



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Extração Supercrítica de Matrizes Vegetais Oleaginosas:
rendimento global, cinética de extração, composição química
e atividade antioxidante**

Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque

Engenheira de Alimentos, 2006 (UFPB)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Angela de Almeida Meireles

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Al15e Albuquerque, Carolina Lima Cavalcanti de
Extração supercrítica de matrizes vegetais oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante / Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Extração supercrítica. 2. *Caryocar brasiliense* Camb. 3. *Coffea arábica*. 4. Composição química. 5. Atividade antioxidante. I. Meireles, Maria Angela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Supercritical extraction from oilseed plants: global yield, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity

Palavras-chave em inglês (Keywords): Supercritical extraction, *Caryocar brasiliense* Camb., *Coffea arábica*, chemical composition, Antioxidant activity

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles

Fernando Antonio Cabral

Raquel Simões Angelo

Data de defesa: 02/09/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
DEA-FEA/UNICAMP
Orientador

Dr. Fernando Antônio Cabral
DEA-FEA/UNICAMP
Membro

Dr.^a Raquel Simões Angelo
Croda do Brasil Ltda.
Membro

Aos meus pais, Paulo e Ilma,
Pelo amor incondicional, por tudo.

Aos meus irmãos, André, Diana e Bruno,
Pela torcida, companheirismo e união.

Ao meu irmão Rodrigo (*in memoriam*)
Agradeço a Deus pela oportunidade de ter convivido com você durante todo o
tempo que nos foi permitido. Muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria Ângela Meireles,
Pela credibilidade depositada em mim.
Pela orientação neste trabalho.

A CAPES,
Pelo financiamento de meu aperfeiçoamento.

À Croda do Brasil Ltda. na pessoa de Raquel Simões Angelo,
Pela cessão das matérias-primas utilizadas neste trabalho. Pelas
conversas enriquecedoras durante as reuniões.

Aos membros da banca,
Pela contribuição na finalização deste trabalho.

À Prof.^a Délia Rodriguez Amaya e à Cintia Nanci Kobori,
Pela gentileza em possibilitar a validação da pureza do padrão utilizado
na determinação de atividade antioxidante realizando análises em HPLC.

Ao Prof. Ademir José Petenate,
Por possibilitar a participação como ouvinte da disciplina ME-
623:Planejamento de Experimentos – Programa Black Belt:
Melhoria de Processos.

Ao técnico Ari e à Taisa,
Pela presteza, paciência e amizade.

Aos colegas que compõem o Grupo LASEFI,
Pelos treinamentos, discussões enriquecedoras e apoio.

Às pessoas especiais:

Meus queridos tios, Iêda e Alex,
Pelo carinho e apoio fundamentais aqui em Campinas.
Muito obrigada.

Ao meu querido Marcos Djun Barbosa Watanabe,
Pelo carinho, paciência e amizade de sempre.
Foram imprescindíveis.

À minha “mana” querida Carina Lima da S. Soares,
“amigo é o irmão que o coração escolhe”.

Ao amigo Rodrigo Nunes Cavalcanti,
Muito obrigada pela “mão” amiga.

Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior. Estas atitudes se refletirão em mudanças positivas no seu ambiente familiar. Deste ponto em diante, as mudanças se expandirão em proporções cada vez maiores. Tudo o que fazemos produz efeito, causa algum impacto.

Dalai Lama

TESE DE MESTRADO

AUTOR: Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque

TÍTULO: Extração Supercrítica de Matrizes Vegetais Oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante.

ORIENTADORA: Dr.^a Maria Angela de Almeida Meireles

RESUMO

Extratos brutos e princípios ativos extraídos de plantas nativas brasileiras possuem características altamente atrativas por serem capazes de prover, além da nutrição básica, benefícios à saúde ou medicinais como a prevenção e/ou tratamento de doenças. A extração com fluido supercrítico (SFE) caracteriza-se pela obtenção de extratos de elevada qualidade, sem os inconvenientes da presença de resíduos de solventes e da alteração das propriedades do extrato, associados aos processos de extração convencionais. Apesar dessa tecnologia já estar sendo estudada há muitos anos no Brasil, e da vasta disponibilidade de matéria-prima de alta qualidade e baixo custo no País, ainda não existe na América Latina nenhuma planta industrial. O objetivo deste trabalho foi identificar os parâmetros de processo da extração SFE, utilizando CO₂ como solvente, para a maximização do rendimento de extratos de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e determinação dos rendimentos de extratos de sementes de café verde (*Coffea arabica*) em diferentes tamanhos de partículas. Compararam-se os extratos obtidos via SFE com os extratos comerciais existentes no mercado. Para a avaliação do processo, verificou-se o perfil fitoquímico dos extratos e suas atividades antioxidantes. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi feita por CCD, espectrofotômetro-UV, CG-FID e HPLC-UV. A atividade antioxidante foi determinada através da reação acoplada de ácido linolênico e β -caroteno. Extratos de café verde foram obtidos a 323 K e 30 MPa obtendo-se rendimentos globais em base seca iguais a $0,9 \pm 0,2\%$, $4 \pm 2\%$ e $8 \pm 1\%$, para sementes quebradas, partículas de *mesh* 16 e sementes moídas, respectivamente. Extratos de polpa de pequi foram obtidos no intervalo de pressão de 20 a 40 MPa nas temperaturas de 323 e 333 K. O maior rendimento obtido em base seca foi igual a $64,3 \pm 0,3\%$ a 333 K e 40 MPa. A quantidade de carotenóides totais (78 ± 26 mg Carotenóides totais/100g extrato) e de fenóis totais ($1,6$ g GAE/100g extrato) de extratos de pequi obtidas via SFE foram maiores que a do extrato comercial (31 ± 1 mg Carotenóides totais/100g extrato e $1,1 \pm 0,3$ g GAE/100g extrato, respectivamente). Os ácidos graxos majoritários em todos os extratos SFE foram o ácido

palmítico e o ácido oléico. Entre os tocóis identificados, α -tocoferol e α -tocotrienol estavam presentes em todos os extratos analisados. Os extratos de pequi, SFE e comercial, tiveram atividade antioxidante inferior ao β -caroteno conforme determinado pelo método da reação acoplada com ácido linolênico.

Palavras-chave: Extração supercrítica. *Caryocar brasiliense* Camb. *Coffea arábica*. Composição química. Atividade antioxidante.

MASTER THESIS

AUTHOR: Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque

TITLE: Supercritical extraction from oilseeds plants: global yield, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity.

MAJOR PROFESSOR: Dr.^a Maria Angela de Almeida Meireles

ABSTRACT

Crude extracts and active compounds extracted from Brazilian native plants have characteristics highly attractive since they are able to provide, in addition of the basic nutrition, benefits for health or medical as the prevention and/or treatment of diseases. Supercritical fluid extraction (SFE) is characterized by obtaining extracts of high quality, without the disadvantages of the presence of solvents residue and changing the extract's properties, associated to conventional extraction processes. Although this technology is already being studied for many years in Brazil, and the wide availability of raw material of high quality and low cost in the country, yet there is no Latin American industrial unit. The objective of this study was to identify the parameters of the SFE process, using CO₂ as solvent, for maximum yield of pequi pulp extracts (*Caryocar brasiliense* Camb.) and determination of yield in extract from green coffee bean (*Coffea arabica*) using particles of different sizes. SFE extracts were compared with commercial extract. For the process evaluation, it was verified the extracts phytochemical profile and their antioxidant properties. The identification of the compounds present in the extracts was made using TLC, Spectrophotometer-UV, GC-FID and HPLC-UV. The antioxidant activity was determined using the coupled reaction of β -carotene and linolenic acid. Green coffee beans extracts were obtained at 323 K and 30 MPa. The global yields on dry basis were $0.9 \pm 0.2\%$, $4 \pm 2\%$ and $8 \pm 1\%$ for broken seeds, particles of mesh 16 and ground seeds, respectively. Pequi pulp extracts were obtained for pressures of 20 to 40 MPa at temperatures of 323 and 333 K. The largest global yield on dry basis was $64.3 \pm 0.3\%$ at 333 K and 40MPa. The total carotenoids (78 ± 26 mg total carotenoids /100g extract) and total phenols (1.6 g GAE/100g extract) from pequi extracts obtained by SFE were higher than that of the commercial extract (31 ± 1 mg total carotenoids /100g extract and 1.1 ± 0.3 g GAE/100g extract, respectively). The main components detected in the SFE extracts were oleic acid and palmitic acid. Among the identified tocois, α -tocopherol and α -tocotrienol were present in all extracts analyzed. The pequi extracts,

SFE and commercial, exhibited antioxidant activity smaller than that of the control (β -carotene) as measure by the coupled reaction with linolenic acid.

Keywords: Supercritical extraction. *Caryocar brasiliense* Camb. *Coffea arábica*. Chemical composition, Antioxidant Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Diagrama de fases para uma substância pura.....	5
Figura 3.2 – Esquema de uma diagrama de equilíbrio líquido-vapor para uma substância pura. 6	
Figura 3.3 - Isotermas de rendimento global de extratos de <i>A. annua</i> obtidas com CO ₂ supercrítico (QUISPE-CONDORI, 2005).....	11
Figura 3.4 – Comportamento típico de processo de extração com fluido supercrítico.....	12
Figura 3.5 – Curva global apresentando as três regiões distintas da extração.....	13
Figura 4.1 - Spe-ed SFE: 1: Banho de resfriamento; 2: Bomba pneumática; 3: Unidade controladora de temperatura; 4: Totalímetro; 5: Rotâmetro; 6: Cilindro de CO ₂	23
Figura 4.2 – 1: Célula de extração identificada como 5mL; 2: Célula de extração identificada como 300mL.	24
Figura 4.3 - Fluxograma da unidade experimental Spe-ed SFE (adaptado de VASCOCELLOS, 2007).	25
Figura 4.4 - Leito empacotado da célula de 5 mL.	27
Figura 5.1 - Distribuição de tamanho de partículas de sementes de café verde: CVM: café verde moído; CV16: café verde <i>mesh</i> 16; CVQ: café verde quebrado.	38
Figura 5.2 - Distribuição do tamanho das partículas da amostra PQ.....	43
Figura 5.3 – Amostra PQ após extração exaustiva em aparelho sohxlet com éter de petróleo como solvente por 12 horas.	43
Figura 5.4 - Cinética piloto 1102: t= 3,5 h; T= 323 K; P= 30 MPa; Q _{CO2} = 12,10×10 ⁻⁵ kg/s.	45
Figura 5.5 – Amostra de PQ após cinética piloto 1102.....	46
Figura 5.6 - Amostra de PQ após cinética piloto 1302.	46
Figura 5.7 - Ajuste linear de 3 retas à curva global de extração obtida pela cinética piloto 1302: t= 8 h; T= 323 K; P= 30 MPa; Q _{CO2} = 12,70×10 ⁻⁵ kg/s.	47
Figura 5.8 – Isotermas de Rendimento Global de PQ: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.	48
Figura 5.9 - Amostra de PQ antes e após a realização da cinética de extração.....	49
Figura 5.10 - Ajuste linear de 3 retas à curva global de extração obtida pela cinética: t= 8h 20 min.; T= 323 K; P= 35 MPa; Q _{CO2} = 11,57×10 ⁻⁵ kg/s.	50
Figura 5.11 – Compostos fenólicos em UV-254 nm sem tratamento químico: A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4: 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.....	53
Figura 5.12 – Compostos fenólicos no visível com tratamento químico (AS): A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4- 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.....	53
Figura 5.13 - Compostos fenólicos em UV-366 nm com tratamento químico (AS): A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4- 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.....	54
Figura 5.14 - Flavonóides em UV-366nm com tratamento químico (NP): A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4- 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.....	54
Figura 5.15 – A) Compostos fenólicos no visível com tratamento químico (AS); B) Flavonóides em UV-366nm com tratamento químico (NP): 1: 323K/20MPa; 2: 323K/25MPa; 3: 323K/30MPa; 4:323,15K/35MPa; 5: 323K/40MPa. 6: 333K/20MPa; 7: 333K/25MPa; 8: 333K/30MPa; 9:333K/35MPa; 10: 333K/40MPa.....	55

Figura 5.16 – teores de carotenóides totais [mg/100g extrato] em função da pressão para extratos de PQ: t= 60 min.; S/F= 60; Q_{CO_2} = $8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.	56
Figura 5.17 - Teores de fenóis totais [mg/100g extrato] em função da pressão para extratos de PQ: t= 60 min.; S/F= 60; Q_{CO_2} = $8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.....	58
Figura 5.18 - Efeito da degradação do β -caroteno na presença de extratos de pequi: comercial (0000236125) e extratos obtidos por SFE em T= 323 K.	63
Figura 5.19 – Efeito da degradação do β -caroteno na presença de extratos de PQ: comercial (0000236125) e extratos obtidos por SFE em T= 333 K.	64
Figura 9.1 – Curva padrão de β -caroteno	81
Figura 9.2 - Curva padrão de ácido gálico.	83
Figura 9.3 - 2º experimento: Absorbâncias das soluções de reação para cada solução de substrato testada em função do tempo.	91
Figura 9.4 – 2º experimento: Absorbâncias da solução de reação com extrato e sem extrato (substrato 4).....	91
Figura 9.5 – 3º experimento: Aspectos de soluções de substrato preparados com β -caroteno 22040, concentrados por 20 min. em 323 K (1) e em 308 K (2).	92
Figura 9.6 – 4º experimento: Soluções de reação sem a adição de substrato. (CN=DH ₂ O+EtOH; N=DH ₂ O+Extrato)	92
Figura 9.7 – 4º experimento: absorbâncias das soluções de reação, com e sem extrato, em função do tempo.	93
Figura 9.8 - Porcentagem em área da pureza do padrão β -caroteno C9750.....	97
Figura 9.9 - Porcentagem em área da pureza do padrão β -caroteno 22040.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Valores característicos de propriedades de transporte para compostos de acordo com o estado de agregação.....	7
Tabela 3.2 - Condições de temperatura e pressão críticas para diferentes solventes.....	8
Tabela 4.1 Parâmetros operacionais adotados para a determinação das isotermas de rendimento global (IRG).....	28
Tabela 5.1 – Composição centesimal de sementes de café verde [g/100g em base seca].	38
Tabela 5.2 – Parâmetros dos ensaios preliminares de extração com CO ₂ supercrítico de sementes de café verde (X ₀ 323 K / 30MPa).	39
Tabela 5.3 – Teor de água, de lipídio extraível, densidade aparente do leito, vazão de extração e rendimento global de amostras de café verde (CV) utilizando diferentes tamanhos de partículas (X ₀ 323 K/30MPa S/F=18.).	40
Tabela 5.4 - Dados de rendimento das etapas de preparo da matéria-prima PQ-155.....	41
Tabela 5.5 – Composição centesimal de PQ [g/100g].....	43
Tabela 5.6 - Parâmetros dos ensaios preliminares de extração com CO ₂ supercrítico de PQ-155 (X ₀ 323 K / 30 MPa).	44
Tabela 5.7 – Dados da etapa de taxa constante de extração obtidos através do ajuste não linear de três retas à curva obtida pela cinética 1302.	47
Tabela 5.8 - Dados da etapa de taxa constante de extração obtidos através do ajuste não linear de três retas aos pontos experimentais obtidos da cinética de extração da amostra PQ : t= 8h 20 min.; T= 323 K; P= 35 MPa; Q _{CO2} = 11,57×10 ⁻⁵ kg/s.	50
Tabela 5.9 – Identificação e concentrações dos extratos supercríticos (323 K / 30 MPa) e comerciais de café verde utilizados para análise em cromatografia em camada delgada (CCD).	52
Tabela 5.10 – Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de PQ-155, CVQ e CVM: [mg GAE / 100g de extrato].....	57
Tabela 5.11 - Tocóis totais detectados nos extratos supercríticos de PQ obtidos em 323 K: [mg/100g de extrato].	59
Tabela 5.12 - Tocóis totais detectados nos extratos supercríticos de PQ obtidos em 333 K: [mg/100g de extrato]	59
Tabela 5.13 - Proporção relativa dos ácidos graxos dos extratos de PQ obtidos em 323 K em função da pressão [MPa].	61
Tabela 5.14 - Proporção relativa dos ácidos graxos dos extratos de PQ obtidos em 323,15 K em função da pressão [MPa].	62
Tabela 9.1 – Rendimento global de PQ obtido por SFE em temperatura de 323 K: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.	79
Tabela 9.2 - Rendimento global de PQ obtido por SFE em temperatura de 333 K: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.	80
Tabela 9.3 - Rendimentos globais (média ± desvio padrão) obtidos das SFE de PQ: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.	80
Tabela 9.4 – Teor de carotenóides totais de extratos de PQ [mg/100g extrato] obtidos por SFE em temperatura de 323 K: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.....	81
Tabela 9.5 – Teor de carotenóides totais de extratos de PQ [mg/100g extrato] obtidos por SFE em temperatura de 333 K: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.....	82
Tabela 9.6 – Teor de carotenóides totais de extratos de PQ ¹ [mg/100g extrato]: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.....	82
Tabela 9.7 - Teor de fenóis totais de extratos de PQ obtidos para a temperatura de 323 K [mg GAE/100g extrato]: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.....	83
Tabela 9.8 – Teor de fenóis totais de extratos de PQ obtidos para a temperatura de 333 K [mg GAE/100g extrato]: t=60 min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.....	84

Tabela 9.9 - Teor de fenóis totais de extratos de PQ ¹ [g GAE /100g extrato]: t=60min.; S/F= 60; Q _{CO2} = 8,35×10 ⁻⁵ kg/s.....	84
Tabela 9.10 – Dados brutos da determinação de atividade antioxidante de extratos de PQ obtidos por SFE em 323 K: valores das absorbâncias para os intervalos de tempo t= 0, 1, 2 e 3 horas.....	85
Tabela 9.11 – Dados brutos da determinação de atividade antioxidante de extratos de PQ obtidos por SFE em 333 K: valores das absorbâncias para os intervalos de tempo t= 0, 1, 2 e 3 horas.....	86
Tabela 9.12 - Reagentes utilizados nas soluções de substratos testadas.....	89
Tabela 9.13 – Planejamento dos experimentos	89
Tabela 9.14 – 1º experimento: Aspectos das soluções de substrato durante as etapas de procedimento de preparação.	90
Tabela 9.15 - 4º experimento: Aspectos das soluções de substrato durante as etapas de procedimento de preparação.	93
Tabela 9.16 – 4º experimento: absorbâncias e atividade antioxidante das soluções de reação, com e sem extrato.	94
Tabela 9.17 – Pureza dos padrões de β-caroteno [%em área]	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. SF = *Supercritical Fluid*
2. SFE = Supercritical Fluido
3. GYI = *Global Yield Isotherms*
4. OEC = *Overall Extraction Curves*
5. LPSE = *Low Pressure Solvent Extraction*
6. HD – *Hydrodistillation*
7. GRAS = Generally recognized as safe
8. CER = *Constant Extraction Rate*
9. FER = *Falling Extraction Rate*
10. DC = *Diffusion Controlled*
11. CGA = clorogenic acids
12. CV = Café verde
13. CVI = Café verde inteiro
14. CVM = Café verde moído
15. CVQ = Café verde quebrado
16. CV16 = Café verde *mesh* 16
17. PQ-155 = Amostra comercial de pequi
18. PQ = Pequi
19. C-CO₂ = Cilindro de dióxido de carbono
20. BT = Banho ultratermostático
21. BB = Bomba
22. CE = Célula de extração
23. F = Forno da unidade Spee-d SFE
24. V1, V2, V3 e V4 = Válvulas de retenção
25. V5 = Válvula micrométrica de expansão
26. FC = Frasco coletor
27. RT = Rotâmetro
28. TT = Totalímetro
29. CP = Compressor
30. BG = banho de gelo
31. VBA = Visual basic para aplicação
32. CCD = Cromatografia em camada delgada
33. AS = Anisaldeído sulfúrico
34. NP = 2-aminoetil-difenilborinato
35. GAE = *Galic Acid Equivalent*

LISTA DE SÍMBOLOS

1. T = Temperatura
2. T_c = Temperatura crítica
3. P = Pressão
4. P_c = Pressão crítica
5. CO_2 = Dióxido de carbono
6. X_0 = Rendimento global
7. M_{extrato} = Massa de extrato
8. M_{amostra} = Massa da amostra
9. t_{CER} = Duração do período de taxa constante de extração
10. Y_{CER} = Razão mássica de soluto na saída do leito
11. M_{CER} = Taxa de transferência de massa
12. R_{CER} = Rendimento do período de taxa constante de extração
13. ρ_a = Densidade aparente
14. S = Massa de CO_2
15. F = Massa de alimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1	FLUIDO SUPERCRÍTICO (ScF)	5
3.2	EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO (CO ₂) SUPERCRÍTICO.....	8
3.2.1	RENDIMENTO GLOBAL (X_0)	10
3.2.2	CURVA GLOBAL DE EXTRAÇÃO (OEC = OVERALL EXTRACTION CURVES).....	11
3.3	MATRIZES VEGETAIS OLEAGINOSAS	14
3.3.1	ÓLEO DE CAFÉ VERDE (<i>Coffea arabica</i>)	15
3.3.2	ÓLEO DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense Camb.</i>).....	16
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS	21
4.1.1	CAFÉ VERDE (<i>Coffea arabica</i>).....	21
4.1.2	PEQUI (<i>Caryocar brasiliense Camb.</i>)	21
4.2	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	22
4.2.1	CAFÉ VERDE	22
4.2.2	PEQUI	22
4.3	EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO	23
4.3.1	UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	23
4.3.1.1	Procedimento operacional	24
4.3.2	PREPARO DO LEITO DE EXTRAÇÃO	27
4.3.3	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL (X_0)	28
4.3.4	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	29
4.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	30
4.4.1	ANÁLISE QUALITATIVA.....	31
4.4.2	CAROTENÓIDES TOTAIS	32
4.4.3	FENÓIS TOTAIS	33
4.4.4	TOCOFERÓIS TOTAIS	34
4.4.5	ÁCIDOS GRAXOS	34
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	CAFÉ VERDE (COFFEA ARABICA)	37
5.1.1	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	37

5.1.2	EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	39
5.1.2.1	Ensaios preliminares	39
5.1.2.2	Determinação do Rendimento Global (X ₀).....	39
5.2	PEQUI (CARYOCAR BRASILIENSE CAMB.)	40
5.2.1	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	40
5.2.2	EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	44
5.2.2.1	Ensaios preliminares	44
5.2.2.2	Cinética piloto	45
5.2.2.3	Isotermas de Rendimento Global (GYI)	48
5.2.2.4	Cinética de extração e cálculo dos parâmetros cinéticos	49
5.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	51
5.3.1	ANÁLISE QUALITATIVA.....	51
5.3.1.1	Café verde (<i>Coffea arabica</i>).....	51
5.3.1.2	Pequi (<i>Caryocar brasiliense Camb</i>).....	55
5.3.2	CAROTENÓIDES TOTAIS	55
5.3.3	FENÓIS TOTAIS	57
5.3.4	TOCOFERÓIS TOTAIS	59
5.3.5	ÁCIDOS GRAXOS	60
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	63
5.4.1	VALIDAÇÃO DO PADRÃO B-CAROTENO.....	64
6	CONCLUSÕES	67
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
8	REFERÊNCIAS.....	71
9	ANEXOS	79
9.1	DADOS DAS ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL	79
9.2	DADOS DE CAROTENÓIDES TOTAIS	81
9.3	DADOS DE FENÓIS TOTAIS.....	83
9.5	DADOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	85
9.6	PDSA – PROGRAMA BLACK BELT: MELHORIA DE PROCESSOS	87

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de uma das mais abundantes biodiversidades do mundo apresentando grande potencial como produtor de matrizes vegetais com atividade biológica. Entretanto, muito pouco tem sido realizado para transformar este potencial em uma realidade competitiva, principalmente considerando-se o desenvolvimento como forma de inserção social e de proteção e manutenção desses ecossistemas.

