuração da célula de extração pode ser visualizada na Figura 4.6.

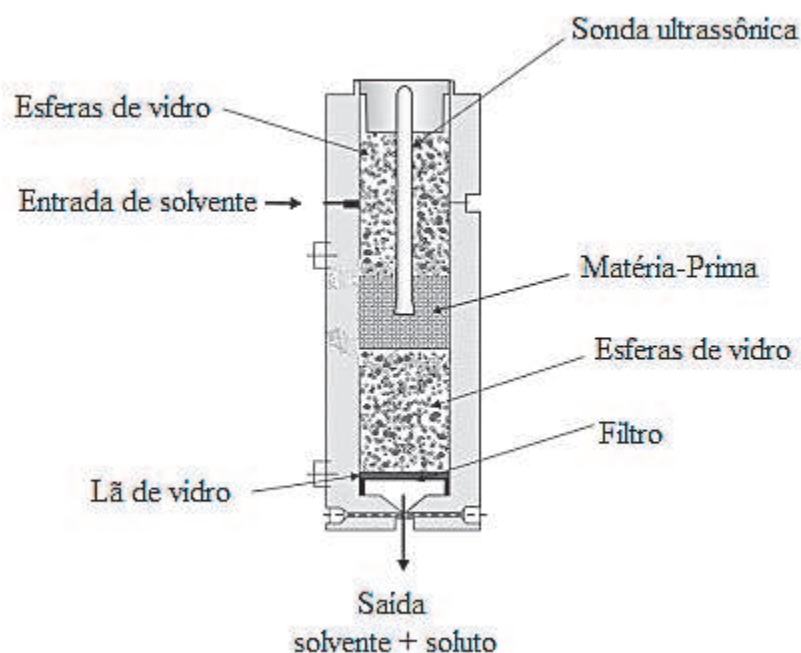


Figura 4.6 Célula de extração supercrítica assistida por ultrassom.

Para avaliar a influência do ultrassom na extração supercrítica inicialmente foram realizados testes preliminares com matéria-prima *in natura* e matéria-prima seca triturada em diferentes condições de pressão (15 e 20 Mpa), temperatura (40 e 50 °C) e potência ultrassônica fixa de 200 Watts, mantendo a vazão de CO₂ constante em $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s.

4.5 RENDIMENTO GLOBAL (X_0)

O rendimento global (X_0) é definido como a razão máxima de soluto que pode ser extraído a partir de uma matriz vegetal em determinadas condições de temperatura, pressão e solvente (Pereira e Meireles, 2010), como também pode fornecer informações sobre o perfil fitoquímico dos extratos obtidos em tais condições. Portanto, as melhores condições são encontradas pelo estudo de rendimento global. O rendimento global (X_0) foi calculado relacionando a massa total de extrato ($M_{extrato}$), e a massa de amostra em base seca ($M_{amostra}$) de acordo com a Equação 4.1

$$X_0 = \frac{m_{extrato}}{m_{amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

O tempo de extração foi fixo em 120 minutos, para os ensaios de rendimento global, tendo sido definido através da observação da curva de extração obtida no teste preliminar com matéria-prima seca triturada a pressão de 15 MPa, temperatura de 40 °C e vazão de CO₂ de 2,77 x 10⁻⁴ kg/s. Neste trabalho os experimentos de rendimento global foram realizados também utilizando aproximadamente 5 gramas de matéria-prima seca triturada e uma vazão de CO₂ constante de 2,77 x 10⁻⁴ kg/s. Os experimentos foram feitos em duplicata e avaliados através de um desenho de Box-Behnken de três níveis e três variáveis (temperatura, pressão e potência) definidos de acordo com as limitações do equipamento. As variáveis foram: temperatura (40, 50 e 60 °C), pressão (15, 20 e 25 Mpa) e potência (0, 200 e 400 Watts), conforme ilustrado na Tabela 4.1. A Tabela 4.2 apresenta o desenho de Box-Behnken com os valores reais e codificados.

Tabela 4.1 Valores codificados e reais para o desenho de Box-Behnken.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
(X ₁) Temperatura (°C)	40	50	60
(X ₂) Pressão (MPa)	15	20	25
(X ₃) Potência (W)	0	200	400

Tabela 4.2 Desenho Box-Behnken com os valores codificados e reais.

Experimento	Variáveis codificadas			Variáveis naturais		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0	40	15	200
2	+1	-1	0	60	15	200
3	-1	+1	0	40	25	200
4	+1	+1	0	60	25	200
5	-1	0	-1	40	20	0
6	+1	0	-1	60	20	0
7	-1	0	+1	40	20	400
8	+1	0	+1	60	20	400
9	0	-1	-1	50	15	0
10	0	+1	-1	50	25	0
11	0	-1	+1	50	15	400
12	0	+1	+1	50	25	400
13	0	0	0	50	20	200
14	0	0	0	50	20	200
15	0	0	0	50	20	200

Após o fim de cada extração, o frasco contendo o extrato foi deixado por 10 minutos em condições ambientes para garantir que todo o CO₂ fosse volatilizado do extrato, e depois a massa de extrato contida no frasco foi medida em uma balança analítica (Sartorius, Modelo A200S, Gottingen, Alemanha) e armazenada em freezer a uma temperatura de -18 °C até a realização das análises. As variáveis de resposta dos experimentos foram o rendimento global de extrato (X₀) extraível, conteúdo de fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e ABTS.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Para os experimentos cinéticos de extração de bagaço de amora-preta foram utilizados aproximadamente 5 gramas de matéria-prima seca triturada. Foi utilizada uma célula de 300 mL, onde o leito foi preparado de acordo ao explicado na seção 4.4.1. A melhor condição adotada foi aquela onde se obteve o maior rendimento de extrato. Esta condição foi a 50 °C de temperatura, 25 MPa de pressão e 400 Watts de potência ultrassônica. O extrato foi coletado em frascos de vidro previamente pesados em balança

analítica (Sartorius, Modelo A200S, Gottingen, Alemanha) e a coleta foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Após a coleta os frascos foram deixados por 10 minutos à temperatura ambiente para garantir que todo o CO₂ fosse volatilizado do extrato, depois a massa de extrato contida nos frascos foi medida novamente, de modo a determinar a massa de extrato obtido em função do tempo de extração. Ao final da cinética, a curva de extração foi apresentada em um gráfico a fim de se observar o comportamento do processo.

4.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Para as análises de fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e ABTS), pesou-se aproximadamente 0.1 g dos extratos obtidos com CO₂ puro, com e sem ultrassom. Posteriormente, o extrato concentrado foi diluído com metanol em um balão volumétrico de 10 mL. Finalmente, a solução metanol/extrato foi acondicionada em um frasco âmbar e armazenada em freezer a uma temperatura de -18 °C até a realização das análises.

4.7.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinar a quantidade de fenóis totais presentes nos extratos de bagaço de amora-preta, utilizou-se o método do reagente Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações para extratos vegetais (Singleton et al., 1999). Em tubos de ensaio contendo uma alíquota de 0,5 mL da solução metanol/extrato, adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, foram adicionados 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5 %. As soluções permaneceram por duas horas em repouso, protegidas da luz, e finalmente a absorbância foi determinada a 760 nm em um espectrofotômetro (modelo U-310, HITACHI, Tóquio, Japão). O conteúdo de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras frente uma curva de calibração construída com o padrão de ácido gálico (concentrações entre 0,010 a 0,080 mg/mL) e expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g de extrato).

4.7.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de bagaço de amora-preta foi determinada segundo os métodos DPPH e ABTS, descritos a seguir.

4.7.2.1 Método DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila)

O método DPPH, segundo Brand-Williams et al. (1995), é baseado na captura dos radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. O DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515 nm. Para a quantificação da capacidade antioxidante foi necessário fazer uma curva padrão de trolox a partir das medidas de absorbância, com o objetivo de representar o porcentual de inibição versus à concentração de trolox (μM), construído por regressão linear.

Inicialmente uma solução de DPPH (394,3 g/mol) 60 μM foi preparada dissolvendo-se 4,8 mg de radical DPPH em álcool metílico em um balão volumétrico de 200 mL. Em seguida a solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar para evitar degradação pela luz. Uma alíquota de 0.1 mL da solução metanol/extrato foi transferida em ambiente escuro para tubos de ensaio e em seguida, adicionou-se 3,9 mL do radical DPPH (solução de DPPH 60 μM) e a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos. Utilizou-se 0,1 mL da solução controle (álcool metílico) com 3,9 mL do radical DPPH. Depois de a solução permanecer no escuro por 4 horas, a absorbância foi lida a 515 nm em espectrofotômetro (modelo U-310, HITACHI, Tóquio, Japão). O aparelho foi zerado com álcool metílico. Assim, a porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada de acordo com a Equação 4.2, de Kulisic et al. (2004).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs Amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

A quantificação de atividade antioxidante é expressa como μmol equivalente de trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato) através da utilização de uma curva padrão de trolox variando as concentrações de 50 a 1200 μM . A capacidade antioxidante

foi apresentada por meio da média \pm desvio padrão. A utilização do equivalente trolox visa facilitar a comparação entre as atividades antioxidantes obtidas pelos métodos DPPH e ABTS.

4.7.2.2 Método ABTS (2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolina) 6-ácido sulfônico)

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é o do radical ABTS produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Kuskoski et al., 2005). O radical ABTS é um composto cromóforo quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS^+$. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos. Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis.

O método utilizado foi descrito por Re et al. (1999) com algumas modificações. Utilizou-se o trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como antioxidante referência, que foi preparado em metanol e estocado como solução padrão. O ABTS foi dissolvido em metanol até a concentração de 7,0 mM, e submetido à reação com 140 mM de persulfato de potássio para a formação do radical. O radical $ABTS^+$ é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 μ L da solução de persulfato de potássio. A mistura ficou com cor azul esverdeada e foi mantida no escuro à temperatura ambiente, por 16 horas. Uma vez formado o radical $ABTS^+$, o mesmo foi diluído em metanol até obter-se uma medida de absorvância de 0,70 (\pm 0,05) a um comprimento de onda de 734 nm. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (modelo U-310, HITACHI, Tóquio, Japão). Uma alíquota de 30 μ L da solução metanol/extrato foi transferida em ambiente escuro para tubos de ensaio e em seguida, adicionou-se 3,0 mL do radical $ABTS^+$. A leitura foi realizada a 734 nm após 6 minutos da mistura foi utilizado o álcool metílico como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Finalmente, para a quantificação da atividade antioxidante foi construída uma curva padrão de trolox variando as concentrações de 100 a 2500 μ M. A atividade antioxidante foi

apresentada como média \pm desvio padrão expressa em μmol equivalente de trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato).

4.8 EMPREGO DE COSSOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

As extrações foram realizadas na melhor condição de operação, definidas com base nas análises descritas na seção 4.7.2. Os experimentos de extração SFE com cossolvente foram realizados na condição de 15 MPa, 60 °C e potência ultrassônica de 200 Watts. Foram utilizados aproximadamente cinco gramas de matéria-prima nas extrações utilizando CO_2/EtOH e $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, mantendo constante a vazão de CO_2 (Q_{CO_2}) em $2,77 \times 10^{-4}$ kg/s. Considerou-se a mistura dos solventes em proporção mássica de 95 % CO_2 + 5 % EtOH e 95 % CO_2 + 5 % H_2O para as extrações a partir de matéria-prima *in natura* e matéria-prima seca triturada, assim como também considerou-se a mistura de 90 % CO_2 + 10 % EtOH e 90 % CO_2 + 10 % H_2O só para matéria-prima seca triturada. O tempo das extrações empregando 95 % CO_2 + 5 % EtOH e 95 % CO_2 + 5 % H_2O foi de 57 minutos, e para as extrações com 90 % CO_2 + 10 % EtOH e 90 % CO_2 + 10 % H_2O foi de 54 minutos. A relação entre massa de CO_2 (S) e massa de matéria-prima (F) foi mantida constante. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e na Tabela 4.3 são apresentadas as condições utilizadas.

Tabela 4.3 Parâmetros adotados na extração supercrítica com cossolvente.

Parâmetros				
	95 % CO_2 + 5 % H_2O	95 % CO_2 + 5 % EtOH	90 % CO_2 + 10 % H_2O	90 % CO_2 + 10 % EtOH
$Q_{\text{cossolvente}}$ (kg/s)	$1,46 \times 10^{-5}$	$1,46 \times 10^{-5}$	$3,08 \times 10^{-5}$	$3,08 \times 10^{-5}$
Tempo (min)	57	57	54	54
Q_{CO_2} (kg/s)	$2,77 \times 10^{-4}$		$2,77 \times 10^{-4}$	
S/F (kg/kg)	200		200	
M_p (g)	5		5	
Temperatura (°C)	60		60	
Pressão (MPa)	15		15	
Potência (Watts)	200		200	

Para a adição de cossolvente junto à extração supercrítica, foi acoplada ao equipamento uma bomba de cossolvente (modelo serie III, Laballiance, USA) que trabalha numa faixa de vazão de 0 a 10 mL/min. O CO₂ e o cossolvente são misturados antes de sua entrada no extrator conforme mostra o esquema de operação da unidade de extração supercrítica com cossolvente assistida por ultrassom, descrita na Figura 4.7.

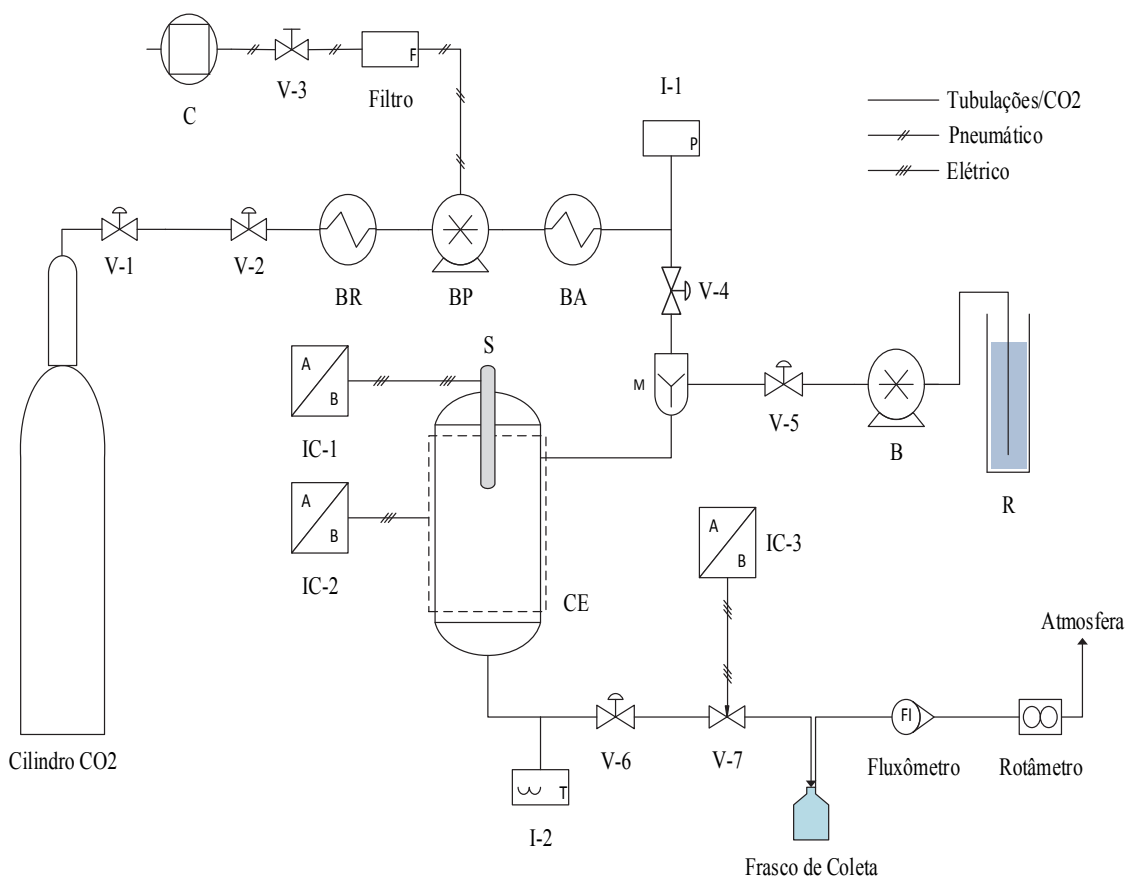


Figura 4.7 Diagrama de operação da unidade de extração supercrítica assistida por ultrassom com cossolvente.

V-1, V-2, V-3, V-4, V-5, e V-6 = Válvulas de bloqueio; V-7 = Válvula micrométrica; C = Compressor; F = Filtro de ar comprimido; BR = Banho de refrigeração; BP = Bomba (*Booster*); BA = Banho de aquecimento; B = Bomba de líquido (HPLC); R = Reservatório de líquido; M = Misturador; I-1 e I-2 = Indicadores de pressão e temperatura, respectivamente; IC-1 = Controladores de potência ultrassônica; IC-2 = Temperatura da célula de extração e IC-3 = Temperatura da válvula micrométrica; CE = Célula de extração (300 mL); S = Sonda ultrassônica.

O procedimento operacional padrão de uso da unidade para um processo de extração supercrítica com co-solvente assistida por ultrassom é o mesmo procedimento descrito na seção 4.4.

4.9 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) se empregou o mesmo procedimento descrito na seção 4.7. Para quantificação e identificação de antocianinas se utilizou o método descrito a seguir.

4.9.1 Teor de Antocianinas Monoméricas

O conteúdo de antocianinas do bagaço de amora-preta (*Rubus spp.*), foi determinado pelo método da diferença de pH (Giusti e Wrolstad, 2001). Para a realização desse método, foi necessário preparar duas soluções tampão: cloreto de potássio pH 1,0 a 0,025M e acetato de sódio pH 4,5 a 0,4 M. O ajuste do pH das soluções foi realizado através da adição de ácido clorídrico concentrado e a medição do pH foi realizada utilizando pH metro de bancada (QUIMIS®, Mod.Q400AS, Brasil). Após 30 minutos em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente, foram feitas as leituras de absorbância a 510 nm e 700 nm em um espectrofotômetro. A absorbância foi calculada a partir da Equação 4.3.

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}_1} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}_{4,5}} \quad \text{Equação 4.3}$$

A concentração de pigmentos no extrato foi calculada usando a Equação 4.4, considerando a absorvidade molar (ϵ) de 26900, peso molecular de 449,2 g/mol da cianidina-3-glicosídeo, e os resultados são expressos como equivalentes de mg de cianidina-3-glicosídeo/g de extrato.

$$C_{\text{cianidina 3 glicosídeo}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = (\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} \cdot 1000) / \epsilon \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde:

Abs = absorbância; PM = peso molecular; FD = fator de diluição, e ϵ = absorvidade molar.

4.9.2 Identificação das Antocianinas por UPLC-QTOF-MS

Antocianinas foram identificadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) Acoplada a um Espectrômetro de Massas quadrupolo, mais tempo de voo (QTOF) (Synapt G2, Waters Corp, Milford, MA, USA). O volume de injeção foi ajustado para 3 µL. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase inversa em C18 (Acquity UPLC BEH C18, Waters) de 2,1 mm x 100 mm e 1,7 µm de tamanho de partícula.

Para a identificação de antocianinas, foram utilizadas como fases móveis água como solvente A e metanol como solvente B ambos contendo 2% de ácido fórmico. A vazão de solvente foi de 0,4 mL min⁻¹. O gradiente aplicado foi o seguinte: 0 min 15 % de B; 3,30 min 20 % de B; 3,86 min 30 % de B; 5,05 min 40 % de B; 5,35 min 55 % de B; 5,64 min 60 % de B; 5,94 min 95 % de B; 7,50 min 95 % de B. O tempo de corrida foi de 12 min, incluindo 4 min para calibração do equipamento. A determinação dos analitos foi realizada por meio de uma fonte de eletrospray no modo positivo sob as seguintes condições: dessolvatação de fluxo de gás = 700 L h⁻¹, com temperatura de dessolvatação = 500 °C, vazão de gás do cone = 10 L h⁻¹, temperatura da fonte = 150 °C, a tensão capilar = 700 V, tensão de cone = 30 V e energia de colisão = 20 eV. O modo de varredura completa utilizada foi m/z = 100 - 800. Tais análises foram realizadas no Departamento de Química Analítica da Faculdade de Ciências da Universidade de Cádiz, na Espanha, com apoio do prof. Dr. Gerardo Fernandez Barbero.

4.9.3 Separação e quantificação das Antocianinas por HPLC-DAD

A separação e quantificação de antocianos foram realizadas num HPLC- DAD elite LaChrom (VWR Hitachi, Tóquio, Japão) consistindo de injetor automático de amostras (L-2200U), um forno para coluna (L2300), uma bomba (L-2160U) e um detector UV-Vis (L-2420U). O forno de coluna foi ajustada a 50 °C para a cromatográfica. O detector UV-Vis foi fixado a 520 nm para as análises. Os Antocianos foram analisadas numa coluna C18 HaloTM Hitachi LaChrom (100 x 3 mm de diâmetro, tamanho de partícula 2,7 µm).

Um método de gradiente, usando água acidificada (ácido fórmico a 5%, de solvente A) e metanol (solvente B), trabalhando com um caudal de 1,0 mL/min, foi utilizado para a

separação cromatográfica. O gradiente utilizado foi como se segue: 0 min 15% de B; 1,50 min 20% de B; 3,30 min 30% de B; 4,80 min 40% de B; 5,40 min 55% de B; 5,90 min 60% de B; 6,60 min 95% de B; 9,30 min 95% de B, 10 min 15% de B. Tais análises também foram realizadas no Departamento de Química Analítica da Faculdade de Ciências da Universidade de Cádiz, na Espanha, com apoio do prof. Dr. Gerardo Fernandez Barbero.

4.10 ANÁLISE DE IMAGEM

4.10.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta poderosa para as análises das superfícies de uma vasta gama de materiais, incluindo pequenos organismos biológicos (Potter e Love, 1999). A morfologia ou estrutura da amostra foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), antes e após da extração supercrítica, com e sem ultrassom, a fim de observar possíveis mudanças estruturais causadas pelas condições dos processos. O microscópio eletrônico de varredura utilizado é equipado com um canhão de emissão de campo (FESEM - FEI Quanta 650). Antes da análise, as amostras secas foram cobertas com ouro (Au) em um metalizador SCD 050 (Oerlikon-Balzers, Balzers, Liechtenstein). Os equipamentos estavam disponíveis no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), localizado em Campinas-SP. As análises das superfícies das amostras foram realizadas sob vácuo, usando uma tensão de aceleração de 5 kV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo estão apresentados os resultados obtidos neste trabalho, desde a caracterização da matéria-prima, testes preliminares, passando pelos resultados dos experimentos de rendimento global, cinética e terminando com a avaliação da composição química dos extratos e as análises de imagem por microscopia eletrônica de varredura.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A caracterização físico-química da matéria-prima está apresentada na Tabela 5.1. Os resultados foram obtidos em triplicata, conforme descrito na seção 4.2 e são apresentados como média \pm desvio padrão.

Tabela 5.1 Teor de umidade e composição centesimal do bagaço de amora-preta.

