UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE PITANGA LIOFILIZADA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Genival Lopes Filho

Orientador: Prof. Dr. **Fernando Antonio Cabral**

Co-orientadora: Prof[a] Dra. **Alessandra Lopes de Oliveira**

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS
São Paulo – Brasil
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Lopes Filho, Genival
L881e Extração de carotenóides de pitanga liofilizada com dióxido de carbono supercrítico / Genival Lopes Filho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Fernando Antonio Cabral
Co-orientador: Alessandra Lopes de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Pitanga. 2. *Eugenia uniflora*. 3. Carotenóides. 4. Extração supercrítica. I. Cabral, Fernando Antonio. II. Oliveira, Alessandra Lopes de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Supercritical Fluid extraction of carotenoids from a freeze-dryed powder of Eugenia uniflora
Palavras-chave em inglês (Keywords): Pitanga, Eugenia uniflora, Carotenoids, Supercritical extraction
Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora: Fernando Antonio Cabral
Adriana Zerlotti Mercadante
Maria Angela de Almeida Meireles
Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof[a] Dr. Fernando Antonio Cabral
(ORIENTADOR)

_____

Prof[a] Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(MEMBRO)

_____

Prof[a] Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
(MEMBRO)

_____

Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa
(MEMBRO)

"...O futuro é uma astronave que tentamos pilotar. Não tem tempo, nem piedade, nem tem hora de chegar. Sem pedir licença muda nossa vida e depois convida a rir ou chorar. Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá e o fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar..."

"Vinícius de Morais"

À minha mãe Maria Mirtes.

Por sempre estar ao meu lado. Pelo sacrifício em nome da minha Formação e pelo exemplo de luta, fé na família e em Deus. Te amo!

Ao meu tio Sebastião Nato.

Pelas conversas e conselhos nos momentos difíceis. Suas palavras ecoam na minha memória.. Pela confiança e apoio nos momentos decisivos da minha vida. Uma transição cuja sua participação foi fundamental. Por tudo isso te tenho como um pai e exemplo.

Muito obrigado

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando Antônio Cabral, orientador.

Pelos ensinamentos e orientações. Pela paciência e dedicação. Muito obrigado.

À Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles.

Por ter aberto as portas do Lasefi para a realização das minhas extrações. Obrigado.

À Dra. Adriana Zerlotti Mercadante.

Por tornar realidade as análises realizadas neste trabalho.

Aos Doutores Paulo de Tarso Vieira e Rosa e Veridiana V. de Rosso

Pela grande ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao CNPq

Pelo apoio financeiro concedido, o que tornou possível a realização do trabalho.

Aos colegas do Extrae e amigos.

Pelos bons momentos que dividimos.

À Graziela.

Por fazer meus dias mais felizes.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 4

2.1. OBJETIVO GERAL 4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4

3. REVISÃO DE LITERATURA 5

3.1. PITANGA 5
3.1.1. QUÍMICA DA Eugenia uniflora 6
3.1.2. FARMACOLOGIA DAS FOLHAS 9
3.2. FLUIDO SUPERCRITICO 11
3.2.1. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA 13
3.2.2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES 15
3.2.2.1. MÉTODO DINÂMICO 16
3.2.2.2. MÉTODO ESTÁTICO ANALÍTICO 16
3.2.2.3. MÉTODO ESTÁTICO SINTÉTICO 17
3.3. EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES COM FLUIDO SUPERCRÍTICO 18
3.3.1. EFEITOS DE DENSIDADE, PRESSÃO E COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA 23
3.3.2. TAXA DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA 25

4. MATERIAL E MÉTODOS 27

4.1. MATÉRIA-PRIMA 27
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA 27
4.2.1. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE 27
4.2.2. GRANULOMETRIA DO MATERIAL 28
4.2.3. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE REAL DAS PARTÍCULAS 29
4.2.4. CÁLCULO DA DENSIDADE APARENTE E DA POROSIDADE DO LEITO 29
4.3. SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA EM LEITO FIXO 30
4.3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 31
4.4. ANÁLISE DE CAROTENÓIDES 33
4.4.1. REAGENTES 33
4.4.2. PADRÕES 34
4.4.3. SAPONIFICAÇÃO 34
4.4.4. DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES 35

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

5.1. TREINAMENTO E TESTES PRELIMINARES 37
5.2. EXTRAÇÕES 38
5.3. COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES DOS EXTRATOS 42

6. CONCLUSÃO 52

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

8. ANEXOS 61

ANEXO 1 – TABELA BASE PARA CONSULTA DE ABERTURA NOMINAL DAS PENEIRAS 62

ANEXO 1 – CONTINUAÇÃO 63

ANEXO 2 – DETERMINAÇÃO DA UMIDADE (MÉTODO DE JACOBS, 1973) 64

ANEXO 3 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE PRESSÃO E TEMPERATURA E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS GLOBAIS 65

LISTA DE FIGURAS

Páginas

FIGURA 1: DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO PARA UMA SUBSTANCIA PURA (BAIKER, 1999). 12
FIGURA 2: DIAGRAMA DA UNIDADE DE ESC SPE-ED DA APPLIED SEPARATIONS 32
FIGURA 3: UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (SPE-ED) DO LASEFI – DEA/FEA UNICAMP..... 33
FIGURA 4: (A) RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE PITANGA LIOFILIZADA EM FUNÇÃO DA PRESSÃO. (B) RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE PITANGA LIOFILIZADA EM FUNÇÃO DA DENSIDADE. 40°C (◊) E 60°C (■)..... 40
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DOS CAROTENÓIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS DE PITANGA LIOFILIZADA. 43
FIGURA 6: CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPLC DE PITANGA LIOFILIZADA OBTIDA POR EXTRAÇÃO COM ACETONA. 1. ALL-*TRANS*-LUTEINA, 2. ALL-*TRANS*-ZEAXANTINA, 3. ALL-*TRANS*-RUBIXANTINA, 4. *CIS*-RUBIXANTINA I, 5. *CIS*-RUBIXANTINA II, 6. ALL-*TRANS*-β-CRIPTOXANTINA, 7. ALL-*TRANS*-LICOPENO, 8. *CIS*-LICOPENO, 9. ALL-*TRANS*-γ-CAROTENO, 10. ALL-*TRANS*-α-CAROTENO, 11. ALL-*TRANS*-β-CAROTENO + 9-*CIS*-β-CAROTENO, 12. 15-*CIS*-β-CAROTENO + 13-*CIS*-β-CAROTENO. 44
FIGURA 7: CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPLC DO EXTRATO SUPERCRÍTICO DE PITANGA LIOFILIZADA NA CONDIÇÃO DE 300 BAR E 40°C (A) E 300 BAR E 60°C (B). 45
FIGURA 8: (A) CONCENTRAÇÃO DE RUBIXANTINA (μG/G) NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS. (B) CONCENTRAÇÃO DE *CIS*-RUBIXANTINA (μG/G) NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS. (◊) 40°C, (■) 60°C. 48
FIGURA 9: (A) CONCENTRAÇÃO DE β-CRIPTOXANTINA (μG/G) NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS. (B) CONCENTRAÇÃO DE LICOPENO (μG/G) NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS. (◊) 40°C, (■) 60°C. 49
FIGURA 10: (A) CONCENTRAÇÃO DE *CIS*-LICOPENO (μG/G) NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS. (B) CONCENTRAÇÃO DE γ-CAROTENO (μG/G) NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS. (◊) 40°C, (■) 60°C. 49
FIGURA 11: (A) CONCENTRAÇÃO DE α-CAROTENO (μG/G) DE EXTRATO SUPERCRÍTICO. (B) CONCENTRAÇÃO DE β-CAROTENO (9-*CIS*+ALL-*TRANS*) (μG/G) DE EXTRATO SUPERCRÍTICO. (◊) 40°C, (■) 60°C. 50
FIGURA 12: (A) CONCENTRAÇÃO DE β-CAROTENO (13+15-*CIS*) (μG/G) DE EXTRATO SUPERCRÍTICO. (B) TOTAL DE CAROTENÓIDES (μG/G) DE EXTRATO SUPERCRÍTICO. (◊) 40°C, (■) 60°C. 51

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA 1: CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE *EUGENIA UNIFLORA* (OGUNWANDE *ET AL.*, 2005)..... 8
TABELA 2: DADOS CRÍTICOS PARA COMPONENTES PUROS. 13
TABELA 3: EXEMPLOS DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÕES SUPERCRÍTICAS EMPREGADAS EM ANÁLISES DE CAROTENÓIDES. 22
TABELA 4: PARÂMETROS UTILIZADOS NO CÁLCULO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS. 38
TABELA 5: RESULTADOS DOS TESTES PRELIMINARES. 38
TABELA 6: PARÂMETROS UTILIZADOS NO CÁLCULO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS 39
TABELA 7: RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES COM CO_2 SUPERCRÍTICO DE PITANGA LIOFILIZADA. 40
TABELA 8: CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (µG/G) DE PITANGA LIOFILIZADA EXTRAÍDA COM ACETONA. 44
TABELA 9: CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (µG/G) DE EXTRATO SUPERCRÍTICO A 40°C E TOTAL DE CAROTENÓIDES (µG DE CAROTENÓIDES POR GRAMA DE PITANGA LIOFILIZADA). 47
TABELA 10: CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (µG/G) DE EXTRATO SUPERCRÍTICO A 60°C E TOTAL DE CAROTENÓIDES (µG DE CAROTENÓIDES POR GRAMA DE PITANGA LIOFILIZADA). 47

EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE PITANGA LIOFILIZADA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.

Autor: Genival Lopes Filho

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Co-orientador: Prof. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira

RESUMO

A pitanga (*Eugenia uniflora*) é uma fruta nativa do Brasil e amplamente distribuída nos países da América do Sul. Atualmente, seu uso é para a obtenção de polpas e sucos, mas quando se fala do seu potencial antioxidante e propriedades farmacológicas, a pitanga ainda é pouco estudada. Os carotenóides por sua vez, são amplamente conhecidos pelo seu poder corante, valor nutricional, atividade antioxidante e proteção contra algumas doenças. No presente trabalho, foram obtidos extratos a partir dos frutos liofilizados da pitanga usando o dióxido de carbono supercrítico como solvente de extração, nas condições de 40°C e 60°C e nas pressões de 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 bar. Os ensaios foram realizados em duplicata. Os extratos foram saponificados com KOH metanólico e a análise dos carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. O maior rendimento global em extrato foi de 1,03% na condição de 60°C e 350 bar. Quanto à composição de carotenóides, os extratos apresentaram uma composição complexa sendo β-criptoxantina, licopeno e rubixantina os carotenóides majoritários. A condição de maior concentração de carotenóides totais nos extratos foi a 60°C e 250 bar perfazendo 5474μg/g, sendo licopeno, rubixantina e *cis*-licopeno os carotenóides majoritários nesta condição, representando, respectivamente, 49, 22 e 17% do total. Contudo, a melhor condição operacional para extração de rubixantina foi a 40°C e 300 bar (1485 μg/g). A variação das condições operacionais de temperatura e pressão indicou que o dióxido de carbono supercrítico é seletivo no fracionamento dos diferentes carotenóides, sendo que na isoterma de 60°C não foi detectada a presença de β-criptoxantina nos extratos quando a pressão variou de 200 a 300 bar. Notou-se que para pressões acima de 250 bar, nas duas isotermas, não houve influência das condições operacionais de extração nas concentrações de α e β-caroteno nos extratos.

Palavras chave: Pitanga, *Eugenia uniflora*, carotenóides, extração supercrítica.

SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF CAROTENOIDS FROM A FREEZE-DRYED POWDER OF *Eugenia uniflora*.

Author: Genival Lopes Filho

Major Professor: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Professor: Prof. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira

ABSTRACT

Pitanga (*Eugenia uniflora*) is a fruit native from Brazil and widely distributed in South America. Nowadays, it is used for obtaining pulps and juices, in spite of this, there are few studies analyzing its antioxidant activity and pharmacological properties. On the other hand, the carotenoids, are widely known for their coloring power, nutritional role, antioxidant activity and protection against some diseases. In the present work, extracts of freeze-dried powder of fruits of pitanga were obtained by supercritical carbon dioxide extraction. The operational conditions were as follows: pressures of 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 bar and temperatures of 40 and 60°C. The assays were conducted in duplicate. The extracts were saponified with 10% methanolic KOH and the carotenoid analysis was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector. The larger global yield was achieved at 60°C and 350 bar (1,03%). All extracts showed a complex carotenoid composition with β-cryptoxanthin, lycopene and rubixanthin as the major carotenoids. The condition of higher carotenoid content in the extract was 60°C and 250 bar, reaching 5474 μg/g, being lycopene, rubixanthin and *cis*-lycopene the major carotenoids, representing, respectively, 49, 22, and 17% of the total amount. However, the best operational condition for rubixantin extraction was at 40°C and 300 bar (1485 μg/g). The variation of pressure and temperature showed that supercritical carbon dioxide is selective for carotenoids extraction, as was confirmed at 60°C and pressures among 200 and 300 bar. In this condition any β-cryptoxanthin in the supercritical extracts was detected. For pressures above 250 bar, there was no influence of pressure and temperature on the concentration of α and β-carotene in pitanga extracts.

Keywords: Pitanga, *Eugenia uniflora*, carotenoids, supercritical extraction.

1. INTRODUÇÃO

A cor é um dos atributos mais importantes na comercialização de alimentos influenciando diretamente na aceitação e preferência de determinados produtos por parte do consumidor. No passado, a necessidade de atrair a atenção do consumidor fez com que as indústrias de alimentos passassem a utilizar corantes sintéticos com o intuito de tornar seus produtos mais atrativos deixando-os o mais semelhante possível aos produtos naturais. Entretanto, alguns desses corantes sintéticos foram considerados inadequados para o consumo o que gerou uma tendência à substituição pelos pigmentos naturais. Atualmente percebe-se uma mudança no comportamento do consumidor, que por sua vez, está mais preocupado com a qualidade e com os benefícios que os alimentos podem proporcionar à sua saúde.

Os carotenóides são amplamente conhecidos pelo seu poder corante e sua cor pode variar do amarelo ao vermelho. Alguns carotenóides também desempenham importante papel nutricional como precursores de vitamina A, além de outras ações, tais como, proteção contra alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular e melhoria do sistema imunológico (Krinsky, 1994).

Bendich & Olson (1989), Tinkler *et al*. (1994) e Edge *et al*. (1997) associaram, em seus estudos, as funções biológicas dos carotenóides em seres humanos. De acordo com estes autores, esses compostos podem ser importantes na proteção de células atuando como antioxidantes contra radicais livres e seqüestrando oxigênio singlete devido ao seu longo sistema de ligações duplas conjugadas.

Entretanto, o sistema de ligações duplas conjugadas presente na estrutura dos carotenóides é responsável pela isomerização e oxidação gerando diminuição de cor e de atividade biológica. Dessa forma, a utilização dos carotenóides na indústria de alimentos e de cosméticos limita-se bastante às condições de processamento e estocagem tais como, disponibilidade ao oxigênio, exposição à luz, temperatura, presença de metais, atividade de água e pH (Rodriguez-Amaya, 1999).

Os processos de separação envolvendo o dióxido de carbono (CO_2)0020supercrítico podem resolver alguns problemas atuais das indústrias de processamento, pois reduzem o impacto ambiental, diminuem resíduos tóxicos produzindo alimentos mais saudáveis. O dióxido de carbono é inerte, não tóxico, de baixo custo, sendo ideal para uso em alimentos. O produto final obtido por este processo é isento de resíduos de solventes orgânicos, atende às restrições impostas pelos órgãos de saúde e é de excelente qualidade (Brunner, 2005; Sajfrotová *et al*., 2005; Reverchon, 1997). O CO_2 traz a vantagem de se trabalhar com baixas temperaturas, característica importante em processos que envolvem materiais termolábeis e por fim, como o dióxido de carbono é um gás nas condições ambientes de pressão e temperatura, sua separação é simples, facilitada pelo aquecimento e redução da pressão às condições ambientais (Brunner, 2005; Della Porta *et al*., 1998; Reverchon, 1997).