Para a obtenção de extratos de produtos naturais, diversos métodos de extração associados ao calor e/ou agitação podem ser utilizados, como a hidrodestilação (HD - *Hydrodistillation*) e os processos de extração a baixa pressão (LPSE - *Low Pressure Solvent Extraction*), como extração auxiliada com ultrassom e extração assistida por microondas, dentre outros, sendo o processo de extração com soxhlet a técnica utilizada como principal referência para avaliar o rendimento de outros métodos de extração sólido-líquido (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; VELASCO et al., 2007). Porém, possuem o inconveniente dos elevados tempos de residência e grandes quantidades de solvente requeridas (SEBASTIÁN et al., 1998), da degradação pela luz, calor e/ou presença indesejável de resíduos de solventes no produto final, demandando um número de operações unitárias associadas como a remoção do solvente do soluto elevando os custos de processo.

Na determinação do método mais adequado a ser empregado, deve-se levar em conta os fatores mais relevantes como a economia e a qualidade do produto final do processo selecionado. Dessa maneira, variáveis como custo, produtividade e rendimento aliados às restrições ambientais e de saúde pública, em relação a resíduos de solventes orgânicos, e às exigências dos consumidores por alimentos naturais, tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias limpas, evidenciando a importância da otimização do processo de extração de produtos naturais (MEIRELES, 2003; PEREIRA et al., 2006).

A extração com fluidos supercríticos (SFE - *Supercritical Fluids Extraction*) é um método de extração que há mais de 20 anos é utilizado para fins alimentícios. As principais aplicações comerciais da SFE na agroindústria correspondem ao fracionamento e extração de óleos, a extração de antioxidantes naturais, a extração de alcalóides, aromas e especiarias (VELASCO et al., 2007).

A tecnologia supercrítica tem se mostrado ser uma alternativa aos processos de extração convencionais por se apresentar técnica e economicamente viável para a

obtenção de extratos vegetais (PEREIRA et al., 2006; ROSA & MEIRELES, 2005b; PRADO et al., 2008), e se caracteriza por obter extratos sem o inconveniente da presença de resíduos de solventes e da alteração de suas propriedades (MATILHA, 2001).

No Brasil, há uma expressiva contribuição em pesquisas na área de extração supercrítica. Porém, apesar da especialidade técnica existente, uma vasta diversidade vegetal e uma tradição em produção agrícola, que pode garantir a disponibilidade de matéria-prima de qualidade e baixo custo, não há unidade industrial de extração supercrítica operando na América do sul (ROSA & MEIRELES, 2005a). Para aproveitar o seu potencial efetivamente, o país precisa desenvolver e/ou aperfeiçoar tecnologias que sejam economicamente viáveis e menos danosas ao meio ambiente, disponibilizando extratos naturais de elevada pureza para os mercados da indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

As matérias-primas selecionadas para o estudo neste trabalho foram o café (*Coffea arábica*) e o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). O óleo de café verde é rico em matéria insaponificável, onde os esteróis são os compostos ativos de propriedades cosméticas desejáveis (TURATI, 2007). Os frutos e folhas de pequi são muito utilizados pela população da região do centro do Brasil, tanto para fins de alimentação quanto para fins terapêuticos, como por exemplo no tratamento de resfriados, bronquites, tosse e como afrodisíaco (VIEIRA; MARTINS, 2000 apud PEREZ, 2004).

Diante disto, estudos voltados para aprofundar o conhecimento sobre as possibilidades de comercialização são necessários para proporcionar o desenvolvimento social, econômico e ambiental através da valorização de plantas nativas. Isso implicará em uma maior competitividade para os produtos naturais de plantas nativas, e conseqüente expansão comercial, uma vez que se observa uma tendência generalizada do mercado (indústria de alimentos, fármacos e cosméticos) em relação à busca por produtos que gerem vantagens econômica, social e ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo das melhores condições de processo de extração supercrítica de sementes de café verde (*Coffea arábica*) e de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) com dióxido de carbono como solvente através do rendimento global, análises químicas e de atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterização química e física das matérias-primas;
- ❖ Determinação das isotermas de rendimento global (GYI - *Global Yield Isotherms*) em função da pressão;
- ❖ Construção da curva global de extração (OEC - *Overall Extraction Curves*), cálculo dos parâmetros cinéticos do processo;
- ❖ Caracterização e comparação dos extratos obtidos por SFE com extrato comercial em relação ao teor de carotenóides totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FLUIDO SUPERCRÍTICO (ScF)

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico (ScF – *Supercritical Fluid*) quando sua temperatura e pressão são maiores que seus valores críticos, T_c e P_c , respectivamente (BRUNNER, 1994). A pressão crítica é definida como a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido a um gás pelo aumento da temperatura. Analogamente, a temperatura crítica é considerada a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido a um líquido pelo aumento de pressão. Desta forma, acima do ponto crítico, variações de pressão e de temperatura não modificam a fase do fluido (RIZVI et al., 1986). A Figura 3.1 apresenta o diagrama de fases de uma substância pura. A região crítica tem sua origem no ponto crítico, e acima desta temperatura (T_c) e pressão (P_c) críticas, a substância é considerada fluido supercrítico.

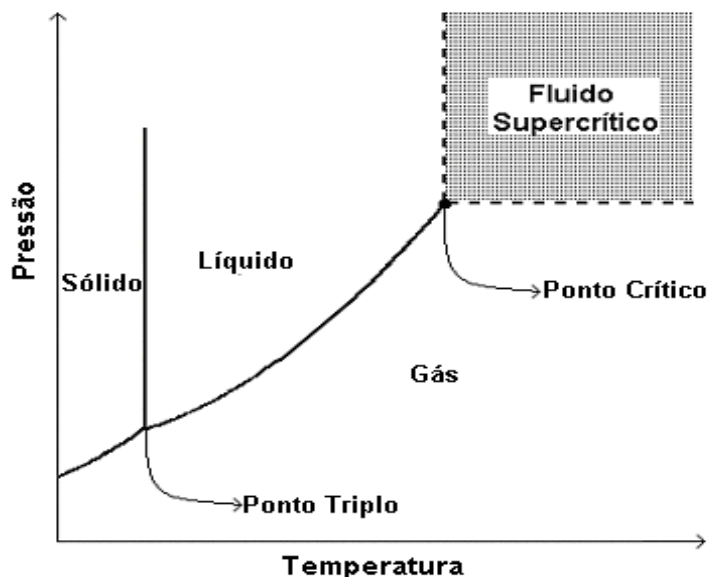


Figura 3.1 - Diagrama de fases para uma substância pura.

Substâncias que se apresentam no estado gasoso em condições normais apresentam densidades próximas às dos líquidos nas proximidades de seu ponto crítico, possuindo poder de solvatação dependente da pressão, onde pequenas variações na pressão acarretam grandes variações na capacidade de solubilização (McHUGH & KRUKONIS, 1994). Substâncias em condições de estado próximas a essa região podem apresentar propriedades semelhantes àsquelas dos fluidos supercríticos. Nesse caso,

considera-se o estado como subcrítico. Na Figura 3.2 pode-se observar o comportamento de uma substância na mudança de fase. Para temperaturas menores que a temperatura crítica (isoterma T1) ocorre variação do volume específico da substância na mudança de fase. Para temperaturas maiores que a temperatura crítica (isoterma T3) não se verifica variação brusca nas propriedades do fluido. Na temperatura crítica (T2) e em temperaturas superiores a ela, o fluido é classificado como supercrítico quando estiver submetido a uma pressão superior à pressão crítica.

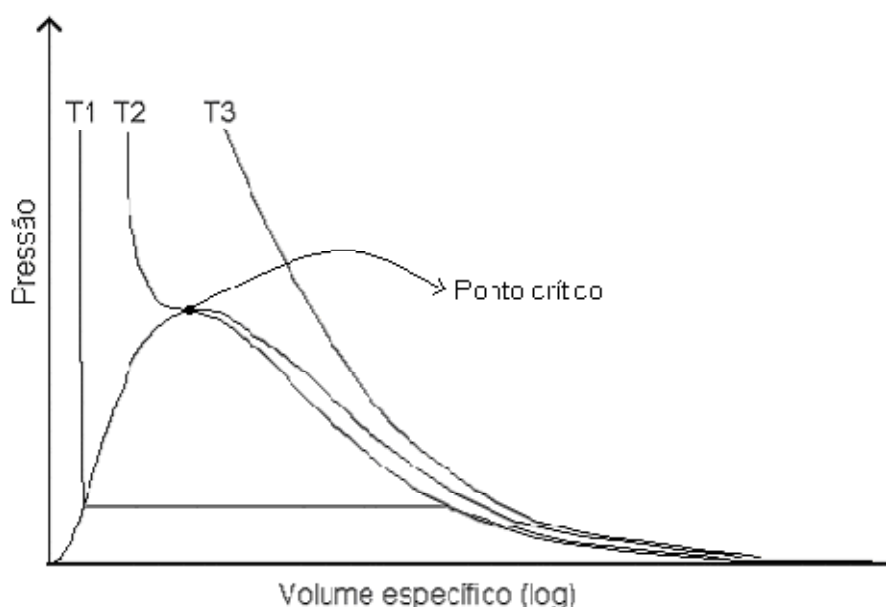


Figura 3.2 – Esquema de um diagrama de equilíbrio líquido-vapor para uma substância pura.

Fluidos em estado supercrítico apresentam propriedades de transporte, como difusividade e viscosidade, com valores intermediários entre as dos gases e dos fluidos (BRUNNER, 2005). Faixas de valores de densidade, difusividade e viscosidade de compostos em diferentes estados de agregação estão dispostos na Tabela 3.1 onde a pressão é representada pela letra P, a temperatura por T e o sub-índice *c* refere-se à condição crítica.

Estas propriedades tornam os fluidos supercríticos interessantes para processos de extração já que a alta densidade proporciona a eles um poder de solvatação semelhante ao apresentado pelos líquidos, enquanto a alta difusividade e a baixa viscosidade permitem alto poder de penetração em diferentes matrizes, propriedade esta

apresentada pelos gases (RIZVI et al., 1986), o que favorece a transferência de massa no processo de extração.

Tabela 3.1 - Valores característicos de propriedades de transporte para compostos de acordo com o estado de agregação.

Estado de agregação	Densidade (g/cm³)	Difusividade (cm²/s)	Viscosidade (g/cm.s)
<i>Gás</i>			
0,1013 MPa, 288-303 K	$(0,6-2,0) \times 10^{-3}$	0,1 - 0,4	$(0,6-2,0) \times 10^{-4}$
<i>Líquido</i>			
0,1013 MPa, 288-303 K	0,6-1,6	$(0,2-2,0) \times 10^{-5}$	$(0,2-3,0) \times 10^{-2}$
<i>Fluido Supercrítico</i>			
P _c , T _c	0,2-0,5	$0,7 \times 10^{-3}$	$(1-3) \times 10^{-4}$
P _c , T _c	0,4-0,9	$0,2 \times 10^{-3}$	$(3-9) \times 10^{-4}$

Fonte: (BRUNNER, 1994)

À medida que a temperatura aumenta, ocorre uma diminuição relativa da densidade, que é o inverso do volume específico, aumentando a difusividade do solvente e a pressão de vapor do soluto, diminuindo o seu poder de solvatação. Assim, a concentração do soluto no solvente será função destas duas variáveis: densidade e pressão de vapor do soluto. Em pressões muito elevadas, a maior influência na solubilidade é dada pela alteração da pressão de vapor do soluto com a temperatura, e não mais pela variação de densidade. Portanto, quanto maior a densidade, maior será o poder de extração de um fluido, entretanto, menor a sua seletividade (REVERCHON et al., 1995).

As propriedades críticas para alguns solventes foram comparadas na Tabela 3.2. Mesmo com a disponibilidade de fluidos com diferentes poder de solvatação, é extremamente dispendioso atingir o ponto crítico de determinadas substâncias, como a água, por exemplo, que ao contrário do CO₂, apresenta temperatura e pressão críticas bastante elevadas (SANDI, 2003). No caso do dióxido de carbono, o ponto crítico ocorre a 304,25 K e 7,38 MPa, valores que podem ser considerados relativamente baixos, uma vez que, por exemplo, o ponto crítico da água ocorre a 374,2 K e 22,05 MPa (MCHUGH & KRUKONIS, 1994).

Tabela 3.2 - Condições de temperatura e pressão críticas para diferentes solventes

Solvente	Temperatura crítica [K]	Pressão crítica [MPa]
Dióxido de carbono	304,25	7,38
Etano	305,35	4,88
Etileno	282,45	5,04
Propano	369,85	4,25
Propileno	365,05	4,62
Cicloexano	553,45	4,07
Isopropanol	508,35	4,76
Benzeno	562,15	4,89
Tolueno	591,75	4,11
p-xileno	616,25	3,52
Clorotrifluorometano	302,05	3,92
Triclorofluorometano	471,25	4,41
Amônia	405,65	1,13
Água	647,35	2,21

Fonte: McHUGH e KRUKONIS (1994)

3.2 EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) SUPERCRÍTICO

O processo de extração com fluido supercrítico é uma operação unitária por contato que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos: alto poder de solvatação, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (BRUNNER, 1994).

SFE de matrizes vegetais é realizada em batelada, onde o empacotamento da matéria-prima, de onde se obtém o extrato, é realizado em cilindro (extrator) de aço inoxidável a pressão atmosférica. O extrator é fechado, pressurizado e aquecido até a temperatura de operação. O processo consiste das etapas de extração e separação do extrato do solvente (BRUNNER, 1994; SOVOVÁ, 2005; ALKIO, 2008):

- A etapa de extração inicia quando o solvente no estado supercrítico (fluido) é bombeado através do extrator, fluindo continuamente através da matéria-prima sólida, a qual absorve o fluido dilatando sua estrutura celular e diminuindo a resistência ao transporte de massa, facilitando assim a solubilização dos compostos que são transportados para a superfície do sólido, escoando para a saída do extrator;

- A etapa de separação do extrato do solvente ocorre quando a pressão do fluido é reduzida por uma válvula de expansão, localizada após o extrator, diminuindo drasticamente seu poder de solubilização quando expandido a estado gasoso, e o soluto precipita em um separador onde a quantidade de extrato pode ser medida;

Na etapa de extração, a temperatura e a pressão são selecionadas para maximizar os rendimentos nos compostos de interesse, enquanto que na etapa de separação o nível de solubilidade é reduzido para assegurar a precipitação do extrato e possibilitar a reciclagem do CO₂ (QUISPE-CONDORI, 2005). A etapa de separação pode ser realizada por descompressão, variação da temperatura, adsorção e ação anti-solvente. Em pequena escala, a separação pode ser realizada a pressão atmosférica e o solvente pode ser descartado ao ambiente, e em escala maior, o solvente deixa o dispositivo de coleta e é resfriado para recirculação.

Charpentier (1988 apud VASCONCELLOS, 2007) afirma que, dentre as técnicas de separação, a extração com fluido supercrítico apresenta vantagens consideráveis. Além de o solvente ser facilmente removido do soluto através da redução da pressão e/ou ajuste da temperatura, apresenta menor requerimento energético quando comparado à destilação e possibilita uma rápida extração devido à baixa viscosidade, alta difusividade e adequado poder de solvatação do fluido supercrítico. Além disso, a extração com fluido supercrítico requer o uso de pouco ou nenhum solvente orgânico, apresentando-se, portanto, como uma tecnologia segura e ecologicamente correta, uma vez que, industrialmente, o solvente é recirculado no sistema.

Segundo Singh & Singh (1996), um solvente para a indústria de alimentos deve ter alto coeficiente de distribuição, alta seletividade para o soluto de interesse, ser atóxico, estável e inerte, não ser miscível com o alimento, não ser inflamável e ser ambientalmente seguro (GRAS = *Generally recognized as safe*) e barato.

O dióxido de carbono (CO₂) está sendo usado como solvente em uma variedade de aplicações em alimentos e na indústria de processamento: preservação de alimentos em embalagens com atmosfera modificada, inativação de microorganismos e extração de óleos, aromas e corantes (KALIYAN et al., 2007).

O CO₂ é o solvente mais usado para a extração supercrítica por estar disponível em alta pureza, ser barato, não tóxico, não inflamável e de fácil remoção do soluto, pois é removido pela simples expansão à pressão ambiente; e por suas propriedades críticas serem relativamente baixas, que o tornam favorável como solvente de extração de compostos termosensíveis como, por exemplo, os carotenóides, uma vez que não são

necessariamente expostos a altas temperaturas, que podem induzir alterações em sua composição, e nem às altas pressões de operação, reduzindo o investimento, e conseqüentemente os custos de manufatura (UQUICHE et al., 2004; BRUNNER, 2005; VASCONCELLOS, 2007).

A SFE, com dióxido de carbono como solvente, é uma técnica de alta eficiência na extração de óleo devido a sua natureza apolar, tendo como produto final, compostos bioativos apolares, misturas complexas de óleo essencial, ésteres, terpenos, ácidos graxos, ceras, resinas e pigmentos. A solubilidade e a seletividade destes compostos podem ser aumentadas adicionando pequenas quantidades de outros solventes (co-solventes) como etanol, por exemplo. (SIHVONEN et al., 1999; DÍAZ-REINOSO et al., 2006, BHATTACHARJEE et al., 2007).

O primeiro passo da extração com fluido supercrítico a partir de matrizes vegetais é otimizar as condições de temperatura e pressão para maximizar o rendimento dos compostos de interesse e minimizar a co-extração de compostos indesejáveis. O rendimento global (X_0) e a cinética de extração, determinada a partir das curvas globais de extração (OEC = *Overall Extraction Curves*), são informações experimentais importantes para definir os parâmetros do processo, os quais fornecem informações importantes relativas ao dimensionamento industrial de uma unidade de extração com fluido supercrítico, e realizar uma análise preliminar dos custos de manufatura (MEIRELES, 2003; QUISPE-CONDORI et al., 2005; VASCONCELLOS, 2007).

3.2.1 RENDIMENTO GLOBAL (X_0)

O rendimento global (X_0) é a quantidade de material solúvel que pode ser extraída de uma dada matriz vegetal em uma dada pressão e temperatura, expressa como a relação entre a massa de material solúvel pela massa de substrato sólido (MEIRELES, 2003). No cálculo do rendimento global (Equação 3.1) a quantidade de material extraível é calculada como a relação entre a massa total (M_{extrato}) de extrato e a massa inicial da amostra em base seca (M_{amostra}).

$$X_0 = \left(\frac{M_{\text{extrato}}}{M_{\text{amostra}}} \right) \times 100 \quad 3.1$$

O comportamento do rendimento global com a temperatura e pressão pode se assemelhar ao da solubilidade de solutos em fluidos supercríticos. O seu estudo permite visualizar o comportamento do sistema visto que, devido à complexidade da composição

química dos extratos, vários comportamentos podem ser observados, como o fenômeno da inversão (QUISPE-CONDORI, 2005) apresentada na Figura 3.3.

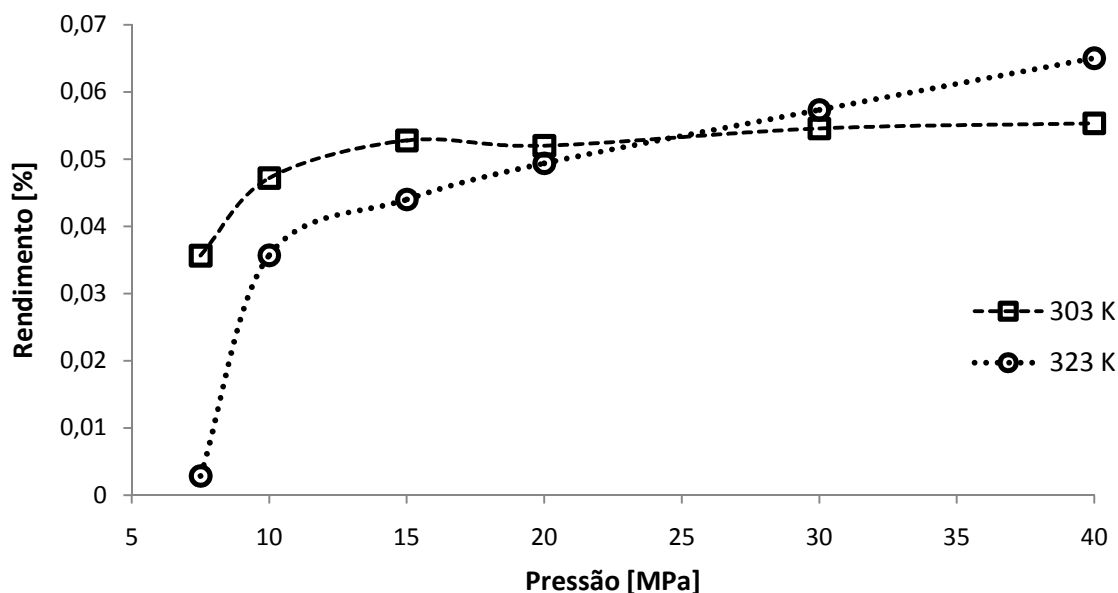


Figura 3.3 - Isotermas de rendimento global de extratos de *A. annua* obtidas com CO₂ supercrítico (QUISPE-CONDORI, 2005).