Análise	Bagaço	Bagaço após
	<i>in natura</i>	secagem e triturada
Umidade (%)	69,0 \pm 0,06	
Cinzas (%)	0,37 \pm 0,01 ^a	1,62 \pm 0,05 ^b
Lipídios (%)	0,87 \pm 0,00 ^c	11,35 \pm 0,58 ^d
Proteínas (%)	9,05 \pm 0,01 ^e	14,31 \pm 0,36 ^f

*Média \pm desvio padrão letras diferentes na mesma fila representam diferença estatística ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

A amora-preta (*Rubus* sp.), também classificada como pequena fruta, apresenta teores consideráveis de micronutrientes essenciais e pode variar em função do grau de maturação e de outros fatores. Não foram encontrados na literatura dados referentes à composição centesimal do bagaço de amora-preta, somente do fruto *in natura*, como mostra a Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Caracterização físico-química de três cultivares de amora-preta (*Rubus* sp.).

Análise	Cultivares		
	Guarani	Tupy	Brazos
Umidade (%)	87,0 ± 0,8	88,3 ± 0,9	89,3 ± 1,0
Cinzas (%)	0,86 ± 0,4	0,80 ± 0,2	0,89 ± 0,3
Fibra (%)	2,02 ± 0,5	2,52 ± 0,8	2,05 ± 0,9
Lipídios (%)	0,17 ± 0,4	0,15 ± 0,3	0,14 ± 0,3
Proteína (%)	0,75 ± 0,7	0,83 ± 0,4	1,24 ± 0,5

Fonte: adaptado de (CHim, 2008).

O bagaço de amora-preta estudado apresentou um teor de umidade de 69 %, diferente dos valores encontrados por CHim (2008) em três variedades do fruto de amora-preta. Além disso, o fruto é altamente nutritivo já que contém 10 % de carboidratos, com elevado conteúdo de minerais, vitaminas B, A e cálcio (Poling, 1996). O alto teor de umidade presente no bagaço de amora-preta poderia representar um caráter pré-extrativo dos compostos de interesse, devido à alta polaridade destes. Porém, ao serem comparadas as médias dos resultados obtidos para bagaço *in natura* e o bagaço após secagem-triturada, houve diferenças segundo o teste F. Observou-se que os teores de cinzas, lipídeos e proteínas apresentam quantidades maiores quando a matéria-prima foi seca e triturada. De acordo com Facco et al. (2008), os frutos da amora-preta de diferentes variedades, apresentam valores de cinzas entre 0,27 a 0,49 %, valor semelhante ao encontrado no presente estudo para bagaço de amora-preta *in natura*, mas diferentes dos valores encontrados por (CHim, 2008). Segundo Antunes (2002), seguindo o mesmo padrão de outros frutos como mirtilo, morango e framboesa, baixas quantidades de proteínas 1,5 % e lipídeos entre 0,03 e 0,08 % foram encontradas em frutos de amora-preta, inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

De fato, estas diferenças encontradas podem estar relacionadas aos processos físicos que alteram as propriedades físicas e químicas da matéria-prima em estudo. Assim, com base nos dados obtidos, pode-se concluir que o bagaço de amora-preta apresentou uma composição centesimal desejável (boa fonte de nutrientes). Mesmo que ainda restritos ao consumo por se tratarem de resíduos agroindustriais, podem ser aproveitados normalmente como complemento na alimentação animal e elaboração de novos produtos.

5.1.1 Testes preliminares de extração

Os testes preliminares foram realizados com matéria-prima úmida e matéria-prima seca triturada. Diversos fatores devem ser levados em consideração para a extração, como o tipo da amostra, método de preparação da amostra e as condições de extração, incluindo a pressão, temperatura, vazão de solvente, potência ultrassônica e a duração do processo (tempo de extração). Os dois primeiros testes foram feitos empregando $40,50 \pm 0,11$ gramas de matéria-prima úmida. As condições empregadas foram temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão de 15 MPa , e a vazão de CO_2 foi definida em $1,40 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$. Os resultados não foram satisfatórios, já que só foram obtidos extratos nos primeiros cinco minutos. Após esse tempo ocorreram alguns problemas: a temperatura de extração caiu bruscamente, chegando a um valor inferior à do CO_2 supercrítico. Outro problema comum era o acúmulo de extrato provocando entupimento na linha de extração, devido à característica úmida da matéria-prima. Na extração número três se trabalhou em condições de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa e vazão de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$, mantendo constante a quantidade de matéria-prima utilizada nas duas primeiras extrações. Nesse teste não ocorreram problemas, e o rendimento obtido depois de 60 minutos de extração foi de $0,43\%$. Um elevado teor de umidade presente na matéria-prima geralmente provoca um menor rendimento, como foi relatado por Lehotay (1997). A água só é $0,3\%$ solúvel em CO_2 supercrítico, mas em alguns casos isso pode ser uma vantagem, porque a água pode funcionar como um modificador de determinados compostos (Lang e Wai, 2001). A partir das extrações quatro e cinco, com as mesmas condições de trabalho da extração número três, ocorreram novamente os mesmos problemas observados nas duas primeiras extrações. Uma maneira simples e eficaz de evitar os problemas encontrados nos primeiros testes foi secar e triturar a matéria-prima para favorecer o processo de extração. A seguir, foi preparado o leito conforme descrito na seção 4.4.1. Para os experimentos realizados em seguida, foram empregadas condições diferentes de pressão, temperatura e potência ultrassônica fixa de 200 Watts , como é mostrado na Tabela 5.3. Além disso, a vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$ foi mantida constante para todos os experimentos realizados posteriormente. No Apêndice B encontra-se uma descrição detalhada dos dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do tempo para a curva de extração dos testes preliminares feitos com matéria-prima seca triturada.

Tabela 5.3 Condições de extração empregadas nos testes preliminares com bagaço de amora-preta seca triturada.

Experimento	Massa de Amostra (g)	T (°C)	P (MPa)	Potência (Watts)	Massa de Extrato (g)	X ₀ (%)
5	5,029 ± 0,23	40	15	0	0,36	7,13 ± 0,10
6	5,162 ± 2,18	40	15	200	0,48	9,30 ± 0,35
7	5,042 ± 0,42	50	15	0	0,43	8,45 ± 0,21
8	5,048 ± 1,35	50	15	200	0,47	9,36 ± 0,14
9	5,082 ± 0,05	50	20	0	0,48	9,48 ± 1,26
10	5,086 ± 1,87	50	20	200	0,51	9,97 ± 0,30

A Tabela 5.3 apresenta os resultados obtidos nos testes preliminares, como rendimento global de extração (X₀ (%)) e quantidade total de extrato obtido em cada experimento em função da massa de matéria-prima utilizada. Percebe-se um aumento do rendimento nos experimentos onde se trabalhou com ultrassom, pois a aplicação do ultrassom pode produzir o efeito de cavitação gerando as fissuras na parede das células para incrementar a área de contato entre as partículas e o solvente de extração (Balachandran et al., 2006). Os efeitos da temperatura sobre o rendimento são bastante diferentes para extração supercrítica com ou sem ultrassom, e a quantidade de extrato obtido por SFE+US foi muito maior do que a obtida por SFE sem ultrassom sob as mesmas condições. Os resultados apresentados na Tabela 5.3 indicam que o ultrassom pode aumentar a difusão da massa dentro de um sistema supercrítico. Observa-se também nos experimentos sete e nove da Tabela 5.3, nos quais não foi aplicado ultrassom, que o rendimento aumenta à medida que a pressão incrementa. Além disso, tomando como referência os experimentos cinco e seis, observou-se que um tempo aproximado de 80 minutos para a SFE assistida por ultrassom é suficiente para obter um rendimento semelhante aos obtidos em cinco horas por SFE sem ultrassom, como é mostrado nas Tabelas 9.1 e 9.2 do Apêndice B. Isto demonstra que o efeito positivo do ultrassom na difusão de massa é um fenômeno instantâneo. O efeito de ultrassom na extração é devido às vibrações que ocorrem nas interfaces entre a matriz sólida e solvente causado pelas ondas de ultrassom. As Figuras 5.1 a, b, c

apresentam as cinéticas de extração para os experimentos feitos com matéria-prima seca triturada nas condições já relatadas na Tabela 5.3.

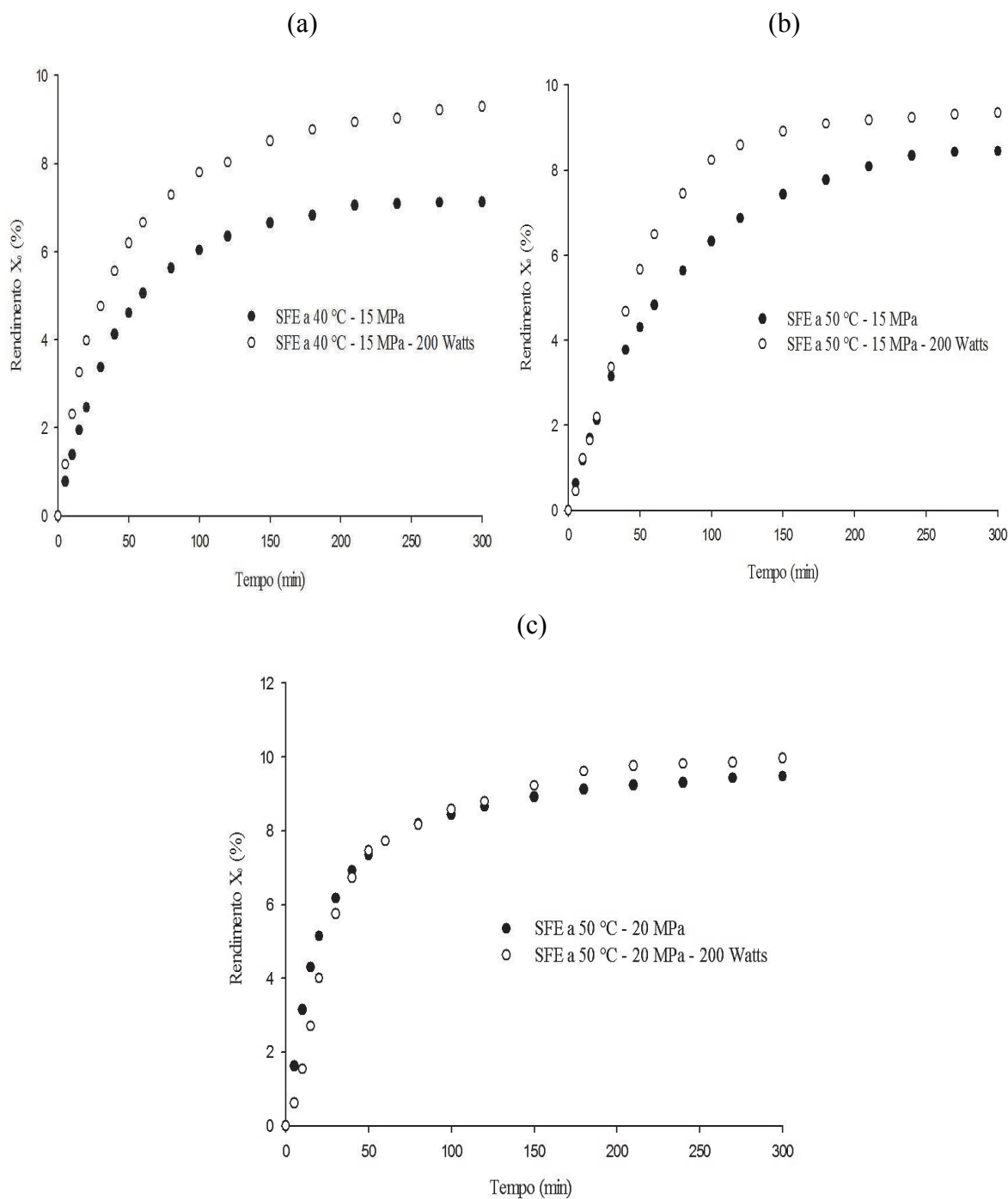


Figura 5.1 Curvas de SFE com e sem adição de ultrassom para as condições relatadas na tabela 5.3, para bagaço de amora-preta seca triturada.

Desta forma, a fim de determinar o tempo de extração, para a determinação de X_0 , observou-se o comportamento da curva de extração apresentada na (Figura 5.1a) em especial, por ter a condição mais amena do planejamento experimental. Partindo desta referência é possível observar que, praticamente no minuto 120, a curva se estabilizou e o tempo foi definido de forma que a etapa difusiva fosse alcançada, garantindo que a maior parte de soluto tenha sido extraída.

5.2 EXTRAÇÃO A BAIXA PRESSÃO

Os resultados do processo de extração a baixa pressão com diferentes solventes estão apresentados na Tabela 5.4. A extração com solventes orgânicos é frequentemente utilizada para o isolamento dos compostos bioativos.

Tabela 5.4 Extratos obtidos por extração a Soxhlet e maceração empregando éter de petróleo e etanol como solvente.

Amostra	Solvente	Yld ⁽¹⁾	A.M ⁽¹⁾	TPC ⁽¹⁾	TEAA ⁽¹⁾	
					DPPH	ABTS
Extratos obtidos por extração com Soxhlet						
Seca triturada	Éter de Petróleo	11,35 ± 0,58 ^a		5,60 ± 0,02 ^a	52,60 ± 3,94 ^b	62,13 ± 0,29 ^a
Seca triturada	Etanol	14,58 ± 0,79 ^b	4,84 ± 0,49 ^a	4,25 ± 0,61 ^b	68,40 ± 1,37 ^a	95,70 ± 5,95 ^b
Extratos obtidos por maceração						
Seca triturada	Etanol	10,72 ± 0,25 ^a	0,13 ± 0,01 ^b	5,95 ± 0,08 ^a	70,24 ± 4,09 ^a	62,82 ± 2,93 ^a

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$);

Yld = Rendimento global (%);

A.M = Antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato);

TPC = Compostos fenólicos (mg EAG/g extrato);

TEAA = Atividade antioxidante expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{mol ET/g}$ extrato).

Os resultados apresentados na Tabela 5.4 indicam que o melhor rendimento foi obtido pela extração com Soxhlet ($14,58 \pm 0,79$ %), utilizando etanol como solvente. A

variação no rendimento pode estar associada às condições de preparo e pré-tratamento da matéria-prima. Observa-se que, ao comparar os métodos de extração para um mesmo solvente, a extração por Soxhlet apresenta maior rendimento em relação ao encontrado pela extração por maceração. A Tabela 5.4 mostra também que o etanol como solvente aumenta o rendimento do teor de antocianinas monoméricas, o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, sugerindo que os compostos presentes na matéria-prima apresentam polaridade alta.

No entanto, na extração por Soxhlet com éter de petróleo a atividade antioxidante medida pelo método ABTS e o rendimento não apresentaram diferenças em relação às dos extratos obtidos por maceração. De acordo com os resultados obtidos, o etanol mostra ser um solvente adequado para ser utilizado como cossolvente na extração com fluido supercrítico assistido por ultrassom.

5.3 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Os ensaios de extração com dióxido de carbono supercrítico com e sem ultrassom foram realizados seguindo um planejamento do tipo Box-Behnken, elaborado com o auxílio do software Statistica, que consistiu de três pontos centrais e doze diferentes combinações das variáveis independentes por duplicata, respectivamente.

A Tabela 5.5 apresenta os valores experimentais do planejamento realizado para avaliar a influência dos parâmetros de processo (temperatura, pressão e potência ultrassônica), sobre o rendimento global, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Pode-se observar que, entre os experimentos realizados, o maior rendimento ($9,87 \pm 0,40$ %) foi encontrado a uma temperatura de 50 °C, pressão de 25 MPa e potência ultrassônica de 400 Watts. O maior teor de compostos fenólicos ($4,44 \pm 0,30$ mg EAG/g extrato) foi encontrado a 60 °C, 20 MPa e sem adição de ultrassom. Além, disso a maior atividade antioxidante observada pelos métodos DPPH e ABTS foi de $25,94 \pm 0,57$ e $67,27 \pm 0,03$ $\mu\text{mol ET/g}$ extrato, respectivamente, nas condições de temperatura 60 °C, pressão de 15 MPa e 200 Watts de potência.

Tabela 5.5 Resultados obtidos por extração supercrítica com e sem ultrassom a partir do bagaço de amora-preta seca triturada.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Yld (%)			TPC (mg EAG/g extrato)			TEAA (μmol ET/g extrato)					
				A	B	M	A	B	M	DPPH			ABTS		
1	-1	-1	0	7,72	8,28	8,00	3,41	3,21	3,31	16,32	16,40	16,36	54,83	56,91	55,87
2	+1	-1	0	6,36	6,14	6,25	4,25	4,49	4,37	26,34	25,54	25,94	67,29	67,25	67,27
3	-1	+1	0	8,21	8,53	8,37	4,09	3,92	4,00	16,41	17,79	17,10	55,17	55,30	55,24
4	+1	+1	0	8,90	8,11	8,51	3,41	3,71	3,56	17,21	17,90	17,56	55,45	61,60	58,52
5	-1	0	-1	7,56	8,16	7,86	3,81	3,73	3,77	21,92	21,22	21,57	60,59	58,75	59,67
6	+1	0	-1	8,21	8,41	8,31	4,23	4,65	4,44	20,85	21,62	21,24	61,63	64,44	63,03
7	-1	0	+1	8,95	9,02	8,99	3,90	3,73	3,81	19,39	19,87	19,63	56,74	56,46	56,60
8	+1	0	+1	8,48	8,68	8,58	4,07	4,05	4,06	22,97	22,07	22,52	63,47	63,57	63,52
9	0	-1	-1	6,85	6,82	6,84	4,24	3,90	4,07	25,58	24,12	24,85	59,64	60,03	59,84
10	0	+1	-1	8,83	8,46	8,65	3,81	4,03	3,92	24,45	23,36	23,90	61,11	66,21	63,66
11	0	-1	+1	7,92	7,95	7,94	3,66	3,39	3,53	23,13	22,86	23,00	66,17	63,76	64,96
12	0	+1	+1	9,59	10,16	9,87	3,81	3,96	3,89	20,93	19,39	19,76	59,70	63,27	61,48
13	0	0	0	9,01	8,75	8,88	4,03	4,27	4,15	17,99	19,84	18,91	64,93	62,95	63,94
14	0	0	0	8,50	9,33	8,92	4,02	4,38	4,20	18,98	18,92	18,95	63,72	64,75	64,24
15	0	0	0	9,47	8,42	8,95	4,19	4,16	4,16	18,62	18,75	18,68	64,06	63,73	63,90

A e B = Réplicas dos experimentos; X₁ = temperatura (°C); X₂ = pressão (MPa); X₃ = potência (W); M = media; Yld = rendimento global X₀; TPC = teor de compostos fenólicos; TEAA = atividade antioxidante expressa em equivalente Trolox

Posteriormente, os dados contidos na Tabela 5.5 foram analisados com auxílio do software Statistica e os resultados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança de 95 % e para cada variável resposta, obteve-se um modelo polinomial, descrito na Equação 5.1.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + \dots + \dots + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad \text{Equação 5.1}$$

Onde Y é a variável resposta, b_0 é uma constante fixa; b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes de regressão para os termos de efeito linear; b_{11} , b_{22} e b_{33} são os termos do efeito quadrático e b_{12} , b_{13} e b_{23} são os termos de efeito de interação, respectivamente.

Os resultados do modelo polinomial que não tiveram efeito significativo ($p > 0,05$) foram eliminados, sendo incorporados no resíduo total para se obter um modelo reduzido. Os modelos gerados para o rendimento global X_0 (Yld), teor de compostos fenólicos (TPC) e atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS foram adequadamente ajustados, obtendo-se coeficientes de determinação de (R^2) iguais a 0,83; 0,79; 0,83 e 0,74, respectivamente. Para todos os casos, a validade dos modelos foi verificada pela análise de variância e o fator F calculado foi superior ao fator F tabelado, evidenciando o ajuste significativo pelos modelos e a relação entre as variáveis independentes. Além disso, o valor de erro puro foi baixo, o que indica uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos. O modelo polinomial codificado e as tabelas de ANOVA gerados estão apresentados pelas equações 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 e as tabelas 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9, considerando apenas os termos significativos.

5.3.1 Modelo codificado e ANOVA para o Rendimento Global X_0 (Yld)

Os efeitos das condições de extração, como a temperatura, pressão e potência ultrassônica foram investigados sobre o rendimento global X_0 a partir do bagaço de amora-preta seca triturada. O modelo polinomial para a análise dos dados demonstra que a relação entre o rendimento e os parâmetros de extração, considerou apenas os termos significativos, como é mostrado na Equação 5.2, onde: x_2 (pressão) e x_3 (potência) para os termos de efeito

linear, x_1^2 (temperatura) e x_2^2 (pressão) para os termos de efeito quadrático e x_1x_2 (temperatura, pressão) para os efeitos de interação, respectivamente.

$$Y_{ld} = 8,93 + 0,79 x_2 + 0,47 x_3 - 0,51 x_1^2 - 0,62 x_2^2 + 0,47 x_1x_2 \quad \text{Equação 5.2}$$

Os resultados da análise da variância (ANOVA), para o rendimento global (Y_{ld}) descritos na (Tabela 5.6), mostram que 83 % da variação experimental observada são explicados pelo modelo matemático. Observa-se, ainda que o valor de F calculado é aproximadamente maior nove vezes do que o valor de F tabelado a um nível de confiança de 95 %. Desta forma, pode-se assegurar que o modelo ofereceu significância estatística e que o mesmo pode ser empregado para fins preditivos.

Tabela 5.6 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de rendimento global X_0 .

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	R^2
Regressão	19,93542	5	3,9871	23,04	2,62	0,83
Resíduos	4,1533	24	0,1731			
Falta de ajuste	2,2211	7	0,3173			
Erro puro	1,9322	17	0,1137			
Total	24,0887	29				

$$F_{\text{tab}}(0,95;5;24) = 2,62$$

Observando a Figura 5.2, verifica-se que o maior rendimento ($9,87 \pm 0,40$ %) é encontrado a 25 MPa, 50 °C e 400 Watts. É possível observar o aumento do rendimento com o incremento da pressão. Este comportamento é devido ao aumento da densidade do solvente com a pressão, aumentando o poder de solvatação do CO_2 (Brunner, 1994). Ainda, observa-se que o rendimento aumenta quando se trabalha com ultrassom durante o processo de extração supercrítica. O emprego de ultrassom causa rupturas na matriz vegetal e facilita a liberação de compostos que não estavam disponíveis anteriormente, e dessa maneira o rendimento tem um incremento (Campos et al., 2005). Observa-se também que a uma pressão de 15 MPa, 60 °C e potência ultrassônica de 200 Watts se obteve o menor

rendimento ($6,25 \pm 0,15 \%$). Tal comportamento deve-se ao fato de que um aumento na temperatura reduz a solubilidade do soluto devido à redução da densidade do solvente supercrítico (Campos et al., 2005). Se, por outro lado, a pressão for incrementada a 20 MPa e a potência ultrassônica mantida a 400 Watts, observa-se um leve incremento do rendimento a temperaturas de 40 °C e 60 °C. É interessante também observar que o maior rendimento sem ultrassom foi de $8,65 \pm 0,26 \%$ nas condições de 50 °C e 25 Mpa, e o menor rendimento sem ultrassom foi de $6,84 \pm 0,02 \%$ a 15 MPa e 50 °C. Portanto, trabalhar com ultrassom a uma intensidade de 400 Watts, temperatura de 50 °C e pressão de 25 MPa durante o processo de extração supercrítica favorece o rendimento global.