A planta *Eugenia uniflora*, comumente conhecida como “pitanga” é nativa do Brasil e pertence à família das Mirtáceas. Atualmente, está amplamente distribuída em países da América do Sul como Argentina, Uruguai e Paraguai (Consolini e Sarubbio, 2002).

A pitanga é um fruto empregado industrialmente na obtenção de polpas e sucos, entretanto ao considerar seu potencial como fonte de antioxidantes e as propriedades farmacológicas que seu extrato possa desempenhar, pouco se conhece a respeito das possíveis aplicações tecnológicas. Baseado no fato de que não existe na literatura a caracterização de extratos de pitanga obtidos com fluido

supercrítico, os seguintes objetivos foram estabelecidos como proposta para este trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi estudar a viabilidade de se extrair e fracionar carotenoides do fruto da pitangueira usando dióxido de carbono supercrítico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização da amostra: umidade e teor de carotenoides no fruto.
- Obtenção de dados experimentais de rendimento global de extração em função das variáveis operacionais (temperatura, pressão e granulometria).
- Obtenção de dados experimentais de rendimento de extração de carotenoides totais e individuais em função das variáveis operacionais (temperatura, pressão e granulometria).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PITANGA

A pitanga (*Eugeniva uniflora*) é um fruto tropical, pertencente à família das Mirtáceas. É nativa do Brasil, especificamente das regiões Sul e Sudeste, e tem sido cultivada no sul dos Estados Unidos, nas Ilhas do Caribe, na Índia, China, Egito, Nigéria e Austrália (Gomes, 1975; Weyerstahl *et al*., 1988; Lederman, *et al*., 1992; Kanazawa *et al*., 2000).

O fruto é uma baga globosa, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 – 5,0 cm de diâmetro, coroado com sépalas persistentes que possui aroma característico intenso e sabor doce e ácido. No processo de maturação, o epicarpo passa de verde para amarelo, alaranjado, vermelho, vermelho-escuro, podendo chegar até quase negro (Bezerra *et al*., 2000).

O fruto da pitangueira apresenta, em média, 69% de polpa, 31% de sementes e cerca de 85% de umidade (Guimarães *et al*., 1982; Villachica, 1996). A polpa, de coloração vermelha, é suculenta, macia, agridoce e aromática (Villachica, 1996).

Os carotenóides da pitanga são o fitoflueno, β-caroteno, ζ-caroteno, β-criptoxantina, γ-caroteno, licopeno, rubixantina e um outro não identificado. O licopeno é o principal carotenóide da pitanga representando 32% dos carotenóides totais (Cavalcante, 1991).

Mais de 50 tipos de carotenóides têm sido extensivamente estudadas por atuarem como precursores de vitamina A. Mais recentemente, o licopeno, que é o principal responsável pela cor vermelho-escuro do tomate, vem despertando interesse dos pesquisadores. As propriedades do licopeno de atuar contra os radicais peróxidos e desse modo seqüestrar o oxigênio singlete através das suas duplas ligações reduz o risco de desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronárias prevenindo a oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL). Além disso, existe um crescente número de evidencias clínicas e estudos epidemiológicos confirmando o papel do licopeno no combate a diferentes tipos de câncer (Gómez-Prieto *et al.*, 2003).

O licopeno também é considerado como sendo um importante pigmento natural no que diz respeito à comercialização, pois este é considerado um ingrediente funcional emergente no mercado nutraceutico. Especificamente o licopeno é altamente demandado não somente pelas indústrias farmacêuticas, mas também pela indústria de cosméticos e de alimentos (Gómez-Prieto *et al.*, 2003).

Dentre os compostos fenólicos, a polpa de pitanga de coloração roxa apresenta teor de antocianinas e flavonóides totais de 22,50 mg/100g e 13,93 mg/100g respectivamente (Lima *et al.*, 2000).

3.1.1. QUÍMICA DA Eugenia uniflora

Em 1977, Rücker *et al*. isolaram vários componentes do óleo essencial de frutos de *E. uniflora* principalmente sesquiterpenos, como furanoelemeno, germacreno, γ-elemeno, selina-4(14),7(11)–dieno. Wyerstahl *et al.* (1988) detalhou a composição do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, obtido com rendimento de 1%, como um óleo amarelo, do qual cariofileno (5,7%), furanodieno (24%), germacreno B (5,8%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17%) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (14%) são os componentes majoritários.

Morais *et al*. (1996) isolaram e identificaram os componentes do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora*, colhidas na região Nordeste do Brasil, com rendimento de 0,74%, do qual os componentes majoritários são selina-1,3,5(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona, com teores de 48,52% e 17,33% respectivamente. Maia *et al*. (1999), estudando o óleo essencial, obtido por hidrodestilação, de folhas e ramos de *E. unifloa*, colhidos na cidade de Belém, no Pará, obtiveram 1,8% em óleo essencial, do qual germacreno (32,8%), germacreno B (15,6%) e curzeneno (30,0%) foram isolados como componentes mais abundantes.

Alguns trabalhos relatam a composição do óleo essencial das folhas e dos frutos da pitangueira. Ogunwande et al. (2005) encontraram no óleo volátil das folhas 19,7% de curzereno, 17,8% de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, 16,9% de atractilona e 9,6% de furanodieno e nos frutos, 27,5% de germacrona, 19,2% de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, 11,3% de curzereno and 11% de oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona. Os constituintes dos óleos essencias das folhas e dos frutos de *Eugenia uniflora* encontradas neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Oliveira et al. (2006) detectaram no óleo volátil do fruto 36.2% de β-ocimeno, 13,4% do isômero β-ocimeno e 10.3% de β-pineno.

Schmeda-Hirschmann (1995) observou a incidência dos flavonóides quercetina e miricetina em extratos, obtidos com etanol 70%, de folhas de *Eugenia uniflora*, coletadas no leste do Paraguai. Lee *et al*. (1997), investigando os constituintes fenólicos de folhas de *E. uniflora*, relatam a presença de eugeniflorina D_1 ($C_{75}H_{52}O_{48}$) e eugeniflorina D_2 ($C_{68}H_{48}O_{45}$), dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico das folhas. Oliveira (1999) verificou a presença de alcalóides por cromatografia em camada delgada em extratos de *Eugenia uniflora,* empregando reativo de Draggendorf para revelação.

Tabela 1: Constituintes dos óleos essenciais das folhas e dos frutos de *Eugenia uniflora* (Ogunwande *et al*., 2005).

Componente	**Composição (%)**	
	Folhas	**Frutos**
Trans-2-Hexenal	Tr	Nd
α-Pineno	Tr	0,1
Myrceno	Tr	0,5
ρ-Cymene	Tr	Nd
Limoneno	Tr	Nd
cis-Ocimeno	0,1	1,6
trans-Ocimeno	0,2	3,9
Terpinoleno	Tr	0,1
δ-Elemeno	0,4	0,2
β-Elemeno	2,7	1,5
α-Gurjuneno	Tr	Nd
β-Cariofileno	3,9	2,2
β-Gurjuneno	Tr	Nd
γ-Elemeno	1,0	0,7
Aromadendreno	0,1	Tr
α-Humuleno	0,3	0,3
Aloaromadendreno	0,2	0,1
γ-Selineno	0,3	0,9
Germacreno D	1,2	0,9
β-Selineno	0,5	0,6
δ-Selineno	Nd	0,3
Ledeno	Nd	1,6
Biciclogermacreno	2,4	Nd
Curzereno	19,7	11,3
γ-Cadineno	Nd	0,2
β-Cadineno	0,5	Tr
δ-Cadineno	0,4	0,3
4,7(11)-Selinadieno	0,2	0,8
3,7(11)-Selinadieno	0,3	0,4
Germacreno B	5,8	4,0
Spatulenol	1,5	0,4

Tabela 1: Continuação

Componente	Composição (%)	
	Folhas	Frutos
$C_{15}H_{24}O$	1,0	0,8
Guaiol	1,4	0,7
trans-β-Elemenona	0,9	1,6
$C_{15}H_{26}O$	Nd	0,5
selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	17,8	19,2
τ-Cadinol	Nd	0,6
Atractilona	16,9	4,5
$C_{14}H_{16}O_2$	1,1	Nd
Furanodieno	9,6	Nd
Germacrona	2,6	27,5
Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona	5,9	11,0

Nd = não detectado; Tr = traço < 0,1%.

3.1.2. FARMACOLOGIA DAS FOLHAS

Schmeda-Hirschmann *et al*. (1987), estudando a toxicidade do extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* não verificaram toxicidade em doses até 4,2 g/kg, administradas em camundongos, por via oral.

Theoduloz *et al*. (1988), avaliaram espécies de Mirtáceas paraguaias quanto à inibição de 50% da atividade da enzima xantina oxidase, e obtiveram índices de 22 µg/ml para extrato de folhas de *E. uniflora*. Os índices obtidos para outras espécies da família, variaram de 3 a 50 µg/ml. A ação inibitória dos padrões dos flavonóides quercitrina e miricitrina (miricetina-3-O-ramnosídeo), sobre a enzima xantina oxidase foi demonstrada.

Schapoval *et al*. (1994), estudando as infusões e decocções das folhas de *E. uniflora*, seguindo o modo de preparo preconizado pela população, relatam efeito antiinflamatório com a infusão elaborada a partir de folhas. Os infusos e decoctos testados mostraram ação analgésica, nas condições do ensaio e se

revelaram mais ativos em relação à diminuição do trânsito intestinal, provavelmente, por extraírem os taninos mais eficazmente. Tanto infusos como os decoctos não exibiram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Em contrapartida, Ogunwande *et al*. (2005) relataram que o óleo essencial da fruta de *E. uniflora* exibiu uma forte atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto que o óleo da folha mostrou-se eficaz contra o crescimento de *Bacillus cereus*.

Almeida *et al*. (1995) constataram a diminuição da propulsão intestinal em ratos como conseqüência do aumento da densidade das fezes, causado pelo aumento de absorção de água em todas as porções do intestino.

Gbolade *et al*. (1996) relataram a ação contrátil de extratos a partir das folhas de *E. Uniflora* dissolvidos com acetato de etila, sobre o duodeno isolado de rato, em comparação com acetilcolina. O óleo essencial não exibiu esta atividade, levando os autores a concluírem que o extrato contém princípios anticolinérgicos, ausentes no óleo essencial.

Consolini *et al*. (1999), tendo em conta o uso popular de *Eugenia uniflora* como anti-hipertensiva, estudaram os efeitos da administração intraperitoneal de seu extrato aquoso bruto em ratos, nos quais observaram decréscimo dose-dependente de até 47,1% nos níveis de pressão sangüínea. Nos estudos que se seguiram, a fim de elucidar o mecanismo desta ação, concluíram os autores que este é mediado pela vasodilatação direta e uma fraca ação diurética que pode estar relacionada com o aumento do fluxo sangüíneo renal.

Momose (2000) atribuiu atividade inibitória às folhas de *Eugenia uniflora* sobre as enzimas α - glicosidase, maltase e sucrase, sendo, por isso, útil no tratamento de diabetes. Os extratos obtidos por extração com água quente foram testados por via oral em camundongos e significativa supressão do aumento dos níveis séricos de açúcar foi registrada.

Na mesma linha de pesquisa, Matsumura *et al*. (2000) confirmaram a presença de componentes do extrato aquoso de folhas secas de *E. uniflora* capazes de inibir a degradação enzimática de polissacarídeos a monossacarídeos

e determinaram a intensidade da inibição das α-glicosidases. O fracionamento do extrato aquoso por coluna de troca iônica levou à fração que exibiu atividades inibitória para estas enzimas, 13 ou 19 vezes maiores do que as anteriores.

Adebajo *et al*. (1989), tendo por base informações anteriores de que a composição do óleo essencial de frutos e de folhas de *Eugenia uniflora*, varia qualitativamente e quantitativamente, dependendo do momento da colheita, estação do ano, estágio de maturidade antes da colheita, estudaram estas variações por meio da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E. uniflora*, colhidos em diferentes estágios de maturação. Os resultados obtidos para *Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes* foram diversos para amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em diferentes épocas do ano, indicando uma variação na composição do óleo das diferentes amostras. Comentam os autores que estas diferenças devem ser consideradas na otimização da atividade antimicrobiana de *E. uniflora*. A maioria das amostras foi inativa contra *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*. *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria mais sensível, enquanto *T. menthagrophytes* foi o fungo mais sensível.

3.2. FLUIDO SUPERCRITICO

Uma substância está em estado supercrítico quando sua temperatura e pressão são superiores à seus valores críticos. O ponto crítico de cada substância é caracterizado por sua temperatura crítica, pressão crítica e volume crítico. Abaixo do ponto crítico a substância pode existir como sólido, líquido ou vapor e acima deste ponto existe a região supercrítica, sendo que as variações das propriedades termodinâmicas nesta região podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (Sandler, 1989; Brunner, 2005). A Figura 1 mostra o diagrama de fases para uma substância pura.

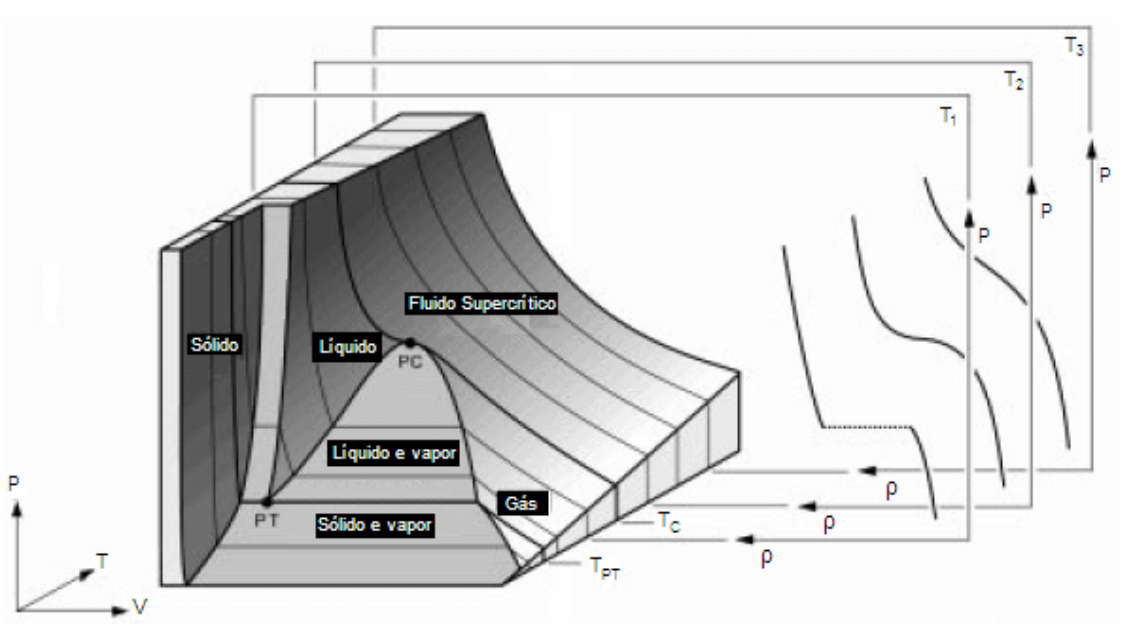


Figura 1: Diagrama de equilíbrio para uma substancia pura (Baiker, 1999).

Na Figura 1 são observadas as regiões onde sólido, líquido, gás (vapor), líquido-vapor, sólido-líquido e fluido supercrítico existem. As isotermas T_1 ($T_1 < T_C$), T_2 ($T_2 > T_C$) e T_3 ($T_3 >> T_C$) ilustram a variação da densidade (ρ) em relação à pressão (Baiker, 1999). Nas regiões acima do ponto crítico, pequenas oscilações na pressão e/ou temperatura acarretam grandes variações na densidade. Entretanto para isotermas muito maiores do que T_3 ($T_n >> T_3$) é necessário uma variação considerável na pressão para que produza uma mudança substancial na densidade (Bott, 1982).