Com o aumento da temperatura, ocorre o aumento da pressão de vapor do soluto e a diminuição da densidade do solvente, conseqüentemente seu poder de solvatação. O fenômeno da inversão pode ser observado quando o aumento da temperatura em uma mesma pressão, relativamente baixa, causa a diminuição da solubilidade do soluto, pois o efeito da densidade do solvente se sobrepõe ao efeito da pressão de vapor do soluto (Figura 3.3: pressões menores que 25 MPa); e em pressão relativamente elevada, causa o aumento da solubilidade do soluto, pois o efeito da pressão de vapor do soluto se sobrepõe ao efeito da densidade do solvente (Figura 3.3: pressões maiores que 25 MPa).

Portanto, a determinação das isotermas de rendimento global permite visualizar o comportamento do sistema indicando a condição de temperatura e pressão na qual ocorre o ponto de inversão, proporcionando informações necessárias para a seleção das condições operacionais de extração.

3.2.2 CURVA GLOBAL DE EXTRAÇÃO (OEC = *OVERALL EXTRACTION CURVES*)

Os processos de extração são descritos graficamente por curvas de extração, denominadas curvas globais de extração ou simplesmente curvas de extração: OEC – *Overall Extraction Curves* (BRAGA, 2005). Uma OEC é obtida considerando a massa de

extrato obtida em função do tempo de extração e uma das informações obtidas através da curva é o tempo requerido para uma batelada (ciclo de extração) (MEIRELES, 2008). O gráfico esquematizado na Figura 3.4 mostra o comportamento típico de um processo de extração com fluido supercrítico.

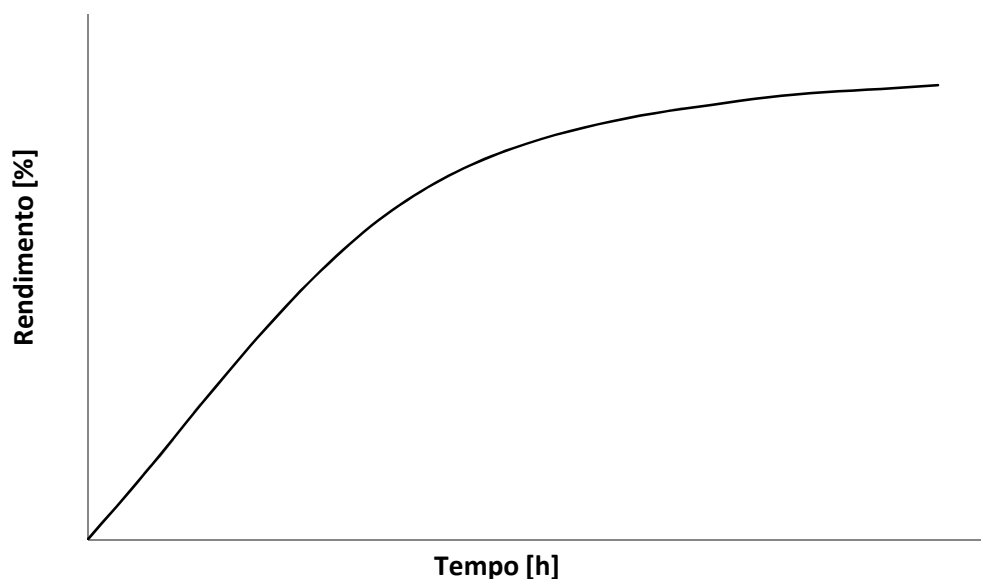


Figura 3.4 – Comportamento típico de processo de extração com fluido supercrítico.

Na curva da Figura 3.4, observa-se que se desenvolve um período de taxa de extração constante nas primeiras duas horas, que representa a extração de substratos que são de fácil acesso ao solvente. Em seguida, observa-se que a taxa de extração diminui progressivamente com o tempo, que representa a extração de substratos que são de difícil acesso ao solvente.

Segundo Lee et al. (1986) e Ferreira et al. (1993), a curva de extração pode ser dividida em três regiões distintas:

- Período de taxa constante de extração (CER: *Constant Extraction Rate*), no qual há presença de soluto facilmente acessível na superfície das partículas da matriz, estando, assim, a resistência à transferência de massa majoritariamente na região externa à partícula. Nesta situação o processo de transferência de massa é controlado pela convecção (escoamento do solvente).
- Período de taxa de extração decrescente (FER: *Falling Extraction Rate*), na qual a camada de extrato facilmente acessível na superfície das partículas está se esgotando, uma vez que nem todas as partículas encontram-se revestidas pelo soluto ou a quantidade de células rompidas não é mais uniforme. A taxa de transferência de

massa decresce rapidamente como resultado da diminuição da área efetiva de transferência de massa e passa a ser significativo o processo de transferência de massa por difusão. Nessa fase de transição, a resistência à transferência de massa encontra-se concomitantemente na fase sólida e na fase fluida e tanto a convecção quanto a difusão são importantes na extração;

- O período de taxa de extração controlada pela difusão (DC: *Diffusion Controlled*), caracterizado pela ausência de soluto facilmente acessível na superfície das partículas. A taxa de extração é determinada pela difusão do solvente para o interior das partículas sólidas e leito seguido da difusão da mistura soluto/solvente para a superfície das partículas.

Segundo Meireles (2008) uma OEC pode ser descrita por ajuste de retas. A massa de extrato (ou rendimento) pode ser obtida a partir da Equação 3.2 para o ajuste de duas retas e da Equação 3.3 para o ajuste de três retas.

$$m_{ext} = (b_0 - C_1 b_2) + (b_1 + b_2)t \quad 3.2$$

$$m_{ext} = (b_0 - C_1 b_2 - C_2 b_3) + (b_1 + b_2 + b_3)t \quad 3.3$$

Onde: b_i e C_i : parâmetros do modelo; C_1 : intersecção da primeira reta com segunda reta; C_2 : intersecção da segunda reta com a terceira reta; m_{ext} : massa de extrato (ou rendimento); t : tempo;

A Figura 3.5 apresenta um esquema das três regiões distintas da extração.

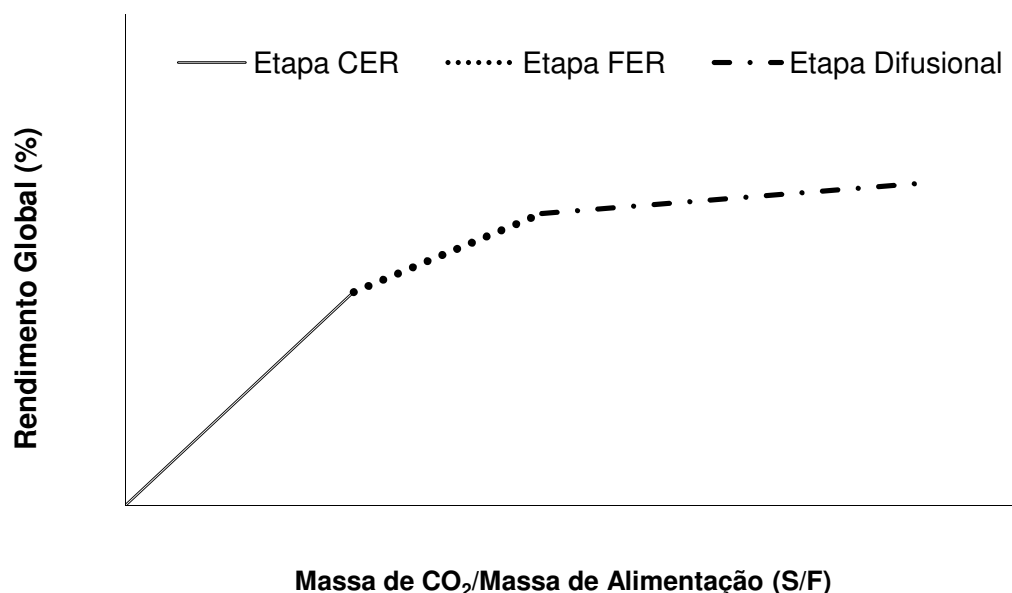


Figura 3.5 – Curva global apresentando as três regiões distintas da extração.

A intersecção entre as duas primeiras retas determina o término do período de taxa constante de extração (t_{CER}) e a intersecção entre a segunda e terceira reta determina o final do período de taxa decrescente de extração (t_{FER}), onde a partir deste ponto inicia-se o período de extração controlado pela difusão (DC).

O estudo dessas curvas ajuda a definir os parâmetros cinéticos do processo: t_{CER} (duração do período CER); M_{CER} (taxa de transferência de massa do período CER); Y_{CER} (razão mássica de extrato na saída do leite no período CER); e R_{CER} (rendimento do período CER), que fornecem informações importantes relativas ao dimensionamento industrial de uma unidade de extração com fluido supercrítico (QUISPE-CONDORI et al., 2005; VASCONCELLOS, 2007;).

3.3 MATRIZES VEGETAIS OLEAGINOSAS

O Brasil possui uma vasta biodiversidade vegetal, englobando cerca de 55.000 espécies conhecidas dentre um total de 350.000 a 550.000 constituindo, portanto, uma importante fonte de matrizes vegetais com atividade biológica. No decorrer dos últimos anos observou-se um crescente interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia na utilização de produtos de origem vegetal cujos metabólitos constituem substâncias bioativas derivadas do metabolismo secundário de plantas, denominados compostos fitoquímicos. Esses compostos possuem características altamente atrativas do ponto de vista nutricional, fisiológico e/ou medicinal, sendo capazes de prover, além da nutrição básica, benefícios à saúde ou medicinais como a prevenção e/ou tratamento de doenças. Dessa maneira, muitas atividades funcionais são atribuídas aos extratos brutos e princípios ativos extraídos de plantas nativas brasileiras como atividade antioxidante, anticarcinogênica, anti-HIV, bactericida, anti-malária, hipoglicêmica, dentre outras (LEAL, 2005; BRAGA, 2005; QUISPE-CONDORI, 2005).

A produção de oleaginosas tem mostrado um notável aumento nas últimas décadas. Esta evolução deve-se ao crescente consumo de gorduras comestíveis, como óleos vegetais e seus produtos, devido à substituição gradual da gordura animal pela de origem vegetal. A mudança está relacionada com a noção de estilo de vida saudável e a necessidade de comer alimentos com uma influência positiva na saúde, aumentando o uso de alimentos ricos em compostos com comprovado benefício (TUBEROSO, 2007)

As numerosas aplicações do dióxido de carbono na obtenção de extratos vegetais têm proporcionado muitas pesquisas sobre a extração supercrítica de lipídios e vitaminas de frutas e vegetais. Óleos vegetais são compostos de misturas complexas de mono-, di- e triglicerídeos; ácidos graxos livres e outros em menor concentração como tocoferóis, carotenóides e esteróis (RODRIGUES et al., 2005).

3.3.1 ÓLEO DE CAFÉ VERDE (*Coffea arabica*)

Coffea arabica, da família Rubiaceae, é uma das espécies de café mais cultivada no mundo. É descrita como árvore pequena de folhas verde escura brilhante e de frutos vermelhos. O nome café é originário da palavra árabe qahwa, que significa vinho mas a planta de café é originária da Etiópia, centro da África. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional, e o segundo mercado consumidor, onde a produção de café arábica se concentra em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2007).

Os lipídios de grãos de café verde (“o óleo de café”) estão presentes, substancialmente, no endosperma e pequena quantidade de ceras encontra-se na camada externa do grão. O óleo, composto principalmente de triacilgliceróis com ácidos graxos, esteróis, com destaque para os tocoferóis, apresenta propriedades hidratantes, emolientes e amaciantes, superiores às dos óleos comuns, o que é de grande interesse na indústria de cosméticos (LAGO, 2001). Na cera do grão, encontram-se as hidroxitriptamidas (5-HTs) e caso os grãos não sejam previamente decerados, serão extraídas junto com o óleo, dada a semelhança de polaridade. A fração insaponificável é rica em diterpenos, principalmente cafestol, caveol e 16-O-metilcafestol, os quais vêm recebendo mais atenção devido aos seus diferentes efeitos fisiológicos (LAGO, 2001; SPEER & SPEER, 2006).

Mais recentemente, o café passou a ser considerado uma planta funcional nutracêutica por diversos pesquisadores. A cafeína e os polifenóis, como os ácidos clorogênicos (CGA = *clorogenic acids*), apresentam atividade antioxidante, assim como as amidas de serotonina, que têm despertado grande interesse na cera de café a ser usado em alimentos. Os diterpenos, cafestol e caveol, apesar de serem considerados hipercolesterolêmicos, apresentam propriedade anticarcinogênica e antiinflamatória (LAGO, 2001; WILDMAN, 2001 apud SANDI, 2003; MONTEIR; TRUGO, 2005; SPEER; SPEER, 2006).

Os métodos comuns para a extração do óleo de café incluem extração por prensagem e/ou com solventes. Em café, a tecnologia de extração supercrítica tem sido quase que exclusivamente empregada para a descafeinização do café como também para a extração do óleo de café torrado como fonte de aroma (SANDI, 2003). O mesmo autor estudou as condições de extração do óleo de café verde e dos diterpenos com CO₂ supercrítico obtendo produtos de alto valor agregado: café verde livre de óleo e de diterpenos (hipercolesterolêmico), e óleo de café verde rico em diterpenos (bloqueador de radiação solar, propriedade antiinflamatória e anticarcinogênica).

3.3.2 ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma planta da família Cariocaraceae nativa do Cerrado e da Amazônia cujo fruto é muito rico em óleo e proteína. O nome pequi se origina da palavra tupi “pyqui”, em que Py = casca e qui = espinho. Em diversas regiões do cerrado do país, o extrativismo dos frutos do pequizeiro constitui em uma importante atividade econômica, geradora de renda e emprego (SANTOS et al., 2004; CALDEIRA JR et al., 2007).

O óleo de pequi é utilizado na indústria cosmética para a fabricação de cremes para a pele e sabonetes devido ao seu delicado aroma e propriedades químicas. A extração artesanal do óleo de pequi é realizada submetendo a polpa do fruto a um cozimento intensivo com água e separando o óleo sobrenadante. Em seguida, seca-se o produto em recipiente metálico sobre uma chapa quente até que o mesmo perca a opacidade que é causada pela umidade. Finalmente, em laboratórios, o óleo obtido é filtrado em papel de filtro (FACIOLI; GONÇALVES, 1998; AQUINO, 2007).

Características físico-químicas da polpa pequi são descritas por Ferreira et al. (1987, apud CALDEIRA Jr., 2007), onde obteve teor de umidade (41,50%), cinzas (0,63%), proteína (3,0%), lipídios (33,40%), carboidratos (11,45%) e fibra alimentar total (10,02%). Aquino (2007) cita estudos de vários autores onde os teores de óleo variaram de 20 a 61%. As diferenças nas características físicas e químicas dos frutos ocorrem, principalmente, em frutos dentro de plantas, em plantas dentro de áreas e até entre as regiões onde existe o pequizeiro, além do tempo entre a coleta e o consumo (VERA et al., 2005; OLIVEIRA et al. 2006). Os lipídios são os constituintes predominantes, prevalecendo nestes os ácidos graxos, oléico e palmítico. Detecta-se também um teor elevado de fibra alimentar e a presença de compostos fenólicos e carotenóides, como violaxantina, luteína e zeaxantina, com pequenas quantidades de β-criptoxantina, β-

caroteno e neoxantina, os quais estão associados à prevenção de processos oxidativos (AZEVEDO-MALEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA et al., 2007).

Na região do Cerrado, as árvores recebem alta incidência de raios solares, o que favorece a geração de radicais livres. Essas condições favorecem a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes (compostos fenólicos e carotenóides) (LIMA et al., 2007). Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da bioatividade de plantas medicinais do Cerrado fornece subsídios para utilizá-las como fármacos pelo homem. Os componentes do pequi (folha, casca, polpa e amêndoa) são indicados para uso em vários produtos como alimentação, indústria cosmética e para tratamento de várias enfermidades, como a gripe, asma e outras doenças respiratórias, devido aos seus diferentes efeitos medicinais (MOTTER et al., 2004; AQUINO, 2007; KHOURI et al., 2007).

O óleo de pequi apresenta atividade inseticida em milho armazenados (COITINHO et al., 2006). No estudo realizado por Khouri et al. (2007), o extrato aquoso da polpa de pequi apresentou potencial anticlastogênico (antimutagênico). Resultados indicam que o extrato da folha e da casca do caule de pequi pode ser utilizado como moluscida no combate à esquistossomose (BEZERRA et al., 2002; MOTTER et al., 2004). O extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* demonstrou efeito leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e atividade bactericida sobre estirpes de bactérias patogênicas para o homem, e relevante capacidade antioxidante, similar às atividades da vitamina C e da rutina (PAULA JR et al. 2006).

Roesler et al. (2007) estudaram a presença de compostos com capacidade antioxidante provenientes de frações diversas de frutas do cerrado brasileiro. Os compostos fenólicos encontrados pelos autores foram expressos em equivalente de ácido gálico (GAE = *galic acid equivalent*): na casca do pequi 209,37g GAE/ kg de matéria seca em extrato etanólico e 208,42 g GAE / kg matéria seca em extrato aquoso; na semente e na polpa, encontraram 27,19 g / kg matéria seca em extrato etanólico e 20,88 g GAE/ kg matéria seca em extrato aquoso. Com este estudo, os autores verificaram que a extração etanólica resulta em extratos com maiores conteúdos de compostos fenólicos e, conseqüentemente, com maior capacidade de seqüestrar radicais livres, ou seja, maior atividade antioxidante, com exceção para a casca de pequi, que apresentou alta capacidade antioxidante para o extrato etanólico e também para o extrato aquoso.

Portanto, para a extração seletiva de antioxidantes naturais, é de grande importância e necessário um estudo sobre um processo mais apropriado e, aliado ao crescente interesse comercial por esses óleos, implicará em ganhos maiores para as comunidades extrativistas.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são definidos como moléculas que, quando presente em pequenas concentrações comparadas as do substrato oxidável, impedem ou reduzem a degradação oxidativa destes substratos (HALLIWELL, 1990 apud HUANG et al., 2005).

Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O_2 , que é o principal responsável pela deterioração nos alimentos. Os lipídios e ácidos graxos poliinsaturados reagem com O_2 formando hidroperóxidos. A oxidação de lipídios, além de representar um problema na indústria de alimentos, está ligada a diversas doenças no ser humano e à aceleração do processo de envelhecimento, uma vez que o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podem interagir e lesar diversas estruturas celulares. (MAFRA et al., 1999; SHAHIDI, 1997 apud VASCONCELLOS, 2007).

Estudos atribuem capacidade antioxidante a compostos minoritários presentes em oleaginosas como o tocoferol, esqualeno, clorofila e compostos fenólicos, devido às suas atividades contra doenças cardiovasculares e oxidação lipídica. A capacidade também é atribuída à presença de compostos fenólicos e tocoferóis na estabilidade de óleos. Ácidos graxos insaturados e os carotenóides afetam o processo autoxidativo agindo como pró ou antioxidantes (TUBEROSO et al., 2007).

Os carotenóides possuem ação comprovada na saúde humana. Desempenham um importante papel como antioxidante por seqüestrar radicais livres e oxigênio singlete, como também inibem o crescimento de certas células cancerígenas (WEI et al., 2005).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros. São incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação (SHAHIDI et al., 1992 apud ÂNGELO; JORGE, 2007). Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (ÂNGELO; JORGE, 2007).

O mais importante grupo de antioxidantes naturais presentes em óleos comestíveis brutos ou refinados são os tocoferóis. Os tocoferóis são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas, que possuem atividade antioxidante e de vitamina E. Eles estão agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis. A estabilidade oxidativa de óleos pode ser aumentada eficientemente pela adição de tocoferóis puros ou outros óleos contendo apenas tocoferóis como antioxidantes naturais (SCHMIDT; POKORNY, 2005; ÂNGELO; JORGE, 2007).

Como o uso de antioxidantes sintéticos tem sido severamente restrito pela indústria de alimentos devido aos efeitos colaterais como alergias e possíveis ações promotoras de câncer (RIZVI, 1994 apud LEAL, 2005), pesquisas têm enfatizado o desenvolvimento e utilização de antioxidantes provenientes de fontes naturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas e extratos comerciais foram cedidos pela Croda do Brasil Ltda.

4.1.1 CAFÉ VERDE (*Coffea arabica*)

A amostra de semente de café consistiu de dois sacos de polietileno contendo 1 kg de sementes de café verde cada um já beneficiadas e classificadas. Ao ser recebida no LASEFI, a amostra foi acondicionada dentro de caixa de polipropileno corrugado e armazenada em sala climatizada, 291 K, até a realização dos ensaios. A amostra de café verde foi identificada como CV.

Amostras de extratos comerciais de café verde foram identificadas de acordo com o lote especificado no rótulo: Grãos Poli-óleos, Maceração, Poli-o e 0003. As quatro amostras de extrato, ao serem recebidas, foram acondicionadas em caixa de isopor e armazenadas em *freezer* doméstico (Metalfrio, DA420, São Paulo, São Paulo) a 255 K.