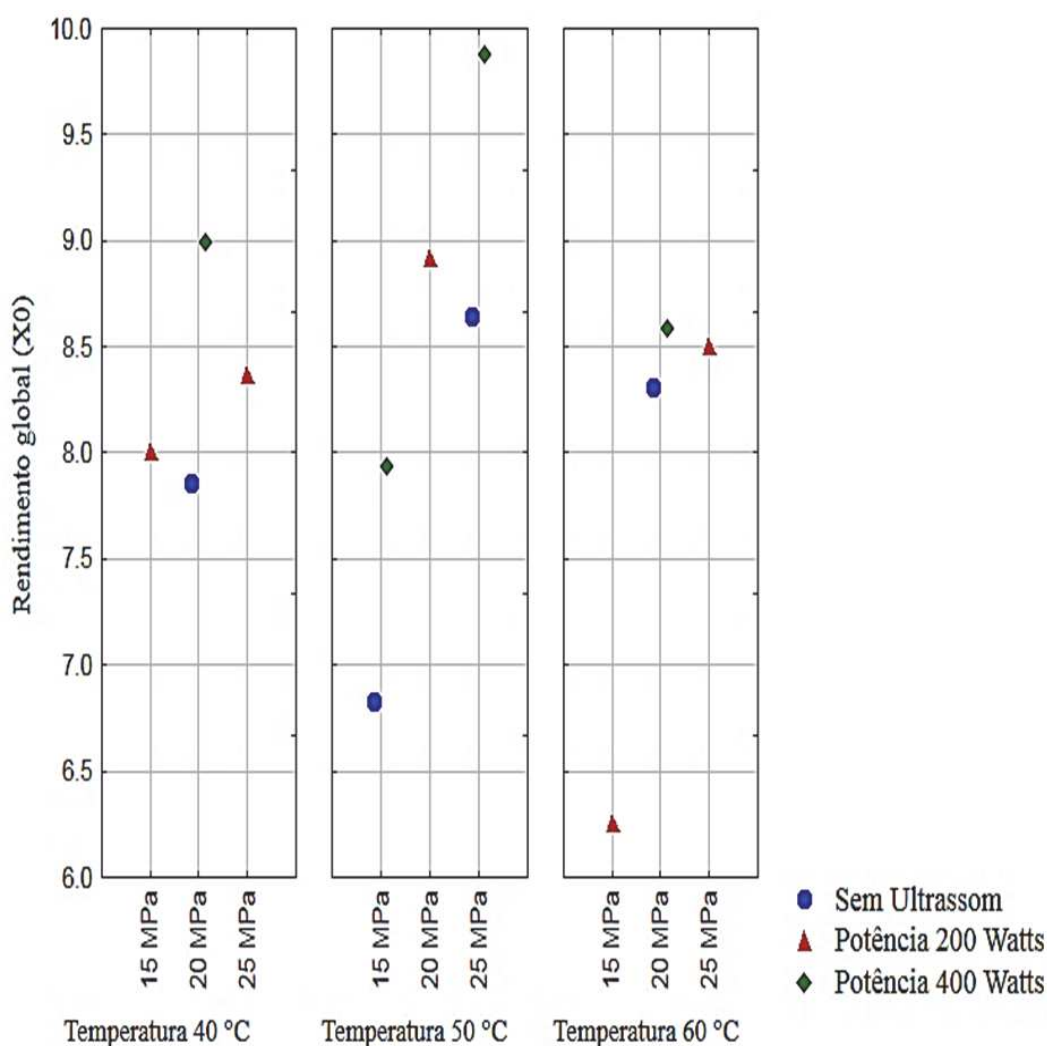


Figura 5.2 Efeito das condições de extração supercrítica sobre o rendimento global.

As análises apresentadas na Figura 5.2 também podem ser observadas por meio das superfícies de resposta, mostradas na Figura 5.3.

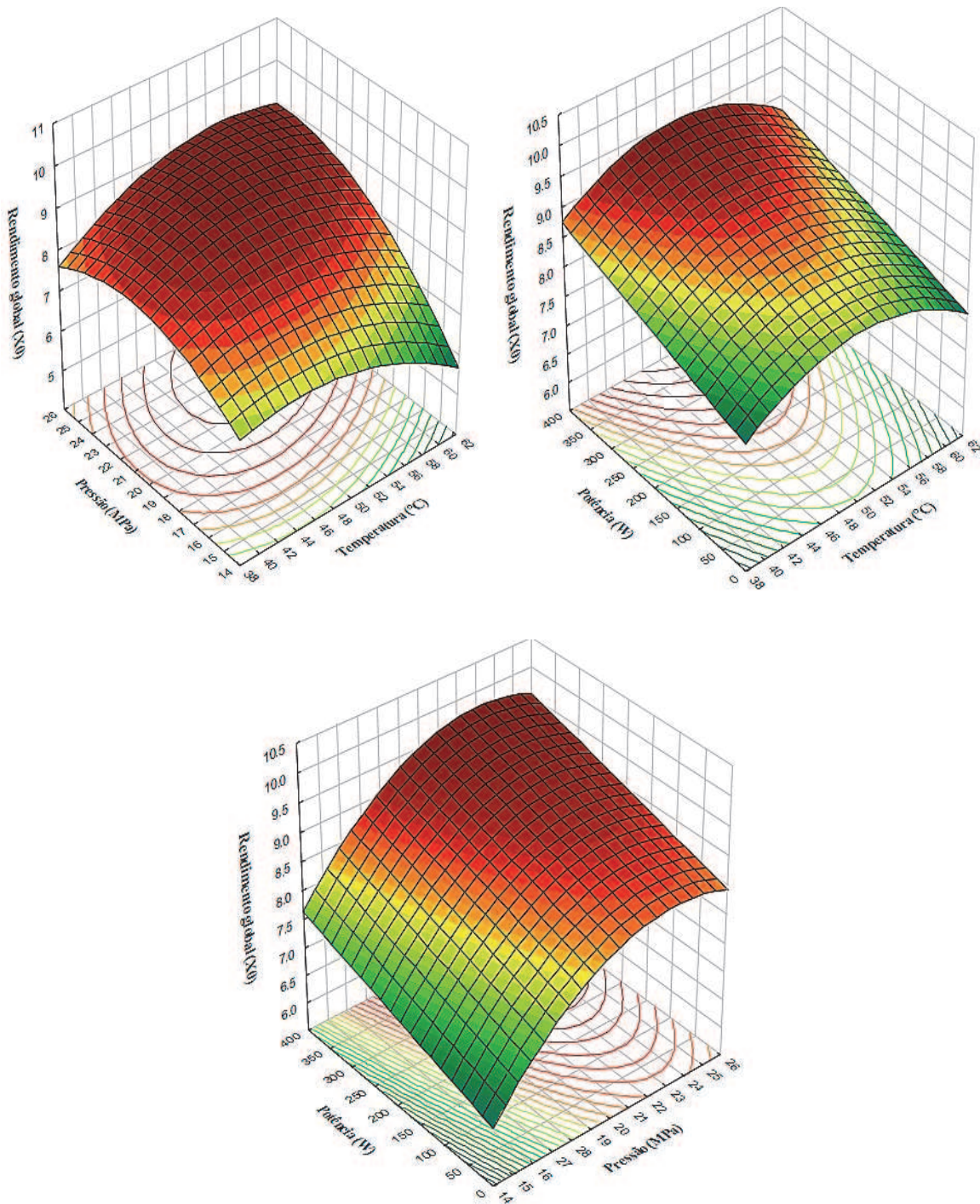


Figura 5.3 Superfícies de resposta para o rendimento global em função da pressão x temperatura, potência x temperatura e potência x pressão.

Ao comparar os rendimentos obtidos por extração supercrítica com ou sem aplicação de ultrassom com os resultados obtidos nas extrações convencionais, pode observar-se que os extratos obtidos por Soxhlet empregando etanol como solvente tiveram rendimentos superiores aos alcançados por extração supercrítica. Tais resultados podem ser justificados pela extração de compostos mais polares, não solúveis em CO₂.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Após os experimentos de rendimento global foi possível selecionar a melhor condição do processo. Desta forma, a cinética de extração (OEC) foi construída na condição de 25 MPa, 50 °C e com adição de potência ultrassônica a 400 Watts.

A Figura 5.4 apresenta a cinética de SFE do bagaço de amora-preta seca triturada em função do rendimento e o tempo de extração. Em 120 minutos o rendimento foi de 9,8 %, igual ao valor observado para X₀ na mesma condição. Por outro lado pode-se observar que no minuto 300 o rendimento chegou a 10,5 %. No Apêndice D encontra-se uma descrição detalhada dos dados da cinética de extração.

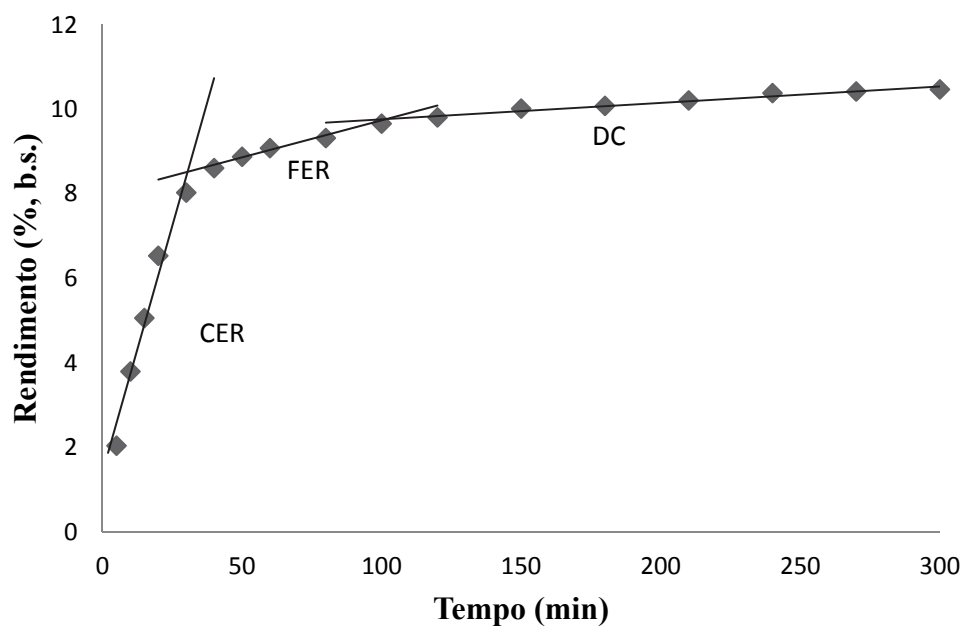


Figura 5.4 OEC do bagaço de amora-preta a 25 MPa, 50 °C com adição de ultrassom a 400 Watts.

Observando a Figura 5.4, nota-se que a OEC do extrato supercrítico assistido por ultrassom apresenta os três períodos de extração característica: taxa de extração constante (CER) na qual o extrato é recuperado a uma taxa constante, sendo predominante a transferência de massa por convecção; taxa de extração decrescente (FER) na qual há um decréscimo na taxa de extração, uma vez que as transferências de massa tanto por convecção e por difusão são importantes e o período difusional (DC), onde a transferência de massa é limitada pela difusão no interior das partículas.

Segundo Veggi (2009) a inclinação da primeira reta representa a taxa de transferência de massa da etapa CER, o tempo que corresponde á interseção das duas primeiras retas é o t_{CER} , que representa o tempo mínimo de duração de um ciclo de SFE; o tempo de interseção entre a segunda e a terceira reta é o t_{FER} e representa a duração máxima que um ciclo de SFE pode ter para manter a viabilidade econômica do processo. Para este trabalho os parâmetros cinéticos ajustados para os três períodos foram: t_{CER} (31 min), t_{FER} (104 min), R_{CER} (8,5 %), M_{CER} ($2,00 \times 10^{-7}$ Kg/s) e Y_{CER} ($9,43 \times 10^{-4}$ Kg/CO₂). Segundo Ferreira e Meireles (2002), através da determinação destes parâmetros é possível otimizar o processo SFE, mas para isso é necessário o conhecimento de características termodinâmicas (solubilidade e seletividade), bem como as características cinéticas (taxa de transferência de massa).

5.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

5.5.1 Modelo codificado e ANOVA para o teor de compostos fenólicos

Os efeitos dos parâmetros de extração como a temperatura, pressão e potência ultrassônica foram investigadas sobre o teor de compostos fenólicos (TPC) a partir do bagaço de amora-preta seca. O modelo polinomial para a análise dos dados foi ajustado considerando os termos significativos, e é mostrado na Equação 5.3, onde os mais importantes são: x_1 (temperatura) e x_3 (potência) para os termos de efeito linear, x_2^2 (pressão) para termos de efeito quadrático, e x_1x_2 (temperatura, pressão), x_2x_3 (pressão, potência) para os termos de efeito interativo, respectivamente.

$$\text{TPC} = 4,09 + 0,19 x_1 - 0,11 x_3 - 0,26 x_2^2 - 0,38 x_1x_2 + 0,13 x_2x_3$$

Equação 5.3

Na Tabela 5.7 são apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA), para o teor de compostos fenólicos (TPC). O modelo pode ser empregado para fins preditivos, já que ofereceu significância estatística, uma vez que o mesmo proporcionou um coeficiente de correlação de 79 %. O valor de F calculado foi sete vezes maior do que o valor de F tabelado com 95 % de confiança.

Tabela 5.7 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de compostos fenólicos.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	2,5658	5	0,5132	18,04	2,62	0,79
Resíduos	0,6828	24	0,0284			
Falta de ajuste	0,2420	7	0,0345			
Erro puro	0,4408	17	0,0259			
Total	3,2486	29				

$$F_{\text{tab}}(0,95;5;24) = 2,62$$

A Figura 5.5 nos mostra que a maior concentração de compostos fenólicos ($4,44 \pm 0,30$ mg EAG/g extrato), foi observada a uma temperatura de 60 °C, pressão de 20 MPa e sem adição de ultrassom ou seja a energia fornecida pelas ondas ultrassônicas, além de liberar os compostos fenólicos, também pode provocar a degradação dos mesmos, como parece ter acontecido neste trabalho. Nota-se que em maiores temperaturas o teor de fenólicos tende a aumentar, o que significa que estes compostos sejam mais facilmente solubilizados a temperaturas elevadas. Por outro lado, observou-se que nos extratos obtidos na extração supercrítica com ultrassom a 200 e 400 Watts, temperatura de 60 °C e pressão de 15 e 20 MPa o maior conteúdo de compostos fenólicos foi de $4,37 \pm 0,17$ e $4,06 \pm 0,02$ mg EAG/g extrato relativamente inferior aos observados na melhor condição ($4,44 \pm 0,30$ mg EAG/g extrato). Verifica-se também que a concentração mais baixa de compostos fenólicos ($3,31 \pm 0,14$ mg EAG/g extrato) foi encontrada a uma temperatura de 40 °C,

pressão de 15 MPa e 200 Watts de potência ultrassônica. Então, é possível concluir que o aumento da temperatura causou uma maior recuperação dos compostos fenólicos, tanto para extrações sem e com ultrassom, como foi mostrado na Figura 5.5. Segundo Carrera et al. (2012), as temperaturas elevadas promovem a maior recuperação de compostos fenólicos.

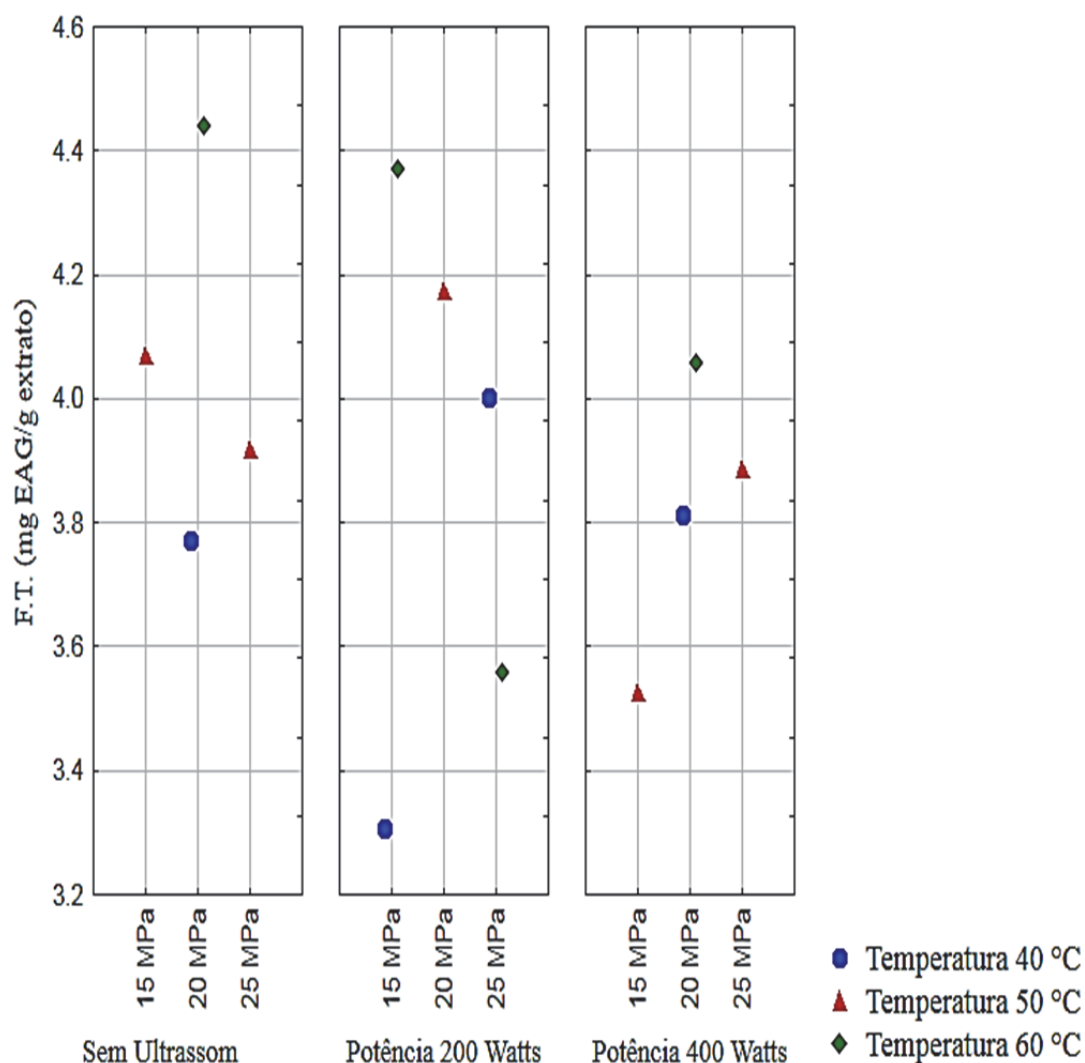


Figura 5.5 Efeito das condições de extração supercrítica sobre o teor de compostos fenólicos.

As análises apresentadas na Figura 5.5 também podem ser observadas por meio das superfícies de resposta, como mostra a Figura 5.6.

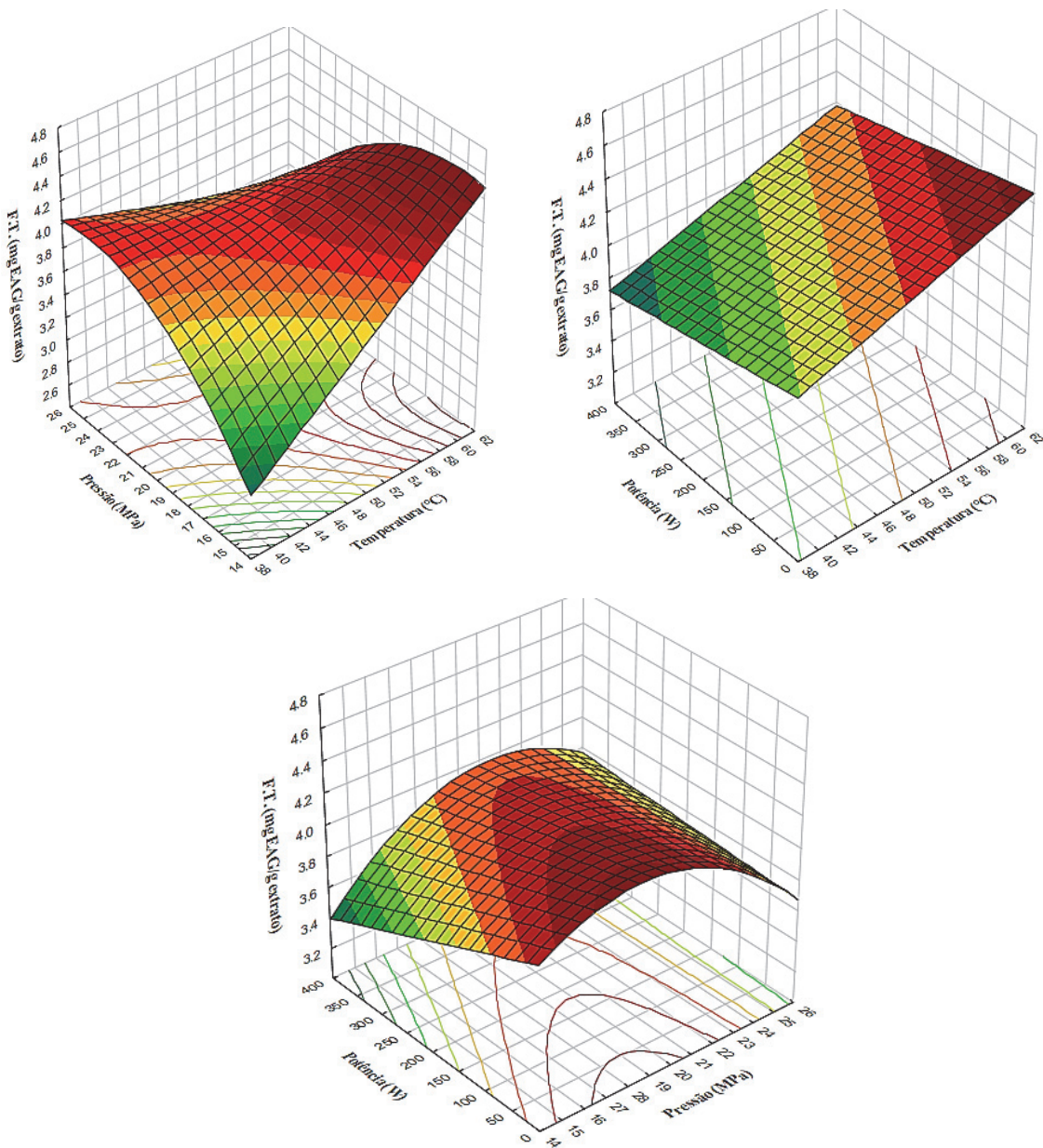


Figura 5.6 Superfícies de resposta para o teor de compostos fenólicos em função da pressão x temperatura, potência x temperatura e potência x pressão.

De modo geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade (Casas et al., 2009). No entanto, podem apresentar uma ampla faixa de polaridade, sendo também solubilizados em solventes de menor polaridade, como foi demonstrado com a extração supercrítica onde se empregou CO_2 puro.