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de uma substância assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso. Propriedades relacionadas à capacidade de solubilização, como a densidade, de um fluido supercrítico aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto que as propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos aos de um gás (Baiker, 1999; Carvalho Jr., 2004). Sabe-se que os líquidos são excelentes solventes, mas de difusão lenta e alta viscosidade. Os gases por sua vez, são péssimos solventes, mas se difundem com extrema facilidade e são poucos viscosos. Dessa forma, os fluidos

supercríticos são ótimos solventes combinando características desejáveis tanto de líquidos quanto de gases.

A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os dados críticos para algumas substâncias puras.

Tabela 2: Dados críticos para componentes puros.

Solvente	T_C (K)[a]	P_C (MPa)[a]	ρ_C (kg m^{-3})[b]
Dióxido de Carbono (CO_2)	304.15	7.38	468
Água (H_2O)	647.3	22.12	322
Etanol (CH_3CH_2OH)	513.9	6.14	276
Metanol (CH_3OH)	512.6	8.09	272
Amônia (NH_3)	455.55	11.35	235
Isopropanol ($CH_3CHOHCH_3$)	508.3	4.76	273

Fonte: [a] Reid *et al.*, 1986.

[b] Ambrose, 1991.

3.2.1. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

A extração com fluido supercrítico, ESC ou SFE, de matrizes sólidas consiste em duas etapas: extração e separação do extrato do solvente. Na extração, o solvente supercrítico escoa através de um leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os compostos da matriz sólida. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e passa pelo precipitador, onde finalmente os componentes são separados (Brunner 1994).

Brunner (1994) também observou que, durante a extração de componentes solúveis de um produto natural:

1. A matriz sólida absorve o solvente supercrítico e outros fluidos, os quais são deliberadamente adicionados para atuar sobre o processo de extração. Como conseqüência, a estrutura celular dilata-se e a resistência ao transporte diminui.
2. Paralelamente, os componentes solúveis são dissolvidos pelo solvente. Reações químicas podem ocorrer antes da solvatação.

3. Os componentes dissolvidos são transportados para a superfície do sólido. Nesta etapa a difusão é o mecanismo de transporte mais importante. Estes componentes agora dissolvidos formam a fase fluida e escoam para a saída do extrator.

O interesse pela extração supercrítica cresceu muito nos últimos anos tornando-se um campo promissor para a indústria química, farmacêutica e de alimentos. Trata-se de um processo alternativo que atende às restrições impostas pelos órgãos de saúde podendo minimizar o impacto ambiental pela diminuição dos resíduos tóxicos reduzindo os custos operacionais. De todos os gases e líquidos estudados, o CO_2 é o fluido mais comumente usado para ESC devido aos baixos valores de suas propriedades críticas (Sajfrotová *et al*., 2005). O CO_2 é inerte, não tóxico, de baixo custo, sendo ideal para uso em alimentos, dessa forma, o produto final obtido por este processo é isento de resíduos de solventes orgânicos (Brunner, 2005; Reverchon, 1997).

Uma das grandes vantagens da extração com dióxido de carbono supercrtitico é permitir o processamento de materiais a baixas temperaturas, o que é especialmente adequado quando compostos termolábeis estão presentes. Dessa forma, evita-se a degradação desses compostos, que é um problema duplamente prejudicial, pois os compostos degradados comprometem a qualidade do produto final e geram rejeitos industriais indesejáveis que precisam ser tratados antes de eliminados. Outra vantagem é a possibilidade de fácil separação do solvente após o processo de extração apenas pelo aquecimento e redução da pressão às condições normais (Brunner, 2005; Della Porta *et al*., 1998; Reverchon, 1997).

O CO_2 supercrítico comporta-se como um solvente lipofílico mas, comparado com solventes líquidos, possui a vantagem de ser seletivo ou seja, o seu poder de solvatação pode ser ajustado (Della Porta *et al*., 1998; Reverchon, 1997). Segundo Brunner (2005), o poder de solvatação do CO_2 supercrítico pode ser resumido de acordo com algumas regras:

1. Dissolve compostos apolares ou ligeiramente polares.

2. O poder de solvatação para compostos de baixa massa molecular é alto e decresce com o aumento da massa molecular. Possui alta afinidade para compostos orgânicos oxigenados.
3. Ácidos graxos livres demonstram baixa solubilidade. Pigmentos são ainda menos solúveis.
4. Água possui baixa solubilidade em temperaturas abaixo de 100°C. Proteínas, polissacarídeos, açúcares e minerais são insolúveis.
5. O CO_2 supercrítico é capaz de extrair compostos que são menos voláteis, com alta massa molecular e/ou que são mais polares, com o aumento da pressão.

Alguns possíveis produtos produzidos pela tecnologia supercrítica já podem ser facilmente encontrados (Brunner, 2005). Como exemplo pode-se citar a descafeinização de café e chá, desalcoolização de cerveja e vinho, remoção do colesterol de alimentos e obtenção de extrato de lúpulo para fabricação de cerveja. Brunner (2005) e McHugh e Krukonis (1994) mostram mais detalhes e outras aplicações da extração supercrítica.

Entretanto, apesar das técnicas especiais e da disponibilidade de matérias-primas, ainda não estudadas, com excelente qualidade e preço, ainda não há na América do Sul uma unidade industrial de extração supercrítica (Rosa e Meireles, 2005).

3.2.2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES

Os métodos experimentais para determinação de equilíbrio de fases a altas pressões são classificados em dinâmico, estático analítico e estático sintético. No método estático, os componentes são colocados dentro de um volume fechado e as condições de equilíbrio são obtidas esperando um tempo apropriado. No método dinâmico, o solvente supercrítico flui através do soluto e

tempos de contatos longos são estabelecidos no sistema (Reverchon, 1997; Brunner, 1994; McHugh e Krukonis, 1994). A seguir são apresentadas as características de cada método.

3.2.2.1. MÉTODO DINÂMICO

Este método pode ser utilizado para determinar baixas concentrações na fase gasosa, desde que o soluto possa ser acumulado depois da célula de equilíbrio e assim as baixas concentrações poder ser determinadas. Dados de equilíbrio podem ser obtidos rapidamente, mas o estabelecimento do equilíbrio deve ser cuidadosamente observado durante os experimentos. O método dinâmico é melhor aplicado para sistemas binários, uma vez que, para sistemas multicomponentes a composição da fase condensada muda. Se aplicado para sistemas multicomponentes, a variação da composição na fase líquida deve ser levada em consideração (Brunner, 1994).

3.2.2.2. MÉTODO ESTÁTICO ANALÍTICO

Este método é mais apropriado para sistemas com compostos pouco voláteis e com mais de dois componentes, e para determinação de solubilidade de compostos pouco voláteis em fluido supercrítico. Para compostos de volatilidade muito baixa, o método dinâmico pode ser mais útil. O procedimento de amostragem é uma operação crítica no método estático, desse modo, a retirada das amostras deve ser feita de tal forma a não provocar perturbações expressivas no estado de equilíbrio. Para o método estático, erros nas concentrações de equilíbrio são característicos e podem ocorrer por separação insuficiente das fases dentro da célula e mudanças de composição durante o procedimento de amostragem (Brunner, 1994).

O equilíbrio de fases para extração gasosa entre componentes de volatilidades diferentes e em temperaturas relativamente baixas favorecem o método estático uma vez que, a composição das fases é determinada diretamente pela amostragem e a dependência da concentração em relação à pressão é relativamente pequena. A principal vantagem do método estático é que por amostragem é possível determinar dados de equilíbrio de sistemas contendo um número ilimitado de componentes (Brunner, 2004).

3.2.2.3. MÉTODO ESTÁTICO SINTÉTICO

Este é o método mais indicado para misturas líquidas binárias ou misturas líquidas multicomponentes. De acordo com o procedimento do método sintético, a mistura dentro do extrator é feita de quantidades exatamente conhecidas dos componentes de modo que a concentração total do sistema é muito bem estabelecida (Brunner, 1994).

As condições operacionais de pressão e temperatura são previamente ajustadas, fazendo com que uma solução homogênea se forme. A principal vantagem deste método é que não há necessidade de coleta de amostras das fases em equilíbrio para análise da composição química, além de preservar o estado de equilíbrio de distúrbios na pressão, fazendo com que o procedimento experimental seja mais simplificado. Outra vantagem importante é que são necessárias em cada experimento pequenas quantidades de soluto e solvente, o que permite reduzir os custos da pesquisa experimental. Porém, dependendo do número de fases e de componentes presentes, não é possível fixar a composição de uma das fases antes da transição, sendo que isto acarreta ao método uma deficiência para a execução de experimentos sob tais condições (Corazza, 2002 citado por Moura, 2004).

3.3. EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Macías-Sanchez *et al*. (2005) estudaram a influência da pressão e temperatura na extração supercrítica de carotenóides e clorofila de pó liofilizado da microalga marinha *Nannochloropsis gaditana*. As condições operacionais foram 100, 200, 300, 400 e 500 bar e temperaturas de 40, 50 e 60°C. Os experimentos foram realizados com aproximadamente 0,2g de amostra, 15 min de equilíbrio estático e 3 horas de extração. Ainda de acordo com os autores o tempo de extração de 3 horas foi adotado, pois grande parte dos carotenóides extraídos com dióxido de carbono supercrítico foram obtidos durante esse período. Neste estudo, os autores concluíram que os maiores rendimentos foram obtidos na pressão de 400 bar e na temperatura de 60°C.

Careri *et al*. (2001) investigaram a influência de alguns parâmetros de operação na extração com fluido supercrítico de β-caroteno, β-criptoxantina e zeaxantina em microalga *Spirulina pacífica*. As variáveis testadas foram temperatura (40, 60 e 80°C), pressão (150, 250 e 350 bar), tempo de extração dinâmica (40, 70 e 100 minutos) e porcentagem de etanol adicionado como co-solvente (5, 10 e 15%). Os experimentos foram conduzidos utilizando 0,5 g de amostra, 5 minutos de equilíbrio estático seguida de extração dinâmica. De acordo com os resultados apresentados, os autores concluem que as melhores condições de operação para extração de zeaxantina, β-criptoxantina e β-caroteno foram 80°C, 350 bar, 70 min; 76°C, 350 bar, 100 min e 60°C, 350 bar, 100 min respectivamente. Uma limitação da extração com dióxido de carbono supercrítico é não ser muito eficiente na extração quantitativa de compostos polares provenientes de matrizes sólidas devido ao baixo poder de solvatação do CO_2 para com estes compostos. A adição de um modificador orgânico pode aumentar drasticamente a eficiência de extração aumentando a solubilidade do analito, reduzindo sua interação com a matriz ou induzindo modificações na matriz vegetal. Desde que vários parâmetros podem, potencialmente, afetar a extração supercrítica, a otimização das condições é um passo crítico no desenvolvimento

de um método de extração supercrítica. De fato, a solubilidade dos analitos pode ser controlada pela composição, densidade e temperatura, porém, o rendimento da extração é dependente, não somente, dos parâmetros de extração, mas também das características da amostra tais como umidade, tipo da matriz e tamanho das partículas dificultando, assim, a seleção das condições ótimas de extração.

Seo *et al*. (2005) extraíram carotenóides de abóbora por extração líquido-líquido e por extração supercrítica. Para a extração com fluido supercrítico, os autores analisaram os efeitos do tempo de extração estática e dinâmica, temperatura (40, 80°C), pressão (310, 350, 500 bar) e mudanças no poder de solvatação e seletividade do fluido supercrítico através da adição de álcool etílico e metanol. Foram testados 0, 10 e 30% de adição de co-solvente e tempos de extração estático de 1, 10 e 30 minutos. Os resultados revelaram que as melhores condições de temperatura, tempo de extração estática e dinâmica, adição de co-solvente e pressão foram 80°C, 40 min, 10% e 310 bar.

França *et al* (1999) aplicaram a extração com fluido supercrítico para determinar lipídeos e carotenos da fruta buriti (*Mauritia flexuosa*). O efeito da pressão e temperatura no rendimento de extração foi estudado através de um experimento fatorial com replicações para as temperaturas de 40 e 55°C e pressões de 200 e 300 bar. O óleo extraído foi analisado por cromatografia gasosa e espectrofotometria e os resultados foram comparados com o óleo obtido utilizando hexano como solvente. O óleo obtido com hexano apresentou cerca de 1% de caroteno enquanto que a extração supercrítica foi capaz de remover cerca de 80% do conteúdo inicial de carotenos. De acordo com os autores, em casos em que o componente alvo a ser extraído está facilmente acessível na superfície das partículas não há necessidade de estender a extração até o fim por conta do drástico aumento no custo de compressão do solvente. Infelizmente isto não acontece na extração de carotenos, pois as frações de extrato com altas concentrações de carotenos são obtidas apenas no período controlada pela difusão.

No estudo, França *et al.* (1999) avaliaram os efeitos da temperatura, pressão e vazão de solvente no rendimento de extração e verificaram através de uma análise de variância que os efeitos da vazão de CO_2, pressão e temperatura afetam significativamente o coeficiente de transferência de massa, sendo a vazão e a pressão os efeitos mais significativos. Ainda neste estudo os autores perceberam que as curvas de extração obtidas apresentaram as três regiões distintas que usualmente são encontradas nas extrações de produtos naturais usando fluido supercrítico: período de taxa constante de extração, período de taxa decrescente (transição) e período de taxa controlada pela difusão. Os resultados mostraram que o período de taxa constante de extração foi significativamente afetada pela vazão de CO_2, pressão e temperatura e que a inclinação da curva aumenta à medida que a pressão aumenta. Tal efeito é devido ao aumento da solubilidade do soluto na fase gasosa. Com o aumento da pressão, todo óleo facilmente acessível na superfície das partículas, é dissolvido rapidamente na fase fluida devido ao aumento do poder de solvatação do dióxido de carbono.

Baysal *et al*. (2000) extraíram licopeno e β-caroteno de pasta de tomate utilizando dióxido de carbono supercrítico. Os autores avaliaram a temperatura do extrator (35, 45, 55 e 65°C), pressão (200, 250 e 300 bar), adição de co-solvente (5, 10 e 15% de etanol), tempo de extração (1, 2 e 3 h) e vazão de CO_2 (2, 4 e 8 kg/h). O máximo de 53,93% de licopeno foi extraído em 2 horas (vazão de CO_2 de 4 kg/h) a 55°C e 300 bar com adição de 5% de etanol. O total de 49,95% de β-caroteno foi extraído em 2 h (vazão de 4 kg/h) a 65°C e 300 bar com a adição de 5% de co-solvente. Os resultados também revelaram que o aumento da pressão e/ou temperatura resultou em um aumento no total de licopeno extraído devido ao aumento na densidade do CO_2 supercrítico.

Rozzi *et al*. (2002) estudaram a presença de licopeno, β-caroteno, α-caroteno, α-tocoferol, γ-tocoferol e δ-tocoferol nos extratos supercríticos obtidos a partir de tomates. Foram investigados os efeitos da temperatura e pressão (etapa 1), vazão de CO_2 (etapa 2) e volume de CO_2 (etapa 3). Os experimentos da etapa 2 foram realizados mantendo os valores ótimos de temperatura e pressão determinados na etapa 1. As condições ótimas determinadas nas etapas 1 e 2

foram utilizadas na etapa 3. Para os experimentos a temperatura variou de 32 a 86°C com intervalos de 9°C e a pressão foi de 137,8 a 482,6 bar com intervalos de 34,5 bar, enquanto que a vazão de CO_2 foi de 2,5 a 15 ml/min e um volume de 1200 ml. Nesse estudo as condições ótimas para a extração de licopeno de 3g de material seco contendo 7,19µg licopeno/g foram 86°C, 344,7 bar e 500 ml de CO_2 com vazão de 2,5 ml/min resultando numa extração de 61% de licopeno.