4.1.2 PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)

A amostra comercial consistiu de salmoura de polpa de pequi em dois recipientes lacrados contendo, cada um, 770g de peso líquido e 270g de peso drenado (Lote 155, fabricação: 17/jul/2008, validade: 17/jul/2009, temperatura ambiente). A amostra comercial foi identificada como PQ-155.

A amostra de polpa de pequi definida para o estudo foi cedida já manualmente descascada e despolpada, sem passar por tratamento posterior e foi submetida diretamente ao congelamento. A amostra *in natura* foi identificada como PQ.

Ambas as amostras, ao serem recebidas no LASEFI, foram acondicionadas em saco de polietileno de cor preta, para proteger da luz, e armazenadas a 255 K em *freezer* doméstico (Metalfrio, DA420, São Paulo, São Paulo).

O extrato comercial de pequi, acondicionado em recipiente plástico, ao ser recebido foi acondicionado em caixa de isopor e armazenado em *freezer* doméstico (Metalfrio, DA420, São Paulo, São Paulo). Para sua identificação foi adotado o número do lote (0000236125) especificado no rótulo.

4.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas foram moídas em moinho de facas (Marconi, modelo MA340, série 0204244, Piracicaba, São Paulo). A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando o jogo de peneiras, com aberturas de 12 a 80 *mesh*, da série Tyler (W.S. Tyler, Wheeling, EUA), posicionadas no sistema vibratório de tipo magnético (Bertel, Piracicaba, São Paulo) por 15 minutos em nível 10. As massas retidas em cada peneira foram medidas em balança semi-analítica (Marte, série AS2000, $\pm 0,01\text{g}$, Artlab, São Paulo, São Paulo). Antes e após cada operação efetuada no preparo e caracterização, as matérias-primas permaneceram armazenadas a 255 K em *freezer* doméstico (Metalfrio, DA420, São Paulo, São Paulo).

As determinações de teor de umidade (925.40: 37.1.10), de lipídios (948.22: 32.1.25), de proteína (950.48: 32.1.22), e de cinzas (950.49: 4.1.10) das matérias-primas, foram realizadas seguindo os métodos oficiais da AOAC (1997) e em triplicata.

4.2.1 CAFÉ VERDE

Alíquotas de sementes inteiras de café verde foram peneiradas para que fossem retiradas as partículas finas que pudessem causar obstrução da linha da unidade durante o processo de extração. Posteriormente, foram acondicionadas e identificadas como CVI. Alíquotas de sementes de café verde foram moídas e classificadas quanto ao tamanho e, posteriormente, partículas de *mesh* 16 (diâmetro maior que 1mm) e *mesh* -24/+48 ($0,3\text{ mm} < \text{diâmetro} < 0,7\text{ mm}$) foram acondicionadas separadamente e identificadas como CV16 e CVM, respectivamente.

Após a moagem e a classificação, as amostras CVQ, CV16 e CVM, foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em *freezer* doméstico a 255 K até a realização da extração.

4.2.2 PEQUI

A amostra PQ-155 passou por um processo de dessalga para posterior preparo e caracterização. Colocou-se a polpa em reservatório plástico com um litro de água destilada e cobriu-se o reservatório com papel alumínio, para proteger a matéria-prima dos fatores ambientais que pudessem causar degradação ao composto alvo. Trocou-se a água destilada a cada duas horas, por cinco vezes, para garantir a dessalga. Após

dessalga, acomodou-se a amostra em reservatório de alumínio previamente tarado, em balança semi-analítica, e mediu-se a massa úmida.

As amostras de polpa de pequi foram secas em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, modelo MA035, Piracicaba, São Paulo) a 318 K por 24 horas, antes da moagem e classificação do tamanho.

4.3 EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

4.3.1 UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

As extrações foram realizadas na unidade Spe-ed SFE equipada com bomba pneumática, unidade controladora de temperatura e rotâmetro (Applied Separations, Inc., model 7071, Allentown, PA, EUA); compressor (SHULZ S/A, modelo MS 3, Joinville, Santa Catarina), banho de resfriamento ultratermostático (Marconi, modelo MA184, Piracicaba, São Paulo); cilindro de CO₂ (99% pureza, Gama Gases Especiais, Campinas, São Paulo); e totalímetro (LAO G0,6, São Paulo, São Paulo) apresentados na Figura 4.1.

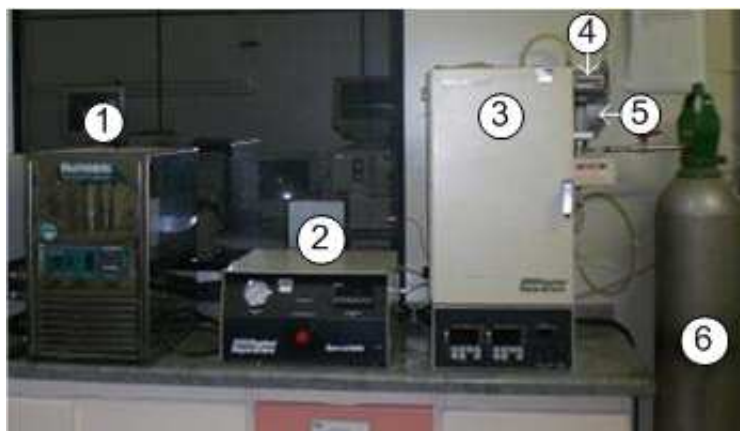


Figura 4.1 - Spe-ed SFE: 1: Banho de resfriamento; 2: Bomba pneumática; 3: Unidade controladora de temperatura; 4: Totalímetro; 5: Rotâmetro; 6: Cilindro de CO₂.

As células de extração (Thar Designs, CL 1373, Pittsburg, EUA) utilizadas na unidade Spe-ed SFE estão apresentadas na Figura 4.2. O leito de extração (1) possui 2 cm de diâmetro e 1,46 cm de altura, totalizando volume de leito de 4,6 mL e o leito de extração (2) possui 5,42 cm de diâmetro e 12,54 cm de altura, totalizando volume de leito de 290 mL.



Figura 4.2 – 1: Célula de extração identificada como 5mL; 2: Célula de extração identificada como 300mL.

4.3.1.1 Procedimento operacional

O fluxograma da unidade de extração com fluido supercrítico Spe-ed SFE é apresentado na Figura 4.1.

O processo tem início quando o CO_2 sai do cilindro (C- CO_2) em direção ao banho ultratermostático (BT), que contém uma solução de etileno glicol e água a 263 K para resfriar o solvente assegurando que o mesmo alcance a bomba na fase líquida. Na bomba (BB), o solvente líquido é comprimido até a pressão de operação e transportado para dentro da célula de extração (CE), onde se encontra a matéria-prima. A célula de extração está acoplada dentro do forno (F) com a temperatura de operação controlada por um termopar. O solvente fluido percola a matéria-prima extraíndo os compostos solúveis e quando atinge a válvula de expansão (micrométrica) (V5) tem sua pressão reduzida até pressão ambiente voltando à fase gasosa. Os compostos solúveis no solvente fluido precipitam no frasco coletor (FC) e o solvente na fase gasosa passa por um rotâmetro (RT) e depois por um totalímetro (TT), onde tem sua vazão quantificada, e é liberado no ambiente.

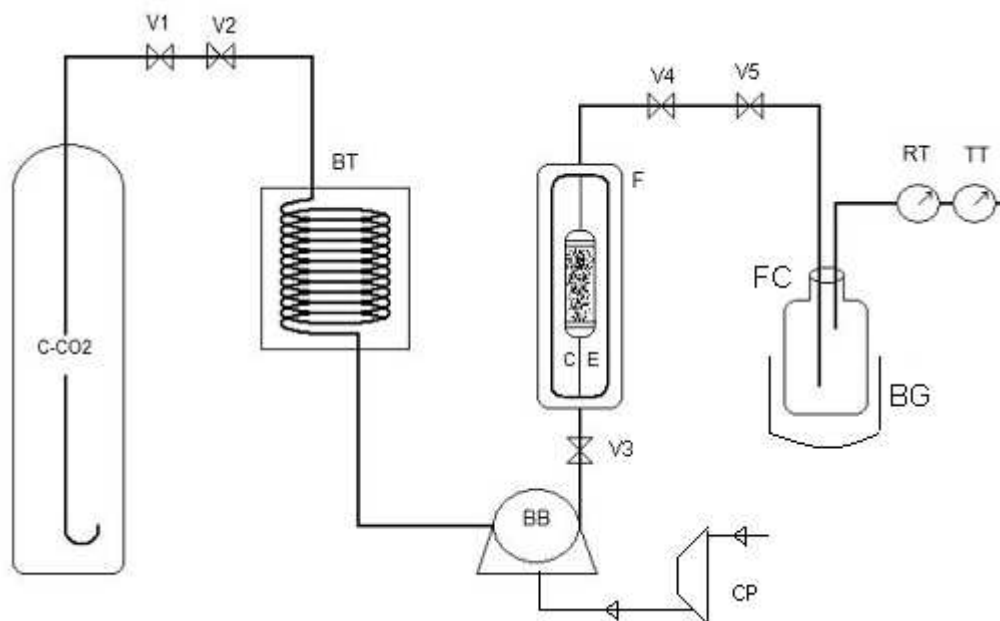


Figura 4.3 - Fluxograma da unidade experimental Spe-ed SFE (adaptado de VASCOCELLOS, 2007).

O procedimento operacional da unidade foi padrão para as todas as extrações:

1. Ligou-se o banho de resfriamento (BT) e esperou-se alcançar a temperatura entre 268K e 263K;
2. Verificou-se se todas as válvulas (V1, V2, V3 e V4) estavam fechadas e ligou-se o Spe-ed SFE e o compressor (CP);
3. Conectou-se a linha de saída do CO₂ no frasco de coleta (FC), previamente tarado, e depois se conectou o frasco de coleta (FC) na linha de saída de CO₂ + extrato;
4. Abriam-se as válvulas do cilindro de CO₂ (V1) e de segurança (V2);
5. Ligou-se a bomba de pressurização do CO₂ (BB);
6. Conectou-se a célula de extração (CE), com a matéria-prima empacotada, no forno (F) e prendeu-se o termopar em sua superfície;
7. Abriu-se lentamente a válvula de entrada de CO₂ (V3) para pressurização do sistema com a pressão existente no cilindro de CO₂ (C-CO₂);
8. Verificou-se que não havia vazamento, nem na célula de extração (CE) nem na linha do sistema;
9. Regulou-se vagarosamente a pressão na bomba (BB) até a pressão de operação e verificou-se novamente se não havia vazamento;

10. Configurou-se a temperatura do forno (F) para a temperatura de operação e a temperatura da válvula micrométrica (V5) para 353 K e ligaram-se os botões de temperatura do forno (F);
11. Ajustou-se a pressão de operação (após alcance das temperaturas de operação) na bomba (BB);
12. Esperou-se 10 minutos para a estabilização do sistema;
13. Colocou-se o frasco de coleta (FC) em banho de gelo (BG) onde foi mantido parcialmente imerso para evitar degradação do extrato durante a extração;
14. Abriu-se vagarosamente a válvula de saída de CO₂+extrato (V4) para iniciar a extração;
15. Ajustou-se a vazão do CO₂ através da válvula micrométrica (V5) que foi mantida constante durante o período de extração e controlada pelo rotâmetro (RT) e pelo totalímetro (TT);
16. Após o tempo pré-estabelecido de extração, fechou-se a válvula de saída de CO₂+extrato (V4) e fechou-se a válvula de entrada de CO₂ (V3);
17. Diminuiu-se a pressão da bomba (BB) até pressão do cilindro de CO₂ (C-CO₂) e desligaram-se os botões de temperatura do forno (F) e da válvula micrométrica (V5);
18. Retirou-se o frasco de coleta (FC) de extrato e o banho gelo (BG) e acoplou-se o frasco de coleta de limpeza, previamente tarado;
19. Abriu-se vagarosamente a válvula de saída de CO₂+extrato (V4) para a total despressurização do sistema;
20. Desconectou-se a célula de extração (CE) das linhas e lavou-se, com auxílio de seringa, a linha de saída de CO₂+extrato com 10mL álcool etílico, coletando-se no mesmo frasco da despressurização;
21. Após o procedimento de limpeza, retirou-se o frasco de coleta de limpeza;
22. Acoplou-se outra célula de extração no forno (F) e abriu-se a válvula de entrada (V3) de CO₂, para que fosse passada, na linha, corrente de CO₂ para retirada total de resíduo de solvente;
23. Desconectou-se a célula, usada para limpeza, da linha; desligou-se o Spe-ed (F), o banho ultratermostático (BT) e compressor (CP).

A vazão do solvente foi monitorada com o auxílio do totalímetro que mede o volume de CO₂ (m³) nas condições ambientes de temperatura e pressão. Estas condições foram registradas com termômetro de mercúrio (PolyScience, EUA) e manômetro (modelo 104, Veb Feingertechnik 9362 Drebach/ERZC GDR, Alemanha), e serviram como dados

de entrada no programa de dados de referência padrão do NIST (2005) - National Institute of Standards and Technology, base de dados nº 69 publicada em junho de 2005 (<http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid>), que disponibiliza as propriedades termofísicas de sistemas fluidos, onde se obteve a densidade do CO₂ nas condições ambientes. Com a densidade e a vazão volumétrica calculou-se a vazão mássica do CO₂ (kg) utilizada em cada experimento de extração.

4.3.2 PREPARO DO LEITO DE EXTRAÇÃO

O preparo do leito seguiu procedimento padrão para todas as extrações: com uma das extremidades da célula fechada, depositou-se uma camada de lã de vidro em sua base; Acrescentou-se aos poucos a matéria-prima moída empacotando-a com o auxílio de um bastão cilíndrico de aço inox, para evitar a formação de caminhos preferenciais; posteriormente, depositou-se outra camada de lã de vidro por cima da matéria-prima e fechou-se a célula. O leito empacotado pode ser visualizado na Figura 4.4. A densidade do leito foi mantida constante. A lã de vidro serve como um filtro para evitar a passagem de partículas finas que possam causar obstrução da linha.

Na célula de 5 mL, a quantidade de matéria-prima foi suficiente para preencher todo o volume do leito. Na célula de 300 mL, preencheu-se aproximadamente 1/4 do volume do leito de amostra de café e aproximadamente 1/6 de amostras de pequi, onde o volume restante foi preenchido com esferas de vidro.

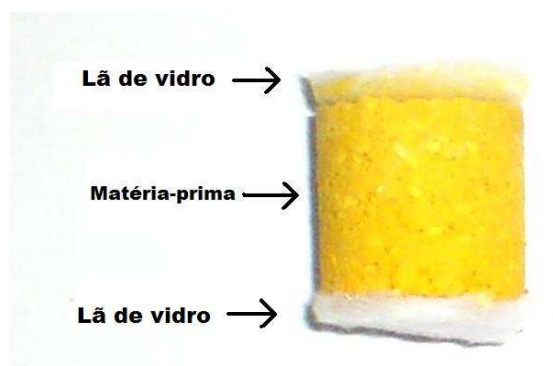


Figura 4.4 - Leito empacotado da célula de 5 mL.

A densidade aparente (ρ_a) do leito foi calculada dividindo-se a massa de matéria-prima utilizada para empacotar o leito pelo volume do leito no extrator.

4.3.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL (X_0)

Ensaio preliminares de rendimento global foram realizados na célula de 300 mL, utilizando-se 50,00 g de massa de amostra de café verde, e 20,00 g de massa de amostra de pequi. Na medição da massa de amostra para extração, tomou-se o devido cuidado para evitar a autoclassificação, adotando-se o método das divisões sucessivas (FOUST et al., 1982), pois as partículas menores permaneciam na parte inferior do recipiente plástico.

Os experimentos para a determinação do rendimento global foram realizados na célula de 5mL apresentada na Figura 4.2, item 4.3.1. Foram realizadas extrações em duas temperaturas e cinco pressões totalizando dez ensaios que foram replicados. O tempo de processo de extração e a razão (S/F) entre a massa de CO_2 (S) e a massa de matéria-prima (F) alimentada na célula, foram mantidos constantes. Os parâmetros utilizados nas extrações estão apresentados na Tabela 4.1:

Tabela 4.1 Parâmetros operacionais adotados para a determinação das isotermas de rendimento global (IRG).

S/F:	60				
Tempo [s]	3600				
Vazão [kg/s]:	$8,35 \times 10^{-5}$				
Temperatura [K]:	323	333			
Pressão [MPa]:	20	25	30	35	40

O procedimento padrão de operação da unidade Spe-ed SFE foi adotado para a determinação do rendimento global. Após o fim da extração, os frascos de coleta de extrato foram deixados por 10 minutos na capela para garantir que todo o CO_2 fosse volatilizado do extrato e o frasco de coleta de limpeza foi acoplado em rota evaporador (Laborota 4001 WB, Heidolph e CH-9230, Buchi, Flawil, Suíça) com bomba de vácuo (Rotovac Control, Heidolph, Instruments, GMBH, Viertrieb, Alemanha) à temperatura de 313K e à pressão de 0,011 MPa, para remover totalmente o álcool etílico empregado na limpeza da linha de saída de CO_2 +extrato. As massas de extratos contidas nos frascos foram medidas usando balança analítica (Sartorius analytic A200S, $\pm 0,0001$, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha).

O rendimento global (X_0) foi calculado relacionando a massa total ($M_{extrato}$) de extrato e a massa de alimentação de matéria-prima em base seca ($M_{amostra}$), de acordo com a Equação 4.1:

$$X_0 = \left(\frac{M_{extrato}}{M_{amostra}} \right) \times 100 \quad 4.1$$

Ao final das extrações com todas as condições de temperatura e pressão, as isotermas de rendimento global (GYI = Global Yield Isotherms) foram apresentadas em gráficos a fim de se observar o comportamento do sistema em diferentes condições de temperatura e pressão.

4.3.4 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Os experimentos para a determinação da cinética de extração foram realizados na célula de 300 mL apresentada na Figura 4.2, item 4.3.1. A condição de temperatura e pressão de extração adotada foi a que se obteve o melhor rendimento do composto de interesse. A duração da cinética de extração foi realizada até que não se observasse mais saída de extrato no frasco coletor.

O procedimento padrão de operação da unidade Spe-ed SFE foi adotado para a determinação da cinética de extração. A célula de 300 mL foi acoplada no forno de forma que a parte preenchida com as esferas de vidro fosse deixada para baixo para que apenas o dióxido de carbono puro, que penetra na parte inferior da célula, percorresse as esferas, evitando a agregação de extrato nas mesmas. Em períodos predeterminados de extração, os frascos de coleta de extratos eram substituídos por outros limpos, e previamente tarados, até que não se percebesse mais a saída de extrato. Os frascos de coleta de extrato foram deixados por 10 minutos na capela para garantir que todo o CO_2 fosse volatilizado do extrato e o frasco de coleta de limpeza foi acoplado no rota evaporador (Laborota 4001 WB, Heidolph e CH-9230, Buchi, Flawil, Suíça) com bomba de vácuo (Rotavac, Heidolph, Instruments, GMBH, Viertrieb, Alemanha) à temperatura de 313 K e à pressão de 0,011MPa, para remover o etanol empregado na limpeza da linha de saída de CO_2 +extrato. As massas de extratos contidas nos frascos foram medidas usando balança analítica (Sartorius analytic A200S, $\pm 0,0001$, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha). Ao final das cinéticas as curvas globais de extração (OEC) foram apresentadas em gráficos a fim de se observar o comportamento do sistema.

4.3.4.1 Cálculo dos parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, t_{CER} (duração do período de taxa constante de extração, [min.]); M_{CER} (taxa de transferência de massa do período CER, [kg/s]); Y_{CER} (razão mássica de extrato na saída do leite, [g_{ext}/100g_{CO2}]); e R_{CER} (rendimento do período da taxa constante de extração, [%]), foi utilizado um aplicativo computacional que consiste em uma planilha de cálculo em Excel com uso da função PROJ.LIN (SANTOS, 2007) que ajusta um *spline* linear de três retas à curva da cinética de extração. Sucessivos valores do ponto de intersecção das três retas são avaliados a partir dos módulos em visual basic para aplicação (VBA), maximizando o coeficiente de correlação das retas. A intersecção entre as duas primeiras retas determina o término do período de taxa constante de extração (t_{CER}) e a intersecção entre a segunda e terceira reta determina o final do período de taxa decrescente de extração (t_{FER}), onde a partir deste ponto inicia-se a o período de extração controlada pela difusão.

Os dados de entrada para o aplicativo são os dados experimentais obtidos das curvas globais de extração, a vazão de solvente, densidade do sólido e a massa inicial de alimentação. O programa gera um gráfico dinâmico plotado em termos da razão entre a massa de extrato e a massa inicial de alimentação *versus* a razão entre a massa de solvente e massa inicial de alimentação (SANTOS, 2007).

4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Para os extratos obtidos nos ensaios preliminares referente às extrações realizadas para a determinação do rendimento global das amostras de café verde (CVI, CVQ, CV16, CVM) realizaram-se análises qualitativas e análises preliminares de fenóis totais, e para as amostras comerciais (Grãos Poli-óleos, Maceração, Poli-o e 0003), realizaram-se análises qualitativas.

Para cada extrato obtido referente às extrações realizadas para a determinação das isotermas de rendimento global da amostra PQ, e para o extrato comercial de pequi (lote: 0000236125), realizaram-se análises de carotenóides totais, fenóis totais e atividade antioxidante de forma que as replicatas das extrações, com mesma condição de temperatura e pressão, participaram do mesmo ensaio. Para se obter uma média entre medidas do mesmo extrato, as soluções de extrato foram preparadas em triplicata para as análises de carotenóides totais e fenóis totais; em duplicata, para ácidos graxos e atividade antioxidante; e a análise de tocoferóis totais foi realizada sem repetição devido a

pouca quantidade de extrato. As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata, para a eliminação do erro do equipamento. Com isso, diminuiu-se a influência de erros causados por erros provenientes de aparelhagem e equipamentos e erros impossíveis de se prever, erro sistemático e erro aleatório, respectivamente.