5.5.2 Modelo codificado e ANOVA para determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH

O modelo polinomial foi aplicado apenas os termos significativos mostrados na Equação 5.4, onde: x_1 (temperatura), x_2 (pressão) e x_3 (potência) para termos de efeito linear, x_2^2 (pressão) e x_3^2 (potência) para termos de efeito quadrático e x_1x_2 (temperatura, pressão) para termos de efeito interativo, respectivamente.

$$\text{DPPH} = 18,46 + 1,57 x_1 - 1,48 x_2 - 0,83 x_3 + 1,06 x_2^2 + 3,06 x_3^2 - 2,28 x_1x_2 \quad \text{Equação 5.4}$$

Os resultados da análise da variância (ANOVA), para a atividade antioxidante pelo método DPPH, descritos na Tabela 5.8, mostram que 83 % da variação experimental observada são explicados pelo modelo matemático. Observa-se que o valor de F calculado é aproximadamente sete vezes maior do que o valor de F tabelado a um nível de confiança de 95%. Desta forma, pode-se assegurar que o modelo ofereceu significância estatística e que o mesmo pode ser empregado para fins preditivos.

Tabela 5.8 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de atividade antioxidante DPPH.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	202,1351	6	33,6892	18,84	2,53	0,83
Resíduos	41,1293	23	1,7882			
Falta de ajuste	34,7974	6	5,7996			
Erro puro	6,3319	17	14,3097			
Total	243,2644	29				

$$F_{\text{tab}}(0,95;6;23) = 2,53$$

Observando a Figura 5.7, nota-se que a maior concentração de atividade antioxidante obtida pelo método DPPH foi de $25,94 \pm 0,57 \mu\text{mol ET/g}$ extrato. Ou seja, maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos a uma temperatura de 60 °C, pressão 15 MPa e

com aplicação de ultrassom a 200 Watts. O aumento da atividade antioxidante foi observado com o aumento da temperatura e em baixas pressões, indicando que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante são mais facilmente solubilizados em temperaturas elevadas e possivelmente não sofreram degradação térmica. Se a pressão for incrementada a 25 MPa e a potência mantida a 200 Watts e temperatura a 60 °C, observa-se uma queda da atividade antioxidante a ($17,56 \pm 0,48 \mu\text{mol ET/g extrato}$). Também foi observado que a menor atividade antioxidante ($16,36 \pm 0,06 \mu\text{mol ET/g extrato}$), obtida pelo radical DPPH, foi encontrada nas condições de 40 °C, 15 MPa e 200 Watts. Além disso, observa-se que a maior concentração de atividade antioxidante sem adição de ultrassom foi de $24,85 \pm 1,03 \mu\text{mol ET/g extrato}$, nas condições de 50 °C e 15 Mpa.

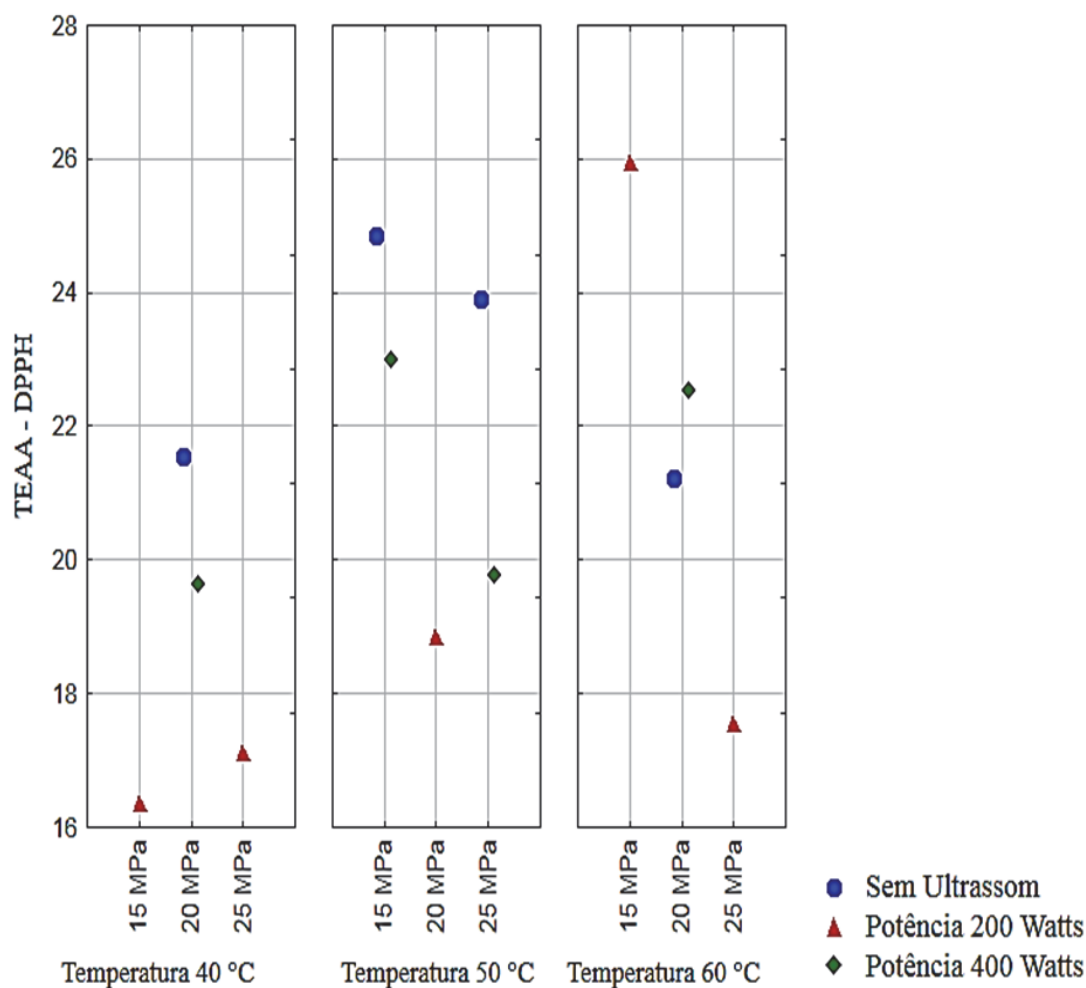


Figura 5.7 Efeito das condições de extração supercrítica sobre a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH.

As análises apresentadas na Figura 5.7 também podem ser observadas por meio das superfícies de resposta, ilustradas na Figura 5.8.

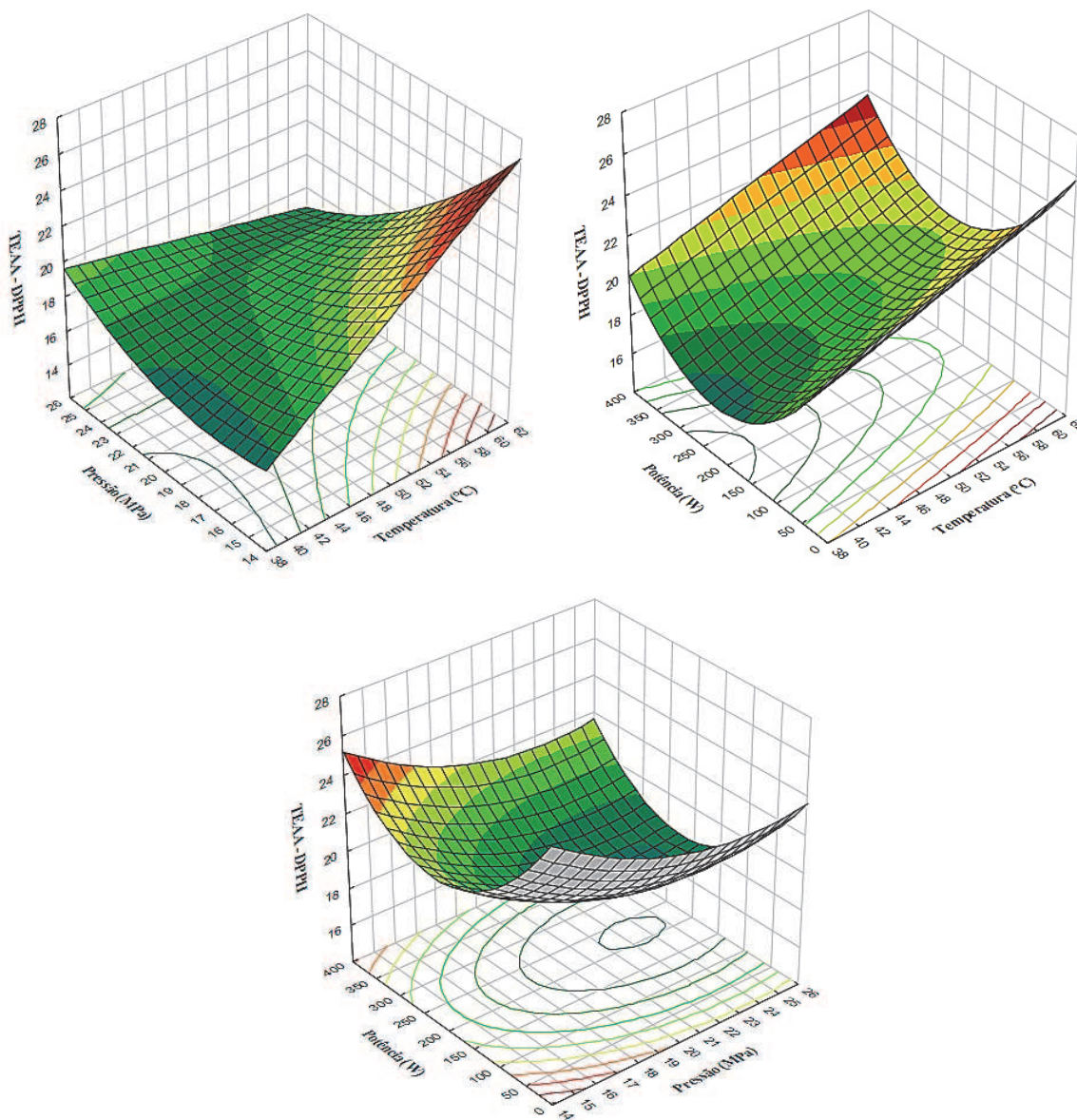


Figura 5.8 Superfícies de resposta para a atividade antioxidante medida pelo método DPPH em função da pressão x temperatura, potência x temperatura e potência x pressão.

Comparando com os resultados obtidos pelas técnicas convencionais, observou-se que a concentração de atividade antioxidante medidas pelo método DPPH foram consideravelmente baixos nos extratos obtidos por extração supercrítica. A atividade antioxidante depende não só da quantidade de antioxidantes presentes no extrato, mas

também da estrutura e das interações entre os antioxidantes. Também é possível observar que o etanol favoreceu o aumento de atividade antioxidante durante as extrações por Soxhlet e maceração.

5.5.3 Modelo codificado e ANOVA para determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS

Os termos significativos mais importantes para o modelo polinomial são: x_1 (temperatura) e x_2 (pressão) para termos de efeito linear, x_1^2 (temperatura) para termos quadráticos e x_1x_2 (temperatura, pressão), x_2x_3 (pressão, potência) para termos de efeito interativo, como é mostrado na Equação 5.5.

$$ABTS = 64,15 + 3,12 x_1 - 1,13 x_2 - 3,18 x_1^2 - 2,03 x_1x_2 - 1,83 x_2x_3 \quad \text{Equação 5.5}$$

A análise da variância (Tabela 5.9) revela que o modelo que descreve a resposta da atividade antioxidante pelo método ABTS em função das variáveis estudadas é adequado. O valor do coeficiente de determinação assegura que 74 % dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático, sendo F calculado aproximadamente cinco vezes superior ao valor de F tabelado a um nível de confiança de 95%. Desta forma, pode-se assegurar que o modelo ofereceu significância estatística e que o mesmo pode ser empregado para fins preditivos

Tabela 5.9 Análise de variância (ANOVA) obtida para o modelo de atividade antioxidante ABTS.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	311,3651	5	62,2730	13,45	2,62	0,74
Resíduos	111,1373	24	4,6307			
Falta de ajuste	59,4030	7	8,4861			
Erro puro	51,7343	17	3,0432			
Total	422,5024	29				

$$F_{\text{tab}}(0,95;5;24) = 2,62$$

Observando a Figura 5.9, verifica-se que o emprego de ultrassom a 200 Watts, nas condições de 15 MPa e 60 °C proporciona a maior atividade antioxidante ($67,27 \pm 0,03 \mu\text{mol ET/g extrato}$), obtida pelo método ABTS. Se a pressão for incrementada até 25 MPa, e com a potência ultrassônica mantida constante a 200 Watts e temperatura de 60 °C, observa-se uma queda da atividade antioxidante, assim como aconteceu pelo método DPPH. Na Figura 5.9 observa-se também que a atividade antioxidante é sensível a variações de temperatura, ou seja, a uma temperatura de 40 °C, 25 MPa e 200 Watts de potência é encontrada a menor atividade antioxidante ($55,24 \pm 0,09 \mu\text{mol ET/g extrato}$). Entretanto, quando a temperatura é aumentada para 50 °C e a pressão é fixa em 15 MPa, observa-se um aumento da atividade antioxidante quando é adicionado ultrassom a 400 Watts.

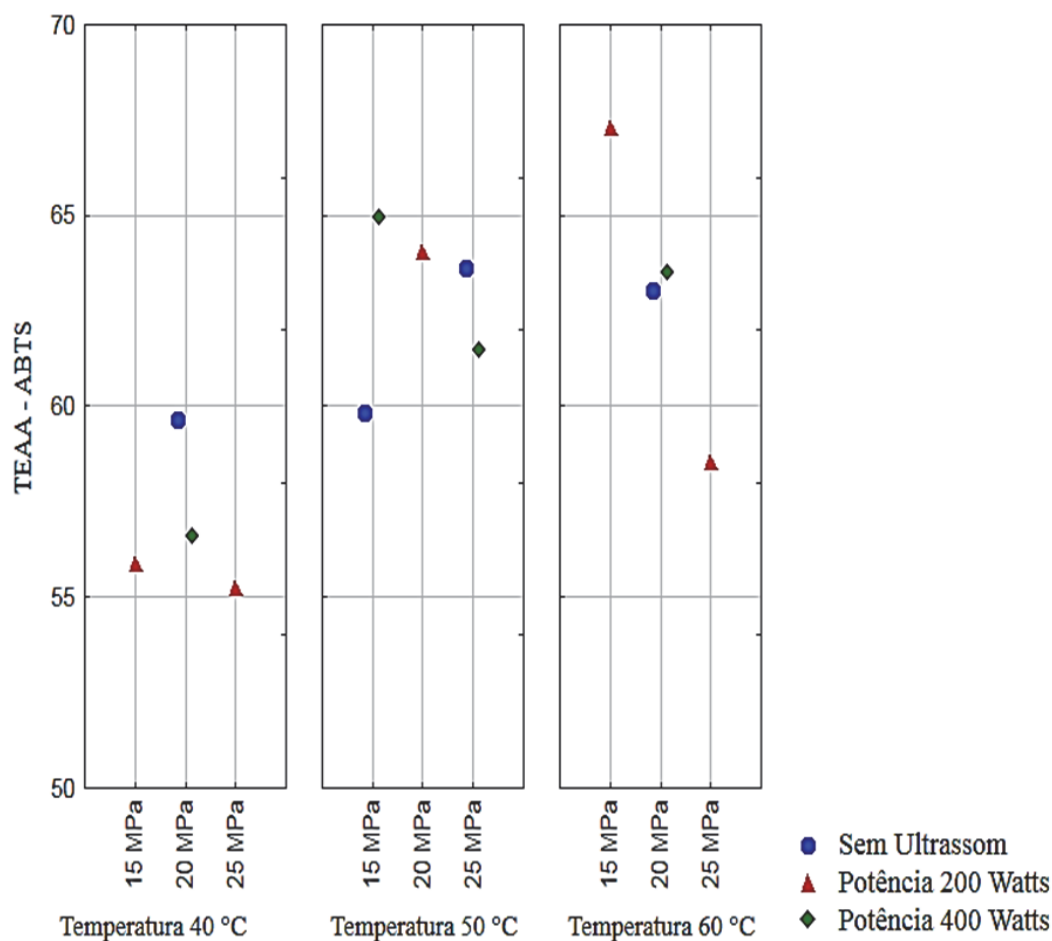


Figura 5.9 Efeito das condições de extração supercrítica sobre a atividade antioxidante medida pelo método ABTS.

As análises apresentadas na Figura 5.9 também podem ser observadas por superfícies de resposta, como ilustra a Figura 5.10.

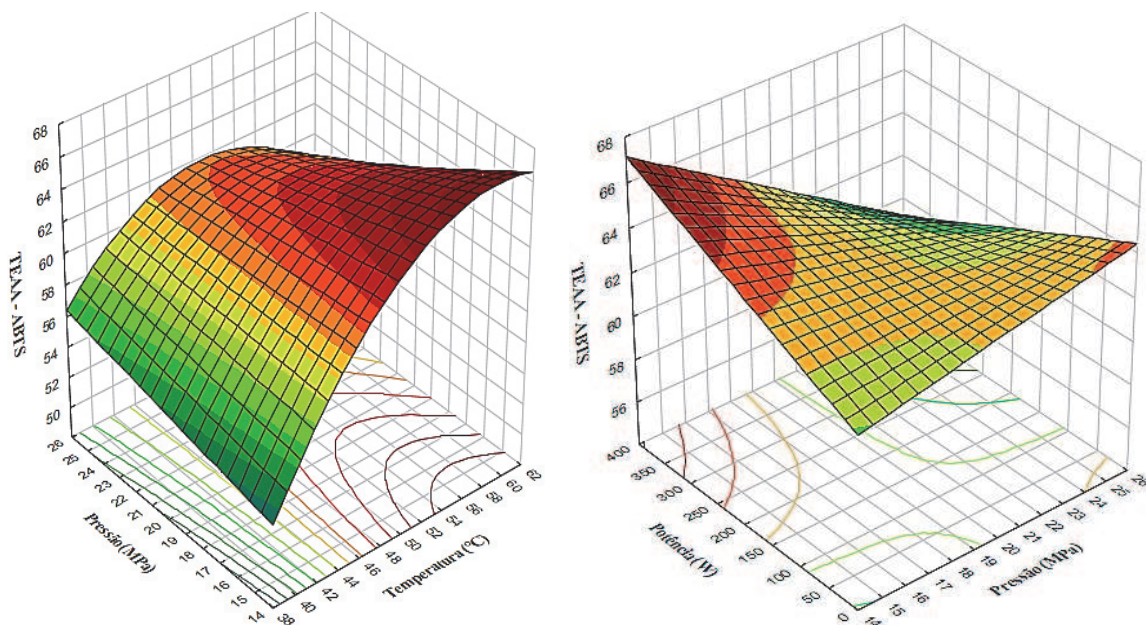


Figura 5.10 Superfícies de resposta para a atividade antioxidante medida pelo método ABTS em função da pressão x temperatura e potência x pressão.

Nota-se que, mais uma vez, o extrato obtido pela extração por Soxhlet com etanol apresentaram a maior atividade antioxidante pelo método ABTS ($95,70 \pm 5,95 \mu\text{mol ET/g}$ extrato), demonstrando assim a afinidade dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante por solventes como etanol. De fato, a maior concentração de antioxidantes medida pelos métodos DPPH e ABTS em extratos obtidos por extração supercrítica foram observadas a maiores temperaturas e pressões baixas, indicando que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante são mais facilmente solubilizados em temperaturas elevadas, como foi relatado anteriormente.

5.6 EMPREGO DE COSSOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Buscando melhorar os resultados da extração supercrítica com CO₂ puro e avaliar a qualidade dos extratos, selecionou-se etanol e água como cossolvente para ser empregado no processo de extração supercrítica. Em geral, um cossolvente que possui temperatura crítica menor que a do fluido supercrítico causa diminuição na solubilidade de componentes poucos voláteis no fluido supercrítico, e quando possui temperatura crítica maior que a do fluido supercrítico causa aumento na solubilidade (Brunner, 1994). A definição das condições de extração a serem utilizadas empregando cossolvente foi realizada com base na atividade antioxidante presente nos extratos obtidos utilizando CO₂ puro. Sendo assim, a condição de 60 °C, 15 MPa e 200 Watts de potência ultrassônica foi selecionada para os ensaios de extração supercrítica com cossolvente a partir de bagaço de amora-preta *in natura* e seca triturada, como mostra a Tabela 5.10. A Figura 5.11 mostra como a adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica elevou o rendimento nos experimentos um ($18,25 \pm 0,77$ %) e dois ($15,33 \pm 0,05$ %) para a matéria-prima seca triturada, quando foram empregados etanol e água nas frações de 10 %. Este comportamento se deve ao caráter polar desses cossolventes, que extraem compostos normalmente não extraídos na extração supercrítica com CO₂ puro, visto que o CO₂ é apolar. O experimento seis apresenta o menor rendimento ($3,41 \pm 0,18$ %) em comparação aos demais experimentos feitos. Observa-se um aumento no rendimento para os experimentos um ($18,25 \pm 0,77$ %), três ($8,84 \pm 0,10$ %) e cinco ($5,03 \pm 0,16$ %), realizado com etanol, em relação aos experimentos onde foi empregada água como cossolvente. Além disso, o uso de etanol facilita sua eliminação do extrato após a extração por evaporação por isso é amplamente relatada sua utilização (Campos et al., 2005). Observou-se também que o rendimento obtido com CO₂ puro a 50 °C, 25 MPa e 400 Watts de potência é significativamente maior aos resultados dos experimentos três ($8,84 \pm 0,10$ %), quatro ($7,58 \pm 0,33$ %), cinco ($5,03 \pm 0,16$ %) e seis ($3,41 \pm 0,18$ %), obtidos com etanol e água como cossolvente, e é inferior aos valores obtidos nos experimentos um ($18,25 \pm 0,77$ %) e dois ($15,33 \pm 0,05$ %). No entanto, ao comparar a extração supercrítica feita com cossolvente com as extrações por Soxhlet e maceração, observou-se que o experimento um tem rendimento ($18,25 \pm 0,77$ %) significativamente superior aos encontrados por maceração ($10,72 \pm 0,25$ %) e aos encontrados por Soxhlet ($14,58 \pm 0,79$ %).

Tabela 5.10 Extratos obtidos pela extração supercrítica com água e etanol como cossolventes.

Amostra	X ₁	X ₂	X ₃	Cossolvente	Yld ^(*)	A.M ^(*)	TPC ^(*)	TEAA ^(*)	
								DPPH	ABTS
(1) Seca triturada	60	15	200	CO ₂ :EtOH / 90:10	18,25 ± 0,77 ^a	2,20 ± 0,05 ^a	12,73 ± 1,26 ^a	53,43 ± 4,51 ^a	53,05 ± 0,79 ^e
(2) Seca triturada	60	15	200	CO ₂ :água / 90:10	15,33 ± 0,05 ^b	13,66 ± 0,07 ^b	49,36 ± 0,27 ^b	96,11 ± 4,49 ^b	154,98 ± 1,83 ^a
(3) Seca triturada	60	15	200	CO ₂ :EtOH / 95:5	8,84 ± 0,10 ^c	0,45 ± 0,03 ^c	6,51 ± 0,27 ^c	45,07 ± 2,20 ^c	53,02 ± 0,07 ^e
(4) Seca triturada	60	15	200	CO ₂ :água / 95:5	7,58 ± 0,33 ^c	5,13 ± 0,35 ^d	33,05 ± 1,24 ^d	74,36 ± 6,18 ^d	112,59 ± 0,69 ^c
(5) In natura	60	15	200	CO ₂ :EtOH / 95:5	5,03 ± 0,16 ^d	6,84 ± 0,31 ^d	24,13 ± 1,62 ^e	25,07 ± 1,44 ^e	81,35 ± 0,48 ^d
(6) In natura	60	15	200	CO ₂ :água / 95:5	3,41 ± 0,18 ^e	17,54 ± 0,07 ^e	42,11 ± 3,96 ^f	40,23 ± 1,07 ^f	134,85 ± 3,05 ^b

(*) Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey;

X₁ = temperatura (°C);

X₂ = pressão (MPa);

X₃ = potência (Watts);

Yld = rendimento global (%);

A.M = Antocianinas Monoméricas (mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato);

TPC = teor de compostos fenólicos (mg EAG/g extrato);

TEAA = atividade antioxidante expressa em equivalente Trolox (µmol ET/g extrato).