Mendes *et al.* (1995) avaliaram a viabilidade da extração de carotenóides e lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris* com CO_2 supercrítico. Os resultados mostraram que extrações em altas pressões permitiam uma maior eficiência da extração no que diz respeito ao rendimento total e que pequenos aumentos na temperatura, a elevadas pressões, proporcionavam leves aumentos no rendimento. Enquanto que a baixas pressões a temperatura exercia um efeito oposto sobre o total de carotenóides extraído quando comparado à altas pressões. A Tabela 3 apresenta apresenta alguns exemplos sobre as condições experimentais (pressão, temperatura, uso de co-solvente, etc.) utilizadas na extração de carotenóides com dióxido de carbono supercrítico.

Tabela 3: Exemplos das condições de extrações supercríticas empregadas em análises de carotenóides.

Material	Nome Botânico	Analito	T (°C)	P (bar)	t (min)	Etanol (%)	Referência
Microalga marinha	*Nannochloropsis gaditana*	Carotenoides Clorofila	40-50-60	100 a 500	180	-	Macías-Sanchez *et al.*(2005)
Microalga marinha	*Spirulina pacifica*	Zeaxantina β-criptoxantina β-caroteno	40-60-80	150-250-350	40-70-100	5-10-15	Careri *et al.*(2001)
Abóbora	*Curcurbita moschata*	α-β-caroteno Criptoxantina Cis-β-caroteno luteina licopeno	40-80	310-350-500	40	0-10-30	Seo *et al.*(2005)
Buriti	*Mauritia flexuosa*	lipídeos carotenoides	40-55	200-300	95-210	-	França *et al.*(1999)
Massa de tomate	-	β-caroteno licopeno	35-45-55-65	200-250-300	60 a 180	5-10-15	Baysal *et al.*(2000)
Tomate	n.m.	licopeno	32 a 86	137,8 a 482,6	n.m.	-	Rozzi *et al.*(2002)
Pimenta	Variedade *Byedige*	capsaicinoides outros pigmentos	40-80	100-400	330-1182	-	Perva-Uzunalic *et al.*(2004)
Tomate	Tipo pêra	licopeno	40	77-280	30	-	Gomez-Prieto *et al.*(2003)
Cenoura	n.m.	α-caroteno β-caroteno	30-40-50	300-400-500	60	5-10	Margaret Barth *et al.*(1995)
Microalga	*Chlorella vulgaris*	astaxantina cantaxantina	40-55	200-350	n.m.	-	Mendes *et al.* (1995)

3.3.1. EFEITOS DE DENSIDADE, PRESSÃO E COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Perva-Uzunalic *et al*. (2004) estudando a influência dos parâmetros de operação (pressão de 100 a 400 bar e temperatura de 40, 60 e 80°C) na eficiência de extração de capsaicinóides os pigmentos da pimenta (variedade *Byedige*) e mostraram que o tempo de extração varia devido as diferentes pressões de operação e temperaturas requeridas para alcançar o rendimento máximo, que por sua vez, é influenciado pela densidade do solvente. Desde que a vazão de CO_2 seja mantida baixa e constante durante toda a extração fica mais perceptível o efeito exercido pela pressão de operação e temperatura no tempo de extração. Os autores mostram que a quantidade de CO_2 por quilogramas de matéria-prima necessária para atingir o máximo rendimento depende da pressão de operação e temperatura. Ainda nesse estudo, os autores observaram que o coeficiente de transferência de massa apresentou uma tendência decrescente com o aumento da pressão a uma temperatura constante, entretanto, aumenta com o aumento da temperatura a uma pressão constante.

De acordo com Carvalho Jr. *et al*. (2005) para entender o comportamento do sistema matéria-prima vegetal + CO_2 faz-se necessário, além da densidade do solvente, o conhecimento das interações entre solvente e os vários solutos presentes no substrato sólido. Entretanto, pouco se sabe sobre estas interações, apenas que se trata de uma natureza muito complexa. Experimentalmente, a extensão dessas interações podem ser medidas através da solubilidade do sistema matéria-prima vegetal + CO_2 ou através das isotermas de rendimento global para o mesmo sistema. Neste trabalho os autores estudaram as isotermas de rendimento global e as curvas globais de extração para o sistema alecrim (*Rosmarinus officinalis*) + CO_2, a composição química e atividade antioxidante dos extratos. Os ensaios foram realizados com temperaturas de 30 e 40°C e pressões de 100 a 300 bar. Os resultados demonstraram que o rendimento global aumenta com a pressão para ambas as temperaturas e que para pressões

menores que 177 bar o rendimento é maior para a temperatura de 30°C enquanto que para pressões maiores que 177 bar observa-se um maior rendimento para a temperatura de 40°C. Segundo os autores, o efeito da temperatura e pressão na solubilidade depende da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente. As diferenças observadas nos rendimentos para as duas isotermas são mais importantes para pressões maiores do que 177 bar. Tal fato explica-se pelo aumento da densidade do CO_2 para pressões maiores do que 177 bar, que é similar a 40 e 30°C, dessa forma prevalece o efeito da pressão de vapor do soluto sobre o efeito da densidade do solvente.

Quispe-Condori *et al*. (2005), estudando as isotermas de rendimento global e a cinética de extração de *Artemisia annua* L, concluiram que para altas pressões há um aumento no rendimento de extração com a temperatura e um comportamento contrário é observado para baixas pressões. Próximo de 250 bar as isotermas de rendimento global se cruzam. Neste ponto, segundo os autores, não há influência da temperatura no rendimento global. Para pressões abaixo de 250 bar observa-se um comportamento similar à condensação retrógrada em fluidos supercríticos. Nesta condição, a densidade do solvente decresce consideravelmente com a temperatura conduzindo a um baixo poder de solvatação e a um baixo rendimento global, enquanto que, para pressões acima de 250 bar, o rendimento aumenta com a temperatura devido ao aumento da pressão de vapor do soluto com a temperatura. Ainda no presente estudo os autores demonstram que o rendimento global de *Artemisia annua* L apresenta uma pressão de inversão na faixa de 200 a 250 bar.

A aparência dos extratos obtidos por meio de extração supercrítica dependem das condições operacionais usadas durante a extração. Em baixas densidade de CO_2 os extratos apresentam uma coloração mais clara e tornam-se mais escuras na medida em que a densidade do solvente aumenta. O aumento da coloração dos extratos pode ser resultado de uma maior quantidade de compostos de alta massa molecular que são extraídos a altas densidades de CO_2 (Quispe-Condori *et al*., 2005).

Margaret Barth *et al.* (1995) otimizaram a extração supercrítica de α-caroteno e β-caroteno de cenoura liofilizada no que diz respeito à temperatura (30, 40 e 50°C), pressão (300, 400 e 500 bar) e adição de etanol como co-solvente (5 e 10%) e, então, compararam os resultados com técnicas de extração de carotenóides envolvendo solventes orgânicos). Os resultados mostraram que a condição que apresentou um maior rendimento na extração de α-caroteno e β-caroteno foi de 50°C, 300 bar e 10% de co-solvente. O estudo também mostra que a 300 bar o aumento da temperatura, independente da concentração de co-solvente, aumenta a extratibilidade de α-caroteno e β-caroteno. A 400 bar tal comportamento é percebido apenas com o uso de 10% de co-solvente. Entretanto, a 50°C e 10% de co-solvente (condição ótima) o aumento da pressão diminui significativamente o rendimento de extração. A 300 bar, a adição de 10% de co-solvente elevou o rendimento a níveis mais altos do que com a adição de 5% no que diz respeito à temperatura e um comportamento oposto foi observado na pressão de 500 bar. Quando comparado com a extração de carotenóides utilizando solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico conseguiu obter 15% mais β-caroteno, porém, 10% menos α-caroteno. Contudo, no que diz respeito ao consumo de solvente, a extração supercrítica consumiu 80% menos solvente do que a técnica que utiliza solventes orgânicos.

3.3.2. TAXA DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

A curva de extração de uma matriz vegetal em fluido supercrítico não é uma função linear do tempo. Em geral uma curva típica pode ser dividida em três regiões (i) taxa constante de extração (*Constant extraction rate – CER*) onde o mecanismo de transferência de massa é convectivo na fase fluida; (ii) taxa decrescente de extração (*Falling extraction rate – FER*), onde tanto a difusão dentro da partícula vegetal quanto a convecção na fase fluida são importantes para a transferência de massa; e (iii) região difusional (*Diffusional region – DF*), onde a transferência de massa é limitada pela difusão dentro das partículas. Em

geral 50 a 90% do total de material extraído é obtido na taxa constante de extração e o processo de otimização deve ser focado dessa região (Quispe-Condori *et al*., 2005).

O coeficiente de transferência de massa é uma função dos parâmetros de processo e das características do leito. Se as características do leito (tamanho das partículas e densidade do leito) forem mantidas constantes, espera-se que os parâmetros de processo (temperatura, pressão e vazão de CO_2) exerçam influência sobre o coeficiente de transferência de massa. Entretanto, os resultados obtidos por Quispe-Condori *et al*. (2005) mostraram que a pressão e temperatura não influenciam o coeficiente de transferência de massa, enquanto que, a vazão de CO_2 demonstra efeito significativo sobre o mesmo.

Carvalho Jr. *et al*. (2005) demonstram que o coeficiente de transferência de massa aumenta à medida que a razão altura/diâmetro do leito aumenta. Mantendo a razão altura/diâmetro do leito constante e aumentando a vazão de CO_2, o coeficiente de transferência de massa também aumenta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA-PRIMA

Os frutos *in natura* foram obtidos da Central de Abastecimento de São Paulo (CEASA) entre os meses de frutificação, de outubro de 2005 a janeiro de 2006. Os frutos *in natura* foram manualmente despolpados no LTAPPN – FZEA, congelados em um ultracongelador (Ecoclima, Santa Catarina, Brazil) e liofilizados pela empreza Terroni Equipamentos Científicos Ltda (São Carlos, São Paulo, Brazil). As frutas liofilizadas foram acondicionadas em embalagens plásticas (polietileno) e armazenadas à -15°C em freezer doméstico (Cônsul, modelo 220, São Paulo, Brasil).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.2.1. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

O teor de umidade foi determinado por um método gravimétrico (método da estufa) que toma por base a perda de massa de amostra, por dessecação até peso constante e foi realizada na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP localizada em Pirassununga. Pesou-se uma alíquota de 2g em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado em balança analítica. Para a análise, utilizou-se uma estufa convencional regulada

para 105°C. A amostra foi submetida ao processo, até peso constante, e o teor de umidade calculado utilizando a equação a seguir.

$$\%Umidade = 100 - \left[\frac{(m' - t)}{(m - t)} \times 100 \right] \quad (1)$$

Onde, m : massa total do sistema (cadinho de porcelana mais amostra) no início do processo; m': massa total do sistema (cadinho de porcelana mais amostra) no final do processo; t : massa do cadinho de porcelana.

4.2.2. GRANULOMETRIA DO MATERIAL

A polpa liofilizada foi triturada em moinho elétrico de facas (Tecnal, modelo TE 631/1, São Paulo, Brasil) e introduzida num jogo de peneiras da série padrão de Tyler de tamanho 9 a 48 meshes. A distribuição granulométrica foi realizada através de um agitador magnético de peneiras (Bertel, Modelo 1868, Caieiras, São Paulo, Brasil). As massas retidas em cada peneira foram pesadas em balança semi-analítica (Marte, modelo AS 5500, São Paulo, Brasil). Após pesagem a polpa liofilizada foi acondicionada em frascos hermeticamente fechados, envoltos em papel alumínio para evitar oxidação dos componentes pela luz e armazenados em freezer doméstico (Cônsul, modelo 220, São Paulo, Brasil), em temperaturas inferiores a -5°C, para uso nos experimentos.

Foram utilizadas todas as partículas de tamanhos 9 a 48 meshes, visto que, o objetivo será o conhecimento do diâmetro médio das partículas. Para tanto, o método ASAE S319.3, recomendado pela ASAE Standards, 1997 (Equação 2), foi utilizado.

$$d_{mg} = \log^{-1}\left[\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(w_i \log \overline{d_i} \right)}{\sum_{i=1}^{n} w_i} \right] \quad (2)$$

Onde, $\overline{d_i} = (d_i.d_{i+1})^{0,5}$, d_i : abertura nominal da i-ésima peneira (mm); d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm); w_i : massa do material retido na i-ésima peneira.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE REAL DAS PARTÍCULAS

A densidade real das partículas foi determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, utilizando-se a técnica de picnometria em gás Hélio. O método utiliza um picnômetro gasoso (*Micrometrics*, modelo *Multivolume Picnometer* 1305, EUA) e uma balança analítica (Quimis, modelo QI-AS, precisão de $\pm$0,0001g, EUA). Este equipamento utiliza o gás hélio para medir o volume e a densidade real das partículas sólidas através da técnica de deslocamento de gás.

4.2.4. CÁLCULO DA DENSIDADE APARENTE E DA POROSIDADE DO LEITO

A densidade aparente do leito foi calculada usando-se o volume total da célula de extração e a massa total de polpa liofilizada necessária para empacotá-la. O extrator consiste de um cilindro de aço inox com 5 x 10^{-6} m^3 de volume total. A porosidade do leito foi calculada através da Equação 3.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \qquad (3)$$

Onde ε = porosidade, d_a = densidade aparente e d_r = densidade real.

4.3. SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA EM LEITO FIXO

O equipamento de extração a alta pressão utilizado foi o Spe-ed (*Applied Separations*, modelo 7071, *Allentown*, EUA) que trabalha em pressão máxima de 670 bar e temperaturas de até 240°C.

O sistema consiste em um extrator instalado dentro do forno de aquecimento elétrico. O CO_2 (Gama Gases Industriais, 99,0%, Campinas, SP) é resfriado em banho de etileno glicol e o sistema de pressurização é formado por uma bomba pneumática. A temperatura do processo é medida por um termopar colocado na parede externa do extrator, sendo que esta temperatura é considerada a mesma do interior do extrator. O extrato é coletado em um frasco de vidro de 50 ml.

O rendimento global (X_0) representa a máxima quantidade de extrato que pode ser recuperada em uma dada condição de pressão e temperatura. Os efeitos da pressão e temperatura no rendimento global de pitanga liofilizada foram estudados em duas isotermas (40 e 60°C) e pressões de 100 a 400 bar (variações de 50 bar). A matéria-prima, em média 5,6 g, foi empacotada manualmente em uma coluna de extração (*Thar Designs*, *Pittsburgh*, USA) com capacidade de 5 x 10^{-6} m^3. Durante o empacotamento do extrator foi colocado lã de vidro no interior do mesmo, mais especificamente na entrada e saida de CO_2, para evitar que pequenas partículas fossem carregadas pelo solvente, evitando assim que estas partículas entupissem a válvula micrométrica do sistema. Um período estático de 10 minutos foi adotado em todos os experimentos para promover um maior contato entre as partículas e o solvente supercrítico.

Os extratos foram coletados em frascos de vidro envoltos por papel alumínio evitando assim a exposição dos extratos à luz. O tempo de extração foi mantido constante em 120 minutos. Após o término da extração a linha foi lavada internamente com álcool etílico (Ecibra, 99,5%, Lote 16.725) para recuperar o extrato depositado na linha. O álcool etílico foi então evaporado utilizando um roto-

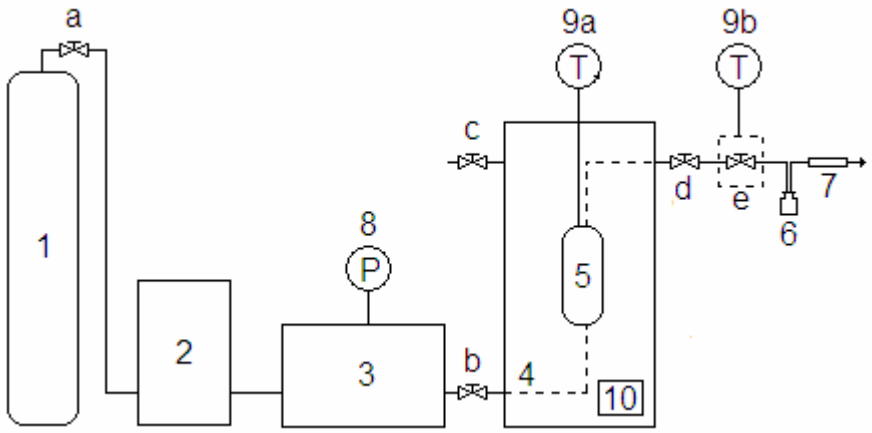
evaporador (*Heidolph Instruments*, modelo Laborota 4001, Alemanha). Tanto o frasco contendo o extrato quanto o frasco contendo o material proveniente da limpeza da linha foram pesados em balança analítica (Sartorius, modelo A 2005, precisão de $\pm$0,0001g, Alemanha).