Análises de composição em ácidos graxos (AOCS Ce 1c-89) e teor de tocoferóis totais (AOCS Ce 8-89) foram realizados seguindo metodologia oficial da AOCS (2004) - American Oil Chemists' Society. Uma amostra de extrato de cada condição de temperatura e pressão foi selecionada aleatoriamente para estas análises.

4.4.1 ANÁLISE QUALITATIVA

O perfil de composição, compostos fenólicos e flavonóides dos extratos, foi determinado qualitativamente através da técnica de adsorção por cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo metodologia de Wagner & Bladt (1996) com algumas modificações.

Material: cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica gel (CCF-C/25, sílica gel 60 F₂₅₄, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha); esqualeno (CAS 111-02-4, Lote 34806355, SIGMA, EUA); cafeína (CAS 58-08-2, Lote 33807218, SIGMA, EUA); ácido caféico (CAS 331-39-5, Lote 23507236, SIGMA, EUA); p-anisaldeído (CAS 123-125, Lote 116K3531, SIGMA, EUA); 2-aminoetil-difenilborinato (CAS 524-95-8, Lote 096K2612, SIGMA, EUA); luz ultravioleta (Multiband UV – 254-366nm, modelo UVGL-58, Mineralight® Lamp, Upland, CA, EUA) equipada com gabinete (UVP-Chromato-VUE, modelo CC-10, Upland, CA, EUA); estufa à vácuo (Tencal, modelo TE-385-1, Piracicaba, São Paulo); acetato de etila P.A.(Merck KGaA, Lote: K37251523, Darmstadt, Alemanha); tolueno PA ACS (Merck KGaA, lote: K37362225, Darmstadt, Alemanha); Clorofórmio PA ACS (ECIBRA, lote:17.408, Santo Amaro, São Paulo); éter etílico ABS ACS (ECIBRA, lote: 17.490, Santo Amaro, São Paulo).

Procedimento: soluções dos extratos e dos padrões de referência foram preparadas com acetato de etila. Alíquotas das soluções dos extratos foram aplicadas nas cromatofolhas com auxílio de tubo capilar. Posteriormente, as cromatofolhas foram inseridas em cubas de vidro e eluídas com combinação de diferentes proporções de solventes orgânicos, para as fases móveis. A visualização das bandas geradas pelos compostos que não estavam na região do visível foi realizada através de luz ultravioleta de curto comprimento de onda, 254nm, e longo comprimento de onda, 366nm. Para compostos que não emitiram fluorescências em luz ultravioleta, a visualização das bandas

foi realizada borrifando as placas com soluções de reagentes, que conferem cores aos compostos. A solução do revelador anisaldeído sulfúrico (AS) foi preparada adicionando em erlenmayer de 250 mL, 0,5 mL de p-anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem, pois a reação é intensa. A solução do revelador 2-aminoetil-difenilborinato (NP) foi preparada em erlenmayer de 250mL, onde se adicionou 1 g de 2-aminoetil-difenilborinato em 100 mL de metanol. Depois da revelação das cromatofolhas com os reagentes, as bandas dos compostos foram novamente visualizadas em luz ultravioleta. Para as placas borrifadas com p-anisaldeído, as bandas dos compostos foram visualizadas após aquecimento, em estufa a 373 K por 10 minutos, na região do visível e em luz ultravioleta.

4.4.2 CAROTENÓIDES TOTAIS

A concentração de carotenóides totais nos extratos foi calculada baseada na curva padrão de β -caroteno seguindo metodologia de França et al. (1999) com algumas modificações.

Material: n-hexano PA ACS (96%, Lote K37503274, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) e acetona PA ACS (Lote K37426814, Merk, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 7:3 (vol./vol.); padrão de β -caroteno (95%, UV, Type I, SIGMA, St Louis, MO, EUA); balança analítica (Sartorius analytic A200S, $\pm 0,0001$, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha); ultra-som (Ultra sonic clean, MaxiClean 1400, Unique, Indaiatuba, São Paulo); e espectrofotômetro (modelo U-3010, HITACHI, Tóquio, Japão).

Procedimento: a solução estoque, de n-hexano PA e acetona PA ACS, foi produzida em quantidade suficiente para que fosse usada a mesma solução em todas as diluições, tanto para a determinação da curva padrão de β -caroteno, quanto para a determinação da concentração de carotenóides dos extratos. A curva padrão de β -caroteno foi construída através de solução produzida com o auxílio de espátula de aço inoxidável, onde se pesou 0,0245g de β -caroteno em balão volumétrico de fundo chato (25 mL) tarado em balança analítica. Diluiu-se até aferição com solução estoque de n-hexano e acetona (7:3 vol./vol.) e, com o uso de ultra-som, garantiu-se a completa dissolução do β -caroteno na solução, obtendo-se uma concentração de 0,98 mg/mL. Ensaios preliminares de leitura da absorbância das diluições desta solução permitiram observar que a concentração final de 0,02 mg/mL seria suficiente para se obter os dados de absorbância no intervalo de 0 a 1, onde a Lei de Lambert-Beer é satisfeita. A partir desta solução, alíquotas foram diluídas em seis diferentes concentrações para a

construção da curva padrão de β -caroteno. As soluções dos extratos, SFE e comercial, foram preparadas pesando-se aproximadamente 0,0500g de extrato, com auxílio de espátula de aço inoxidável apoiada em béquer, na balança analítica. Depositou-se esta massa em balão volumétrico de fundo chato (10 mL) e aferiu-se com a solução estoque de n-hexano e acetona. Posteriormente, as leituras das absorbâncias foram realizadas imediatamente, a fim de se evitar degradação do β -caroteno presente, e no comprimento de onda de 450 nm.

4.4.3 FENÓIS TOTAIS

A concentração de fenóis totais nos extratos foi calculada baseada na curva padrão de ácido gálico seguindo metodologia de Singleton & Rossi (1965) com modificações de Cheung et al. (2003) e algumas alterações.

Material: reagente fenólico de Folin & Ciocalteu (Lote 23690, Diadema, São Paulo); solução saturada de carbonato de sódio anidro PA ACS (Na_2CO_3) (99,5%, Lote 16.999, Ecibra, Santo Amaro, São Paulo); álcool etílico ABS ACS (99,5%, Lote 17.439, Ecibra, Santo Amaro, São Paulo); água destilada em destilador (Marconi, modelo MA 078, Piracicaba, São Paulo); padrão de ácido gálico (Lote 023K01171, SIGMA, St Louis, MO, USA); balança analítica (Sartorius analytic A200S, $\pm 0,0001$, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha); balança semi-analítica (Marte, série AS2000, $\pm 0,01\text{g}$, Artlab, São Paulo, São Paulo); e espectrofotômetro (modelo U-3010, HITACHI, Tóquio, Japão).

Procedimento: a solução saturada (~50%) de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi produzida a cada ensaio realizado. Pesou-se em béquer previamente tarado em balança semi-analítica 25g de Na_2CO_3 e diluiu-se em 50 mL de água destilada. A curva padrão de ácido gálico foi construída através de solução preparada com o auxílio de espátula de aço inoxidável, onde se pesou 0,0200g de ácido gálico em balão volumétrico de fundo chato (100 mL) tarado em balança analítica. Diluiu-se até aferição com água destilada obtendo-se uma concentração de 0,2000 mg/mL. Ensaio preliminares de leitura da absorbância das diluições desta solução permitiram observar que a concentrações menores que 0,1000 mg/mL seria suficiente para se obter os dados de absorbância no intervalo de 0 a 1, onde a Lei de Lambert-Beer é satisfeita. A partir desta solução, alíquotas foram diluídas em diferentes concentrações para a construção da curva padrão de ácido gálico. As soluções dos extratos, SFE e comercial, foram preparadas pesando-se aproximadamente 0,0200g de extrato, com auxílio de espátula de aço inoxidável apoiada em béquer, na balança analítica. Depositou-se esta massa em balão volumétrico de fundo chato (5 mL),

diluiu-se com 0,5mL de álcool etílico, e aferiu-se com água destilada. A solução da reação foi preparada para cada solução de extrato, adicionando 1 mL da solução de extrato e 1 mL do reagente fenólico de Folin & Ciocalteu, em balão de fundo chato (10 mL) e homogeneizando-se. Depois de três minutos, adicionou-se 1 mL da solução saturada de carbonato de sódio e imediatamente aferiu-se com água destilada. Esta solução foi mantida no escuro por noventa minutos para que ocorresse a reação e, posteriormente, as leituras das absorbâncias foram realizadas no comprimento de onda de 725 nm.

4.4.4 TOCOFERÓIS TOTAIS

A análise do teor de tocoferóis totais dos extratos foi realizada utilizando o método AOCS Ce 8-89 (2004) por cromatografia líquida de alta eficiência no Laboratório de Óleos e Gorduras/DTA/FEA/UNICAMP.

Material: sistema HPLC (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) com Bomba Waters 515, coluna Hibar RT 250 x 4mm Li Chrosorb Si 60, 5µm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), detector UV / Visível Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, fase móvel com 99% de Hexano e 1% de Isopropanol com taxa de fluxo de 1,0 mL/min.; e comprimento de onda de 292 nm; Interface Peak Simple Chromatography Data System (SRI Instruments Inc., modelo 202, Las Vegas, Nevada, EUA), o volume injetado foi de 20,0 µL.

Procedimento: Pesou-se aproximadamente 100 mg de extrato e depositou-se em balão volumétrico de fundo chato de 10 mL e aferiu-se com hexano. Alíquota desta solução foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a determinação de tocoferóis totais.

4.4.5 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos dos extratos foram determinados seguindo o método AOCS Ce 1c-89 (2004) no Laboratório de Óleos e Gorduras/DTA/FEA/UNICAMP. Os ésteres metílicos foram preparados seguindo metodologia de Hartmann & Lago (1973).

Material: Cromatógrafo Gasoso capilar (CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, Wilmington, Delaware, EUA) equipado com coluna capilar DB-23 AGILENT (US2201526H) (50% cianopropil) – metilpolisiloxano, dimensões 60 m, diâmetro interno: 0,25 mm, 0,25 µm filme. Programação com vazão de 1,00 mL/min.; velocidade linear de 24 cm/seg.; temperatura do detector em 553 K; temperatura do injetor em 523 K;

temperatura do forno com rampa de 383 K por 5 minutos, 383 K à 488 K com taxa de 278K/min., e 488 K por 24 minutos; utilizou-se hélio (Air Liquide Brasil, São Paulo, São Paulo) como gás de arraste; o volume injetado foi de 1,0 μ L.

Procedimento: pesou-se, com auxílio de pipeta Pasteur, aproximadamente 60 mg de extrato em balança analítica e depositou-se em tubo de ensaio com tampa rosqueada. Adicionou-se 4 mL de reagente de saponificação (KOH 0,5M) e agitou-se até completa dissolução do extrato. Posteriormente, aqueceu-se a solução por 5 minutos e depois se resfriou em banho de gelo. Adicionou-se 5 mL de reagente de esterificação (solução metanólica de cloreto de amônia e ácido sulfúrico) e agitou-se. Novamente, aqueceu-se a solução por 5 minutos e depois se resfriou em banho de gelo. Adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaCl e 5 mL de éter de petróleo. Agitou-se por 30 segundos e deixou-se em repouso até separação das fases. Alíquota da fase superior, onde estão os ésteres metílicos, foi transferida para *vials* de 1,5 mL e armazenados em freezer para posterior injeção no cromatógrafo.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos, SFE e comercial (lote: 0000236125), foi determinada através da reação acoplada de β -caroteno e ácido linolênico, segundo metodologia de Hammerschmidt & Pratt (1978) adaptada por Leal et al. (2003) para extratos obtidos via extração supercrítica.

Material: Clorofórmio PA ACS (99%, Lote 17408, Ecibra, Santo Amaro, São Paulo); ácido linolênico (99%, Lote 037K1045, SIGMA, Darmstadt, Alemanha); β -caroteno (95%, UV, Tipo I, SIGMA, St Louis, MO, EUA); Tween 80[®] (Lote 046K0128, SIGMA-ALBRICH, Darmstadt, Alemanha); água destilada em Destilador (Marconi, modelo MA 078, Piracicaba, São Paulo); tubos Ependorf (1,5 mL, Lote 05P1014501); balança analítica (Sartorius analytic A200S, $\pm 0,0001$, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha); ultrasom (Ultra sonic clean, MaxiClean 1400, Unique, Indaiatuba, São Paulo); rota evaporador (Laborota 4001 WB, Heidolph e CH-9230, Buchi, Flawil, Switzerland); Agitador de tubos (Phoenix, modelo AP56, Araraquara, São Paulo), Banho (Marconi, modelo MA127/BO, Piracicaba, São Paulo); e espectrofotômetro (modelo U-3010, HITACHI, Tóquio, Japão).

Procedimento: As soluções dos extratos, SFE e comercial, foram preparadas pesando-se aproximadamente 0,0200g de extrato, com auxílio de espátula de aço inoxidável apoiada em béquer, na balança analítica. Depositou-se esta massa em tubo

Ependorf (1,5 mL) e, com o auxílio de ultra-som, diluiu-se em 1 mL de álcool etílico. Os tubos foram fechados e mantidos em freezer doméstico até realização das análises. A solução de substrato foi preparada em balão de fundo redondo de 50 mL apoiado em béquer na balança analítica, previamente tarado. Com auxílio de espátula de aço inoxidável, pesou-se 0,0100 g de β -caroteno e se adicionou ao balão. Com auxílio de seringa e agulha, pesou-se 0,0600g de ácido linolênico e com o auxílio de pipeta automática, pesou-se 0,2000g de Tween 80[®]. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio ao balão e homogeneizou. Esta foi concentrada em rota evaporador até completa remoção do clorofórmio e suspendida em 50 mL de água destilada. A solução de reação foi preparada em tubos de ensaio. Adicionou-se 2 mL de água destilada em cada tubo e, posteriormente, acrescentou-se 0,05 mL das soluções de extrato (para os tubos que serviram de controle, adicionou-se 0,05 mL de álcool etílico). Adicionou-se 1 mL da solução de substrato em cada tubo, homogeneizou em agitador de tubos e imediatamente realizou-se a leitura em espectrofotômetro, iniciando a contagem do tempo. As leituras das absorbâncias foram realizadas no comprimento de onda de 470 nm nos intervalos de 0, 1, 2 e 3 horas. Durante os intervalos das leituras, os tubos permaneceram em banho-maria à temperatura de 313 K.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de estatística MINITAB[®] (Release 14.12.0, Minitab Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Antes de se iniciar as medições com os instrumentos e equipamentos utilizados, identificaram-se os limites de precisão que poderiam ser obtidos. Para diminuir a incerteza do resultado final, realizaram-se as medições físicas não uma vez só, mas mais de uma vez para as mesmas condições experimentais. Com a repetição, diminuiu-se a influência de erros causados por erros provenientes de aparelhagem e equipamentos e erros impossíveis de se prever, erro sistemático e aleatório, respectivamente, para se obter resultados muito mais próximos do verdadeiro valor da grandeza medida do que os obtidos com a medição única. Os resultados obtidos com medição única foram devidos à limitação da quantidade de extrato.

5.1 CAFÉ VERDE (*COFFEA ARABICA*)

5.1.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Experimentou-se simular a quebra de sementes de café verde por prensagem. Inicialmente, tentou-se quebrar as sementes utilizando-se de triturador doméstico e observou-se que nem todas as sementes foram quebradas, onde sementes sem defeitos continuaram inteiras e sementes defeituosas quebraram-se.

Outro método foi utilizado, depositando-se as sementes em saco plástico e, com auxílio de utensílio adequado, realizou-se a quebra das sementes de forma que nenhuma semente ficou inteira. Posteriormente, foi classificada quanto ao tamanho, usando peneiras de 6 a 16 *mesh*, e as partículas finas que poderiam obstruir a linha do Spe-ed SFE, durante a extração, foram retiradas.

Toda a massa retida nas peneiras foi acondicionada e identificada como CVQ. O rendimento das sementes após quebra e classificação foi de aproximadamente 98%.

A distribuição do tamanho das partículas para as sementes de café verde está apresentada na Figura 5.1.

A composição centesimal de café verde com $8,5 \pm 0,1\%$ de umidade está apresentada na Lago (2001) reportou teores de lipídios de trabalhos realizados com café verde (*Coffea arabica*) em base seca, onde foram encontrados valores entre 12 e 20%. O tipo de extração e o solvente utilizado no processo de extração de lipídios influenciam não só o rendimento como também a qualidade do óleo de café (LAGO, 2001).

Tabela 5.1 em base seca. Os dados obtidos em triplicata estão expressos como média mais ou menos a amplitude. Os lipídios foram extraídos durante 12 horas com éter etílico P.A. (Synth, lote: 63.384, Diadema, São Paulo) e os carboidratos e as fibras foram calculados pela diferença, após a determinação de proteínas.

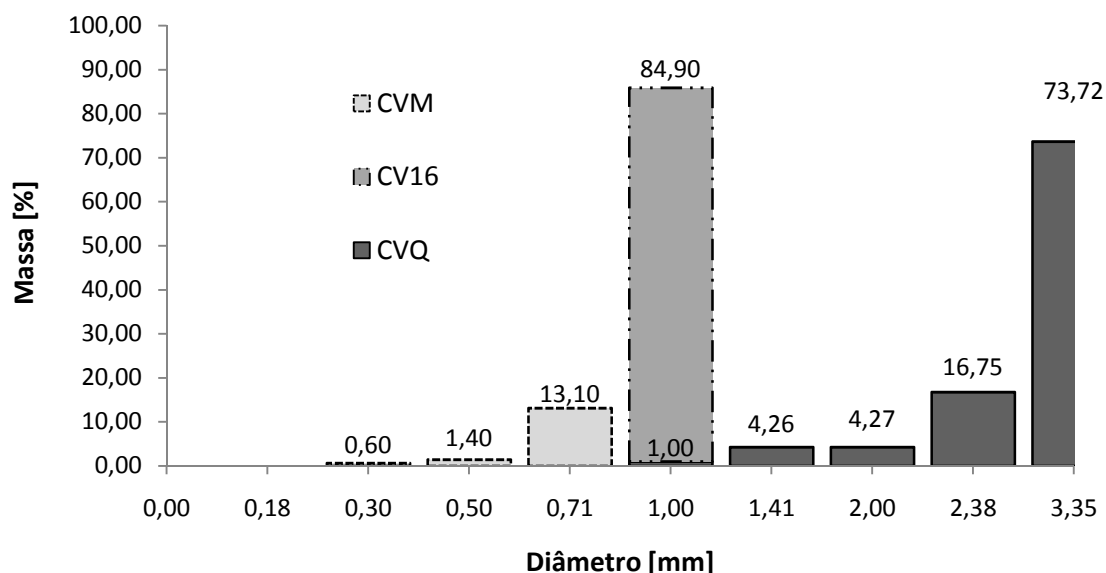


Figura 5.1 - Distribuição de tamanho de partículas de sementes de café verde: CVM: café verde moído; CV16: café verde *mesh* 16; CVQ: café verde quebrado.

Lago (2001) reportou teores de lipídios de trabalhos realizados com café verde (*Coffea arabica*) em base seca, onde foram encontrados valores entre 12 e 20%. O tipo de extração e o solvente utilizado no processo de extração de lipídios influenciam não só o rendimento como também a qualidade do óleo de café (LAGO, 2001).

Tabela 5.1 – Composição centesimal de sementes de café verde [g/100g em base seca].

Cinzas	Proteínas	Lipídios	Carboidratos + fibras
4,9 ± 0,1	16,4 ± 0,5	21 ± 2	49,21

As sementes de café verde CVI, CVQ, CV16 e CVM foram utilizadas em extrações a fim de se caracterizar o extrato quanto à composição química e, a partir desta observação, escolher a granulometria que melhor rendimento possui em compostos de interesse.

5.1.2 EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO

5.1.2.1 Ensaios preliminares

Ensaios preliminares de extração supercrítica de café verde foram realizados nas condições de 323 K de temperatura e 30 MPa de pressão. Os rendimentos estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Parâmetros dos ensaios preliminares de extração com CO₂ supercrítico de sementes de café verde (X_0 323 K / 30MPa).

Amostra	Vazão CO ₂ [kg/s]	Razão S/F	Rendimento [%]
CVI	$10,30 \times 10^{-5}$	14,82	0,19
CVQ	$12,26 \times 10^{-5}$	17,65	0,78
CV16	$11,64 \times 10^{-5}$	16,73	2,73
CVM	$9,79 \times 10^{-5}$	14,09	6,37

Observando-se o limite máximo de vazão do equipamento Spe-ed SFE, onde a vazão máxima medida pelo rotâmetro é de 8 L/min. ($\cong 2,4 \times 10^{-4}$ kg/s, T= 300 K e P=0,1MPa), efetuou-se o cálculo da vazão mássica do solvente, adotando-se uma quantidade de solvente 18 vezes maior que a quantidade de matéria-prima, S/F=18, para uma vazão média onde a duração da extração não fosse menos que 1 hora e também não fosse tão longa que a vazão ficasse muito baixa, obtendo-se uma vazão média de 4,5 L/min. ($\cong 1,2 \times 10^{-4}$ kg/s, T= 300 K e P=0,1 MPa).

5.1.2.2 Determinação do Rendimento Global (X_0)

A condição adotada para a determinação do rendimento global de café verde foi de 323 K, 30 MPa, tempo de extração de 2 horas (7200s) e razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima (S/F) igual a 18.

Os dados de teor de água presente, de conteúdo lipídico extraível, densidade aparente do leite de extração, vazão média de solvente e rendimento global, em diferentes tamanhos de partículas, estão apresentados na Tabela 5.3.

Observou-se que, para as mesmas condições de temperatura e pressão, a quantidade de extrato obtido de sementes moídas foi superior que a de sementes quebradas, o que pode ser atribuída à quebra da estrutura do grão com o processo de

moagem aumentando a superfície de contato entre o soluto e o solvente melhorando a eficiência da transferência de massa.