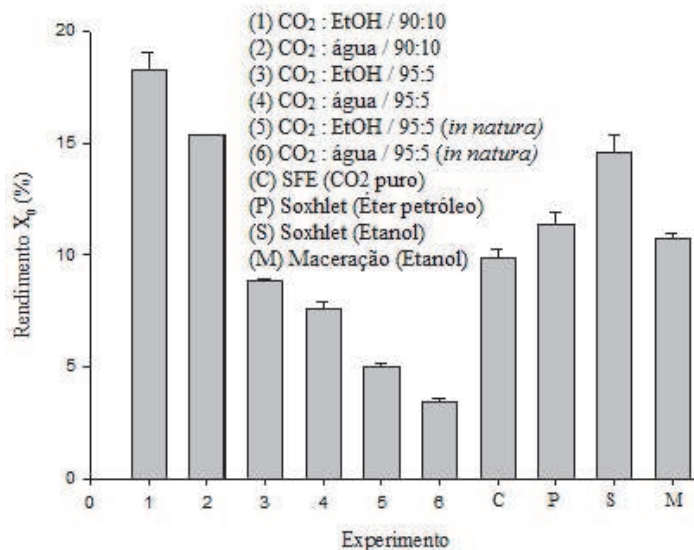


Figura 5.11 Rendimento dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração.

A Figura 5.12 apresenta os teores de antocianinas monoméricas presentes nos extratos obtidos pela extração supercrítica com cossolvente e pelos métodos convencionais a partir da matéria-prima em estudo. De acordo com a Figura 5.12, observa-se que o maior rendimento de antocianinas para o processo de extração supercrítica foi de $17,54 \pm 0,07$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato, obtido no experimento empregando 5 % de água como cossolvente. O resultado obtido pela extração por Soxhlet com etanol foi de $4,84 \pm 0,49$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato, e é maior que aquele valor encontrado pela extração por maceração ($0,13 \pm 0,01$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato). Por outro lado, pode-se observar que os teores de antocianinas obtidos nos experimentos um ($2,20 \pm 0,05$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato), três ($0,45 \pm 0,03$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato) e cinco ($6,84 \pm 0,31$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato) pela extração supercrítica com etanol como cossolvente não apresentam similaridade, diferindo estatisticamente ao valor encontrado por Soxhlet. Tena et al. (1998) e Murga et al. (2000) relatam que adição de cossolvente ao CO_2 melhora o rendimento de extração de alguns compostos, como as antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Observou-se também como a quantidade e tipo de cossolvente adicionado ao processo de extração supercrítica influencia significativamente no teor final de antocianinas. Isto é observado na

Figura 5.12 para os experimentos quatro ($5,13 \pm 0,35$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato) e dois ($13,66 \pm 0,07$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato), onde um aumento na fração de água de 5 % para 10 % melhorou o rendimento, devido a um favorecimento das interações soluto/cossolvente, o que leva a uma maior solubilidade dos compostos no solvente (Hollender et al., 1997). Esse efeito também foi observado nos experimentos três ($0,45 \pm 0,03$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato) e um ($2,20 \pm 0,05$ mg cianidina-3-glicosídeo/g de extrato) para o etanol, que embora o conteúdo de antocianinas encontrado tenha sido menor aos encontrados com água. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.10, a água parece ser o solvente mais eficiente para extrair antocianinas. Assim, a água não somente aumenta a eficiência da extração, mas também é o solvente mais adequado por ser ecologicamente seguro e ter baixo custo. Além disso, o teor de antocianinas apresentou uma tendência de variação com a mudança da concentração de cossolvente empregado, tipo de pré-tratamento da matéria-prima utilizada e métodos de extração, respectivamente. As principais antocianinas reportadas em frutos de amora-preta são a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo (Fan-Chiang e Wrolstad, 2005).

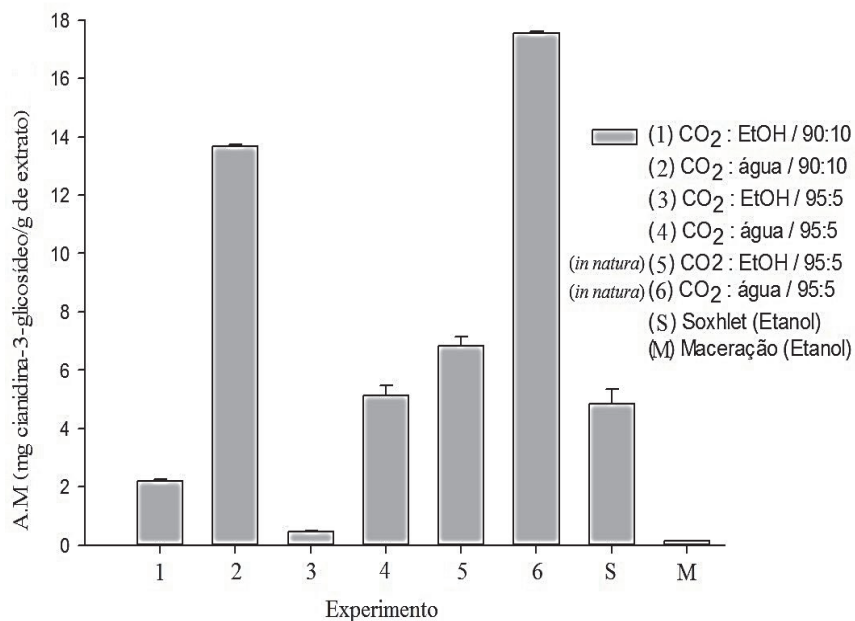


Figura 5.12 Teores de antocianinas monoméricas obtidos pelos diferentes métodos de extração.

Com respeito ao teor de compostos fenólicos, pode-se dizer que os melhores resultados foram encontrados no experimento dois, com matéria-prima seca triturada ($49,36 \pm 0,27$ mg EAG/g extrato), e no experimento seis para amostra *in natura* ($42,11 \pm 3,96$ mg EAG/g extrato), empregando água como cossolvente como é mostrado na Figura 5.13. Além disso, observou-se que a quantidade de compostos fenólicos obtidos pela extração por Soxhlet com etanol ($4,25 \pm 0,61$ mg EAG/g extrato) é menor aos valores observados nos experimentos um ($12,73 \pm 1,26$ mg EAG/g extrato), três ($6,51 \pm 0,27$ mg EAG/g extrato) com matéria-prima seca triturada e cinco ($24,13 \pm 1,62$ mg EAG/g extrato) para amostra *in natura*, observados na extração supercrítica com etanol como cossolvente. Porém, como era de se esperar, a adição de cossolvente na extração supercrítica gerou extratos com conteúdo de compostos fenólicos superiores aos obtidos com CO₂ puro e a aqueles valores encontrados pela extração por maceração e Soxhlet respectivamente.

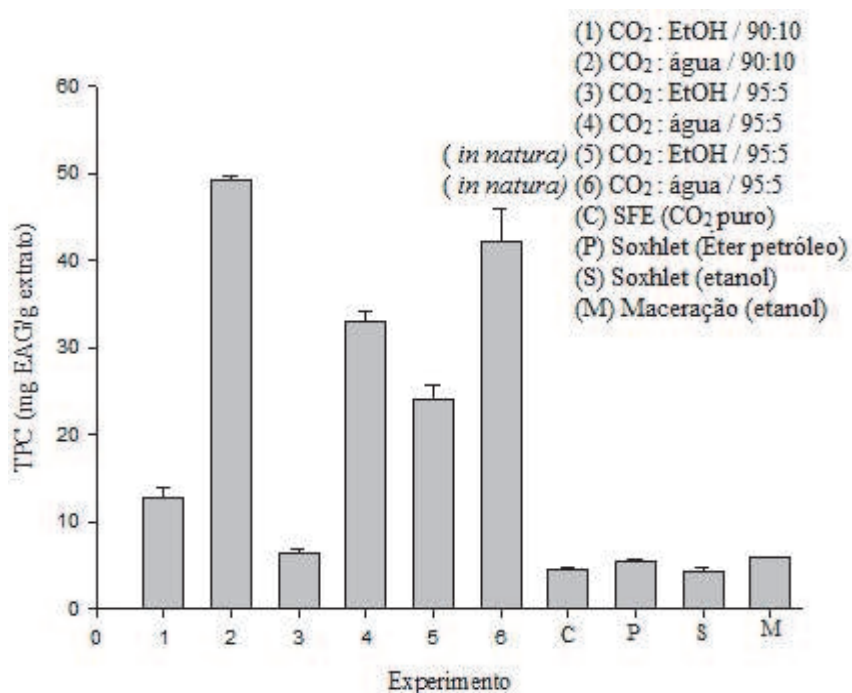


Figura 5.13 Teor de compostos fenólicos obtidos pelos diferentes métodos de extração.

A atividade antioxidante encontrada pelo método DPPH no extrato obtido com CO₂ puro ($25,94 \pm 0,57$ μ mol ET/g extrato) foi inferior aos valores observados na extração supercrítica com cossolvente para os experimentos um ($53,43 \pm 4,51$ μ mol ET/g extrato), dois ($96,11 \pm 4,49$ μ mol ET/g extrato), três ($45,07 \pm 2,20$ μ mol ET/g extrato) e quatro

($74,36 \pm 6,18 \mu\text{mol ET/g extrato}$), onde foi empregada matéria-prima seca triturada, como é mostrado na Figura 5.14. Além disso, a baixa atividade antioxidante observada na extração com CO_2 puro pode estar associada à baixa quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos, já que o CO_2 , um solvente apolar, não favorece a solubilização de tais compostos. Por outro lado, observa-se que os valores da atividade antioxidante obtidos pela extração por Soxhlet com etanol ($68,40 \pm 1,37 \mu\text{mol ET/g extrato}$), e na extração por maceração ($70,42 \pm 4,09 \mu\text{mol ET/g extrato}$) são maiores aos valores observados nos experimentos um ($53,43 \pm 4,51 \mu\text{mol ET/g extrato}$), três ($45,07 \pm 2,20 \mu\text{mol ET/g extrato}$) e cinco ($25,07 \pm 1,44 \mu\text{mol ET/g extrato}$), da extração supercrítica com etanol como cossolvente. Porém a maior concentração de atividade antioxidante foi observada no extrato do experimento dois ($96,11 \pm 4,49 \mu\text{mol ET/g extrato}$), que foi a extração onde se empregou água como cossolvente.

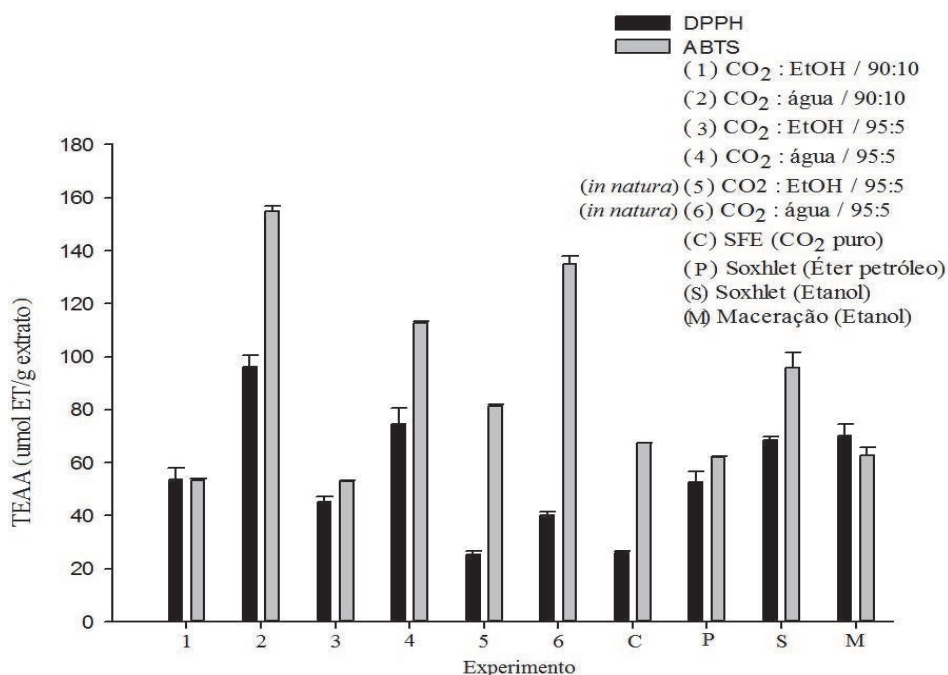


Figura 5.14 Valores de atividade antioxidante determinados por DPPH e ABTS a partir dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração.

A Figura 5.14 também mostra um aumento da atividade antioxidante quando esta é determinada pelo método ABTS. Nota-se uma vez mais que a adição de água como cossolvente, na fração de 10 %, proporciona maior atividade antioxidante ($154,98 \pm 1,83 \mu\text{mol ET/g extrato}$). Observa-se também que a concentração de antioxidantes encontrados

nos extratos obtidos com CO₂ puro foram maiores que as observadas nos experimentos um ($53,05 \pm 0,79 \mu\text{mol ET/g extrato}$) e três ($53,02 \pm 0,07 \mu\text{mol ET/g extrato}$), obtidos pela extração supercrítica com etanol, e inferiores aqueles valores observados nos experimentos dois ($154,98 \pm 1,83 \mu\text{mol ET/g extrato}$) e quatro ($112,59 \pm 0,69 \mu\text{mol ET/g extrato}$) para matéria-prima seca triturada, onde o cossolvente empregado foi água. Ainda, a concentração de atividade antioxidante determinada pelo método ABTS, obtida pela extração por Soxhlet e maceração foram maiores aos valores encontrados na extração supercrítica com etanol como cossolvente para matéria-prima seca triturada.

Analisando o conteúdo de antocianinas monoméricas e teor de compostos fenólicos com os dados encontrados para atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, é possível observar que os extratos com maior atividade antioxidante foram aqueles, obtidos empregando água como cossolvente. As variações de atividade antioxidante podem estar associadas às condições de pré-tratamento da matéria-prima, aos solventes e aos métodos de extração empregados (Cuvelier et al., 1996, Ames et al., 1993). O método ABTS, quando aplicado aos extratos, mostrou-se mais eficiente na detecção de compostos antioxidantes não identificáveis pelo método DPPH. Nos resultados obtidos, pode-se observar que a atividade antioxidante está diretamente correlacionada com o conteúdo total de compostos fenólicos presentes no bagaço de amora-preta. Finalmente, avaliando os extratos obtidos com cossolvente, na condição de 60 °C, 15 MPa e 200 Watts de potência ultrassônica, pode-se concluir que para alcançar o melhor rendimento ($18,25 \pm 0,77 \%$) é melhor trabalhar com 10 % de etanol, já que nesta condição o rendimento foi oito vezes maior que o observado para extração supercrítica com CO₂ puro. Isto se deve ao fato do etanol ser um solvente com característica polar, de modo que sua adição como cossolvente fez com que substâncias polares passassem a ser solubilizadas pela mistura dióxido de carbono/etanol, aumentando a extração desses compostos polares que não eram extraídos pelo dióxido de carbono puro. Em termos de conteúdo de antocianinas, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante para os extratos encontrados a partir do bagaço de amora-preta seca triturada, é melhor usar água a 10 % como cossolvente e, para determinar antocianinas a partir do bagaço de amora-preta *in natura*, é recomendável trabalhar com 5 % de água como cossolvente, já que o teor de umidade presente na amostra *in natura* parece beneficiar a obtenção de antocianinas. De modo geral, as antocianinas, compostos

fenólicos e atividade antioxidante são caracterizadas como polares. E, por isso, são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade como água. Segundo Mau et al. (2005), a água extrai com eficiência antocianinas, compostos, fenólicos e atividade antioxidante devido à sua polaridade. Outra vantagem é a alta pureza dos extratos e a grande eficiência no processo, que pode torná-lo viável (Herrero et al., 2006).

5.6.1 Identificação das Antocianinas por UPLC-QTOF-MS

A análise por (UPLC-QTOF-MS) identificou quatro antocianinas no bagaço de amora-preta. A Tabela 5.11 apresenta o íon molecular e a região visível dos compostos identificados.

Tabela 5.11 Características cromatográficas, espectro UV-visível e espectrometria de massas obtidas por UPLC-QTOF-MS.

Composto	Íon molecular - Massa (m/z)	Região visível (nm)
Cianidina-3-glucosídeo	449	514
Cianidina-3-rutinosídeo	595	234
Cianidina-3-malonil-glucosídeo	535	253
Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo	593	279

A identificação das quatro antocianinas foi alcançada utilizando água e metanol com 2 % de ácido fórmico como fases móveis. A partir da análise por UPLC-QTOF-MS, foi possível observar o perfil cromatográfico variando somente a magnitude dos picos, a qual está diretamente relacionada à concentração das antocianinas. A Figura 5.15 mostra claramente um íon molecular de (449 m/z), enquanto o espectro UV-visível para o composto identificado foi de (514 nm). A Cianidina-3-rutinosídeo apresentou íon molecular de (595 m/z) conforme mostra a Figura 5.16. Por outro lado, a Cianidina-3-malonil-glucosídeo (Figura 5.17) e Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo (Figura 5.18) foram identificadas como derivados da Cianidina-3-glucosídeo com diferentes ácidos. A Cianidina-3-glucosídeo (Figura 5.15) e Cianidina-3-rutinosídeo (Figura 5.16) foram as

antocianinas majoritárias identificadas neste trabalho a partir do bagaço de amora-preta. O perfil de antocianinas é compatível com dados reportados na literatura para amora-preta.

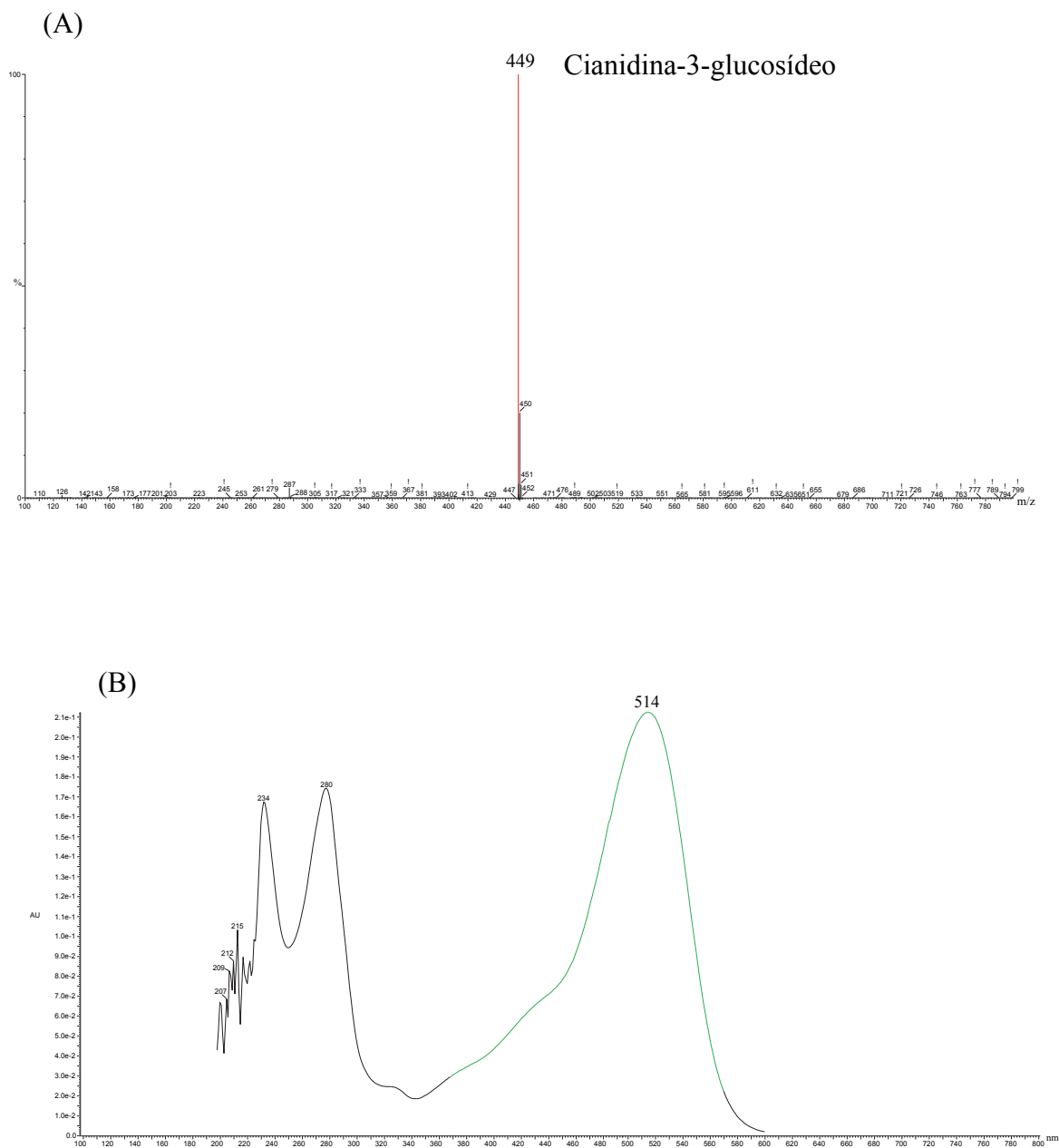
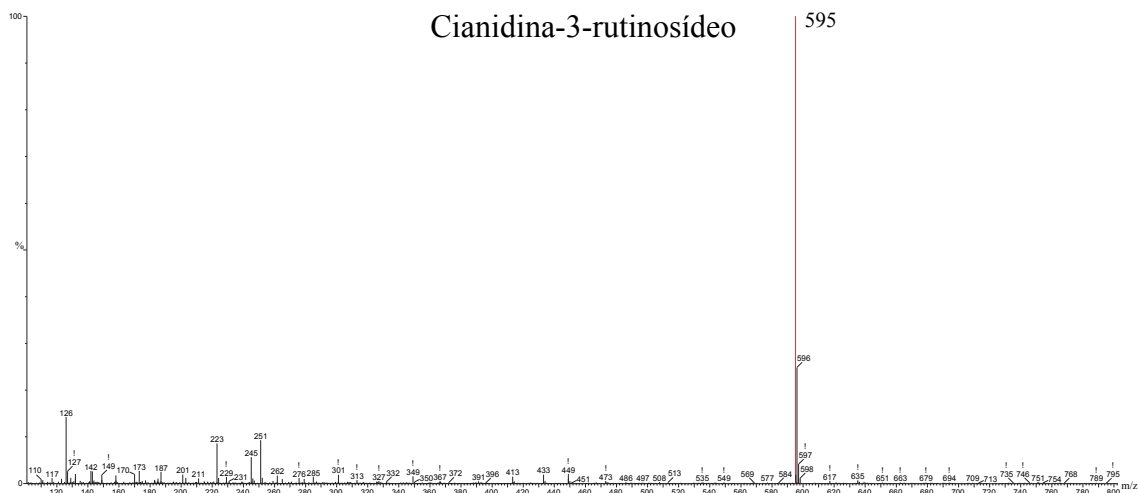


Figura 5.15 Espectro de massa do íon molecular m/z 449 (Cianidina-3-glucosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B).