4.3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento de operação do equipamento, descrito de forma sintética, pode ser visualizado na Figura 2 enquanto que o equipamento de extração supercrítica (Spe-ed) é ilustrado pela Figura 3.

1. Certificar-se que as válvulas *b*, *c*, *d*, e *e* encontram-se fechadas;
2. Abre-se a válvula *a* do cilindro de CO_2 (1);
3. Resfria-se o banho (2) até a temperatura de -10°C;
4. Programar a temperatura do forno (4), em 40 ou 60°C conforme experimento, e da válvula de saída (*e*) em 80°C. Controlar utilizando o indicador digital (10);
5. Insere-se aproximadamente 5,6 x 10^{-3} kg de pitanga liofilizada no extrator instalando-o, posteriormente, no interior do forno de aquecimento através da ligação das linhas;
6. Pressuriza-se o sistema por meio do ajuste da bomba pneumática (3) até a pressão de operação;
7. Pressuriza-se o extrator através da abertura da válvula de entrada de CO_2 pressurizado (*b*);
8. Atingida a pressão de trabalho, mostrada no indicador digital de pressão (8), aguarda-se o período estático pré-fixado de 10 min e abrem-se as válvulas de saída *d* e *e*;

9. O extrato é recolhido em um frasco de vidro de 50 ml envolto por papel alumínio (6);
10. Após o tempo pré-estabelecido de extração de 120 minutos fecha-se a válvula de alimentação de CO_2 (*b*), reduz-se a pressão da bomba pneumática, iniciando a despressurização do sistema com duração de aproximadamente 1 minuto;
11. O banho de resfriamento e o painel do forno de aquecimento (10) podem ser desligados;
12. Fecha-se a válvula do cilindro de CO_2 (*a*);
13. Para garantir a total despressurização do sistema, abre-se a válvula de alívio (*c*);
14. Abre-se o forno (4), retirando a célula de extração (5).



1. Cilindro de CO_2
2. Banho de resfriamento de CO_2
3. Booster
4. Forno de aquecimento
5. Extrator
6. Frasco coletor de amostra
7. Rotâmetro
8. Indicador digital de pressão
9. a e b, Termopares
10. Indicador digital de temperatura

Válvulas

a. do cilindro de CO_2
b. entrada de CO_2 pressurizado
c. de alívio
d. de saída de CO_2 e produto
e. micrométrica

Figura 2: Diagrama da unidade de ESC Spe-ed da Applied Separations

Figura 3: Unidade de extração supercrítica (Spe-ed) do Lasefi – DEA/FEA UNICAMP

4.4. ANÁLISE DE CAROTENÓIDES

Vários fatores dificultam a obtenção de dados confiáveis sobre o teor de carotenóides como estrutura desses compostos, exposição ao oxigênio, luz e calor. Esses fatores podem promover a degradação desses pigmentos com consequente formação de artefatos. Cuidados como uso de solventes livres de peróxidos, ausência de luz, tempo total de análise, uso de atmosfera inerte, baixa temperatura devem ser levados em consideração durante a análise.

4.4.1. REAGENTES

Acetonitrila e acetato de etila, de grau cromatográfico, foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes eram de grau p. a. e foram fornecidos pela Labsynth (Diadema, Brasil). Os solventes foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membranas

para solvente orgânico de 0,45 μm antes da análise em HPLC[1]. Todos os solventes empregados na saponificação e reações químicas foram grau PA.

4.4.2. PADRÕES

Os padrões de all-*trans*-rubixantina, all-*trans*-licopeno, all-*trans*-γ-caroteno, all-*trans*-α-caroteno e all-*trans*-β-caroteno foram fornecidas pelo Dr. Werner Simon da DSM Nutritional Products (Basel, Suíça), apresentando um grau de pureza de 95 a 99%, demonstrado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.4.3. SAPONIFICAÇÃO

Para a análise quantitativa, os carotenóides de pitanga liofilizada foram exaustivamente extraídos com acetona e hyflosupercel[2] em almofariz. O extrato obtido foi filtrado em funil de Büchner, seguido de partição para éter etílico/éter de petróleo (1:1) em funil de separação. Os extratos supercríticos foram todos dissolvidos em éter de petróleo e transferidos para erlenmeyers de 500 ml. Em seguida mais éter de petróleo foi adicionado até a marca de 150 ml. Para eliminar os lipídeos presentes nas amostras e hidrolizar os ésteres de xantofilas, foi realizado a saponificação dos extratos etéreos com igual volume de 10% de KOH em metanol (150 ml), à temperatura ambiente por uma noite. Posteriormente foi feita a lavagem com água destilada para retirada do álcali, até pH neutro. Sulfato de sódio anidro foi adicionado com a finalidade de eliminar possíveis resíduos de água. Por fim, o extrato foi concentrado até secura em evaporador rotativo (temperaturas inferiores à 35°C) e armazenados em atmosfera inerte (nitrogênio) à -18°C em freezer.

[1] HPLC: *High performance liquid chromatography*
[2] Hyflosupercel: Terra diatomacea

Zanatta (2004), estudando o teor de carotenóides e antocianinas em camu-camu, observou que a saponificação completa dos carotenóides depende da proporção entre a quantidade de amostra e o volume do solvente utilizado para a partição dos carotenóides. Ainda de acordo com a autora, a presença ou ausência dos ésteres de xantofila podem ser determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, pois estes compostos possuem tempo de retenção superior ao do β-caroteno.

4.4.4. DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES

Os carotenóides foram determinados em um HPLC equipado com sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters, modelo 600), detector de arranjo de fotodiodo (Waters, modelo 996), desgaseificador *on-line*, injetor Rheodyne com alça de amostra (*loop*) de 20 μm, forno externo com controle de temperatura e *software* de aquisição e processamento de dados Millennium (Waters). Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados em comprimento de onda fixo de 450 nm.

Para as análises quantitativas, as separações dos carotenóides foram conduzidas em uma coluna C_{18} monométrica (Nova-Pak ODS, 300 mm x 3,9 mm, 4 μm de tamanho de partícula) com vazão de 1 ml/min e temperatura mantida a 29°C, usando como fase móvel um gradiente linear de acetonitrila/H_2O/acetato de etila partindo de 88:10:2 (v/v), atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo essa proporção por 30 minutos. Todas os extratos saponificados foram dissolvidos em acetonitrila/acetato de etila na proporção de 50:50 e filtradas em membranas com 0,22 μm de poro marca Millipore filter, imediatamente antes da injeção no cromatógrafo.

Os carotenóides foram identificados de acordo com os seguintes parâmetros: comportamento cromatográfico na coluna de HPLC C_{18} (De Rosso & Mercadante, 2005; Zanatta & Mercadante, 2007), espectros UV/visíveis

(comprimentos de onda máximos de absorção e estrutura fina espectral) comparados com dados da literatura (Britton, 1995). Os carotenóides foram então quantificados por HPLC usando curvas-padrão para all-*trans*-β-criptoxantina, all-*trans*-rubixantina, all-*trans*-licopeno, all-*trans*-γ-caroteno, all-*trans*-α-caroteno, all-*trans*-β-caroteno, com um mínimo de sete níveis de concentração. Os isômeros *cis* do licopeno, rubixantina, β-caroteno e γ-caroteno foram quantificados usando as curvas-padrão dos seus isômeros all-*trans* correspondentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TREINAMENTO E TESTES PRELIMINARES

Foi realizado um treinamento na unidade de extração supercrítica a fim de estar apto a controlar as variáveis do processo de extração, assim como os demais equipamentos envolvidos. Outro fator significativo e que justificava o treinamento era a pouca disponibilidade de matéria-prima liofilizada. Dessa forma era mais prudente estar familiarizado com os equipamentos antes de iniciar os experimentos, evitando assim, erros operacionais durante as extrações. Foram então realizados quatro testes preliminares em uma mesma condição de pressão e temperatura (300 bar e 50°C). Uma etapa crítica durante o treinamento foi o de moagem da fruta liofilizada. Essa operação é passiva de altas perdas de matéria-prima, que no caso deveria ser minimizada. Portanto, para os testes preliminares, também foi realizada uma análise de granulometria do material onde foram reservados aproximadamente 25 g de pitanga liofilizada. O leito foi empacotado com amostras de mesh 24 a 80 e a matéria-prima que compôs o leito de extração durante os testes tinha um teor de umidade de 9,7%, densidade real das partículas de 1457 kg/m^3, densidade aparente média de 1046 kg/m^3, porosidade de 0,28 e diâmetro médio das partículas de 0,380 mm. A vazão mássica do dióxido de carbono supercrítico foi mantida constante em 6,8 x 10^{-5} kg/s na corrente de saída do extrator.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros utilizados para o cálculo do diâmetro médio das partículas através da equação 2, enquanto que a Tabela 5 mostra os resultados das extrações realizadas durante os testes preliminares. Os testes TP-GL02, TP-GL03 e TP-GL04 apresentaram uma boa repetibilidade apresentando apenas uma pequena variação no rendimento global na terceira casa decimal. As massas dos extratos e da limpeza da linha de extração também apresentaram valores bastante consistentes. Esse resultado permitiu avançar para a etapa de extração nas condições de pressão e temperatura pré-determinadas além de aumentar a confiança na operação do equipamento e no controle das variáveis durante o processo de extração.

Tabela 4: Parâmetros utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas.

Mesh	d_i	d_{i+1}	$(d_i.d_{i+1})^{0,5}$	w_i	log d	w_i. log d	%
16	1.000	2.000	1.414	0	0.151	0	0
24	0.710	1.000	0.843	1.765	-0.074	-0.131	7.290
32	0.500	0.710	0.596	4.760	-0.225	-1.070	19.666
48	0.300	0.500	0.387	10.003	-0.412	-4.121	41.328
80	0.180	0.300	0.232	7.676	-0.634	-4.865	31.715

Tabela 5: Resultados dos testes preliminares.

Teste preliminar	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Amostra (g)	Rendimento (%)		
				Global	Extrato	Lavagem
TP-GL01	300	50	5.629	0,513	0.323	0.190
TP-GL02	300	50	4.548	0.743	0.187	0.556
TP-GL03	300	50	5.121	0.740	0.199	0.541
TP-GL04	300	50	5.615	0.741	0.183	0.557

5.2. EXTRAÇÕES

A matéria-prima utilizada nos experimentos apresentava umidade de 9,7%, densidade real de 1457 $\pm$6 kg/m^3, densidade aparente do leito mantida constante em 1120 kg/m^3, porosidade de 23% e diâmetro médio das partículas de 0,376 mm. A vazão mássica de CO_2, assim como nos testes preliminares, foi

mantida constante em 6,8 x 10^{-5} kg/s medida na corrente de saída do extrator. De acordo com Meireles (2003), a densidade aparente do leito depende da natureza do substrato sólido (folhas, raízes, frutas, etc.) e do pré-tratamento utilizado na matéria-prima, os quais podem incluir secagem e moagem. Matérias-primas contendo mais de 10% de umidade requerem um processo de secagem antes da extração.

Os parâmetros utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas estão apresentados na Tabela 6 onde a última coluna apresenta a porcentagem de material retida em cada peneira. A partir dos resultados obtidos na análise de granulometria tinha-se disponível 290 g de matéria-prima para os experimentos.

Tabela 6: Parâmetros utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas

Mesh	d_i	d_{i+1}	$(d_i.d_{i+1})^{0,5}$	w_i	log d	w_i. log d	%
16	1.00	2.00	1.41	2.49	0.15	0.37	0.79
24	0.71	1.00	0.84	19.96	-0.07	-1.48	6.33
32	0.50	0.71	0.60	52.88	-0.22	-11.89	16.77
48	0.30	0.50	0.39	115.54	-0.41	-47.60	36.63
80	0.18	0.30	0.23	98.23	-0.63	-62.26	31.15

A Tabela 7 apresenta os resultados das extrações com dióxido de carbono supercrítico de pitanga liofilizada. O rendimento global (X_0) é a quantidade de material solúvel que pode ser extraída de uma matrix vegetal a uma dada temperatura e pressão expressa como a razão entre a massa de material solúvel sobre a massa do substrato sólido (Meireles, 2003). Todos os experimentos foram realizados em duplicatas nas pressões de 100 a 400 bar, com variações de 50 bar, e temperaturas de 40°C e 60°C.

Tabela 7: Resultados das extrações com CO_2 supercrítico de pitanga liofilizada.

40°C				60°C			
P (bar)	ρ (kg/m^3)	X_0 (%)	Amplitude do erro	P (bar)	ρ (kg/m^3)	X_0 (%)	Amplitude do erro
100	632.5	0.471	0.052	100	291.6	0.193	0.019
150	782.7	0.656	0.025	150	607.4	0.648	0.007
200	841.6	0.772	0.039	200	725.5	0.771	0.066
250	880.8	0.732	0.077	250	787.7	0.850	0.066
300	910.9	0.751	0.018	300	830.6	0.965	0.073
350	935.6	0.739	0.048	350	863.6	1.033	0.054
400	956.6	0.786	0.002	400	890.7	0.982	0.025

As Figuras 4a e 4b apresentam as curvas de rendimento global em função da pressão e da densidade respectivamente. A 60°C, houve um aumento de 336,8 % no rendimento global quando a pressão foi elevada de 100 para 150 bar, e outros aumentos na pressão também tiveram um impacto positivo no rendimento global, mas não nas mesmas proporções. O maior rendimento foi obtido na condição de 60°C e 350 bar. A 40°C houve um aumento nos valores do rendimento para pressões variando de 100 a 200 bar e depois o rendimento permaneceu praticamente constante com a pressão.

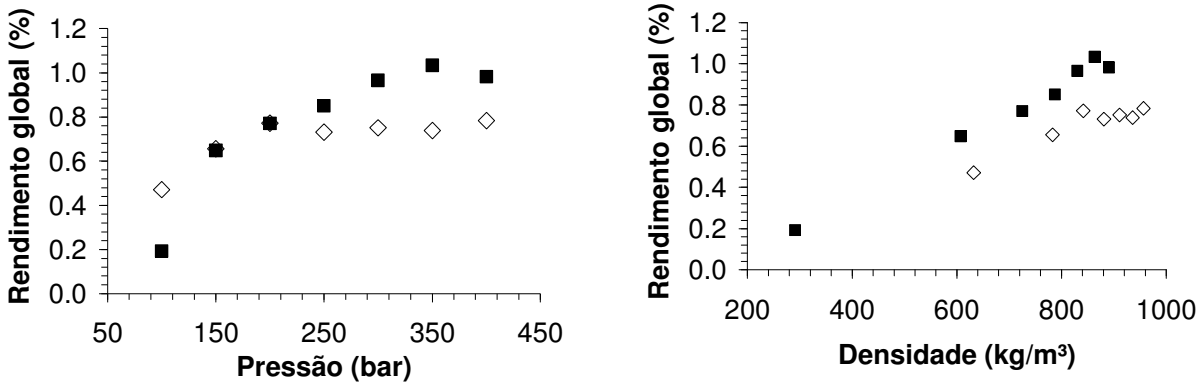


Figura 4: (a) Rendimento global de extratos supercríticos de pitanga liofilizada em função da pressão. (b) Rendimento global de extratos supercríticos de pitanga liofilizada em função da densidade. 40°C (◊) e 60°C (■).