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para os dados experimentais de rendimento global de café verde, indicando que o efeito do diâmetro sobre o rendimento global foi significativo ($P_{\text{valor}} \cong 0,000$).

Tabela 5.3 – Teor de água, de lipídio extraível, densidade aparente do leito, vazão de extração e rendimento global de amostras de café verde (CV) utilizando diferentes tamanhos de partículas ($X_{0.323 \text{ K/30MPa S/F=18.}}$).

CV	Água [g _{água} /100g CV]	Lipídio extraível [%]	Densidade aparente [kg/m ³]	Vazão média [×10 ⁻⁵ kg/s]	Rendimento extrato [%]
CVQ	11,0 ± 0,1	3 ± 2	612	12,36	0,9 ± 0,2
CV16	9,0 ± 0,3	nd ¹	713	12,11	4 ± 2
CVM	8,5 ± 0,1	21 ± 2	713	11,37	8 ± 1

¹nd = não determinado

A umidade determinada para a caracterização do café verde foi inferior a quantidade de água determinada para o CVQ e o CV16. Presume-se que a perda de água deveu-se ao aumento da superfície de contato do grão de café verde durante o preparo e armazenamento, o que pode ter ocorrido em menor proporção para as outras amostras.

Os teores de lipídio extraível e os rendimentos de extrato mostraram que o rendimento de lipídio bruto é função, além da temperatura e pressão de extração, do tamanho da partícula e área de superfície, escolha do solvente e duração de extração, ressaltando a importância do estudo dos processos de extração como também de suas variáveis.

5.2 PEQUI (CARYOCAR BRASILIENSE CAMB.)

5.2.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Na avaliação da influência do pré-tratamento da polpa de pequi no processo de extração do óleo, em batelada, utilizando acetona como solvente, Aquino (2007) concluiu que a umidade influencia no processo de extração e que o maior rendimento do extrato oleaginoso da polpa de pequi se obtém com a secagem antes do processo de extração.

Devido ao alto teor de óleo presente na polpa de pequi, observou-se experimentalmente que seria inviável a caracterização da matéria-prima *in natura* quanto

à redução e classificação de tamanho, assim como a extração, como foi observado por Aquino (2007). Portanto, realizou-se a secagem da amostra em estufa a 318 K, com convecção forçada de ar, por um período de vinte e quatro horas. Após a secagem, mediu-se a massa de matéria-prima seca, e observou-se que seu rendimento foi de aproximadamente 25% na operação da secagem e que devido ao seu aspecto seria recomendável se congelar a matéria-prima PQ-155 antes da moagem, pois o óleo exsudava da polpa seca. Portanto, acondicionou-se a amostra seca em sacos plásticos, depositou-se dentro de sacos plásticos de cor escura, e armazenou-se em freezer doméstico a 255 K para que na realização da moagem da matéria-prima ainda congelada se evitasse a perda pelo aquecimento causado pelo atrito.

Na moagem, percebeu-se que grande quantidade de partículas ficou aderida nas paredes do moinho, verificando perda de matéria-prima em cerca de 10%. Necessitou-se fazer uso de triturador doméstico (liquidificador) para desagregar as partículas que se formaram nas paredes do moinho. Os dados de rendimento das etapas de preparo da matéria-prima estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Dados de rendimento das etapas de preparo da matéria-prima PQ-155

Etapas	Entrada [g]	Saída [g]	Rendimento [%]
Secagem	280,56	75,53	26,92
Moagem	75,53	67,96	89,98

Após a moagem, a matéria-prima foi acondicionada em saco de polietileno, depositada em saco escuro e armazenada em *freezer* doméstico a 255 K. Percebeu-se posteriormente que quantidades de óleo ficavam agregadas no plástico que o acondicionava, dificultando o manuseio da matéria-prima. A amostra PQ-155 foi utilizada para fins de testes preliminares de preparo e extração, a fim de se familiarizar com a matéria-prima.

As determinações das características físicas e de composição centesimal, das isotermas de rendimento global e dos parâmetros cinéticos do trabalho foram realizadas utilizando a amostra PQ, definida para o estudo.

Sabendo-se do rendimento nas etapas de preparo da amostra PQ-155, quantidade suficiente da amostra PQ foi preparada para ser utilizada na caracterização e em todas as condições de extração a serem estudadas.

Aproximadamente 2400 g de amostra de PQ foi parcialmente descongelada em temperatura ambiente, 301 K, por aproximadamente três horas. Separaram-se as lascas, uma a uma, e acomodou-se em reservatório plástico, forrado com papel alumínio, de maneira que não se sobrepusessem umas sobre as outras para facilitar a saída de água na etapa da secagem. Realizou-se a secagem da amostra em estufa a 318 K, com convecção forçada de ar, por um período de vinte e quatro horas. Após a secagem, acondicionou-se a amostra seca no mesmo reservatório plástico utilizado para a secagem e armazenou-se em freezer doméstico a 255 K até a realização da moagem e peneiramento.

A amostra PQ foi moída, ainda congelada, para evitar deterioração de compostos de interesse pelo atrito da moagem. Por ser muito oleosa, mesmo congelada, a amostra ficou agregada nas paredes do moinho, formando placas que só puderam ser retiradas com o auxílio de espátula, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 90%. A matéria-prima foi triturada em triturador doméstico e peneirada para a retirada de finos e foi acondicionada em béqueres envolvidos com alumínio, foi depositada em saco de polietileno e armazenada em *freezer* doméstico a 255 K. O acondicionamento da amostra PQ em béquer facilitou o manuseio e não houve perda por agregação nas paredes. A quantidade de matéria-prima após a etapa de preparo foi de 604,47 g o que foi previsto com os dados descritos com a amostra PQ-155.

O tamanho das partículas ficou distribuído como mostra a Figura 5.2, onde aproximadamente 99% das partículas possuem diâmetro maior 0,700 mm.

A caracterização química da amostra PQ, após a etapa de secagem, está apresentada na Tabela 5.5 e os dados obtidos em triplicata estão expressos como média mais ou menos a amplitude. Os lipídios foram extraídos durante 12 horas com éter de petróleo P.A. (Synth, lote: 63.384, Diadema, São Paulo) e os carboidratos e as fibras foram calculados pela diferença, após determinação de proteínas.

Após extração exaustiva com éter de petróleo, a amostra PQ apresentou aparência de esgotamento, com perda de sua cor característica, conforme Figura 5.3.

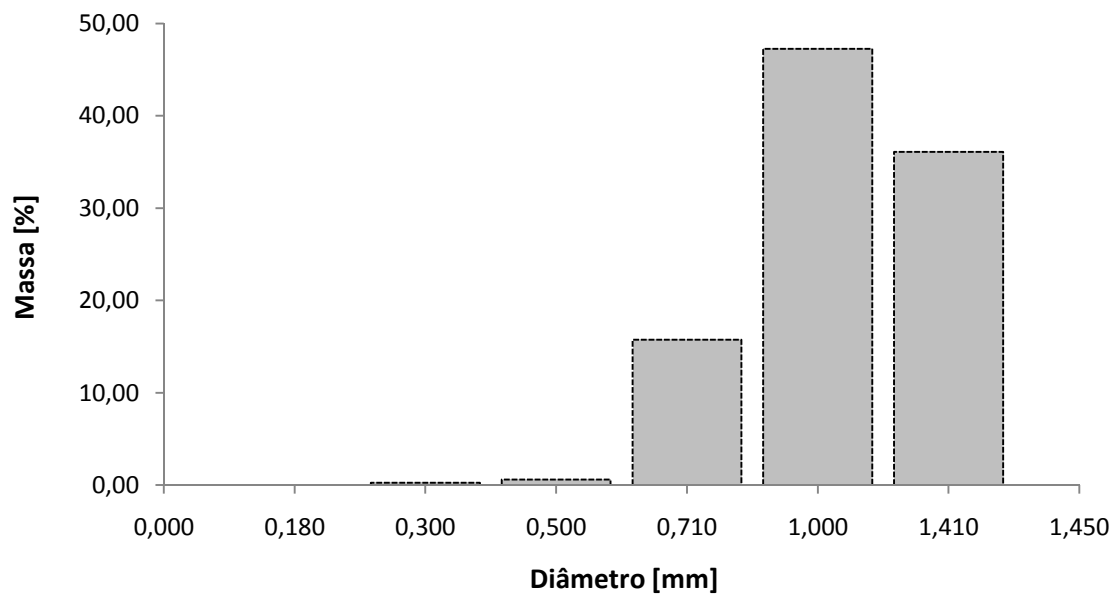


Figura 5.2 - Distribuição do tamanho das partículas da amostra PQ.

Tabela 5.5 – Composição centesimal de PQ [g/100g].

Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios	Carboidratos + Fibras
6,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	7,0 ± 0,4	64 ± 1	21,60



Figura 5.3 – Amostra PQ após extração exaustiva em aparelho sohxlet por 12 horas com éter de petróleo como solvente.

5.2.2 EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO

5.2.2.1 Ensaios preliminares

Com base no alto rendimento em lipídios de pequi descrito na literatura, 61,79% (FERREIRA et al. 1987, apud OLIVEIRA et al. 2006), e posteriormente pôde ser comprovado pela composição centesimal (

Tabela 5.5), decidiu-se aumentar a quantidade de solvente e diminuir a massa de amostra para a realização da extração com fluido supercrítico, adotando-se a razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima igual a 22.

A partir da razão S/F e da limitação de vazão comportada pelo equipamento, o tempo de duração da extração foi estimado em 1 hora e a vazão em $12,23 \times 10^{-5}$ kg/s, para uma quantidade de aproximadamente 20,00 g de amostra PQ-155. Ensaios preliminares de extração foram realizados nas condições de 323 K de temperatura e 30 MPa de pressão, em duplicata. A densidade aparente do leite de extração foi igual a 425 kg/m³, para a célula de extração de 300 mL. Os dados obtidos estão apresentados como média de rendimento em base seca mais ou menos a amplitude, como mostra a Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Parâmetros dos ensaios preliminares de extração com CO₂ supercrítico de PQ-155 (X_0 323 K / 30 MPa).

Vazão CO ₂ [kg/s]	Razão S/F	Rendimento [%]	Amplitude [%]
$12,23 \times 10^{-5}$	22	19,0	± 0,9

Observou-se que a massa de amostra PQ-155, retirada do leite de extração após as extrações, mostrava-se com grande quantidade de óleo levando-se a conclusão de que a quantidade de solvente poderia ser aumentada para se obter um maior rendimento e possível esgotamento do leite. Para validar essa hipótese, foi realizada uma cinética piloto, descrita no item 5.2.2.2, a fim de se obter dados que pudessem fornecer informações sobre a quantidade de solvente e duração do período de extração, para obtenção do rendimento global, necessárias para se utilizar uma menor quantidade de amostra na alimentação, utilizando a célula de 5 mL, o que demandaria menor tempo de preparo do leite, de pressurização e de despressurização do sistema entre uma extração e outra, e também obter uma massa de extrato suficiente para a realização de todas as análises químicas.

5.2.2.2 Cinética piloto

Cinéticas pilotos foram realizadas em célula de 300 mL nas condições de 323 K de temperatura e 30 MPa de pressão, utilizando aproximadamente 20,00 g de amostra PQ cada uma.

A cinética com duração de 3,5 horas foi identificada como 1102 e o rendimento global da extração, em base seca, em função do tempo está apresentada na Figura 5.4.

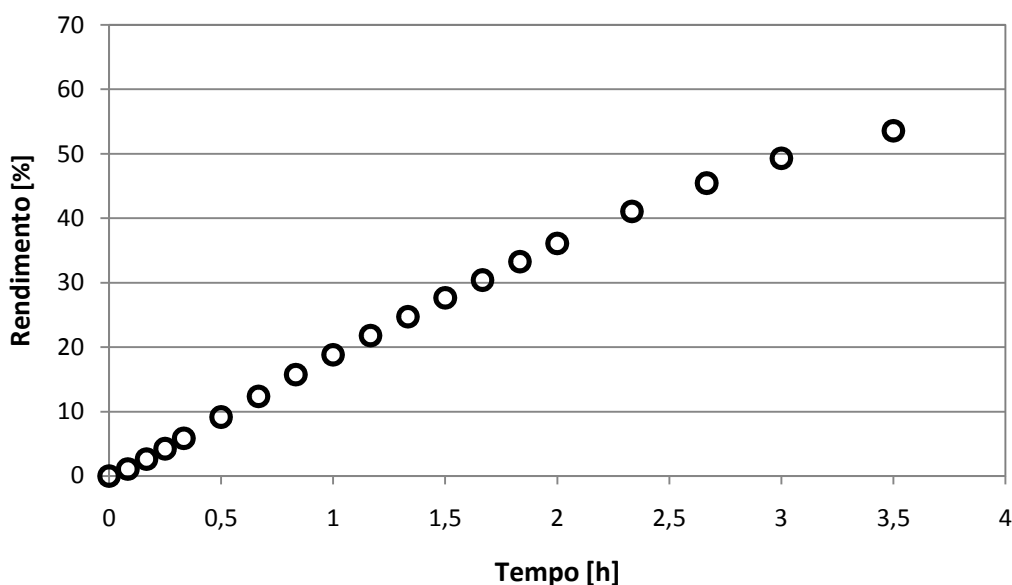


Figura 5.4 - Cinética piloto 1102: $t = 3,5$ h; $T = 323$ K; $P = 30$ MPa; $Q_{CO_2} = 12,10 \times 10^{-5}$ kg/s.

Verificou-se que o tempo não foi suficiente para o esgotamento do leito, pois ao final das 3,5 horas observou-se extrato saindo no frasco coletor. O fato foi confirmado observando-se a aparência da amostra após a extração, apresentadas na Figura 5.5, onde indica a necessidade de maior tempo de duração da cinética de extração para esgotamento do leito.



Figura 5.5 – Amostra de PQ após cinética piloto 1102.

A cinética com duração de 8 horas foi identificada como 1302. O período de extração foi suficiente para o esgotamento do leito, pois ao final da extração não mais era observada saída de extrato no frasco coletor. Confirmou-se o esgotamento do leito observando-se a aparência da amostra, apresentada na Figura 5.6.



Figura 5.6 - Amostra de PQ após cinética piloto 1302.

Os pontos experimentais obtidos pela cinética de extração 1302 de PQ, em base seca, foram ajustados a um *spline* com o auxílio de planilha Excel, conforme descrito no item 4.3.4.1, com 3 retas para a determinação das taxas de transferências de massa nas etapas de taxa constante, decrescente e controlada pela difusão (Figura 5.7).

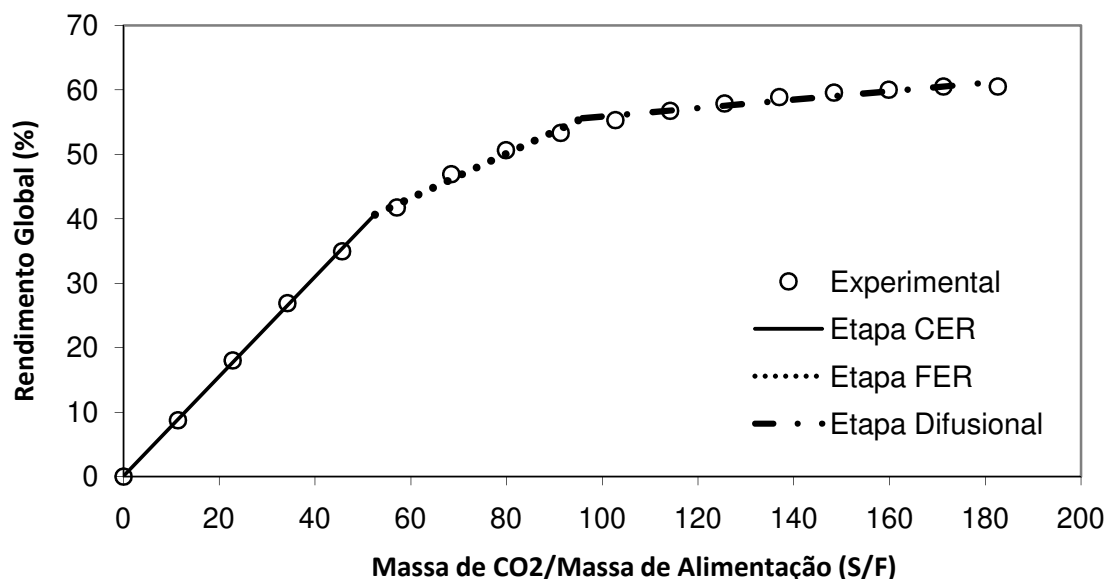


Figura 5.7 - Ajuste linear de 3 retas à curva global de extração obtida pela cinética piloto 1302: $t = 8$ h; $T = 323$ K; $P = 30$ MPa; $Q_{CO_2} = 12,70 \times 10^{-5}$ kg/s.

Os parâmetros da etapa CER, t_{CER} [min.], M_{CER} [kg/s] e Y_{CER} [g_{ext}/100g_{CO₂}] calculados pelo modelo obtido através do ajuste ao *spline*, estão apresentados na Tabela 5.7. O rendimento para a condição adotada na cinética e para esta etapa de extração foi calculado multiplicando-se a razão mássica de extrato na saída do leito (Y_{CER} [g_{ext}/100g_{CO₂}]) pela razão S/F [g_{CO₂}/g_{Alimentação}].

Tabela 5.7 – Dados da etapa de taxa constante de extração obtidos através do ajuste não linear de três retas à curva obtida pela cinética 1302.

t_{CER} [min.]	Q_{CO_2} [kg/s]	M_{CER} [kg/s]	Y_{CER} [g _{ext} /100g _{CO₂}]	S/F [g _{CO₂} /g _{Alimentação}]	R_{CER} [%]
138	$12,7 \times 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-5}$	0,77	56,11	43,41

Com os resultados obtidos, verificou-se que a taxa constante de extração (CER) termina aos 138 minutos e com uma massa de solvente 56,11 vezes maior que a massa de amostra utilizada para alimentar o leito (S/F), o que validou a hipótese de que maior quantidade de CO₂ deveria ser utilizada nos ensaios para a determinação das isotermas de rendimento global da amostra PQ.

A partir destes resultados, pôde-se calcular a massa de solvente e o tempo de duração de extração, necessários para a determinação das isotermas de rendimento global, e conseqüentemente, a vazão do solvente.

5.2.2.3 Isotermas de Rendimento Global (GYI)

Para a determinação das isotermas de rendimento global testou-se a quantidade máxima de amostra que a célula de 5 mL comportaria, onde aproximadamente 5,00 g de massa da amostra PQ couberam no extrator. Para a extração dessa quantidade de matéria-prima, usando a vazão mínima permitida pelo rotâmetro, 2,5 L/min. ($\cong 75,4 \times 10^{-4}$ kg/s, $T = 300$ K e $P = 0,1$ MPa), e um período de, no mínimo, 1 hora de extração, a massa mínima necessária de solvente foi de 0,247 kg de CO_2 . Logo, a razão entre massa de solvente (S) e massa de alimentação (F) seria no mínimo 50. Decidiu-se adotar a razão $S/F = 60$, pois observando os dados obtidos pelo ajuste da curva da cinética 1302, apresentada na Figura 5.7, esta razão seria mais adequada. A densidade aparente do leite de extração foi igual a 1090 kg/m^3 , para a célula de extração de 5 mL.

As isotermas de rendimento global estão apresentadas na Figura 5.8, onde os rendimentos globais foram expressos em função das pressões. As barras de erros estão representadas pelas amplitudes, diferença entre o máximo valor observado e o mínimo valor observado.

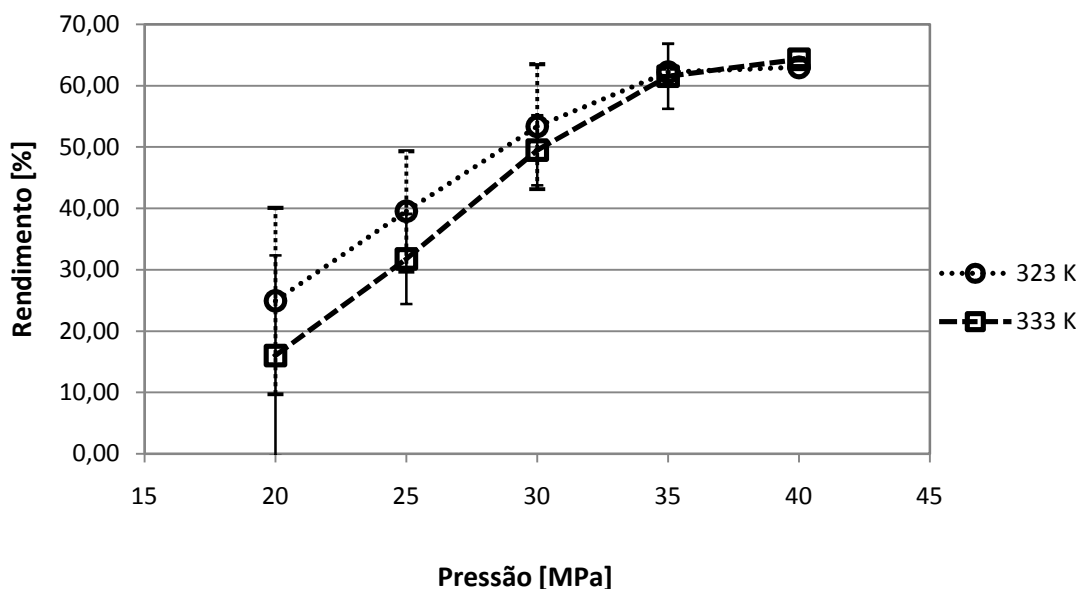


Figura 5.8 – Isotermas de Rendimento Global de PQ: $t=60$ min.; $S/F= 60$; $Q_{\text{CO}_2}= 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Uma análise de variância (ANOVA) juntamente com o teste de comparação múltipla de Tukey para um nível de significância de 5%, foi realizada para os dados experimentais das isotermas de 323 K e 333 K, e pressões de 20, 25, 30, 35 e 40 MPa.