(A)



(B)

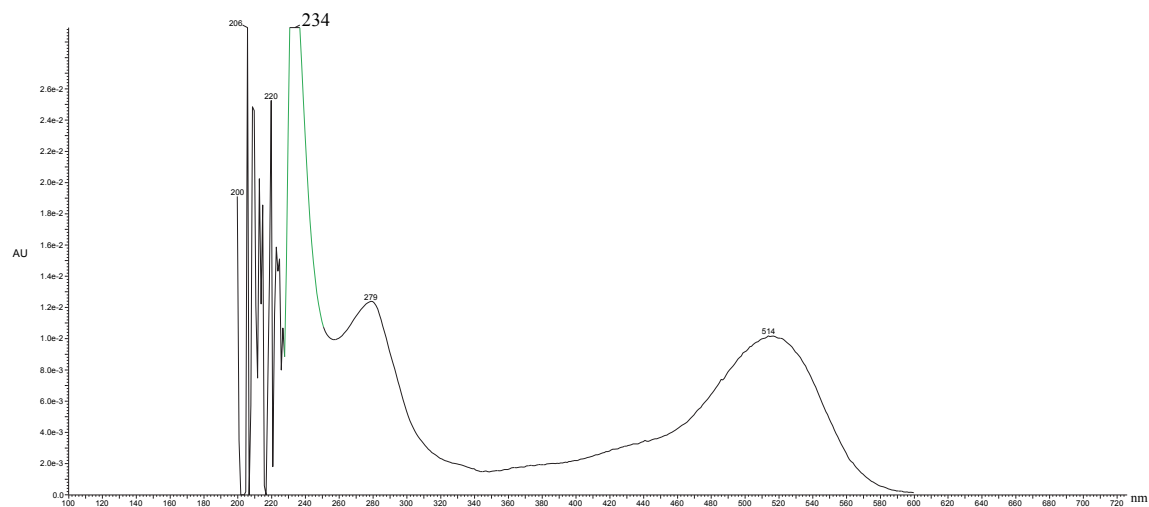


Figura 5.16 Espectro de massa do íon molecular m/z 595 (Cianidina-3-rutinosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B).

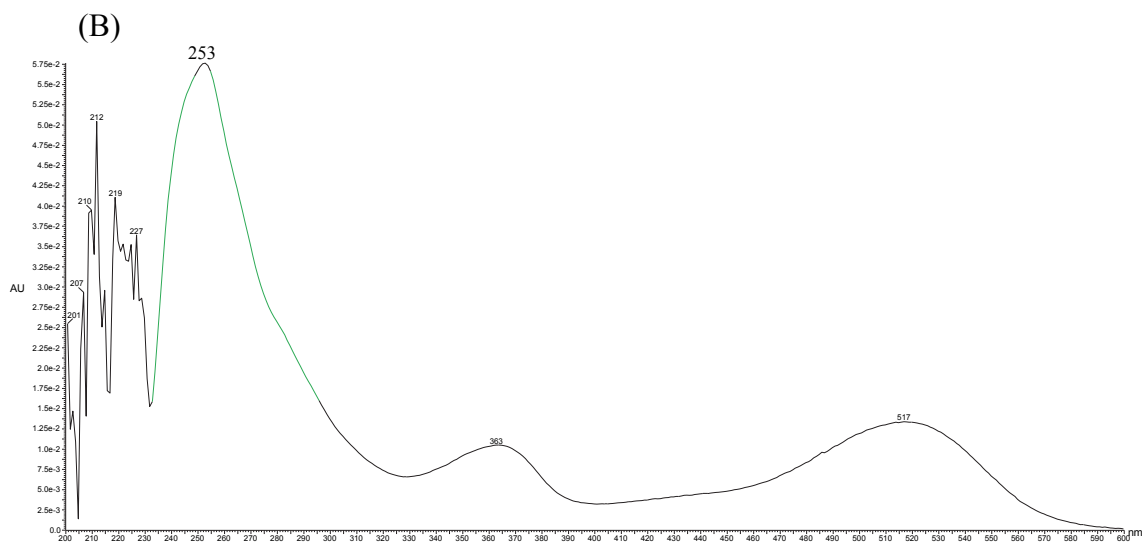
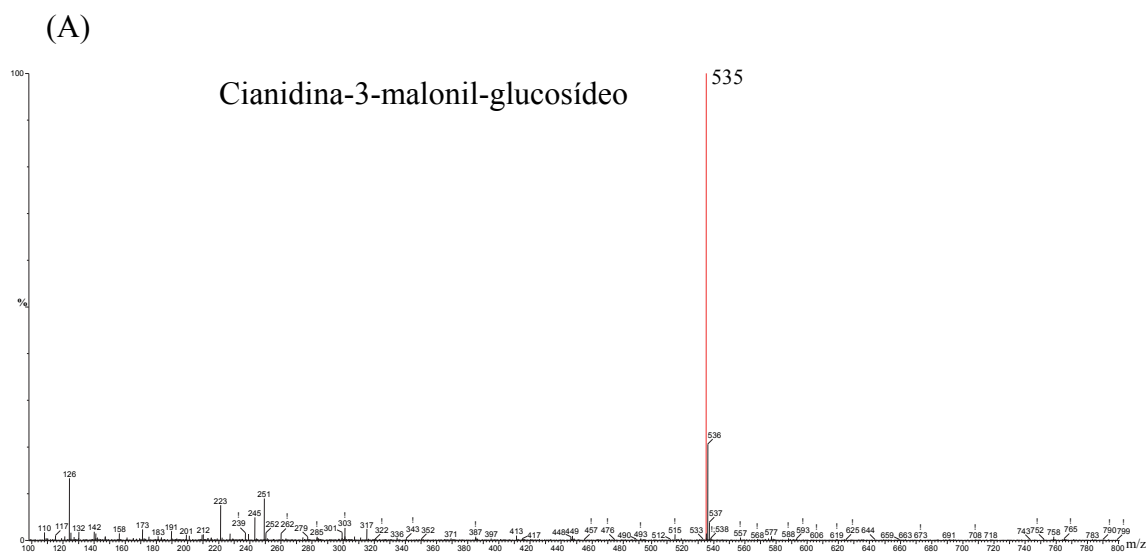


Figura 5.17 Espectro de massa do íon molecular m/z 535 (Cianidina-3-malonil-glicosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B).

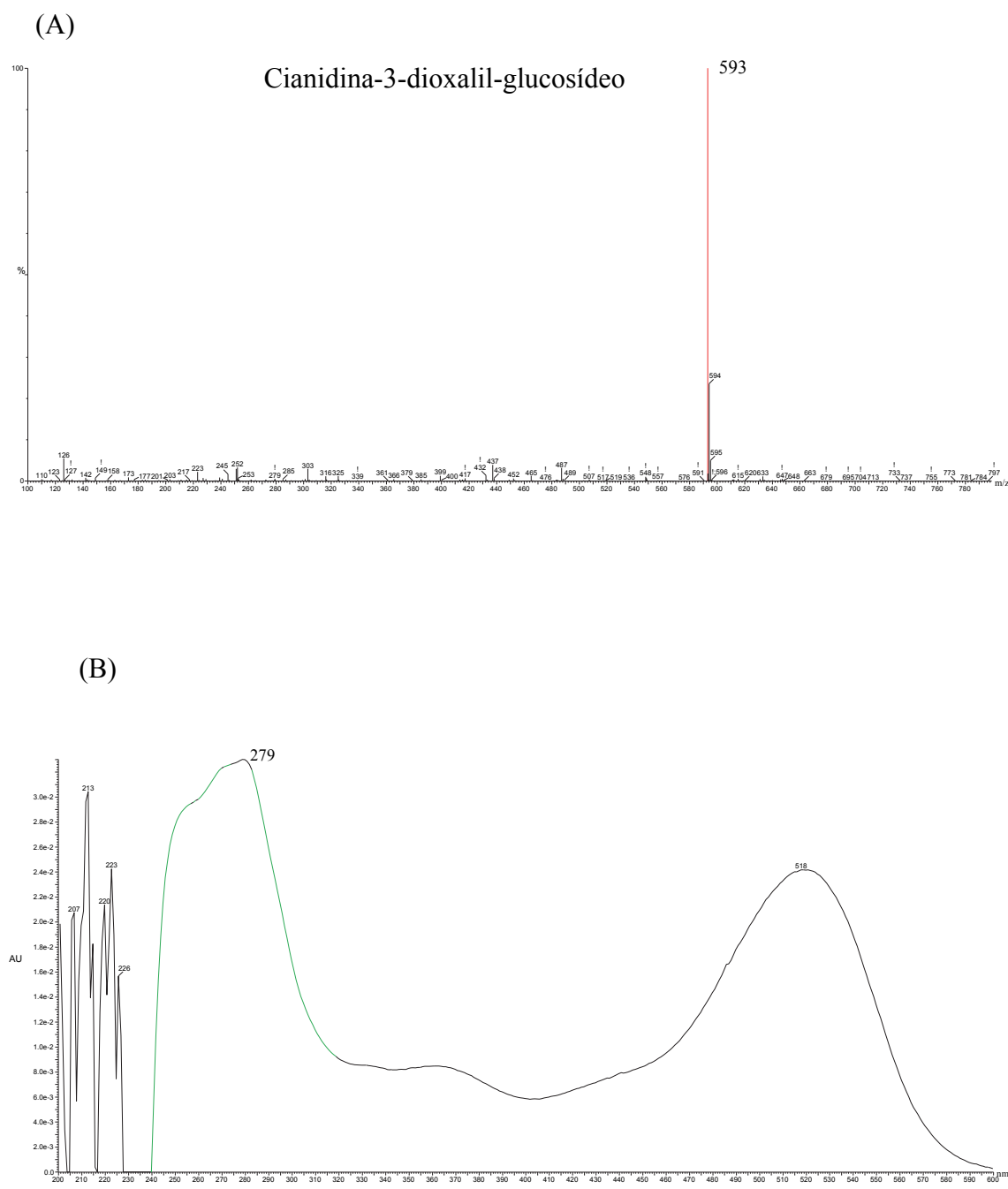


Figura 5.18 Espectro de massa do íon molecular m/z 593 (Cianidina-3-dioxalil-glicosídeo) (A) e seu respectivo espectro com sua máxima absorvância na região UV-Visível (B).

Os espectros de UV-Vis dos compostos identificados, mostrados nas Figuras 5.15 B, 5.16 B, 5.17 B e 5.18 B, exibem os comprimentos de onda máximos visíveis, respectivamente. O comprimento de onda máximo na gama visível é estreitamente relacionado com o padrão de hidroxilação das antocianinas (Tian et al., 2006). Segundo Dao et al. (1998) e Gouvêa (2010), entre as principais antocianinas presentes na amora-preta destacam-se a Cianidina-3-glucosídeo e Cianidina-3-rutinosídeo, como as mais representativas. Um estudo realizado em 18 cultivares de amora-preta apresentou como antocianina majoritária a Cianidina-3-glucosídeo, além de quatro minoritárias, Cianidina-3-rutinosídeo, Cianidina-3-xilosídeo, Cianidina-3-malonil-glucosídeo e Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo (Fan-Chiang e Wrolstad, 2005). Estes resultados são semelhantes aos das antocianinas encontradas neste trabalho, com exceção de Cianidina-3-xilosídeo que não foi detectada no presente estudo. As antocianinas normalmente são mais estáveis sob condições ácidas, porém podem se degradar por qualquer mecanismo que leva à formação de compostos escuros (Barnes et al., 2009).

5.6.2 Separação e quantificação das Antocianinas por HPLC-DA

A Tabela 5.12 mostra as concentrações das respectivas antocianinas (Cianidina-3-glucosídeo, Cianidina-3-rutinosídeo, Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo e Cianidina-3-malonil-glucosídeo) presentes em os extratos obtidos pela extração supercrítica com etanol e água como cossolvente na condição de 60 °C, 15 MPa e 200 Watts de potência ultrassônica. No Apêndice E encontra-se uma descrição detalhada das curvas padrão utilizada para determinar a concentração de antocianinas presentes nos extratos. De acordo com os resultados obtidos por HPLC-DAD, foi observado que a concentração de antocianinas é menor com respeito, aqueles valores encontrados pelo método pH diferencial. Porém essa diferença é pequena, já que a quantificação realizada pelo método de pH diferencial fornece valores de antocianinas monoméricas totais, ou seja, tanto as majoritárias quanto as outras de menor concentração são quantificadas, enquanto o valores obtidos por HPLC-DAD fornece a soma dos valores das antocianinas majoritárias. Segundo Gouvêa (2010) outra possível hipótese para esta diferença é devido à presença de possíveis substâncias no extrato de amora, que interferiram apenas nos resultados proveniente da análise de quantificação por pH diferencial e não nos resultados por HPLC-DAD.

Tabela 5.12 Concentração das antocianinas obtidas por HPLC-DAD a partir dos extratos da amora-preta.

Amostra	Cossolvente	C3G ^a	C3R ^b	C3MG ^c	C3DG ^d	Total
Extratos obtidos pela extração supercrítica						
Seca triturada	CO ₂ :EtOH / 90:10	0,5216 ± 0,05	0,0439 ± 0,00	0,0344 ± 0,00	0,0406 ± 0,01	0,6405 ± 3,18
Seca triturada	CO ₂ :água / 90:10	5,6966 ± 0,38	0,4223 ± 0,00	0,2179 ± 0,01	0,2575 ± 0,01	6,5944 ± 2,56
Seca triturada	CO ₂ :EtOH / 95:5	0,1939 ± 0,01	0,0309 ± 0,00	0,0211 ± 0,00	0,0265 ± 0,00	0,2726 ± 2,87
Seca triturada	CO ₂ :água / 95:5	3,9091 ± 0,49	0,2888 ± 0,03	0,1659 ± 0,02	0,1875 ± 0,02	4,5513 ± 5,44
In natura	CO ₂ :EtOH / 95:5	4,4434 ± 0,02	0,2859 ± 0,00	0,1494 ± 0,00	0,1962 ± 0,01	5,0749 ± 1,45
In natura	CO ₂ :água / 95:5	8,0656 ± 0,19	0,6487 ± 0,03	0,2564 ± 0,01	0,3384 ± 0,02	9,3091 ± 2,72
Extratos obtidos por extração com Soxhlet						
Seca triturada	Etanol	3,1996 ± 0,16	0,1879 ± 0,01	0,0720 ± 0,01	0,1088 ± 0,01	3,5683 ± 4,22

^aTeor de antocianina cianidina-3-glicosídeo (C3G) expresso em mg de antocianina por grama de extrato;

^bTeor de antocianina cianidina-3-rutinosídeo (C3R) expresso em mg de antocianina por grama de extrato;

^cTeor de antocianina cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG) expresso em mg de antocianina por grama de extrato;

^dTeor de antocianina cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG) expresso em mg de antocianina por grama de extrato;

*Resultados expressos pela sua média ± desvio padrão.

5.7 ANÁLISE DE IMAGEM

5.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 5.19 apresenta as imagens produzidas com microscopia eletrônica de varredura a partir do bagaço de amora-preta seca triturada. As amostras analisadas por MEV foram retiradas aleatoriamente daquelas extraídas com dióxido de carbono supercrítico, com e sem ultrassom.

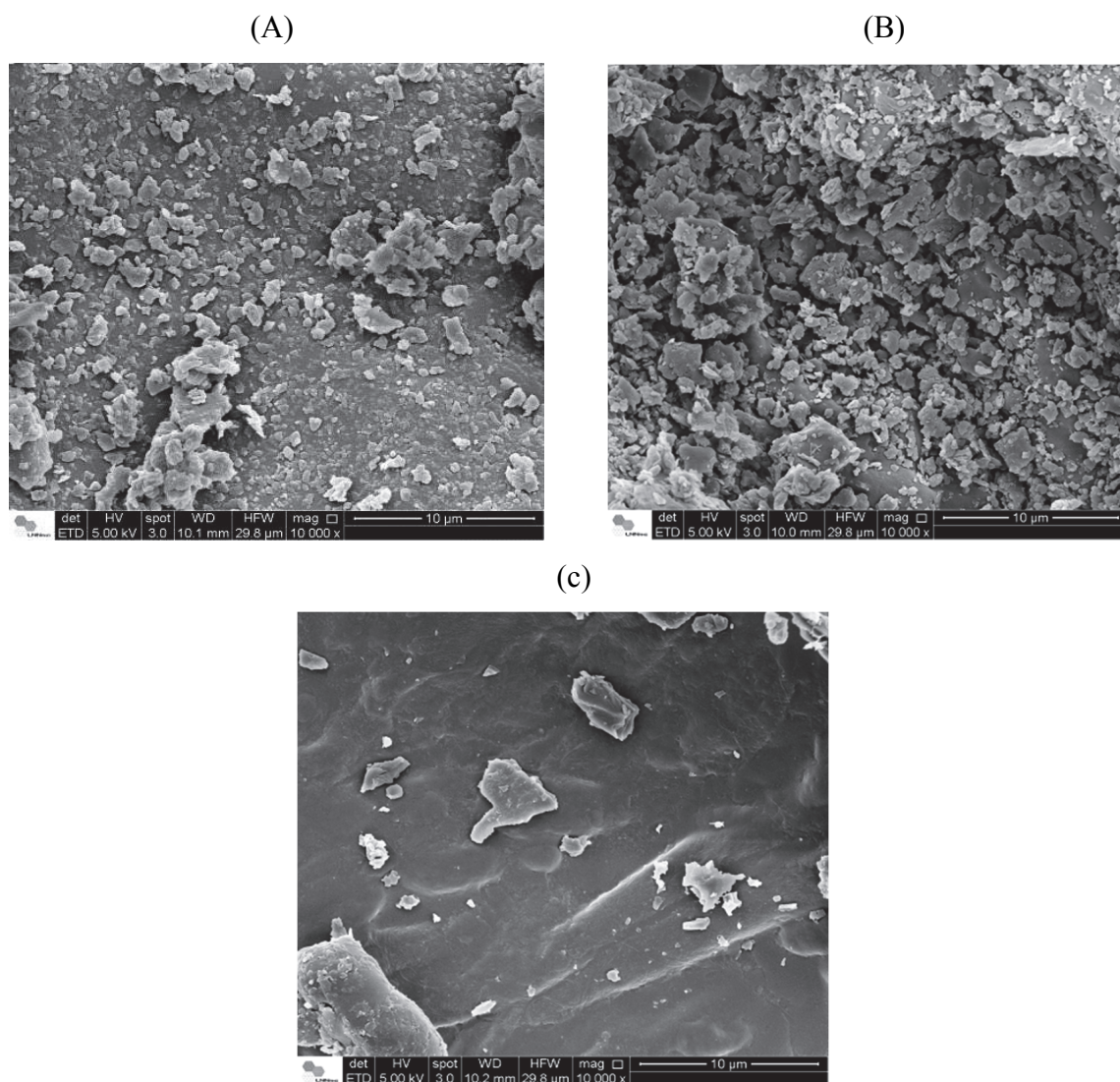


Figura 5.19 Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas a partir do bagaço de amora-preta com aumento de 10.000 vezes, onde: (A) amostra extraída a 40 °C, 15 MPa com adição de ultrassom de 200 Watts; (B) amostra extraída a 50 °C, 25 MPa e 400 Watts de potência ultrassônica e (c) amostra extraída a 50 °C, 25 MPa sem adição de ultrassom.

O objetivo da análise de imagem foi avaliar o efeito da vibração ultrassônica sobre a estrutura física das partículas de amora-preta. Observou-se que a vibração ultrassônica perturba as paredes das células, facilitando a remoção dos componentes internos da parede celular, permitindo o acesso do solvente de extração a regiões antes inacessíveis (Figuras 5.19 A e 5.19 B). O contrário é observado na Figura 5.19 C, obtida de amostra extraída sem adição de ultrassom, onde a passagem só do fluido supercrítico não provoca uma alteração morfológica nas partículas. De fato, a adição de ultrassom a 200 Watts é mais branda que aquela onde se aplicou 400 Watts, mas nas duas pode ser observado que um maior número de partículas é retirado do interior da matriz vegetal para depois ser depositado na sua superfície, o que deve contribuir significativamente no aumento do rendimento. Porém, processos de extração supercrítica com e sem ultrassom não causam fissuras nem rachaduras na superfície da amostra.

6 CONCLUSÕES

O uso do bagaço de amora-preta como matéria-prima para a obtenção de extratos é promissor devido à elevada qualidade dos compostos que permanecem presentes neste resíduo industrial, justificando assim seu aproveitamento. A matéria-prima em estudo foi extremamente difícil de ser trabalhada *in natura*, como relatado durante os testes preliminares. Logo, um pré-tratamento, como secagem é necessário para a extração supercrítica.

A extração supercrítica com CO₂ puro apresentou rendimentos inferiores àqueles alcançados pelas extrações por Soxhlet e maceração. O maior rendimento para a extração supercrítica foi obtido na condição de 50 °C, 25 MPa e 400 Watts de potência ultrassônica, enquanto que para a extração por Soxhlet o maior rendimento foi obtido empregando etanol como solvente. Os resultados mais expressivos para antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante foram observados nos extratos por Soxhlet, onde o solvente utilizado foi etanol.

O uso de cossolvente na extração supercrítica aumentou consideravelmente o rendimento de extração, em comparação à extração supercrítica com CO₂ puro. O aumento foi de quase oito e cinco vezes com 10 % de etanol e água, respectivamente. Por outro lado, foi observada uma queda significativa em quase quatro e seis vezes com 5 % de etanol e água, quando a extração foi realizada na matéria-prima *in natura*. Além disso, o uso de cossolvente aumentou o conteúdo de antocianinas, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante para os extratos encontrados a partir do bagaço de amora-preta seca triturada com 10 % de água, e no caso da matéria-prima *in natura*, apresentou maior teor de antocianinas na extração com 5 % de água como cossolvente. Além disso, a partir da análise por UPLC-QTOF-MS, foi possível identificar quatro antocianinas; duas majoritárias (Cianidina-3-glucosídeo e Cianidina-3-rutinosídeo) e duas minoritárias (Cianidina-3-malonil-glucosídeo e Cianidina-3-dioxalil-glucosídeo), presentes no bagaço de amora-preta.

De modo geral, este trabalho mostra a influência de ultrassom na extração supercrítica do bagaço de amora-preta seca triturada. O rendimento dos compostos de interesse é significativamente aumentado sob a influência do ultrassom. Este aumento no rendimento de extração pode ser explicado pela turbulência criada pela vibração ultrassônica. A análise de imagem feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou um número maior de partículas depositadas na superfície da matéria-prima submetida à extração supercrítica com ultrassom, em relação à matéria-prima extraída sem ultrassom. É possível que o acúmulo de partículas na superfície seja causado simplesmente pelas rápidas mudanças na densidade associadas com as variações de pressão induzidas pelas ondas de ultrassom.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo da cinética de extração usando modelos matemáticos, para verificar como parâmetros cinéticos mudam com as condições aplicadas.

Aplicação de métodos alternativos de separação dos extratos, como concentração em membranas.

Utilização de outros modificadores, a fim de avaliar seus efeitos na eficiência de extração.