A 40°C o rendimento global foi de 0,78% a 400 bar de pressão, apenas 66% maior que o rendimento global a 100 bar de pressão e neste caso a variação de densidade do solvente foi 51% superior. A 60°C, a variação da densidade foi mais acentuada, onde a 400 bar é 3 vezes maior do que a densidade a 100 bar e o rendimento de extração foi 5 vezes maior.

Para altas pressões houve um aumento no rendimento global com o aumento da temperatura e um comportamento inverso foi observado a baixas pressões, onde o rendimento diminui com o aumento da temperatura. Este comportamento também é observado em dados de solubilidade de diferentes componentes em dióxido de carbono supercrítico. Tal fato é explicado pelo efeito da variação da densidade do solvente e da pressão de vapor dos solutos. No intervalo de 150 a 200 bar as isotermas se sobrepuseram e a partir dai houve um cruzamento nas curvas de rendimento. O ponto de cruzamento da pressão varia para cada sistema, pois depende diretamente da pressão de vapor de cada soluto em questão. Neste intervalo não há influência da temperatura no rendimento global. Tal comportamento também foi observado por Carvalho Jr. *et al*. (2005) e por Quispe-Condori *et al*. (2005). De acordo com Quispe-Condori *et al*. (2005), para pressões inferiores ao ponto de interseção a densidade do solvente decresce consideravelmente com a temperatura levando a um baixo poder de solvatação e consequentemente a um baixo rendimento global.

Para pressões menores que 150 bar o comportamento é similar à condensação retrógrada em fluidos supercríticos. É sabido que a solubilidade de solutos em fluidos supercríticos depende de dois fatores: 1) da influência da temperatura na pressão de vapor dos solutos e 2) da influência concomitantente da temperatura e pressão na densidade do solvente. O rendimento de extração é influenciado pela solubilidade dos compostos e pela granulometria do material, pois esta pode dificultar ou até mesmo impedir a saída de alguns solutos. A determinação deste ponto de cruzamento é importante na extração supercrítica, pois é um divisor do comportamento da solubilidade dos diferentes solutos e pode ser importante quando se deseja fracionar extratos em termos de solutos de interesse.

A 100 bar, o rendimento global a 40°C (densidade do CO_2 = 632,45 kg/m^3) foi maior do que a 60°C (ρ_{CO2} = 291,62 kg/m^3) evidenciando a predominância do efeito da densidade[3] do solvente na solubilidade e no rendimento global sobre o efeito da pressão de vapor. Nos resultados obtidos por Braga *et al*. (2005) é possível observar a predominância do efeito da pressão de vapor sobre o efeito da densidade na solubilidade quando na condição de 100 bar e 45°C (ρ_{CO2} = 481 kg/m^3) o rendimento global foi 1,2 vezes maior do que o obtido a 120 bar e 50°C (ρ_{CO2} = 478 kg/m^3), tendo em vista que os valores da densidade do CO_2 estavam bem próximos. Ainda de acordo com a autora uma região de retrogradação deveria ser esperada nas vizinhanças dessas condições, porém a região onde esse fenômeno ocorre é muito pequena e é facilmente perdida experimentalmente.

A intensidade da cor dos extratos supercríticos depende das condições operacionais usadas durante a extração. Em baixas densidades o extrato possui uma cor mais clara, mas o mesmo vai se tornando mais escuro à medida que a densidade do solvente aumenta (Braga *et al.*, 2005). Esse fenômeno também foi observado durante as extrações. Na condição de 60°C e 100 bar o extrato possuía uma cor vermelha muito menos intensa do que nas demais condições operacionais. O aumento na intensidade de cor foi provavelmente resultante dos carotenóides extraídos quando o solvente supercrítico têm altos valores de densidade.

5.3. COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES DOS EXTRATOS

Para analisar a capacidade de extração e a seletividade do dióxido de carbono supercrítico em relação aos carotenóides, a extração convencional com acetona foi realizada e os resultados comparados com aqueles alcançados

[3] Os experimentos na ordem em que foram realizados, suas respectivas condições de pressão e temperatura e seus valores de densidade estão disponíveis no anexo 3.

através da extração com CO_2 supercrítico. A Tabela 8 apresenta as respectivas concentrações dos carotenóides obtidos através da cromatografia líquida de alta eficiência enquanto que as Figuras 5 e 6 ilustram, respectivamente, as estruturas químicas dos carotenóides encontrados nos extratos supercríticos e o perfil destes carotenóides. Através da análise da Figura 6 e Tabela 8 nota-se que os carotenóides majoritários no extrato obtido com acetona são all-*trans*-licopeno, all-*trans*-rubixantina e all-*trans*-β-criptoxantina perfazendo, respectivamente, um total de 33.22, 15.67 e 15.24 μg/g.

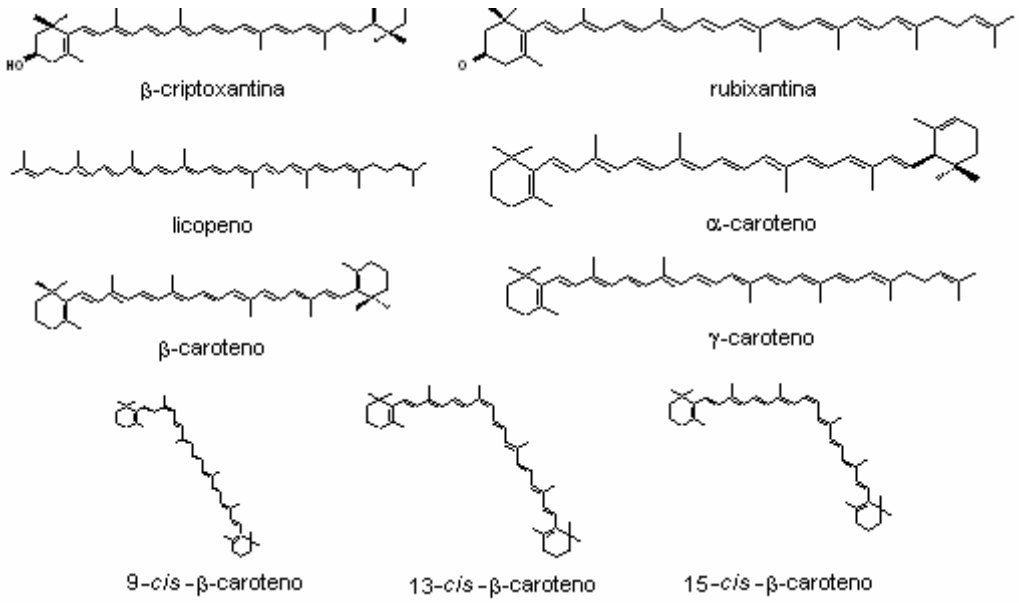


Figura 5: Estrutura química dos carotenóides encontrados nos extratos de pitanga liofilizada.

Tabela 8: Concentração de carotenóides (μg/g) de pitanga liofilizada extraída com acetona.

Pico	Carotenóide	Concentração (μg/g)
1	all-*trans*-luteina	3.12
2	all-*trans*-zeaxantina	3.96
3	all-*trans*-rubixantina	15.67
4	*cis*-rubixantina I	3.62
5	*cis*-rubixantina II	1.31
6	all-*trans*-β-criptoxantina	15.24
7	all-*trans*-licopeno	33.22
8	*cis*-licopeno	6.99
9	all-*trans*-γ-caroteno	1.12
10	all-*trans*-α-caroteno	0.54
11	all-*trans*-β-caroteno + 9-*cis*-β-caroteno	2.35
12	15-*cis*-β-caroteno + 13-*cis*-β-caroteno	0.74

Total de carotenóides (μg/g de pitanga liofilizada): 87,88

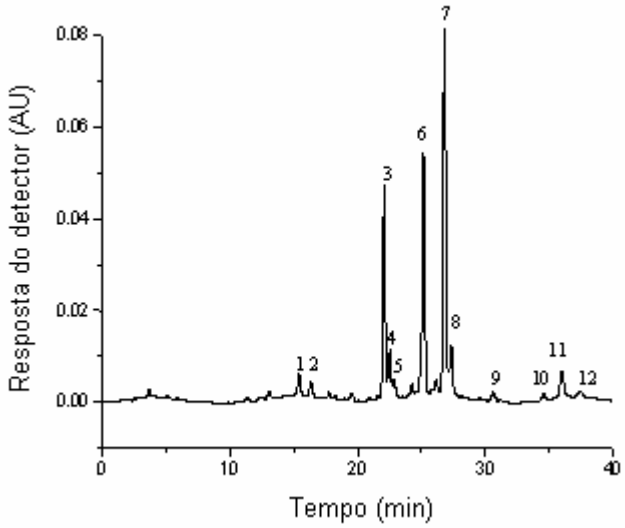


Figura 6: Cromatograma obtido por HPLC de pitanga liofilizada obtida por extração com acetona. 1. all-*trans*-luteina, 2. all-*trans*-zeaxantina, 3. all-*trans*-rubixantina, 4. *cis*-rubixantina I, 5. *cis*-rubixantina II, 6. all-*trans*-β-criptoxantina, 7. all-*trans*-licopeno, 8. *cis*-licopeno, 9. all-*trans*-γ-caroteno, 10. all-*trans*-α-caroteno, 11. all-*trans*-β-caroteno + 9-*cis*-β-caroteno, 12. 15-*cis*-β-caroteno + 13-*cis*-β-caroteno.

A maioria dos perfis cromatográficos de carotenóides obtidos por extração supercrítica nas diferentes condições de pressão e temperatura foram similares (Figura 7a), sendo β-criptoxantina, licopeno e rubixantina os carotenóides majoritários. Por outro lado, na isoterma de 60°C, em um determinado intervalo de pressão, o dióxido de carbono supercrítico mostrou-se seletivo em relação à β-criptoxantina (Figura 7b). As Tabelas 9 e 10 exibem as concentrações de carotenóides nos extratos supercríticos e o total de carotenóides em μg de carotenóides por grama de pitanga liofilizada, tomando como base de cálculo o rendimento global do processo de extração nas temperaturas de 40°C e 60°C. Os anexos 4 e 5 trazem as concentrações de carotenóides nos extratos supercríticos, obtidos nas duas isotermas estudadas, levando em consideração a massa de pitanga liofilizada utilizada para o empacotamento do leito de extração[4].

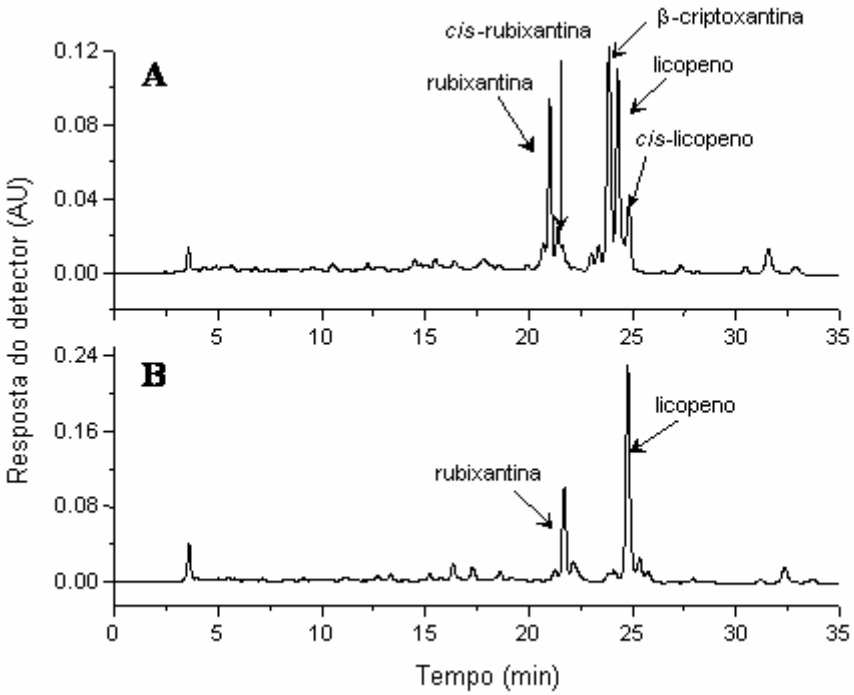


Figura 7: Cromatograma obtido por HPLC do extrato supercrítico de pitanga liofilizada na condição de 300 bar e 40°C (A) e 300 bar e 60°C (B).

[4] As massas de pitanga liofilizada utilizadas para o empacotamento do leito nas diferentes condições de pressão e temperatura estão disponíveis no anexo 3.

Nos extratos obtidos a 40°C a condição de maior concentração de carotenóides nos extratos supercríticos foi a 300 bar tendo como carotenóides majoritários a rubixantina, licopeno, *cis*-rubixantina e *cis*-licopeno representando respectivamente 37,5, 30, 16 e 12% do total. É muito comum na literatura extrações com CO_2 supercrítico visando a obtenção de um ou mais compostos de interesse. Como o licopeno e a rubixantina foram os principais carotenóides presentes nos extratos, a melhor condição experimental para a obtenção dos mesmos foram 300 bar e 40°C para a rubixantina e 250 bar e 60°C para o licopeno perfazendo um total de 1485 e 2675 (μg/g de extrato) respectivamente.

Para as duas isotermas, as concentrações de licopeno e rubixantina foram sempre maiores do que as concentrações dos demais carotenóides. Nos extratos obtidos a 60°C as concentrações de licopeno foram maiores do que as de rubixantina, enquanto que a 40°C foi observado um comportamento inverso. A condição de máxima concentração de carotenóides totais na isoterma de 60°C foi a 250 bar perfazendo 5474 μg de carotenóides por grama de extrato supercrítico sendo o licopeno, rubixantina e *cis*-licopeno os carotenóides majoritários nesta condição representando respectivamente 49, 22, 17% do total.

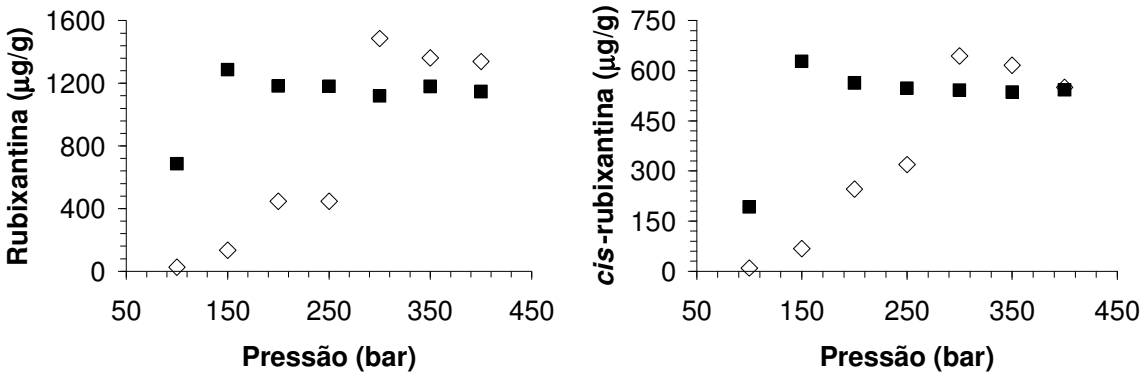
A Figura 8a apresenta a concentração de rubixantina (μg/g) enquanto que a Figura 8b mostra a concentração de *cis*-rubixantina (μg/g) nos extratos supercríticos. O comportamento das curvas de concentração de rubixantina e *cis*-rubixantina descreveram um comportamento semelhante nas duas isotermas estudadas. Para pressões menores do que 300 bar as concentrações foram sempre superiores a 60°C e um comportamento contrário é observado em pressões maiores ou igual a 300 bar sendo que a melhor condição de extração destes carotenóides foi a 300 bar e 40°C.

Tabela 9: Concentração de carotenóides (μg/g) de extrato supercrítico a 40°C e total de carotenóides (μg de carotenóides por grama de pitanga liofilizada).