Para a temperatura de 323 K, o rendimento global foi significativamente diferente para a pressão de 20 MPa em relação às demais. A pressão não influenciou significativamente (5%) nos rendimentos obtidos entre as pressões de 25 e 30 MPa, e 30, 35 e 40 MPa. Para a temperatura de 333 K, as diferenças foram estatisticamente significativas entre a pressão de 20 MPa e de 25 MPa com as demais. Os rendimentos não diferiram significativamente (5%) para as pressões de 30 MPa com 35 MPa, e de 35 MPa com 40 MPa.

Entre as temperaturas, os rendimentos globais não diferiram significativamente para as mesmas pressões. Entre as condições de temperatura e de pressão de extração, as médias entre os rendimentos globais para pressões maiores que 30 MPa não diferiram significativamente, como apresentado na Tabela 9.3, anexa.

Diante do exposto, concluiu-se que o rendimento global não apresentou diferença significativa para as pressões de extração maior ou igual a 35 MPa. Logo, considerando a possível degradação térmica dos compostos de interesse e também os custos de energia gastos no processo por aquecimento, realizou-se o estudo da curva global de extração (OEC) em 323 K e 35 MPa, para se determinar o tempo de taxa constante de extração, assim como o rendimento nesta etapa.

5.2.2.4 Cinética de extração e cálculo dos parâmetros cinéticos

A condição de 323 K e 35 MPa foi selecionada para a realização do ensaio cinético da amostra PQ, onde a duração foi de 8 horas e 20 min., suficientes para o esgotamento do leite, como pode ser observado na Figura 5.9.



Figura 5.9 - Amostra de PQ antes e após a realização da cinética de extração.

Os pontos experimentais obtidos foram ajustados a um *spline* com 3 retas, com o auxílio de planilha Excel conforme descrito no item 4.3.4.1, para a determinação das taxas de transferências de massa nas etapas de taxas constante, decrescente e controlada pela difusão e estão apresentados na Figura 5.10.

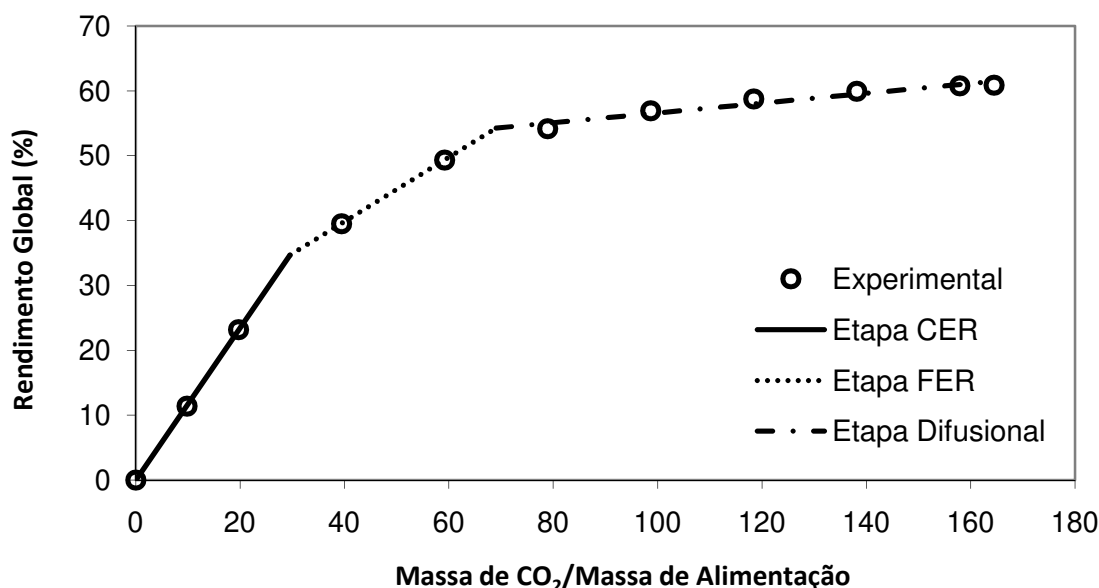


Figura 5.10 - Ajuste linear de 3 retas à curva global de extração obtida pela cinética: $t = 8\text{h } 20\text{ min.}$; $T = 323\text{ K}$; $P = 35\text{ MPa}$; $Q_{\text{CO}_2} = 11,57 \times 10^{-5}\text{ kg/s}$.

Os parâmetros da etapa CER, t_{CER} [min.], M_{CER} [kg/s] e Y_{CER} [g_{ext}/100g_{CO₂}] calculados pelo modelo obtido através do ajuste ao *spline*, estão apresentados na Figura 5.10. O rendimento para a condição adotada na cinética e para esta etapa de extração foi calculado multiplicando-se a razão mássica de extrato na saída do leito (Y_{CER} [g_{ext}/100g_{CO₂}]) pela razão S/F [g_{CO₂}/g_{Alimentação}].

Tabela 5.8 - Dados da etapa de taxa constante de extração obtidos através do ajuste não linear de três retas aos pontos experimentais obtidos da cinética de extração da amostra PQ : $t = 8\text{h } 20\text{ min.}$; $T = 323\text{ K}$; $P = 35\text{ MPa}$; $Q_{\text{CO}_2} = 11,57 \times 10^{-5}\text{ kg/s}$.

t_{CER} [min.]	Q_{CO_2} [kg/s]	M_{CER} [kg/s]	Y_{CER} [g _{ext} /100g _{CO₂}]	S/F [g _{CO₂} /g _{Alimentação}]	R_{CER} [%]
90	$11,57 \times 10^{-5}$	$13,55 \times 10^{-5}$	1,17	31,64	37,02

Com os resultados obtidos, verificou-se que a taxa constante de extração (CER) termina aos 90 minutos e com uma massa de solvente 31,64 vezes maior que a massa de amostra utilizada para empacotar o leito (S/F).

Esses dados servirão de parâmetros para cálculos de custo de manufatura necessários para o estudo da viabilização de uma planta industrial.

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

5.3.1 ANÁLISE QUALITATIVA

Wagner & Bladt (1996) realizaram estudos para a identificação de diferentes compostos químicos de várias plantas com a técnica de cromatografia em camada delgada. A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura por migração diferencial sobre uma camada delgada, com propriedades adsorventes, preso sobre uma superfície plana. O soluto é separado entre uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida (CECCHI, 2003). Diferentes composições de solventes para a fase móvel assim como diferentes soluções para uso como reveladores foram utilizados. Porém, os compostos químicos podem não ter o mesmo comportamento elucidado na literatura dependendo da matriz vegetal de origem, e por isso o estudo da composição da fase móvel se faz necessária para facilitar a identificação dos compostos de interesse com auxílio de padrões de referência.

A solução de p-anisaldeído sulfúrico, denominada de AS, foi utilizado como reagente revelador de compostos fenólicos. Após a aplicação das soluções na cromatofolha, a mesma foi aquecida por 10 minutos a 373 K, as bandas dos compostos foram visualizadas no visível ou em luz ultravioleta em 365 nm, onde este foi possível porque a cromatofolha era de sílica UV-sensível. AS detecta também terpenóides, princípios pungentes e amargos e saponinas. O comportamento fluorescente é dependente da estrutura química. A solução 1% metanólica de 2-aminoetil-difenilborinato, denominada de NP, foi utilizada como reagente revelador de flavonóides, os quais se caracterizam por fluorescências, observadas em luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, predominantemente laranjas e amarelo-esverdeado para as flavonas e alguns tipos de flavonóis; e verde-escuro para alguns tipos de flavononas. Ácidos carboxílicos fenólicos aparecem como azul brilhante (WAGNER & BLADT, 1996).

5.3.1.1 *Café verde (Coffea arabica)*

Para a detecção dos compostos fenólicos e flavonóides de extratos supercríticos de café verde, a fase móvel foi composta de tolueno, clorofórmio e éter etílico na proporção de 43:43:14. As concentrações das soluções dos extratos supercríticos e

extratos comerciais de café verde utilizadas para aplicação nas cromatofolhas estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Identificação e concentrações dos extratos supercríticos (323 K / 30 MPa) e comerciais de café verde utilizados para análise em cromatografia em camada delgada (CCD).

Extrato	Concentração [mg/mL]	Identificação
Grãos Poli-óleos	199,7	1
Maceração	47,6	2
Poli-o	802,2	3
0003	812,5	4
CVI	40,3	5
CVQ	41,7	6
CVM	43,7	7
CV16	44,0	8
Ácido caféico (padrão)	6,4	ac
Cafeína (padrão)	11,3	c

As concentrações das soluções de extratos supercríticos foram baixas devido à limitação de quantidade de extrato. As concentrações dos extratos comerciais foram mais altas para se verificar a presença de compostos que não foram vistos em concentrações menores, o que ocorreu em ensaios preliminares.

Os compostos fenólicos de café verde foram visualizados nas cromatofolhas sem tratamento químico e com tratamento químico (revelador anisaldeído sulfúrico, AS), conforme apresentado na Figura 5.11, Figura 5.12 e Figura 5.13.

As purinas, pertencentes ao grupo dos alcalóides, são representadas pela cafeína. Seu teor em grãos de cafés crus (*Coffea arábica*) varia fortemente com a espécie da planta e é da ordem de 1,2% em base seca (MACRAE, 1985 apud CAMARGOS, 2005). Valores aproximados também foi encontrado por Ky et al. (2001): 0,96% a 1,62%. A visualização da cafeína na cromatografia em camada delgada foi possível sem tratamento químico (revelador) e em luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, em destaque na Figura 5.11.

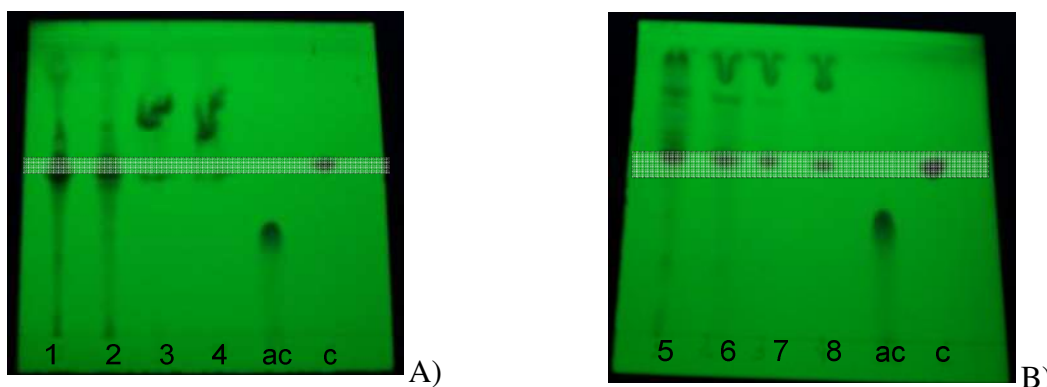


Figura 5.11 – Compostos fenólicos em UV-254 nm sem tratamento químico: A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4: 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.

Observou-se que os extratos supercríticos de café verde, Figura 5.12 (B), as bandas foram semelhantes, onde para a amostra CVI se mostraram mais concentradas. As bandas visualizadas na fronteira do eluente têm características de ácidos graxos (em formato de “U”).

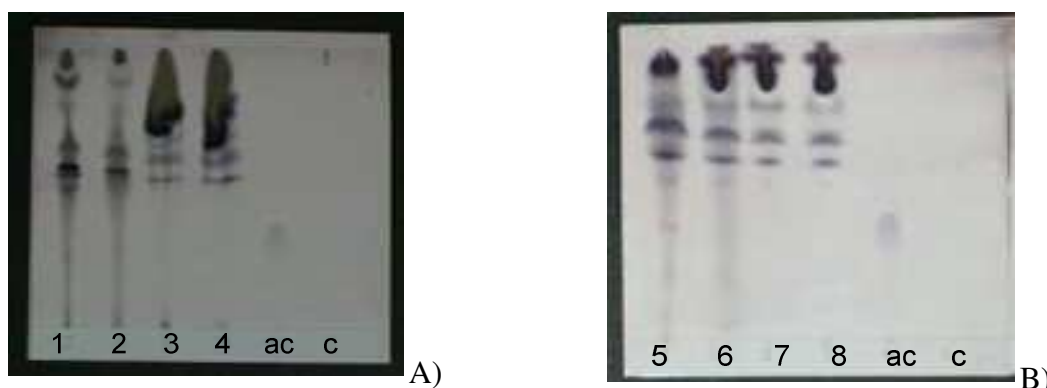


Figura 5.12 – Compostos fenólicos no visível com tratamento químico (AS): A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4- 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.

A cromatofolha utilizada para a visualização de compostos fenólicos possuía sílica UV-sensível e por isso foi possível a visualização em UV-366 nm dos ácidos carboxílicos fenólicos em azul brilhante, em destaque na Figura 5.13.

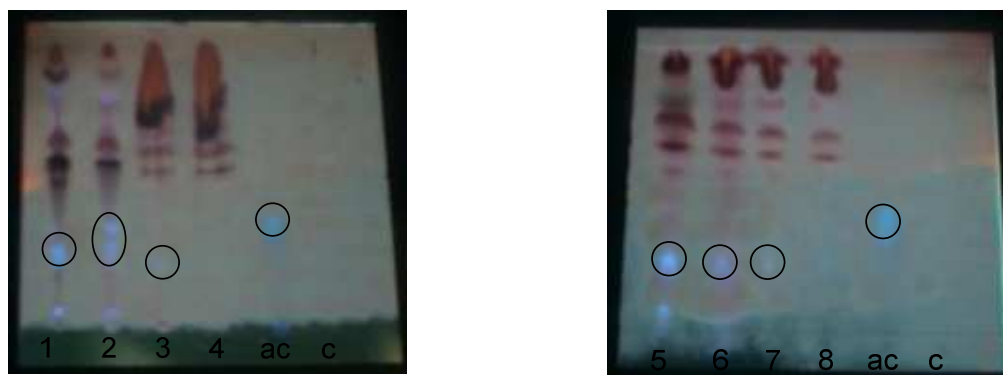


Figura 5.13 - Compostos fenólicos em UV-366 nm com tratamento químico (AS): A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4- 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.

Os flavonóides de café verde foram visualizados nas cromatofolhas conforme apresentados na Figura 5.14.

Os alcalóides foram visualizados em comprimento de onda de 366 nm. Na Figura 5.14, apresentam-se com cor azul, azul-esverdeado ou violeta, com várias bandas indicando a presença de flavonóides de tipos diferentes.

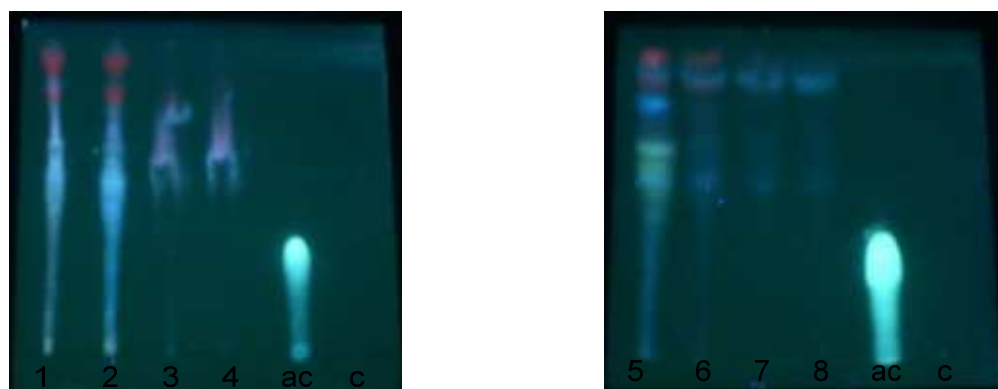


Figura 5.14 - Flavonóides em UV-366nm com tratamento químico (NP): A) amostras comerciais de Café verde: 1: Grãos Poli-óleos; 2: Maceração; 3: Poli-o; 4- 0003. B) extratos supercríticos de café verde: 5: CVI; 6: CVQ; 7: CVM; 8: CV16. ac: padrão ácido caféico; c: padrão cafeína.

5.3.1.2 *Pequi (Caryocar brasiliense Camb)*

Para a detecção dos compostos fenólicos e flavonóides de extratos de PQ, a fase móvel foi composta de tolueno, clorofórmio e éter etílico na proporção de 70:15:15.

Uma amostra de extrato supercrítico de PQ de cada condição de extração estudada foi utilizada para a preparação das soluções a serem aplicadas nas cromatofolhas. As concentrações destas soluções foram de aproximadamente 40 mg/mL devido a limitação de quantidade de extrato.

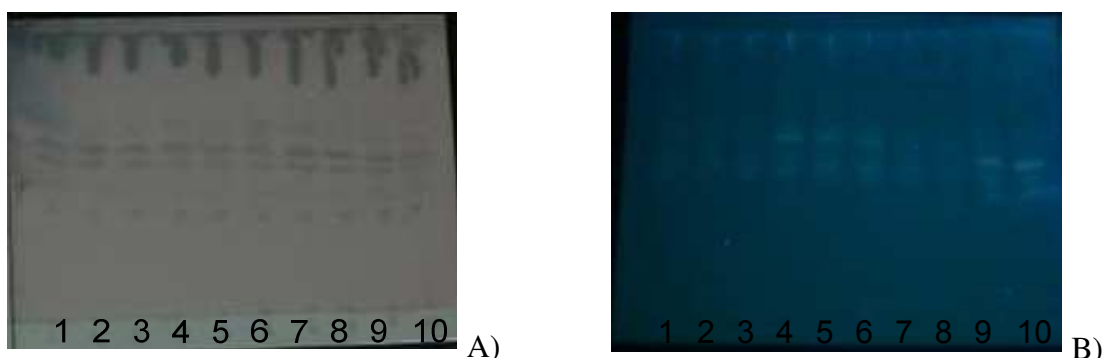


Figura 5.15 – A) Compostos fenólicos no visível com tratamento químico (AS); B) Flavonóides em UV-366nm com tratamento químico (NP): 1: 323K/20MPa; 2: 323K/25MPa; 3: 323K/30MPa; 4:323,15K/35MPa; 5: 323K/40MPa. 6: 333K/20MPa; 7: 333K/25MPa; 8: 333K/30MPa; 9:333K/35MPa; 10: 333K/40MPa.

Verificou-se a semelhança no perfil químico qualitativo tanto de compostos fenólicos quanto de flavonóides, através das bandas visualizadas na Figura 5.15, indicando possivelmente que as diferentes temperaturas e pressões estudadas não influenciaram na extração dos compostos químicos presentes na amostra PQ.

5.3.2 CAROTENÓIDES TOTAIS

O teor de carotenóides totais foi expresso em equivalentes de β -caroteno. A curva padrão foi construída com concentrações 0,0033 mg/mL à 0,0163 mg/mL obtidas da solução inicial 2 mM com absorbâncias entre 0 e 1, obtendo-se o modelo $y = 62,4704x - 0,0512$ com $R^2=0,9992$. Ensaios preliminares de determinação de teor de carotenóides totais foram realizados a fim de se testar a concentração do extrato que resultasse em absorbância entre 0 e 1. A concentração de 5,00 mg/mL foi adotada para as soluções dos extratos supercríticos da amostra PQ.

Os teores em carotenóides totais estão apresentados na Figura 5.16, expressos em mg Carotenóides totais/100g de extrato, em função das pressões estudadas. As barras de erros estão representadas pelas amplitudes, diferença entre o máximo valor observado e o mínimo valor observado.

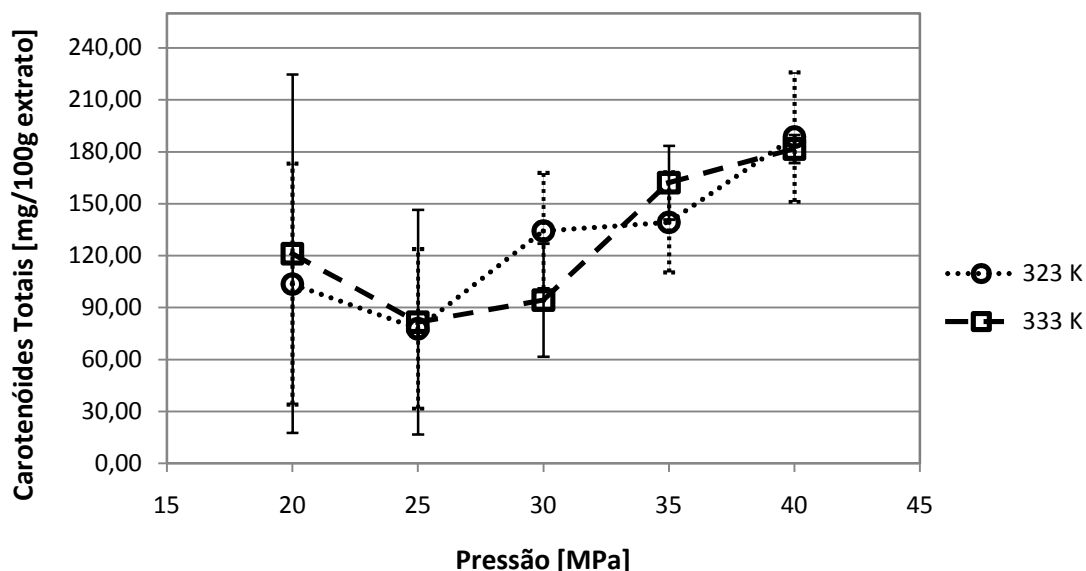


Figura 5.16 – teores de carotenóides totais [mg/100g extrato] em função da pressão para extratos de PQ: $t = 60$ min.; $S/F = 60$; $Q_{CO_2} = 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Uma análise de variância (ANOVA) juntamente com o teste de comparação múltipla de Tukey para um nível de significância de 5%, foi realizada para os dados experimentais das isotermas de 323 K e 333 K, e pressões de 20, 25, 30, 35 e 40 MPa, apresentadas no anexo.