Análise da atividade antioxidante dos extratos de bagaço de amora-preta por outros métodos, como por exemplo o método de redução do ferro (FRAP) e pelo método β -caroteno/Ácido linoleico.

Avaliação do custo de manufatura para o processo de extração supercrítica assistida por ultrassom.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDILLE, M. H., SINGH, R. P., JAYAPRAKASHA, G. K. e JENA, B. S. 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. . *Food Chemistry*, Washington, , v. 90, p. 891-896.
- ADIL, İ. H., ÇETIN, H. İ., YENER, M. E. e BAYINDIRLI, A. 2007. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43, 55-63.
- AI-JUN, H., SHUNA, Z., HANHUA, L., TAI-QIU, Q. e GUOHUA, C. 2006. Ultrasound assisted supercritical fluid extraction of oil and coixenolide from adlay seed. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 219-224.
- AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K. e HAGEN, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
- ANKLAM, E., BERG, H., MATHIASSEN, L., SHARMAN, M. e ULBERTH, F. 1998. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review. *Food Additives and Contaminants*, 15, 729-750.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., ROBARDS, K. e RYAN, D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125, 989-1009.
- ANTUNES, L. E. C. 2002. Amora-preta: nova opção de cultivo no brasil. *Ciência Rural*. Santa Maria., v.32, n.1., p.151-158.
- ANTUNES, L. E. C., REGINA, M. A. e DUARTE FILHO, J. 2002. A cultura da amora-preta. . Belo Horizonte: EPAMIG., 28 p. (Boletim Técnico, 69).
- AOAC, I. 1997. Official methods of analysis. 16^a ed., 3^a rev. Gaithersburg: Published by AOAC International., v.2., cap. 32, p.1-43.
- AWAD, T. S., MOHARRAM, H. A., SHALTOUT, O. E., ASKER, D. e YOUSSEF, M. M. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48, 410-427.
- AYALA-ZAVALA, J. F., VEGA-VEGA, V., ROSAS-DOMÍNGUEZ, C., PALAFOX-CARLOS, H., VILLA-RODRIGUEZ, J. A., SIDDIQUI, M. W., DÁVILA-AVIÑA, J. E. & GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866-1874.

- BAGCHI, D., SEN, C. K., BAGCHI, M. e ATALAY, M. 2004. Review: Antiangiogenic, antioxidant, and anticarcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biokhimiya*, 69, 95-102.
- BALACHANDRAN, S., KENTISH, S. E., MAWSON, R. e ASHOKKUMAR, M. 2006. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 471-479.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, A. 2006. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, n. 1, p. 558-565
- BARNES, J. S., NGUYEN, H. P., SHEN, S. e SCHUG, K. A. 2009. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4728-4735.
- BAYSAL, T., ERSUS, S. e STARMANS, D. A. J. 2000. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5507-5511.
- BENVENUTI, S., PELLATI, F., MELEGARI, M. e BERTELLI, D. 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 69, 164-169.
- BLASCO, M., TÁRREGA, A., CAPILLA, V. e SUBIRATS, S. 1999. Applications of SCF in Food Industry. AINIA, Valencia, Spain.
- BLITZ, J. 1963. Fundamentals of ultrasonics. Butterworths e Co., London, 214 pp.
- BLITZ, J. 1971. Ultrasonics: Methods and applications. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- BOCCO, A., CUVELIER, M. E., RICHARD, H. e BERSET, C. 1998. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. e BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- BRAVO, L. e SAURA-CALIXTO, F. 1998. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 135-141.

- BRUNI, R., GUERRINI, A., SCALIA, S., ROMAGNOLI, C. e SACCHETTI, G. 2002. Rapid techniques for the extraction of vitamin E isomers from *Amaranthus caudatus* seeds: Ultrasonic and supercritical fluid extraction. *Phytochemical Analysis*, 13, 257-261.
- BRUNNER, G. 1994. Gas extraction: An introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, , 387.
- BRUNNER, G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33.
- BUREAU, S., RENARD, C. M. G. C., REICH, M., GINIES, C. e AUDERGON, J. M. 2009. Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 372-377.
- CALABUIG ARACIL, J. J. 1998. Extracción con CO₂ supercrítico de la cafeína del café y otras aplicaciones alimentarias. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. UPC.
- CAMPOS, L. M. A. S., MICHIELIN, E. M. Z., DANIELSKI, L. e FERREIRA, S. R. S. 2005. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *Journal of Supercritical Fluids*, 34, 163-170.
- CARRERA, C., RUIZ-RODRÍGUEZ, A., PALMA, M. e BARROSO, C. G. 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- CASAS, L., MANTELL, C., RODRÍGUEZ, M., TORRES, A., MACÍAS, F. A. e MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. 2009. Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 152, 301-306.
- CASTRO-VARGAS, H. I., RODRÍGUEZ-VARELA, L. I. e PARADA-ALFONSO, F. 2011. Guava (*Psidium guajava* L.) seed oil obtained with a homemade supercritical fluid extraction system using supercritical CO₂ and co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 56, 238-242.
- CONFORTI, F., MENICHINI, F., FORMISANO, C., RIGANO, D., SENATORE, F., ARNOLD, N. A. e PIOZZI, F. 2009. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chemistry*, 116, 898-905.
- COOK, N. C. e SAMMAN, S. 1996. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.

- CORTESI, A., KIKIC, I., ALESSI, P., TURTOI, G. e GARNIER, S. 1999. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 14, 139-144.
- COWAN, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- CUCCIOLONI, M., MOZZICAFREDDO, M., SPARAPANI, L., SPINA, M., ELEUTERI, A. M., FIORETTI, E. e ANGELETTI, M. 2009. Pomegranate fruit components modulate human thrombin. *Fitoterapia*, 80, 301-305.
- CUVELIER, M. E., RICHARD, H. e BERSET, C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 645-652.
- CHEMAT, F., ZILL E, H. e KHAN, M. K. 2011a. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.
- CHEMAT, F., ZILL, E. H. e KHAN, M. K. 2011b. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.
- CHIM, J. F. 2008. Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus* sp.) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e light., Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Brasil.
- CHOUCHI, D., BARTH, D., REVERCHON, E. e DELLA PORTA, G. 1996. Bigarade peel oil fractionation by supercritical carbon dioxide desorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1100-1104.
- DAO, L. T., TAKEOKA, G. R. e EDWARDS, R. H. 1998. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *Journal Agriculture. Food Chemistry.*, 46, 3564-3569.
- DE ANCOS, B., GONZALEZ, E. M. e CANO, M. P. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4565-4570.
- DEGNAN, A. J., VON ELBE, J.H., HARTEL e R.W. 1991. Extraction of annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Science.*, 56 (6), pp. 1655–1659.

- DEIGHTON, N., BRENNAN, R., FINN, C. e DAVIES, H. V. 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1307-1313.
- DEL VALLE, J. M. e AGUILERA, J. M. 1999. Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. Revisión: Extracción con CO₂ a alta presión. *Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos*, 5, 1-24.
- DING, M., FENG, R., WANG, S. Y., BOWMAN, L., LU, Y., QIAN, Y., CASTRANOVA, V., JIANG, B.-H. e SHI, X. 2006. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity. *Journal of Biological Chemistry, Maryland*, v. 281, n. 25, , p. 1.7359-1.7368.
- FACCO, E. M. P., HIRSCH, G. E., BAGETTI, M. e EMANUELLI, T. Estudo da composição centesimal e valor nutricional fde diferentes variedades de amora preta (*Rubus* sp.). XV. Seminário Latino americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008 Belo Horizonte.
- FADEL, H., MARX, F., EL-SAWY, A. e EL-GHORAB, A. 1999. Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils. *Zeitschrift fur Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung*, 208, 212-216.
- FACHINELLO, J. C. 2008. Mirtilo. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30: p. 285-576
- FAN-CHIANG, H. J. e WROLSTAD, R. E. 2005. Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70, C198-C202.
- FAVATI, F., KING, J. W., FRIEDRICH, J. P. e ESKINS, K. 1998. Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *Journal of Food Science*, 53 (5), pp. 1532–1536.
- FERREIRA, S. R. S. e MEIRELES, M. A. A. 2002. Modeling the supercritical fluid extraction of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Journal of Food Engineering*, 54, 263-269.
- FRANCIS, F. J. 1989. Food colorants: anthocyanins. *Critical reviews in food science and nutrition*, 28, 273-314.
- GALLEGO-JUÁREZ, J. A., RODRIGUEZ, G., ACOSTA, V. e RIERA, E. 2010. Power ultrasonic transducers with extensive radiators for industrial processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 953-964.
- GALLI, R. L., BIELINSKI, D. F., SZPRENGIEL, A., SHUKITT-HALE, B. e JOSEPH, J. A. 2006. Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection. *Neurobiology of Aging*, 27, 344-350.

- GAO, Y. 2009. Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49, 345-350.
- GIL, M. I., TOMAS-BARBERAN, F. A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D. M. e KADER, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589.
- GIUSTI, M. M. e WROLSTAD, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- GOUVÊA, A. C. M. S. 2010. Quantificação das antocianinas majoritárias do açaí por cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação (mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- GRAHAM, H. D. 1992. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus,, 40, 801-805.
- GROSS, J. 1987. Anthocyanins. In J. Gross (Ed.). *Pigment in fruits*, (pp. 59–77). London: Academic Press.
- HARBORNE, J. B., BAXTER, H. e MOSS, G. P. 1999. *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London: Taylor and Francis.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. e BOBILYA, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- HEINONEN, I. M., MEYER, A. S. e FRANKEL, E. N. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 46,, p. 4107-4112.
- HERRERO, M., CIFUENTES, A. e IBAÑEZ, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98, 136-148.
- HOLLENDER, J., SHNEINE, J., DOTT, W., HEINZEL, M., HAGEMANN, H. W. e GOTZ, G. K. E. 1997. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. *Journal of Chromatography* 776, 33-43.
- IGARTUBURU, J. M., PANDO, E., RODRÍGUEZ LUIS, F. e GIL-SERRANO, A. 1997. An acidic xyloglucan from grape skins. *Phytochemistry*, 46, 1307-1312.

- IGNAT, I., VOLF, I. e POPA, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- ISHIGE, K., SCHUBERT, D. e SAGARA, Y. 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biological Medicine*, Washington,, v. 30,, p. 433-446.
- JUN, C., KEDIE, Y., SHULAI, C., ADSCHIRI, T. e ARA, K. 1997. Effects of Ultrasound on Mass Transfer in Supercritical Extraction. *The 4th Symposium on Supercritical Fluids.*, Mayo 11-14, Sendai, Japón.
- KAPASAKALIDIS, P. G., RASTALL, R. A. e GORDON, M. H. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4016-4021.
- KARAKAYA, S., EL, S. N. e TAŞ, A. A. 2001. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 501-508.
- KIM, G. N., SHIN, J. G. e JANG, H. D. 2009. Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chemistry*, 117, 35-41.
- KIMBALL, D. A. 1987. DEBITTERING OF CITRUS JUICES USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE. *J Food Sci*, 52, 481-482.
- KNORR, D., FROEHLING, A., JAEGER, H., REINEKE, K., SCHLUETER, O. e SCHOESSLER, K. 2011. Emerging technologies in food processing. *Annual review of food science and technology*, 2, 203-235.
- KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N.-K., CHIA, T.-F. e BROUILLARD, R. 2003a. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- KONG, J. M., CHIA, L. S., GOH, N. K., CHIA, T. F. e BROUILLARD, R. 2003b. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V. e MILOS, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633-640.
- KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., TRONCOSO, A. M., MANCINI-FILHO, J. e FETT, R. 2005. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.

- LANG, Q. e WAI, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. *Talanta*, 53, 771-782.
- LAZZE, M. C., SAVIO, M., PIZZALA, R., CAZZALINI, O., PERUCCA, P., SCOVASSI, A. I., STIVALA, L. A. e BIANCHI, L. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*, Oxford,, v. 25, n. 8,, p. 1.427-1.433.
- LEHOTAY, S. J. 1997. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of Chromatography A*, 785, 289-312.
- LOMMEN, A., GODEJOHANN, M., VENEMA, D. P., HOLLMAN, P. C. H. e SPRAUL, M. 2000. Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel. *Analytical Chemistry*, 72, 1793-1797.
- LOPEZ-AVILA, V., YOUNG, R. e TEPLITSKY, N. 1996. Microwave-Assisted Extraction as an Alternative to Soxhlet, Sonication, and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of AOAC International*, 79, 142-156.
- LU, Y. e FOO, L. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, 65, 1-8.
- LU, Y. e FOO, L. Y. 1997. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 59, 187-194.
- LUQUE-GARCÍA, J. L. e LUQUE DE CASTRO, M. D. 2003. Ultrasound: A powerful tool for leaching. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22, 41-47.
- MALLACRIDA, S. R. e MOTTA, S. 2006. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *CEPPA*., 24, 59-82.
- MARTÍNEZ, J. 2005. Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: Desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. Tese (Doutorando em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.
- MARTINS, S., MUSSATTO, S. I., MARTÍNEZ-AVILA, G., MONTAÑEZ-SAENZ, J., AGUILAR, C. N. e TEIXEIRA, J. A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29, 365-373.
- MASON, T. J., PANIWNKY, L. e LORIMER, J. P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, S253-S260.

- MAU, J.-L., TSAI, S.-Y., TSENG, Y.-H. e HUANG, S.-J. 2005. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 589-597.
- MCCLEMENTS, D. J. 1997. Ultrasonic Characterization of Foods and Drinks: Principles, Methods, and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 1-46.
- MEIRELES, M. A. A. 2008. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American plants. In: Jose Martinez. (Org.). *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. Boca Raton: CRC Press - Taylor e Francis Group, 243-274.
- MENDES, R. L., NOBRE, B. P., CARDOSO, M. T., PEREIRA, A. P. e PALAVRA, A. F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328-334.
- MIYAKE, T. e SHIBAMOTO, T. 1998. Inhibition of Malonaldehyde and Acetaldehyde Formation from Blood Plasma Oxidation by Naturally Occurring Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3694-3697.
- MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., JOSÉ NÚÑEZ, M. A. e PARAJÓ, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- MOYER, R. A., HUMMER, K. E., FINN, C. E., FREI, B. e WROLSTAD, R. E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525.
- MULET, A., CARCEL, J. A., BON, J. e SAN JUAN, N. 2003. New food drying technologies - use of ultrasound. *Food Science and Technology International*, 9(3):215-221.
- MURGA, R., RUIZ, R., BELTRAN, S. e CABEZAS, J. L. 2000. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3408-3412.
- MUTHUKUMARAN, S., KENTISH, S. E., STEVENS, G. W. e ASHOKKUMAR, M. 2006. Application of ultrasound in membrane separation processes: A review. *Reviews in Chemical Engineering*, 22, 155-194.
- N. SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, C. PROVOST e VIVAS, N. 1999. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 425-431.

- NACZK, M. e SHAHIDI, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- NAKASUGI, T. e KOMAI, K. 2008. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2560-2564.
- NURGEL, C. e CANBAS, A. 1998. Production of tartaric acid from pomace of some Anatolian grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 95-99.
- OLLANKETO, M., HARTONEN, K., RIEKKOLA, M. L., HOLM, Y. e HILTUNEN, R. 2001. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *European Food Research and Technology*, 212, 561-565.
- PATIST, A. e BATES, D. 2008. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 147-154.
- PELLERIN, P. 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. *Perfum.Flavor, Wheaton*, v.16, p. 37-9.
- PEREIRA, C. G. e MEIRELES, M. A. A. 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 340-372.
- PÉREZ, J. V. G. 2007. Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos. tesis doctoral universidad politecnica de valencia.
- PICO, Y. 2012. Low-Intensity Ultrasounds.
- PINELO, M., FABBRO, P. D., MANZOCCO, L., NUÑEZ, M. J. & NICOLI, M. C. 2005. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92, 109-117.
- POLING, E. B. 1996. Blackberries. *Journal of Small Fruit and Viticulture*, 14, 38-69.
- POPA, V. I., DANAILA, M., VOLF, I., POPA, M.I. 2007. Natural antioxidants from agroindustrial wastes sources, separation and practical implications. In: *Proceedings of the 8th ILI Forum* (pp. 67–70), Rome, 10–12.
- POTTER, U. J. e LOVE, G. 1999. MICROSCOPY | Scanning Electron Microscopy. In: EDITOR-IN-CHIEF: RICHARD, K. R. (ed.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Oxford: Elsevier.

- POURMORTAZAVI, S. M. e HAJIMIRSADEGHI, S. S. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163, 2-24.
- PRADO, I. M. 2009. Uso de simulador no estudo de aumento de escala e viabilidade econômica do processo de extração supercrítica de produtos naturais. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.
- RAJAEI, A., BARZEGAR, M. e YAMINI, Y. 2005. Supercritical fluid extraction of tea seed oil and its comparison with solvent extraction. *European Food Research and Technology*, 220, 401-405.
- RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., NAMIKI, M. e KAWAKISHI, S. 2006. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, A C-glycosyl flavonoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 316-319.
- RASEIRA, A., SANTOS, A. M. D. e RASEIRA, M. D. C. B. 1992. Caingangue, nova cultivar de amoreira-preta para consumo 'in natura'. *HortiSul, Pelotas*, v.2, n.3,, p.11-12.
- RAVENTÓS, M., DUARTE, S. e ALARCÓN, R. 2002. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: An overview. *Food Science and Technology International*, 8, 269-284.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. e RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- REVERCHON, E. e DE MARCO, I. 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.
- RIERA, E., GOLÁS, Y., BLANCO, A., GALLEGO, J. A., BLASCO, M. e MULET, A. 2004. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 241-244.
- RODRIGUEZ DE SOTILLO, D., HADLEY, M. e HOLM, E. T. 1994a. Phe-nolics in aqueous potato peel extract, extraction, identification and degradation. *Journal of Food Science*, 59, , 649-651.
- ROSTAGNO, A., PALMA, M. e BARROSO, C. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012, 119-128.
- SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A., ABBAS, K. A., NORULAINI, N. A. N. e OMAR, A. K. M. 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 95, 240-253.

- SANTOS, P. D. 2013. Extração de capsacinoídeos da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) usando CO₂ supercrítico e ultrassom. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.
- SCHIEBER, A., KELLER, P. e CARLE, R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910, 265-273.
- SEERAM, N. P. 2006. Chapter 37 - Berries. In: DAVID, H., GEORGE, L. B., VAY LIANG, W. G., JOHN MILNERA2 - DAVID HEBER, G. L. B. V. L. W. G. e JOHN, M. (eds.) *Nutritional Oncology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press.
- SEERAM, N. P., ADAMS, L. S., ZHANG, Y., LEE, R., SAND, D., SCHEULLER, H. S. e HEBER, D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 54, p. 9.329-9.339.
- SIMÓM, G. V., HERNÁNDEZ, R. M. S. e GONZÁLEZ, M. T. R. 2002. Análisis preliminar de antocianinas en fruto de icaco. *Revista Fitotecnica Mexicana*, v. 25, p. 261-264
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R. e LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- SINGLETON, V. L. e ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 144-158.
- SORIA, A. C. e VILLAMIEL, M. 2010a. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 323-331.
- SORIA, A. C. e VILLAMIEL, M. 2010b. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 323-331.
- SPANOS, G. A., CHEN, H. e SCHWARTZ, S. J. 1993. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from sweet potatoes. *Journal of Food Science*, 58 (4), pp. 817-820.
- SUN, J., CHU, Y. F., WU, X. e LIU, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449-7454.

- TATE, P., STANNER, A., SHIELDS, K., SMITH, S. e LARCOM, L. 2006. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100. *Nutrition Research*, Amsterdam,, v. 26,, p. 100-104.
- TENA, M. T., RÍOS, A. e VALCÁRCEL, M. 1998. Supercritical fluid extraction of *t*-resveratrol and other phenolics from a spiked solid. . *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 143-148.
- THIEM, B. 2003. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review,. *Biotechnology Letters*, v. 40, nº 1,, p. 3-13.
- TIAN, Q., GIUSTI, M. M., STONER, G. D. e SCHWARTZ, S. J. 2006. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 94, 465-468.
- TSANG, C., HIGGINS, S., DUTHIE, G. G., DUTHIE, S. J., HOWIE, M., MULLEN, W., LEAN, M. E. J. e CROZIER, A. 2005. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*, 93, 233-240.
- TSAO, R. e YANG, R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018, 29-40.
- TSUDA, T., MIZUNO, K., OHSHIMA, K., KAWAKISHI, S. e OSAWA, T. 1995. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidative components from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2803-2806.
- VAN ACQUIRE, S. A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 20, 331-342.
- VEGA, P. J., BALABAN, M. O., SIMS, C. A., O'KEEFE, S. F. e CORNELL, J. A. 1996. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM. *Journal of Food Science*, 61, 757-759.
- VEGGI, P. C. 2009. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. *Disertação (Mestre em Engenharia de Alimentos)*, Universidade Estadual de Campinas.
- VILKHU, K., MAWSON, R., SIMONS, L. e BATES, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science eamp; Emerging Technologies*, 9, 161-169.

- VOLF, I. e POPA, V. I. 2004. The obtaining of antioxidant active principles from vegetal waste materials. I. The study of the extraction process of polyphenolic compounds from *Vitis* sp. wood. Obținerea unor principii active cu caracter antioxidant din subproduse vegetale I. Studiul procesului de extracție a compușilor polifenolici din lemn de *Vitis* sp., 55, 707-710.
- WANG, S. Y., e JIAO, H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5677–5684.
- WANG, W. D. e XU, S. Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82, 271-275.
- WILLIAMS, D. F. 1981. Extraction with supercritical gases. *Chemical Engineering Science*, 36, 1769–1788.
- ZHANG, Z., LIAO, L., MOORE, J., WU, T. e WANG, Z. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, 113, 160-165.

9 APÊNDICE

9.1 APÊNDICE A: Curvas padrão utilizadas nos experimentos

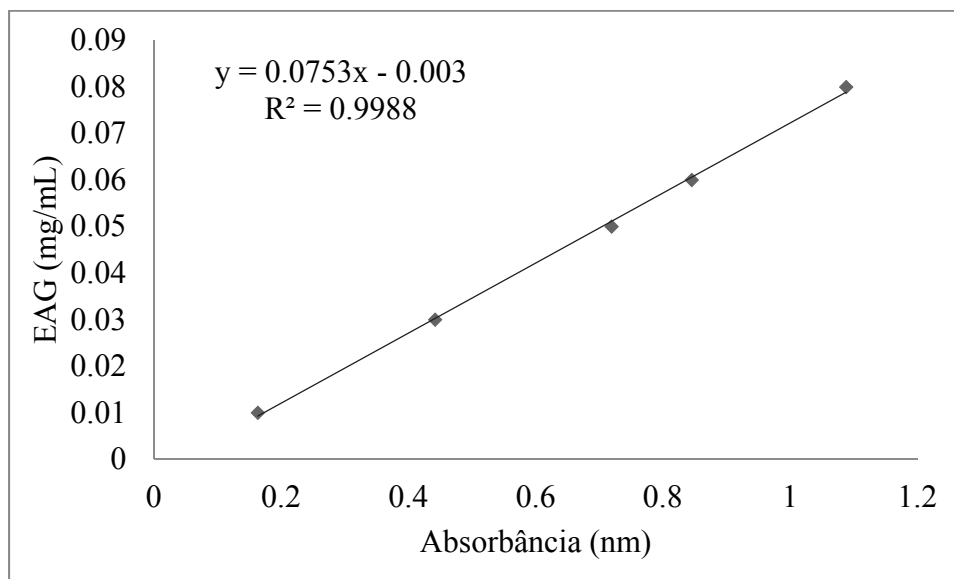


Figura 9.1 Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação do teor de fenólicos totais.