Pressão (bar)	rubixantina	*cis*-rubixantina	β-criptoxantina	licopeno	*cis*-licopeno	γ-caroteno	α-caroteno	β-caroteno (9-cis+all-trans)	β-caroteno (13+15-cis)	Total de carotenóides no extrato	Total de carotenóides extraído
100	26	10	14	18	14	8	12	26	8	138	1
150	134	68	159	266	128	8	11	25	8	802	5
200	447	246	155	402	378	9	15	42	13	1699	12
250	447	319	182	526	401	10	23	43	15	1966	14
300	1485	644	59	1147	478	26	24	76	22	3962	30
350	1362	616	57	528	459	38	24	77	26	3187	25
400	1338	550	53	381	361	42	25	77	27	2856	23

Tabela 10: Concentração de carotenóides (μg/g) de extrato supercrítico a 60°C e total de carotenóides (μg de carotenóides por grama de pitanga liofilizada).

Pressão (bar)	rubixantina	*cis*-rubixantina	β-criptoxantina	licopeno	*cis*-licopeno	γ-caroteno	α-caroteno	β-caroteno (9-cis+all-trans)	β-caroteno (13+15-cis)	Total de carotenóides no extrato	Total de carotenóides extraído
100	686	192	126	388	151	45	56	171	66	1876	4
150	1286	628	34	1160	614	32	29	99	34	3916	23
200	1182	563	-	1657	880	25	23	81	26	4438	34
250	1180	547	-	2675	919	23	25	81	24	5474	47
300	1119	542	-	1446	811	22	23	79	22	4064	39
350	1180	536	207	829	706	22	23	78	22	3597	36
400	1147	543	245	700	385	22	25	74	21	3163	33

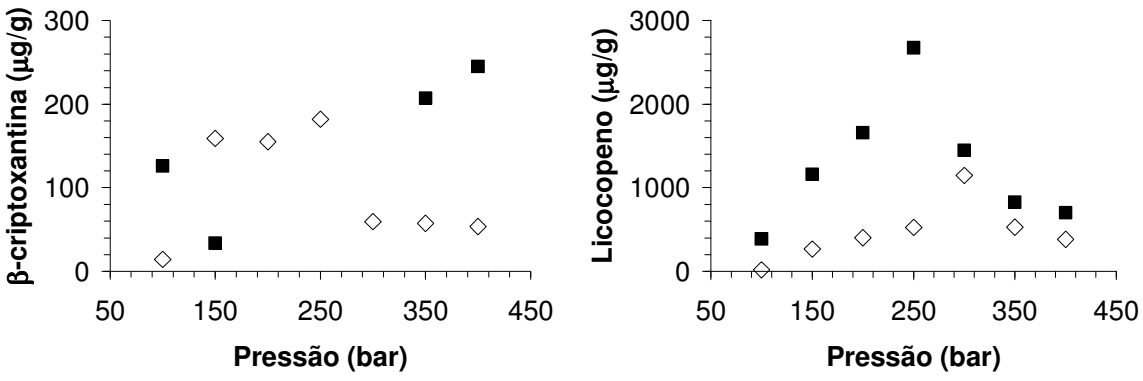


(a) (b)

Figura 8: (a) Concentração de rubixantina (µg/g) nos extratos supercríticos. (b) Concentração de *cis*-rubixantina (µg/g) nos extratos supercríticos. (◊) 40°C, (■) 60°C.

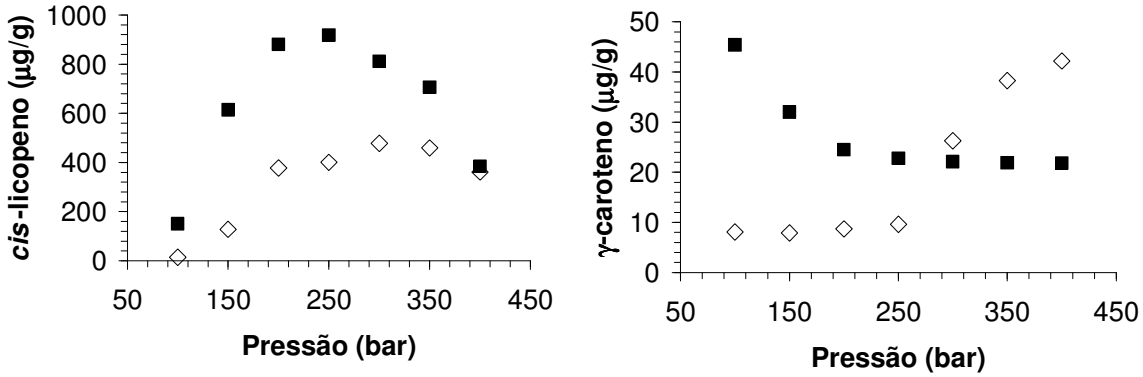
A Figuras 9a e 9b exibem, respectivamente, as concentrações de β-criptoxantina e licopeno nos extratos supercríticos. Os rendimentos de licopeno foram sempre maiores à 60°C sendo que a melhor condição de extração deste carotenóide foi a 250 bar, enquanto que para a β-criptoxantina a melhor condição de extração foi a 400 bar e 60°C. Ainda em relação à β-criptoxantina, na isoterma de 60°C o CO_2 supercrítico mostrou-se bastante seletivo, como mencionado anteriormente, não ocorrendo a extração deste carotenóide nas pressões de 200, 250, 300 bar. Tal fenômeno não foi observado nos extratos obtidos a 40°C.

A Figura 10a ilustra a concentração de *cis*-licopeno, enquanto que a Figura 10b ilustra a concentração de γ-caroteno nos extratos supercríticos. Para o *cis*-licopeno as concentrações foram sempre superiores na temperatura de 60°C e a condição ótima foi a 250 bar. A curva de concentração de γ-caroteno demonstra um comportamento interessante sendo que a condição de concentração máxima, porém rendimento muito baixo, foi a 100 bar e 60°C, condição esta de menor densidade do CO_2. Para pressões menores do que 300 bar o rendimento de γ-caroteno é maior a 60°C do que a 40°C e um comportamento inverso é observado em pressões maiores que a 300 bar.



(a) (b)

Figura 9: (a) Concentração de β-criptoxantina (µg/g) nos extratos supercríticos. (b) Concentração de licopeno (µg/g) nos extratos supercríticos. (◊) 40°C, (■) 60°C.

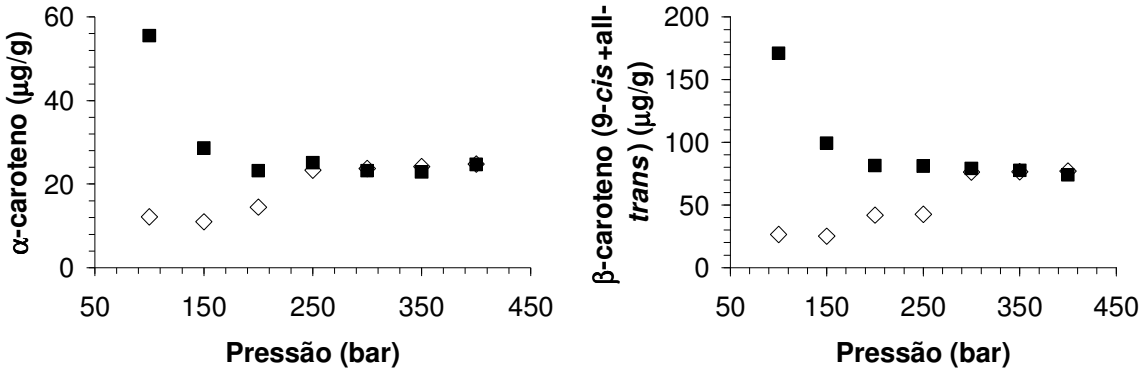


(a) (b)

Figura 10: (a) Concentração de *cis*-licopeno (µg/g) nos extratos supercríticos. (b) Concentração de γ-caroteno (µg/g) nos extratos supercríticos. (◊) 40°C, (■) 60°C.

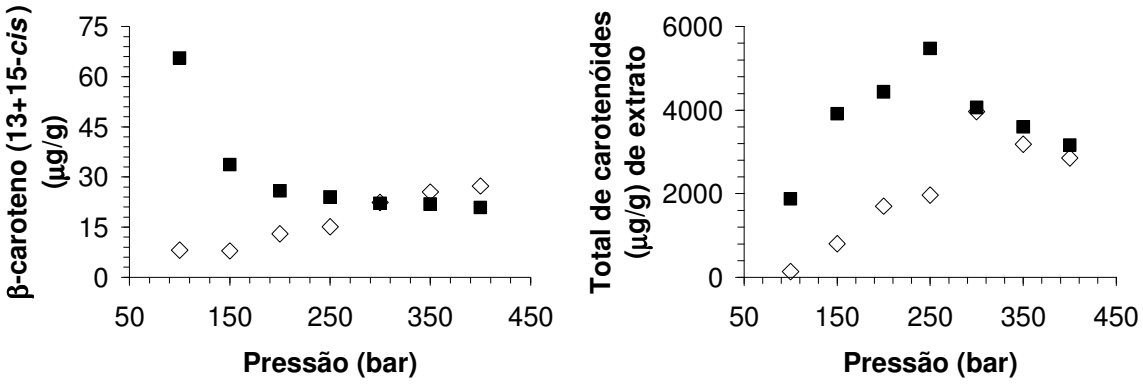
As Figuras 11a e 11b apresentam, respectivamente, o comportamento das curvas de concentração de α-caroteno e β-caroteno (9-*cis*+all-*trans*) (µg/g) nos extratos supercrítico, enquanto que as Figuras 12a e 12b apresentam,

respectivamente, as concentrações de β-caroteno (13+15-*cis*) e o total de carotenóides (μg/g) nos extratos supercríticos. Através das Figuras 11a, 11b e 12a, percebe-se que as curvas de concentração para o α e β-caroteno apresentam comportamentos bastante semelhantes. A condição ótima de extração destes carotenóides foi a 100 bar e 60°C. Para pressões abaixo de 250 bar para o α-caroteno e abaixo de 300 bar para o β-caroteno, as concentrações foram maiores a 60°C. Por outro lado, para pressões acimas das mencionadas anteriormente a pressão e a temperatura não influenciam na concentração destes carotenóides.



(a) (b)

Figura 11: (a) Concentração de α-caroteno (μg/g) de extrato supercrítico. (b) Concentração de β-caroteno (9-*cis*+all-*trans*) (μg/g) de extrato supercrítico. (◊) 40°C, (■) 60°C.



(a) (b)

Figura 12: (a) Concentração de β-caroteno (13+15-*cis*) (µg/g) de extrato supercrítico. (b) Total de carotenóides (µg/g) de extrato supercrítico. (◊) 40°C, (■) 60°C.

6. CONCLUSÃO

Os maiores rendimentos globais de extrato foram obtidos na temperatura de extração de 60°C e pressões entre 300-400 bar com rendimento ao redor de 1%, entretanto as condições operacionais que apresentaram as maiores concentrações de carotenóides foram na temperatura de 60°C e pressões entre 200-300 bar, obtendo-se entre 4064 a 5474 μg/g de carotenóides totais. A condição de maior rendimento global apresentou 34,3% a menos de carotenóides totais do que a condição de maior concentração de carotenóides nos extratos.

Os carotenóides majoritários presentes no extrato obtido com acetona foram licopeno (40,21 μg/g), rubixantina (20,60 μg/g) e all-*trans*-β-criptoxantina (15,24 μg/g). A condição operacional de maior concentração de carotenóides (250 bar e 60°C) apresenta uma concentração de carotenóides no extrato de 5474 μg/g. Entretanto, quando comparado com a extração convencional com acetona a mesma condição operacional extraiu 54,6% dos carotenóides totais extraídos com acetona.

O dióxido de carbono supercrítico mostou-se bastante seletivo em relação à β-criptoxantina não havendo traços deste carotenóide nos cromatogramas obtidos na isoterma de 60°C quando a pressão varia de 200 a 300 bar. Contudo, a extração supercrítica apresenta-se como uma boa alternativa no que diz respeito ao processo de extração de determinados carotenóides quando comparado ao processo de extração exaustiva com acetona em amolxariz. Esta, por sua vez, trata-se de um procedimento manual e muito trabalhoso contendo

transferências para vários solventes, o que pode ocasionar erros tendo em vista que as perdas nessas transferências podem ser significativas. Mesmo extraindo uma quantidade menor de carotenóides totais, a extração supercrítica conseguiu extrair 78% do licopeno e 73% de rubixantina em comparação à quantidade extraída pelo método convencional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of Eugenia uniflora. **Fitoterapia**, 1989, 5, 451-455.

ALMEIDA, E. C.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista Saúde Pública**, 1995, 29, 428-433.

AMBROSE, D. Handbook of Chemistry and Physics, 72 ed., CRC Press, Boca Ranton, 1991.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. International Thermodinamic Table of the Fluid State: Carbon Dioxide. 1º.ed. London: Pergamon Press, 1976, v.3, p.385.

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 1999, 68, 307-314.

ASAE Standards. Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. ASAE, S319.3, 547, 1997.

BAIKER, A. Supercritical Fluids in Heterogeneous Catalysis. **Chemical Reviews**, 1999, 99(2), 453-473.

BAYSAL, T.; ERSUS, S.; STARMANS, D. A. J. Supercritical CO_2 extraction of β-carotene and lycopene from tomato paste waste. **J. Agric. Food Chem.**, 2000, 48, 5507-5511.

BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **FASEB Journal**, 3: 1927-1932, 1989.

BEZERRA, J. E. F.; SILVA JR., J. F.; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**, Jaboticabal: Funep, 2000. p.30 (Série Frutas Nativas 1).

BOTT, T. R. Fundamentals of carbon dioxide in solvent extraction. **Chemistry and Industry**, 1982, 12, 394-396.

BRAGA, M. E. M.; EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: glogal yields, kinetic data, and extract chemical composition. **Jounal of Supercritical Fluids**. 2005, 34, 149-156.

BRITTON, G. UV/Visible Spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.), **Carotenoids**. Vol. 1B: Spectroscopy, 1995, pp. 13-62

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introdution to Fundamentas of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. New York: Springer, 1994, 387p.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, 2005, 67, 21-33.

CABRAL, F. A. **Uso de equações de estado cúbicas para estimativas de solubilidade de óleos essenciais e de seus componentes em dióxido de carbono**. 1993. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; von HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in Spirulina Pacifica algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, 2001, 912, 61-71.

CARVALHO Jr. **Obtenção do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. 2004. 151p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CARVALHO Jr., R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract´s global yield, composition, and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, 2005, 35, 197-204.

CAVALCANTI, M. L. **Composição de carotenóides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia glabra* L.)**. 1991. 86p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

CONSOLINI, A. E.; BANDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for empirical use of *Eugenia uniflora L*. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, 1999, 66, 33-39.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002, 81, 57-63.

De ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvest. **Food Resarch International**, 2005, 38, 1073-1077.

DELLA PORTA, G.; TADDEO,R.; D'URSO, E.; REVERCHON, E. Isolation of Clove Bud and Star Anise Essential Oil by Supercrítical CO_2 Extraction. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, 1998, 31, 454-460

EDGE, R.; McGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants – a review. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 1997, 41, 189-200.

FRANÇA, L.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**, 1999, 14, 247-256.

GBOLADE, A. A.; ILESANMI, O. R.; ALADESANMI, A. J. The contractile effects of the extracts of *Eugenia uniflora* on isolated rat duodenum. **Phytoterapy Research**, 1996, 10, 613-615.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**, 2ª ed. São Paulo: Nobel, 1975. 446p.

GÓMEZ-PRIETO, M. S.; CAJA, M. M.; HERRAIZ, M. ; SANTA-MARÍA, G. Supercritical fluid extraction of *all-trans*-lycopene from tomato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003, 51, 3-7.

GUIMARÃES, F. A.; HOLANDA, L. F. F.; MAIA, G. A.; MOURA FÉ, J.A. Estudos analíticos e físicos em polpa e semente de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 1982, 2(2), 208-215.

HUANG, F. H.; LI, M. H.; LEE, L. L.; STARLING, K. E.; CHUNG, F. T. H. An accurate equation of state for carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 1985, 18(6), 490-496.

JACOBS, M. **The chemical analysis of foods and foods products**. 3.ed. Robert Krieger Publishing Co. Inc., 1973, p.21-28.

KANAZAWA, A.; PATIN, A.; GREENE, A. E. Efficient, highly enantioselective syntesis of Selina-1,3,7,(11)-trien-8-one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, 2000, 63, 1292-1294.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure & Appl. Chem.**, 66: 1003-1010, 1994.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F.; CALADO, G. **A pitangueira em Pernambuco**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, 1992, p.20

LEE, M-I.; NISHIMOTO, S.; YANG, L-L.; YEN, K-Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, Y. Two macrocyclic hydrolysabletannin dimers from Eugenia uniflora. **Phytochemistry**, 1997, 44, 1343-1349.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S.; NASCIMENTO, P. P. Estudo comparativo das características físico-químicas de duas seleções de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Anais**. Fortaleza, 2000. p.5-22.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ de la OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Supercrítical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll *a* from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, 2005, 66, 245-251.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, M. H. L.; DA SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B. A. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, 1999, 11, 727-729.

MARGARET BARTH, M.; ZHOU, C.; KUTE, K. M.; ROSENTHAL, G. A. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1995, 43, 2876-2878.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO_2 supercrítico: Desenvolvimento de uma tecnologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. 2005. 172p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MONOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y. Alfa-glucosidade inhibitors from paraguaian natural medicine, Ñangapity, the leaves of Eugenia uniflora. **Pharmaceutical Biology**, 2000, 38(4), 302-307.

MCHUGH, M. A., & KRUKONIS, V. J. **Supercritical fluid extraction: Principles and practice**. 2ª Ed., Butterworth-Heinemann, 1994, pp.512.

MEIRELES, M. A. A., Supercritical extraction from solid process desing data. **Current Opinion in Solid State and Material Science**. 2003, 7, 321-330.

MENDES, R. L.; FERNANDES, H. L.; COELHO, J. P.; REIS, E. C.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO_2 extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, 1995, 53, 99-103.

MOMOSE, Y. Pentahydoryndolizidine and α-glucosidaseinhibitors containing products of Eugenia uniflora. **Japan Kokai Tokkyo Koho**, 2000, 72, 770**.**

MORAIS, S. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W.; MATOS, J. A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Reserch**, 1996, 8, 449-451.

MOURA, L. S. **Obtenção por extração supercrítica do extrato de funcho (*Foeniculum vulgare*): determinação das isotermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos, e do equilíbrio de fases**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oil composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, 2005, 15, 147-152.

OLIVEIRA, A. M. Avaliação química dos alcalóides da espécie Eugenia uniflora. In: Encontro Regional de Química, Ribeirão Preto, Livro de resumos. Ribeirão Preto:Sociedade Brasileira de Química, 1999. p.65.

OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, 2006, 99, 1-5.

PERVA-UZUNALIC, A.; SKERGET, M.; WEINREICH, B.; KNEZ, Z. Extraction of chilli pepper (var. *Byedige*) with supercritical CO_2: Effect of pressure and temperature on capsaicinoid and colour extraction efficiency. **Food Chemistry**, 2004, 87, 51-58.

QUISPE-CONDORI, S.; SÁNCHEZ, D.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 2005, 36, 40-48.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. The properties of gases and liquids. 4ª Ed. McGraw-Hill, New York, 1986.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential ois and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, 1997, 10, 1-37.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Some physicochemical properties of carotenoids, 14-22, 1999.

ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technolgy in Brazil: system investigated (1994-2003). **Journal of Supercrítical Fluids**, 2005, 34, 109-117.

ROZZI, N. L.; SINGH, R. K.; VIERLING, R. A.; WATKINS, B. A. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, 50, 2638-2643.

RÜCKER, G.; ASSIS BRASIL E SILVA, G.; BAUER, L.; SCHIKARSKI, M. Neue inhaltsstoffe aus Stenocalyx Michelii. **Planta Medica**, 1997, 31, 305-340.

SAJFROTOVÁ, M.; SOVOVÁ, H.; OPLETAL, L.; BÁRTLOVÁ, M. Near-critical extraction of β-sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. **Journal of Supercritical Fluids**, 2005, 35, 111-118.

SANDLER, S. I. **Chemical and Engineering Thermodynamics**, 2ª Ed., Wiley Series, 1989, pp.622.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 1994, 44, 137-142.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from Calycorectes,Campomanesia, Eugenia and Hexachlamys species. **Fitoterapia**, 1995, 16, 373-374.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO. E.; ROJAS DE ARIAS, A. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 1987, 21, 183-186.

SEO, J. S.; BURRI, B. J.; QUAN, Z.; NEIDLINGER, T. R. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. **Journal of Chromatography A**, 2005, 1073, 371-375.

SILVA, G. F. **Extração de pigmentos de urucum com CO_2 supercrítico**. 1999. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Paraguayan myrtaceae.* **Journal of Ethnopharmacology**, 1988, 24, 179-183.

TINKLER, J. H.; BÕHM, F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. Dietary carotenoids protect human cells from damage. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 1994, 26, 283-285.

VILLACHICA, H. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazônia**. Tratado de Cooperacion Amazônica. p.228-213, 1996.

WYERSTAHL, P.; MARCHALL-WEYERSTAHL, H.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTIEN, B. O.; ADEOYE, A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora L*. leaf oil. **Planta Medica**, 1988, 6, 546-549.

ZANATTA, C. F. **Determinação da composição de carotenóides e antocianinas de camu-camu (*Myrciaria dubla*)**. 2004. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, 2007, 101, 1526-1532.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – TABELA BASE PARA CONSULTA DE ABERTURA NOMINAL DAS PENEIRAS

ANEXO 2 – DETERMINAÇÃO DA UMIDADE (MÉTODO DE JACOBS, 1973)

ANEXO3 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE PRESSÃO E TEMPERATURA E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS GLOBAIS

ANEXO 4 – CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (μg/g) DE PITANGA LIOFILIZADA EXTRAÍDA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A 40°C E TOTAL DE CAROTENÓIDES (μg DE CAROTENÓIDES POR GRAMA DE PITANGA LIOFILIZADA).

ANEXO 5 – CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (μg/g) DE PITANGA LIOFILIZADA EXTRAÍDA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A 60°C C E TOTAL DE CAROTENÓIDES (μg DE CAROTENÓIDES POR GRAMA DE PITANGA LIOFILIZADA).

ANEXO 1 – TABELA BASE PARA CONSULTA DE ABERTURA NOMINAL DAS PENEIRAS

ASTM	TYLER	Abertura	Tolerância Abert.		Diâmetro	Tolerânc. diâm. Fio	
		mm/micron	Mín.	Máx	do fio	Mín.	Máx
4"	-	100	97.06	102.94	6.3	5.4	7.2
3.1/2"	-	90	87.34	92.66	6.3	5.4	7.2
3"	-	75	72.78	77.22	6.3	5.4	7.2
2.1/2"	-	63	61.13	64.87	5.6	4.8	6.4
2"	-	50	48.51	51.49	5	4.3	5.8
1.3/4"	-	45	43.65	46.35	4.5	3.9	5.2
1.1/2"	-	37.5	36.37	38.63	4.5	3.8	5.2
1.1/4"	-	31.5	30.55	32.45	4	3.4	4.6
1"	-	25	24.24	25.76	3.55	3	4.1
3/4"	-	19	18.42	19.58	3.15	2.7	3.6
5/8"	-	16	15.51	16.49	3.15	2.7	3.6
1/2"	-	12.5	12.11	12.89	2.5	2.1	2.9
3/8"	-	9.5	9.2	9.8	2.24	1.9	2.6
5/16"	-	8	7.75	8.25	2	1.7	2.3
1/4"	-	6.3	6.1	6.5	1.8	1.5	2.1
3.5	3.5	5.6	5.42	5.78	1.6	1.3	1.9
4	4	4.75	4.6	4.9	1.6	1.3	1.9
5	5	4	3.87	4.13	1.4	1.2	1.7
6	6	3.35	3.24	3.46	1.25	1.06	1.5
7	7	2.8	2.71	2.89	1.12	0.95	1.3
8	8	2.36	2.28	2.44	1	0.85	1.15
10	9	2	1.93	2.07	0.9	0.77	1.04
12	10	1.7	1.64	1.76	0.8	0.68	0.92
14	12	1.4	1.35	1.45	0.71	0.6	0.92
16	14	1.18	1.14	1.22	0.63	0.54	0.72
18	16	1	0.97	1.03	0.56	0.48	0.64
20	20	850	821	879	500	430	580
25	24	710	685	735	450	380	520
30	28	600	579	621	400	340	460
35	32	500	482	518	315	270	360
40	35	425	409	441	280	240	320
45	42	355	342	368	224	190	260
50	48	300	288	312	200	170	230
60	60	250	240.1	259.9	160	130	190
70	65	212	203.3	220.7	140	120	170
80	80	180	172.4	187.6	125	105	150
100	100	150	143.4	156.6	100	85	115
120	115	125	119.2	130.8	90	77	104
140	150	106	100.8	111.2	71	60	82
170	170	90	85.4	94.6	63	54	72
200	200	75	70.9	79.1	50	43	53
230	250	63	59.3	66.7	45	38	52
270	270	53	49.6	56.4	36	31	41
325	325	45	41.9	48.1	32	27	37

ANEXO 1 – CONTINUAÇÃO

ASTM	TYLER	Abertura	Tolerância Abert.		Diâmetro	Tolerânc. diâm. Fio	
		mm/micron	Mín.	Máx	do fio	Mín.	Máx
400	400	38	35.1	40.9	30	24	35
500	500	25	21	28	25	21	29
635	635	20	17	23	20	17	23

ANEXO 2 – DETERMINAÇÃO DA UMIDADE (MÉTODO DE JACOBS, 1973)

O método de Jacobs é aplicado quando se deseja distinguir a água do material volátil (destilação de solvente imiscível), o que seria extremamente indicado para a matéria-prima em questão. O equipamento utilizado para essa determinação consta de um condensador, um tubo coletor graduado que recebe a água evaporada da amostra, uma manta de aquecimento e um balão de 250 ml. Para o experimento, seriam utilizados 10 g de amostra em 100 ml de xilol. A análise seria realizada em triplicata com 5 horas de refluxo. O percentual de umidade seria calculado pela equação a seguir.

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \times \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \qquad (A1)$$

Onde V_{H_2O} é o volume de água extraída da amostra, ρ_{H_2O} é a densidade da água e $m_{amostra}$ é a massa da amostra.

ANEXO 3 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE PRESSÃO E TEMPERATURA E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS GLOBAIS

Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	ρ (kg/m^3)	Amostra (g)	Rendimento (%)		
					Global	Extrato	Lavagem
EXP-GL01[1]	400	40	956.65	5.65	0.65	0.21	0.44
EXP-GL02	350	60	863.62	5.56	0.98	0.60	0.38
EXP-GL03	250	40	880.84	5.64	0.84	0.54	0.29
EXP-GL04	300	60	830.60	5.64	1.04	0.60	0.44
EXP-GL05	350	40	935.59	5.56	0.94	0.49	0.45
EXP-GL06	250	60	787.75	5.64	0.78	0.53	0.25
EXP-GL07	400	60	890.67	5.65	1.01	0.57	0.44
EXP-GL08[2]	300	40	910.92	5.64	0.77	0.50	0.27
EXP-GL09	250	60	787.75	5.65	0.92	0.47	0.45
EXP-GL10	150	40	782.75	5.66	0.63	0.50	0.13
EXP-GL11	150	60	607.36	5.64	0.64	0.49	0.15
EXP-GL12	400	40	956.65	5.61	0.79	0.38	0.40
EXP-GL13	200	60	725.48	5.60	0.58	0.31	0.26
EXP-GL14	350	40	935.59	5.60	1.13	0.38	0.74
EXP-GL15	150	60	607.36	5.57	0.66	0.58	0.07
EXP-GL16	350	60	863.62	5.59	1.09	0.50	0.59
EXP-GL17	200	40	841.61	5.62	1.07	0.49	0.58
EXP-GL18	300	40	910.92	5.64	0.73	0.47	0.26
EXP-GL19	150	40	782.75	5.64	0.68	0.53	0.15
EXP-GL20	300	60	830.60	5.65	0.89	0.50	0.39
EXP-GL21	200	40	841.61	5.63	0.81	0.42	0.38
EXP-GL22	400	60	890.67	5.63	0.96	0.57	0.39
EXP-GL23	200	60	725.48	5.63	1.06	0.59	0.47
EXP-GL24	250	40	880.84	5.62	0.58	0.43	0.15
EXP-GL25	400	40	956.65	5.63	0.78	0.49	0.29
EXP-GL26	100	60	291.62	5.63	0.21	0.17	0.04
EXP-GL27	100	40	632.45	5.63	0.42	0.30	0.12
EXP-GL28	100	60	291.62	5.64	0.47	0.15	0.31
EXP-GL29	100	40	632.45	5.64	0.52	0.44	0.08
EXP-GL30	250	40	880.84	5.65	0.65	0.35	0.30
EXP-GL31	200	40	841.61	5.64	0.78	0.43	0.35
EXP-GL32	350	40	935.59	5.62	0.73	0.35	0.39
EXP-GL33	200	60	725.48	5.64	0.74	0.43	0.31
EXP-GL34	100	60	291.62	5.64	0.17	0.10	0.07

ANEXO 4 – CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (μg/g) DE PITANGA LIOFILIZADA EXTRAÍDA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E TOTAL DE CAROTENÓIDES (μg DE CAROTENÓIDES POR GRAMA DE PITANGA LIOFILIZADA).

Pressão (bar)	rubixantina	*Cis*-rubixantina	β-criptoxantina	licopeno	*cis*-licopeno	γ-caroteno	α-caroteno	β-caroteno (9-*cis*+all-*trans*)	β-caroteno (13+15-*cis*)	Total
100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.7
150	0.9	0.4	1.0	1.7	0.8	0.1	0.1	0.2	0.1	5.1
200	3.1	1.7	1.1	2.8	2.6	0.1	0.1	0.3	0.1	11.8
250	3.3	2.3	1.3	3.8	2.9	0.1	0.2	0.3	0.1	14.4
300	11.3	4.9	0.5	8.7	3.6	0.2	0.2	0.6	0.2	30.1
350	10.7	4.8	0.5	4.1	3.6	0.3	0.2	0.6	0.2	25.0
400	10.8	4.4	0.4	3.1	2.9	0.3	0.2	0.6	0.2	23.0

ANEXO 5 – CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES (μg/g) DE PITANGA LIOFILIZADA EXTRAÍDA COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E TOTAL DE CAROTENÓIDES (μg DE CAROTENÓIDES POR GRAMA DE PITANGA LIOFILIZADA).

Pressão (bar)	rubixantina	*Cis*-rubixantina	β-criptoxantina	licopeno	*cis*-licopeno	γ-caroteno	α-caroteno	β-caroteno (9-*cis*+all-*trans*)	β-caroteno (13+15-*cis*)	Total
100	1.4	0.4	0.3	0.8	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	4
150	7.6	3.7	0.2	6.9	3.7	0.2	0.2	0.6	0.2	23
200	9.2	4.4	-	12.8	6.8	0.2	0.2	0.6	0.2	34
250	10.3	4.8	-	23.5	8.1	0.2	0.2	0.7	0.2	47
300	10.6	5.1	-	13.7	7.7	0.2	0.2	0.8	0.2	39
350	11.9	5.4	2.0	8.3	7.1	0.2	0.2	0.8	0.2	36
400	12.1	5.7	2.6	7.4	4.1	0.2	0.3	0.8	0.2	33