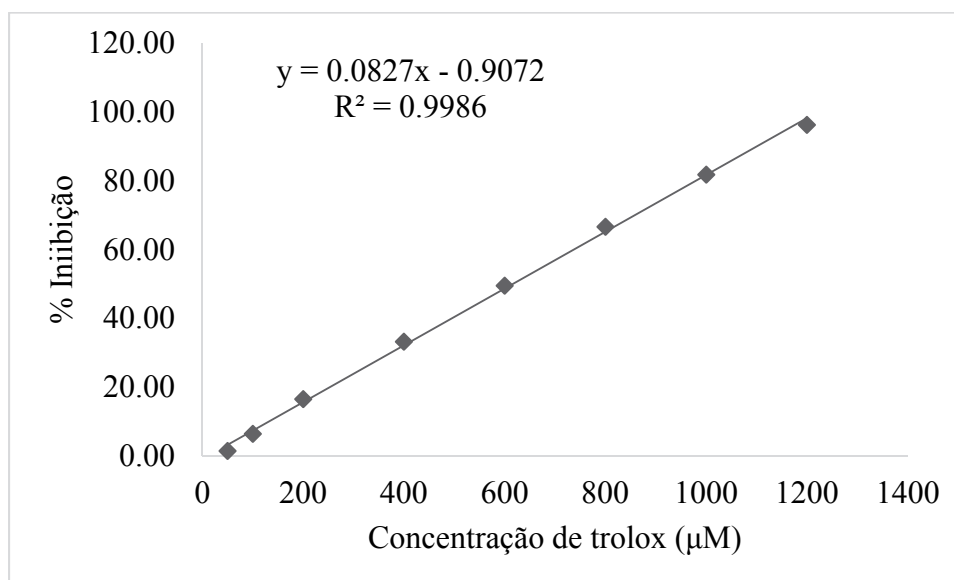


Figura 9.2 Curva padrão de trolox para método de atividade antioxidante DPPH.

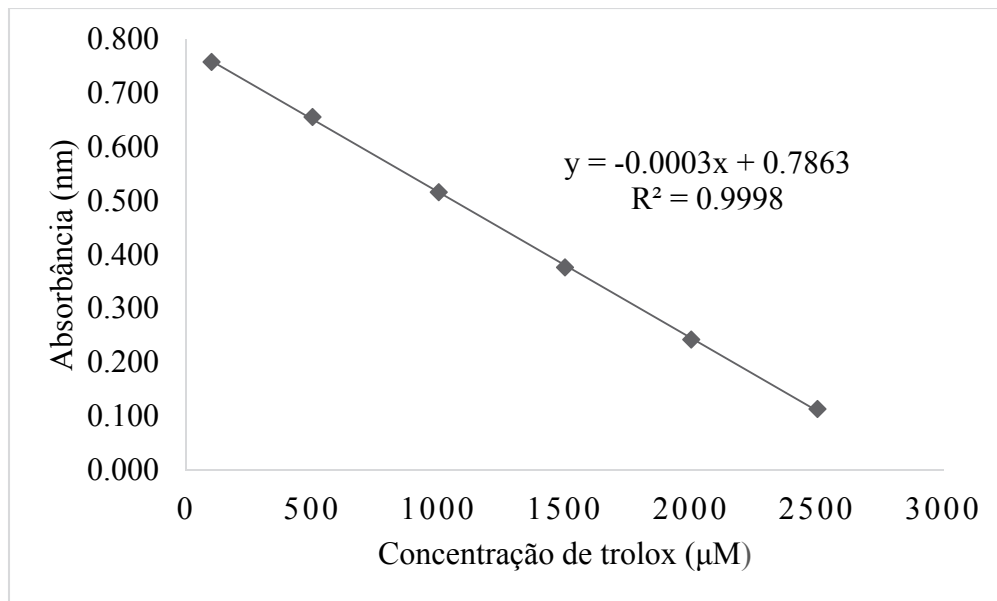


Figura 9.3 Curva padrão de trolox utilizada na determinação de capacidade antioxidante ABTS.

9.2 APÊNDICE B: Dados experimentais dos testes preliminares

Tabela 9.1 Dados do experimento cinco com $5,0291 \pm 0,23$ gramas de matéria-prima seca triturada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$.

Tempo (minuto)	M_{Extrato} (g)	M_{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO_2 (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,0377	0,0377	0,0832	16,55	0,78
10	0,0296	0,0673	0,1664	33,09	1,39
15	0,0273	0,0946	0,2496	49,64	1,95
20	0,0247	0,1193	0,3329	66,19	2,46
30	0,0439	0,1632	0,4993	99,28	3,37
40	0,0364	0,1996	0,6657	132,37	4,12
50	0,0240	0,2236	0,8321	165,46	4,61
60	0,0214	0,2450	0,9986	198,56	5,05
80	0,0281	0,2731	1,3314	264,74	5,63
100	0,0197	0,2928	1,6643	330,93	6,04
120	0,0149	0,3077	1,9971	397,11	6,35
150	0,0149	0,3226	2,4964	496,39	6,65
180	0,0080	0,3306	2,9957	595,67	6,82
210	0,0110	0,3416	3,4950	694,95	7,05
240	0,0021	0,3437	3,9942	794,22	7,09
270	0,0013	0,3450	4,4935	893,50	7,12
300	0,0008	0,3458	4,9928	992,78	7,13
DP	0,0129	0,3587	-	-	-

Tabela 9.2 Dados do experimento seis com $5,1621 \pm 2,18$ gramas de matéria-prima seca triturada a $40\text{ }^\circ\text{C}$, 15 MPa , 200 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$.

Tempo (minuto)	M_{Extrato} (g)	M_{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO_2 (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,0602	0,0602	0,0832	16,12	1,17
10	0,0591	0,1193	0,1664	32,24	2,31
15	0,0488	0,1681	0,2496	48,36	3,26
20	0,0369	0,2050	0,3329	64,48	3,98
30	0,0404	0,2454	0,4993	96,72	4,76
40	0,0412	0,2866	0,6657	128,96	5,56
50	0,0332	0,3198	0,8321	161,20	6,20
60	0,0234	0,3432	0,9986	193,44	6,66
80	0,0326	0,3758	1,3314	257,92	7,29
100	0,0265	0,4023	1,6643	322,40	7,80
120	0,0119	0,4142	1,9971	386,88	8,03
150	0,0244	0,4386	2,4964	483,60	8,51
180	0,0134	0,4520	2,9957	580,32	8,77
210	0,0090	0,4610	3,4950	677,04	8,94
240	0,0045	0,4655	3,9942	773,76	9,03
270	0,0097	0,4752	4,4935	870,48	9,22
300	0,0041	0,4793	4,9928	967,20	9,30
DP	0,0006	0,4799	-	-	-

Tabela 9.3 Dados do experimento sete com $5,0427 \pm 0,42$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$.

Tempo (minuto)	M _{Extrato} (g)	M _{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO ₂ (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,0306	0,0306	0,0832	16,50	0,64
10	0,0258	0,0564	0,1664	33,00	1,17
15	0,0253	0,0817	0,2496	49,51	1,70
20	0,0204	0,1021	0,3329	66,01	2,12
30	0,0490	0,1511	0,4993	99,01	3,14
40	0,0301	0,1812	0,6657	132,01	3,77
50	0,0256	0,2068	0,8321	165,02	4,30
60	0,0255	0,2323	0,9986	198,02	4,83
80	0,0385	0,2708	1,3314	264,03	5,63
100	0,0333	0,3041	1,6643	330,03	6,33
120	0,0262	0,3303	1,9971	396,04	6,87
150	0,0267	0,3570	2,4964	495,05	7,43
180	0,0165	0,3735	2,9957	594,06	7,77
210	0,0150	0,3885	3,4950	693,07	8,08
240	0,0122	0,4007	3,9942	792,08	8,34
270	0,0045	0,4052	4,4935	891,09	8,43
300	0,0007	0,4059	4,9928	990,10	8,45
DP	0,0200	0,4259	-	-	-

Tabela 9.4 Dados do experimento oito com $5,0485 \pm 1,35$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 MPa , 200 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$.

Tempo (minuto)	M_{Extrato} (g)	M_{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO_2 (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,0219	0,0219	0,0832	16,48	0,46
10	0,0367	0,0586	0,1664	32,97	1,22
15	0,0203	0,0789	0,2496	49,45	1,65
20	0,0264	0,1053	0,3329	65,93	2,20
30	0,0557	0,1610	0,4993	98,90	3,36
40	0,0631	0,2241	0,6657	131,86	4,67
50	0,0477	0,2718	0,8321	164,83	5,67
60	0,0394	0,3112	0,9986	197,79	6,49
80	0,0462	0,3574	1,3314	263,72	7,45
100	0,0376	0,3950	1,6643	329,66	8,24
120	0,0170	0,4120	1,9971	395,59	8,59
150	0,0153	0,4273	2,4964	494,48	8,91
180	0,0087	0,4360	2,9957	593,38	9,09
210	0,0040	0,4400	3,4950	692,28	9,18
240	0,0031	0,4431	3,9942	791,17	9,24
270	0,0036	0,4467	4,4935	890,07	9,32
300	0,0019	0,4486	4,9928	988,97	9,36
DP	0,0237	0,4723	-	-	-

Tabela 9.5 Dados do experimento nove com $5,0827 \pm 0,05$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 MPa e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$.

Tempo (minuto)	M_{Extrato} (g)	M_{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO_2 (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,0716	0,0716	0,0832	16,37	1,61
10	0,0682	0,1398	0,1664	32,74	3,15
15	0,0509	0,1907	0,2496	49,12	4,30
20	0,0376	0,2283	0,3329	65,49	5,14
30	0,0456	0,2739	0,4993	98,23	6,17
40	0,0333	0,3072	0,6657	130,97	6,92
50	0,0186	0,3258	0,8321	163,72	7,34
60	0,0171	0,3429	0,9986	196,46	7,72
80	0,0209	0,3638	1,3314	261,95	8,20
100	0,0111	0,3749	1,6643	327,44	8,45
120	0,0091	0,3840	1,9971	392,92	8,65
150	0,0117	0,3957	2,4964	491,16	8,91
180	0,0095	0,4052	2,9957	589,39	9,13
210	0,0051	0,4103	3,4950	687,62	9,24
240	0,0031	0,4134	3,9942	785,85	9,31
270	0,0054	0,4188	4,4935	884,08	9,43
300	0,0019	0,4207	4,9928	982,31	9,48
DP	0,0610	0,4817	-	-	-

Tabela 9.6 Dados do experimento dez com $5,0865 \pm 1,87$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 MPa , 200 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$.

Tempo (minuto)	M_{Extrato} (g)	M_{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO_2 (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,0310	0,0310	0,0832	16,36	0,61
10	0,0470	0,0780	0,1664	32,72	1,54
15	0,0593	0,1373	0,2496	49,08	2,71
20	0,0656	0,2029	0,3329	65,44	4,00
30	0,0889	0,2918	0,4993	98,16	5,75
40	0,0501	0,3419	0,6657	130,88	6,74
50	0,0365	0,3784	0,8321	163,60	7,46
60	0,0136	0,3920	0,9986	196,32	7,72
80	0,0227	0,4147	1,3314	261,75	8,17
100	0,0205	0,4352	1,6643	327,19	8,57
120	0,0109	0,4461	1,9971	392,63	8,79
150	0,0221	0,4682	2,4964	490,79	9,22
180	0,0200	0,4882	2,9957	588,95	9,62
210	0,0072	0,4954	3,4950	687,10	9,76
240	0,0031	0,4985	3,9942	785,26	9,82
270	0,0016	0,5001	4,4935	883,42	9,85
300	0,0057	0,5058	4,9928	981,58	9,97
DP	0,0011	0,5069	-	-	-

9.3 APÊNDICE D: Cinética de Extração

Tabela 9.7 Dados da cinética com $5,1452 \pm 0,63$ gramas de matéria-prima seca triturada a $50\text{ }^\circ\text{C}$, 25 MPa , 400 W e vazão de CO_2 de $2,77 \times 10^{-4}\text{ kg/s}$

Tempo (minuto)	M _{Extrato} (g)	M _{Extrato} Acumulado (g)	Massa de CO ₂ (Kg)	S/F	Rendimento de extração (% b.s.)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,1007	0,1007	0,0832	16,17	2,05
10	0,0890	0,1897	0,1664	32,35	3,80
15	0,0830	0,2727	0,2496	48,52	5,07
20	0,0662	0,3389	0,3329	64,69	6,54
30	0,0816	0,4205	0,4993	97,04	8,03
40	0,0354	0,4559	0,6657	129,38	8,61
50	0,0130	0,4689	0,8321	161,73	8,88
60	0,0087	0,4776	0,9986	194,08	9,08
80	0,0113	0,4889	1,3314	258,77	9,32
100	0,01554	0,5043	1,6643	323,46	9,66
120	0,0035	0,5078	1,9971	388,15	9,81
150	0,0105	0,5183	2,4964	485,19	10,02
180	0,0013	0,5196	2,9957	582,13	10,08
210	0,0073	0,5269	3,4950	679,27	10,21
240	0,0033	0,5302	3,9942	776,30	10,39
270	0,0023	0,5325	4,4935	873,34	10,42
300	0,0004	0,5329	4,9928	970,38	10,47
DP	0,0010	0,5339	-	-	-

9.4 APÊNDICE E: Curva padrão das Antocianinas

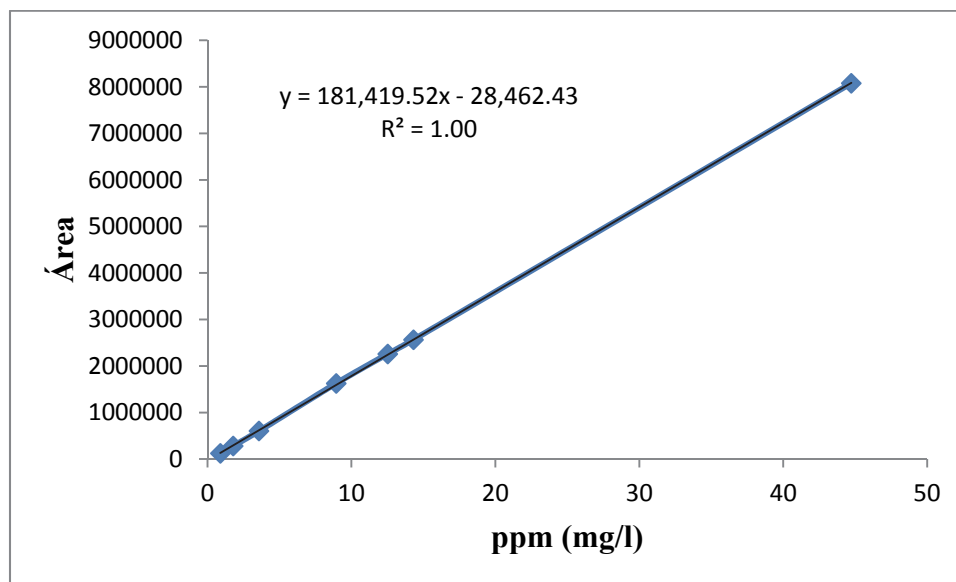


Figura 9.4 Curva padrão da cianidina-3-glicosídeo (C3G).

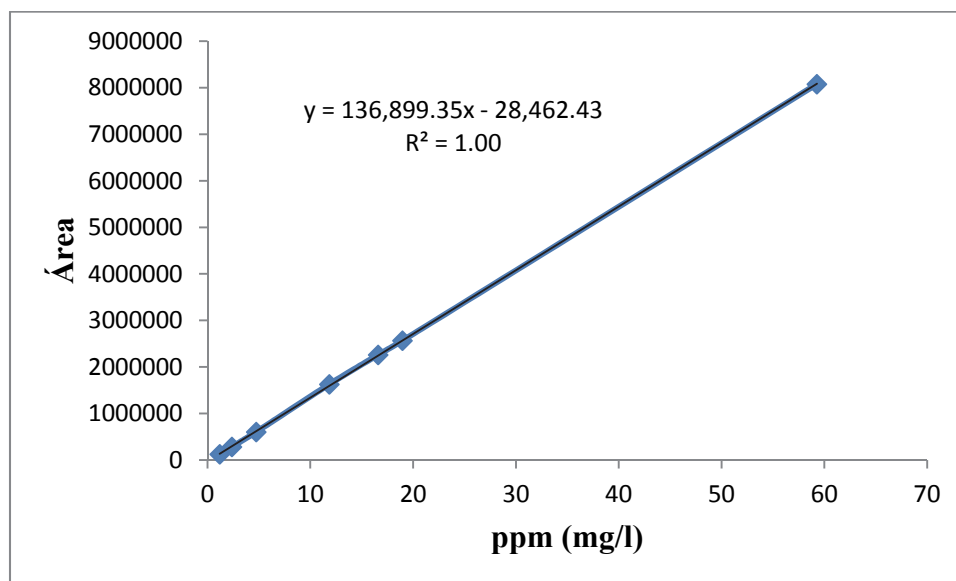


Figura 9.5 Curva padrão da cianidina-3-rutinosídeo (C3R).

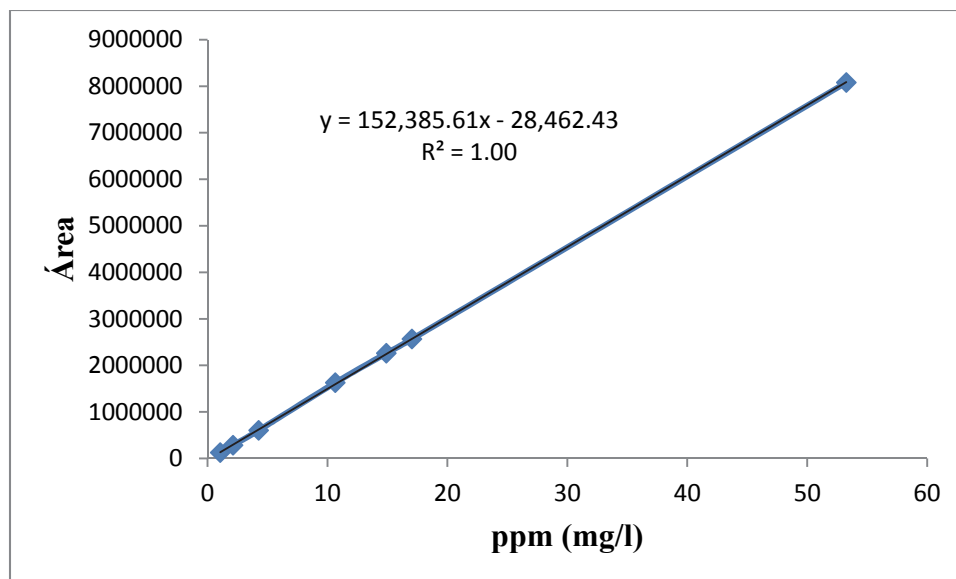


Figura 9.6 Curva padrão da cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG).

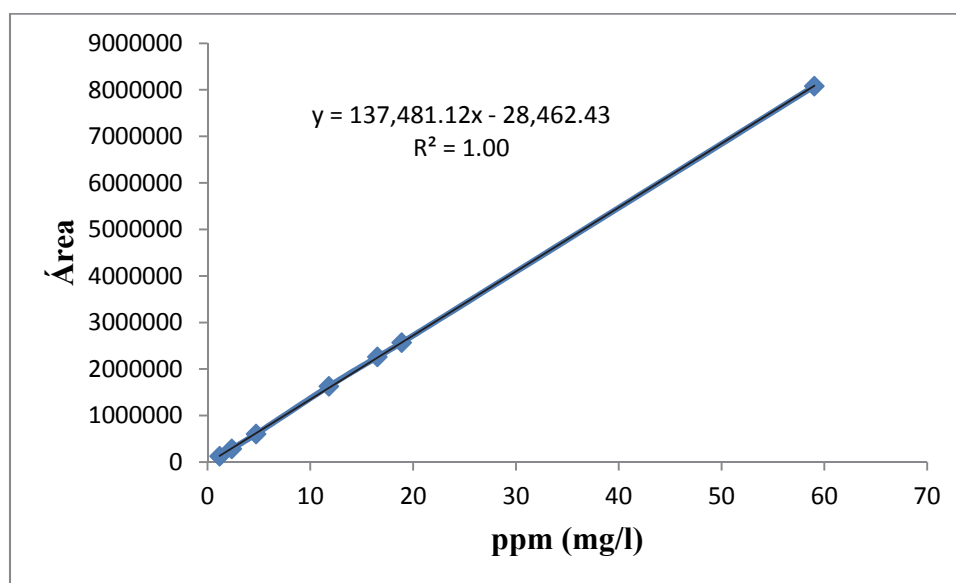


Figura 9.7 Curva padrão da cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG).

9.5 APÊNDICE F: Dados de saída do Software SAS utilizado para o ajuste linear da OEC para o bagaço de amora-preta

RESULTADOS SAS:

 Ensaio Cinético do bagaço de Amora-preta: 25 MPa/50 °C e ultrassom 400 Watts

Obs	TEMPO	Rend
1	5	0.11
2	10	0.20
3	15	0.26
4	20	0.34
5	30	0.41
6	40	0.44
7	50	0.46
8	60	0.47
9	80	0.48
10	100	0.50
11	120	0.50
12	150	0.52
13	180	0.52
14	210	0.53
15	240	0.53
16	270	0.54
17	300	0.54

 Rend NLIN

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Rend
 Method: Gauss-Newton

Iterative Phase							Sum of Squares
Iter	b0	b1	b2	b3	C1	C2	
0	0.0659	0.0123	0.000900	0.000200	30.0000	100.0	0.00244
1	0.0728	0.0119	0.000893	0.000212	30.6556	101.9	0.00212
2	0.0724	0.0120	0.000905	0.000202	30.5230	103.9	0.00212
3	0.0724	0.0120	0.000905	0.000202	30.5233	103.8	0.00212

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(C2)	0.000608
Object	5.573E-6
Objective	0.002118
Observations Read	17
Observations Used	17
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	5	0.2658	0.0532	276.06	<.0001
Error	11	0.00212	0.000193		
Corrected Total	16	0.2679			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	0.0724	0.0131	0.0436	0.1013	
b1	0.0120	0.000721	0.0104	0.0136	
b2	0.000905	0.000288	0.000271	0.00154	
b3	0.000202	0.000087	9.983E-6	0.000395	
C1	30.5233	1.5420	27.1294	33.9172	
C2	103.8	23.4167	52.2685	155.3	

Approximate Correlation Matrix						
	b0	b1	b2	b3	C1	C2
b0	1.0000000	-0.8807710	0.0000000	0.0000000	0.3685246	-0.0000000
b1	-0.8807710	1.0000000	-0.0000000	-0.0000000	-0.6139141	0.0000000
b2	0.0000000	-0.0000000	1.0000000	-0.0000000	-0.5988815	-0.6618736
b3	0.0000000	-0.0000000	-0.0000000	1.0000000	0.0000000	-0.5640537
C1	0.3685246	-0.6139141	-0.5988815	0.0000000	1.0000000	0.2592633
C2	-0.0000000	0.0000000	-0.6618736	-0.5640537	0.2592633	1.0000000