Para a temperatura de 323 K, as diferenças foram estatisticamente significativas entre as pressões de 20 e 25 com 40 MPa. Os maiores teores obtidos não tiveram diferenças estatisticamente significativas para as pressões de 30, 35 e 40 MPa. Para a temperatura de 333K, as diferenças foram estatisticamente significativas entre as pressões de 25 com 35 e 40 MPa. Os teores obtidos nas pressões de 30, 35 e 40 MPa não tiveram diferenças estatisticamente significativas. Ver anexo 9.2.

Para a amostra comercial de extrato de PQ (0000236125), o teor de carotenóides totais obtido foi igual a 31 ± 1 mg Carotenóides totais/ 100g de extrato. Observou-se que para a temperatura e pressão usada na extração supercrítica que obteve o menor teor em carotenóides totais: 78 ± 26 mg Carotenóides totais/ 100g de extrato (323 K, 25 MPa), a quantidade ainda foi maior que o teor da amostra comercial.

5.3.3 FENÓIS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico. A curva padrão foi construída com concentrações 0,0066 mg/mL à 0,080 mg/mL obtidas da solução inicial 1mM com absorbâncias entre 0 e 1 onde a Lei de Lambert-Beer é satisfeita.

Foram realizados ensaios preliminares de conteúdo fenólico total a fim de testar a concentração do extrato que resultasse em absorbância entre 0 e 1 e, a partir desses resultados, adotar a concentração obtida neste intervalo para as soluções dos extratos da amostra PQ. Para estes experimentos foram utilizados extratos de PQ-155, CVQ e CVM, onde se experimentou cinco diferentes concentrações obtidas de soluções com concentrações iniciais de 10 mg/mL, como mostra a Tabela 5.10.

A concentração de 2 mg/mL foi adotada para as soluções de extratos supercríticos da amostra PQ e da amostra comercial 000236125 para a determinação de fenóis totais.

Para verificar a necessidade de se preparar a solução de reação em triplicata, realizou-se um teste com dois extratos, ID 60.400.1 e ID 60.400.2, onde para cada um preparou-se as soluções de extrato em triplicata e para apenas o ID 60.400.1 preparou-se as soluções de reação em triplicata. As médias das concentrações de fenóis totais obtidas de cada triplicata da solução de reação não tiveram diferença significativa ($P_{\text{valor}}=0,170$), justificando assim a não realização da etapa da reação em triplicata.

Tabela 5.10 – Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de PQ-155, CVQ e CVM: [mg GAE / 100g de extrato]

Extrato [mg/mL]	PQ-155	CVQ	CVM
0,50	446,52	1424,33	1463,90
1,00	567,10	1637,23	1133,25
2,00	850,17	1788,89	1366,87
5,00	750,60	1746,69	1356,70
10,00	649,33	1503,46	1196,83

Os teores de fenóis totais estão apresentados na Figura 5.17, expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE = *Galic Acid Equivalent*) em função das pressões estudadas. As barras de erros estão representadas pelas amplitudes, onde a barra positiva foi calculada pela diferença entre o máximo valor observado e o mínimo valor observado.

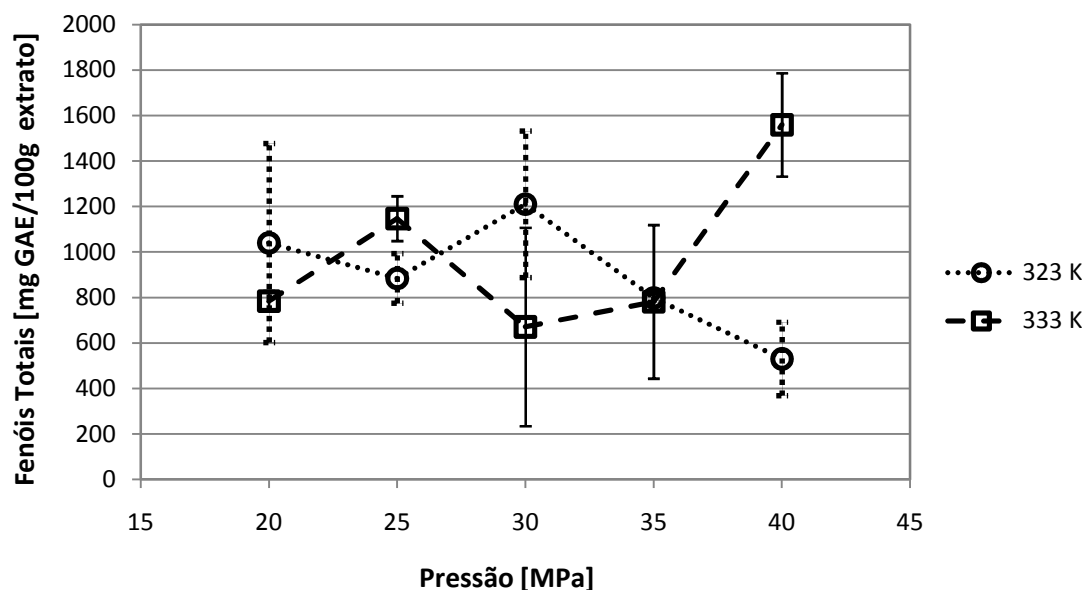


Figura 5.17 - Teores de fenóis totais [mg/100g extrato] em função da pressão para extratos de PQ: $t = 60$ min.; $S/F = 60$; $Q_{CO_2} = 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Uma análise de variância (ANOVA) juntamente com o teste de comparação múltipla de Tukey para um nível de significância de 5%, foi realizada para os dados experimentais de fenóis totais das isotermas de 323 K e 333 K, e pressões de 20, 25, 30, 35 e 40 MPa, conforme apresentada no anexo 9.3.

Para a temperatura de 323 K, as diferenças foram estatisticamente significativas entre as pressões de 20, 25 e 30 MPa com 40 MPa. Os teores obtidos nas pressões de 35 e 40 MPa não tiveram diferenças estatisticamente significativas. Para a temperatura de 333 K, as diferenças foram estatisticamente significativas entre as pressões de 20, 25, 30 e 35 MPa com 40 MPa. Os teores obtidos nas pressões de 20, 30 e 35 MPa não tiveram diferenças estatisticamente significativas, assim como 25 e 35 MPa, e 30 e 35 MPa.

Para o extrato comercial de PQ (0000236125), o teor de fenóis totais foi igual a $1,1 \pm 0,3$ g GAE / 100g de extrato. Observou-se que este teor foi próximo aos maiores teores obtidos pelas condições de 323K e 30 MPa ($1,2 \pm 0,2$ g GAE / 100g de extrato), de 333 K e 25 MPa ($1,15 \pm 0,05$ g GAE / 100g de extrato) e de 333 K e 40 MPa ($1,6 \pm 0,2$ g GAE /

100g de extrato), de temperatura e pressão, respectivamente, no processo de extração supercrítica.

5.3.4 TOCOFERÓIS TOTAIS

Os Tocóis totais identificados nos extratos supercríticos da amostra PQ obtidos a 323 K estão apresentados na Tabela 5.11 e a 333 K na Tabela 5.12.

Tabela 5.11 - Tocóis totais detectados nos extratos supercríticos de PQ obtidos em 323 K: [mg/100g de extrato].

Tocóis totais	Pressão [MPa]				
	20	25	30	35	40
α -tocoferol	1,72	1,00	nd	1,74	2,07
α -tocotrienol	5,37	3,11	2,95	2,86	2,86
β -tocoferol	nd	2,79	nd	nd	nd
γ -tocoferol	0,98	1,00	nd	nd	nd
γ -tocotrienol	nd	nd	nd	nd	nd
δ -tocoferol	nd	nd	nd	3,09	nd
δ -tocotrienol	nd	nd	nd	nd	nd

nd = não detectado.

Tabela 5.12 - Tocóis totais detectados nos extratos supercríticos de PQ obtidos em 333 K: [mg/100g de extrato]

Tocóis totais	Pressão [MPa]				
	20	25	30	35	40
α -tocoferol	2,72	3,99	1,59	1,58	1,61
α -tocotrienol	1,79	3,92	2,07	4,85	3,34
β -tocoferol	nd	nd	nd	nd	nd
γ -tocoferol	nd	nd	nd	nd	nd
γ -tocotrienol	nd	2,09	nd	nd	nd
δ -tocoferol	nd	nd	nd	nd	nd
δ -tocotrienol	1,73	nd	nd	nd	nd

nd = não detectado.

Não foi encontrado na literatura composição em tocóis totais de polpa de pequi.

Observou-se que apenas para a temperatura de 323 K e 30 MPa não foi detectado o α -tocoferol.

Segundo Schmidt & Pokorny (2005), em óleos comestíveis, brutos e refinados, o antioxidante *in vivo* mais ativo entre os tocoferóis, o mais importante grupo de antioxidantes naturais presentes, é o α -tocoferol. Os tocotrienóis possuem atividade antioxidante similar aos dos α -tocoferóis.

5.3.5 ÁCIDOS GRAXOS

Os compostos majoritários identificados nos extratos supercríticos da amostra PQ foram o ácido palmítico (C16:0 hexadecanóico) e o ácido oléico (C18:1 9-octadecanóico) e estão apresentados na Tabela 5.13 e na Tabela 5.14.

Observou-se que os ácidos graxos oléico e palmítico somaram uma proporção de mais de 80% do total de ácidos graxos livres. Esta proporção, para as temperaturas estudadas, permaneceu aproximadamente constante com o aumento da pressão. Conseqüentemente, a quantidade de todos os outros ácidos graxos livres pode ser desconsiderada.

Por outro lado, por possuir mesmo que pequenas quantidades de ácidos graxos com duas, ou mais de duas, insaturações, a estabilidade química do óleo provavelmente pode ser muito boa.

Tabela 5.13 - Proporção relativa dos ácidos graxos dos extratos de PQ obtidos em 323 K em função da pressão [MPa].

Nomenclatura			Pressão [MPa]				
IUPAC	Oficial	Popular	20	25	30	35	40
C12:0	dodecanóico	Láurico	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05
C14:0	tetradecanóico	Mirístico	0,11	0,10	0,09	0,09	0,09
C16:0	hexadecanóico	Palmítico	38,06	37,34	37,63	37,24	36,94
C16:1	9-hexadecanóico	palmitoleico	1,06	1,04	1,02	1,01	0,99
C17:0	heptadecanóico	margárico	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
C17:1	8-heptadecanóico	8-heptadecanóico	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
C18:0	octadecanóico	Esteárico	1,96	2,02	2,12	2,17	2,50
C18:1	9-octadecanóico	oléico	56,64	56,09	57,02	57,17	57,18
C18:2	9,12-octadecadienóico	Linoléico ($\omega 6$)	1,14	2,37	1,04	1,14	1,12
C18:3	9,12,15-octadecatrienóico	Linolênico ($\omega 3$)	0,39	0,41	0,39	0,40	0,40
C20:0	eicosanóico	Araquídico	0,17	0,18	0,19	0,21	0,23
C20:1	11-eicosenóico	gondóico	0,19	0,18	0,19	0,24	0,21
C22:0	docosanóico	Behênico	0,03	0,04	0,05	0,04	0,04
C24:0	tetracoisanóico	Lignocérico	0,07	0,06	0,08	0,09	0,08

Tabela 5.14 - Proporção relativa dos ácidos graxos dos extratos de PQ obtidos em 323,15 K em função da pressão [MPa].

Nomenclatura			Pressão [MPa]				
IUPAC	Oficial	Popular	20	25	30	35	40
ni	ni	ni	-	-	-	-	0,05
ni	ni	ni	-	-	-	-	0,08
C12:0	dodecanóico	Láurico	0,05	0,05	0,03	0,05	4,73
C14:0	tetradecanóico	Mirístico	0,12	0,14	0,11	0,09	2,43
C16:0	hexadecanóico	Palmítico	38,33	38,05	37,79	37,02	32,07
C16:1	9-hexadecanóico	Palmitoleico	1,14	1,33	1,05	1,00	0,85
C17:0	heptadecanóico	Margárico	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
C17:1	8-heptadecanóico	8-heptadecanóico	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07
C18:0	octadecanóico	Esterárico	1,90	2,42	2,05	2,21	2,30
C18:1	9-octadecanóico	Oléico	56,36	55,33	56,91	57,09	52,92
C18:2	9,12-octadecadienóico	Linoléico (w6)	1,12	1,76	1,04	1,42	3,23
C18:3	9,12,15-octadecatrienóico	Linolênico (w3)	0,38	0,37	0,39	0,41	0,63
C20:0	eicosanóico	Araquídico	0,16	0,15	0,18	0,21	0,20
C20:1	11-eicosenóico	Gondóico	0,17	0,16	0,19	0,21	0,22
C22:0	docosanóico	Behênico	0,03	0,03	0,04	0,04	0,05
C24:0	tetracoisanóico	Lignocérico	0,07	0,04	0,07	0,09	0,08

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método de determinação de atividade antioxidante, desenvolvido por Marco (1968) se baseia na perda minimizada de β -caroteno na oxidação acoplada de ácido linoléico e β -caroteno. O desenvolvimento do método consistiu no estudo do aumento da taxa de oxidação do carotenóide induzida pelo aumento dos produtos de degradação de diferentes níveis de ésteres metílicos para resultar em um procedimento com tempo de indução de oxidação suficientemente rápido, já que os testes até então utilizados exigiam dias ou até semanas para determinação de atividades antioxidantes.

A metodologia seguida neste trabalho foi a de Hammerschmidt & Pratt (1978) adaptada por LEAL (2003) que utilizou ácido linolênico para induzir a degradação do β -caroteno. A Figura 5.18 e a Figura 5.19 apresentam o efeito da degradação do β -caroteno na presença de extratos de pequi: extrato comercial (0000236125) e extratos obtidos por SFE.

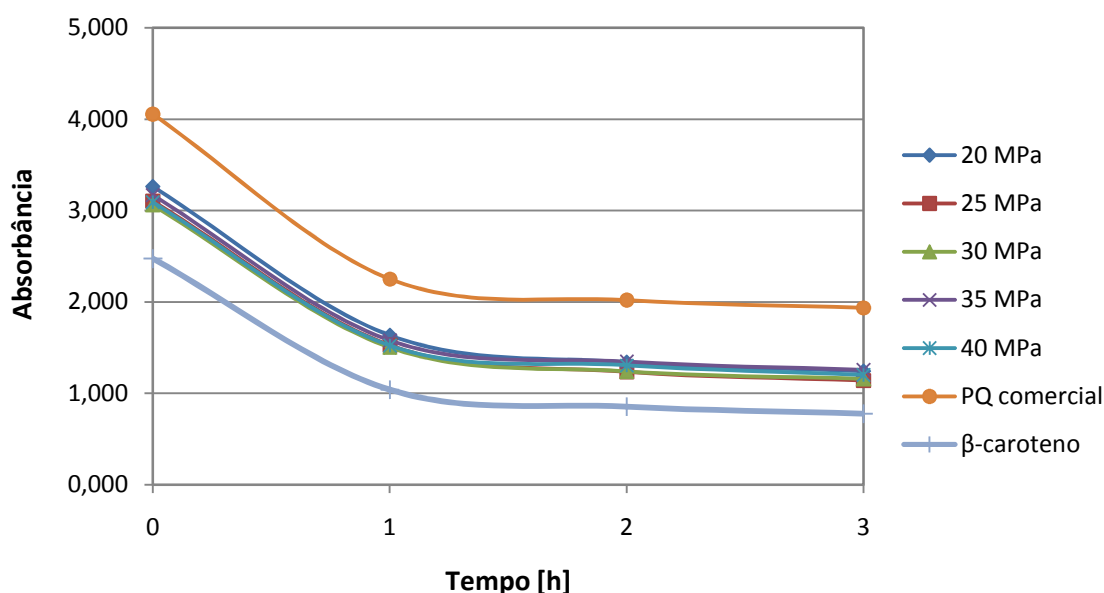


Figura 5.18 - Efeito da degradação do β -caroteno na presença de extratos de pequi: comercial (0000236125) e extratos obtidos por SFE em $T = 323$ K.

Observou-se, através da Figura 5.18 e da Figura 5.19, que as curvas dos extratos, supercrítico e comercial, estão paralelas com a curva do controle. Segundo Marco (1968), esse paralelismo é uma característica que indica que o antioxidante provavelmente presente nos extratos não tiveram nenhum efeito no evento autoxidativo. Caso houvesse deslocamento da curva no tempo, seria característica de concentração do metil éster utilizado para o aumento da taxa de oxidação, o que foi observado por Budowski (1960

apud MARCO, 1968), que verificou que o aumento do nível de metil éster de óleo de semente de algodão aumentou-se a taxa de oxidação de caroteno dissolvido em parafina.

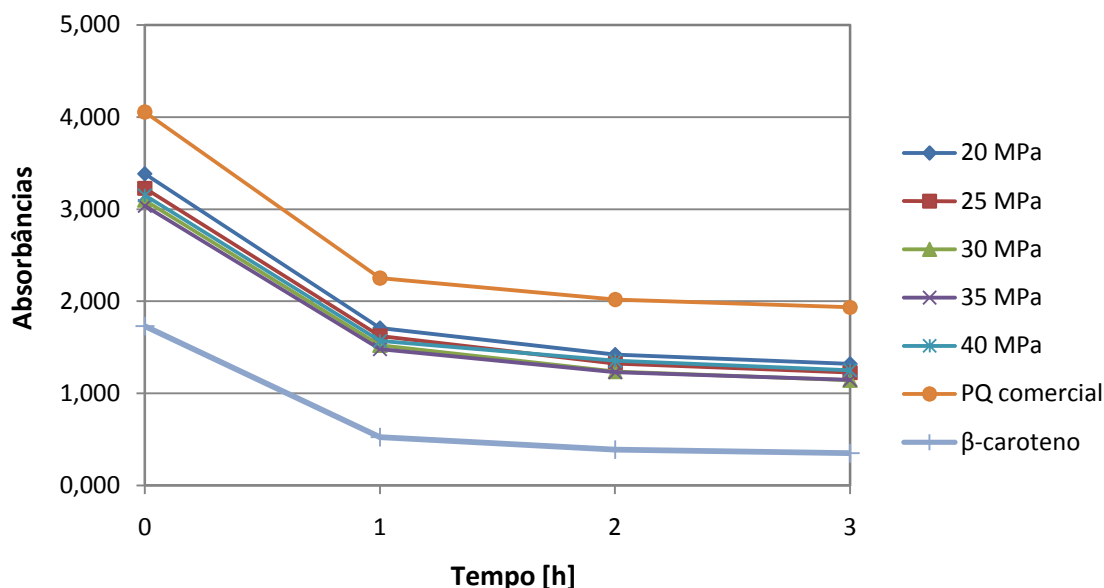


Figura 5.19 – Efeito da degradação do β -caroteno na presença de extratos de PQ: comercial (0000236125) e extratos obtidos por SFE em $T = 333\text{ K}$.

Os ácidos graxos insaturados, particularmente o oléico, o linoléico e o linolênico, se destacam da fração lipídica por serem facilmente oxidados, sendo o número de insaturações nas moléculas correspondentes um fator decisivo para a velocidade da reação. Os óleos comestíveis por conterem uma grande porcentagem dos ácidos oléico, linoléico e linolênico são os mais susceptíveis aos processos oxidativos (PASSOTTO, 1998). Logo, presume-se que, devido à grande quantidade de ácido oléico nos extratos, este composto pode estar agindo como pro-oxidante.

5.4.1 VALIDAÇÃO DO PADRÃO β -CAROTENO

Durante a determinação da atividade antioxidante de extratos da amostra PQ, observou-se que o padrão de β -caroteno (22040, FLUKA, lote: 41507273, BioChemika, purum, $\geq 97\%$ (UV), Darmstadt, Alemanha), adquirido para a realização desta determinação, não se comportava da forma esperada, inviabilizando a análise. Durante o procedimento da preparação da solução de substrato, percebeu-se que a solução ficava com partículas em forma de cristais, as quais permaneciam suspensas mesmo após várias tentativas de homogeneização. A partir desse fato decidiu-se realizar um experimento, utilizando a ferramenta de melhoria de processos PDSA (PDSA = Plan, Do,

Study and Act) do Programa Black Belt, para identificar as possíveis variáveis que poderiam causar o comportamento não esperado do padrão assim como a incapacidade da leitura das absorbâncias pelo espectrofotômetro. O PDSA encontra-se no anexo 9.6.

Os resultados deste estudo corresponderam com as predições realizadas na fase de planejamento apenas em relação a suspeita de que o padrão β -caroteno 22040 poderia estar alterado/degradado. Em relação ao tempo necessário para a concentração da solução de substrato no rotaevaporador, foi necessário aumentar o tempo para 10 min.; e não se pode concluir sobre a influência do reagente Tween® na absorbância da solução de substrato.

6 CONCLUSÕES

Os diferentes tamanhos de partículas utilizados para a SFE de sementes de café verde obtiveram significativas diferenças nos rendimentos globais. Pela análise qualitativa realizada, conclui-se que o perfil químico dos extratos supercríticos é similar ao dos extratos comerciais, porém mostrou-se mais seletivo. Com os resultados obtidos, o óleo de café verde não se mostrou atrativo em relação às amostras comerciais e, por isso, o estudo foi descontinuado.

A polpa de pequi é extremamente difícil de ser trabalhada *in natura* e, como foi observado, um pré-tratamento é necessário, como a secagem, para a extração supercrítica. Apesar de ter baixo rendimento após essa etapa de preparo, obteve-se um ótimo rendimento de extrato no processo de SFE.

Os ensaios cinéticos pilotos realizados permitiram constatar que a etapa de taxa constante de extração extraiu mais de 60% de óleo extraível. O tempo obtido neste período foi uma boa estimativa de tempo de ciclo de processo. Porém, a estimativa mais adequada seja o tempo obtido pela intersecção das retas da etapa FER e etapa DC.

Os maiores rendimentos globais obtidos das isotermas determinadas permitiram identificar as melhores condições de processo para obtenção de compostos de interesse do óleo de pequi e, com isso, partiu-se para a etapa dos cálculos dos parâmetros cinéticos a fim de se obter informações necessárias para o custo de manufatura do extrato na condição otimizada de 35 MPa e 323 K.

A composição química dos extratos supercríticos de pequi, em carotenóides totais e conteúdo fenólico total, superou, em quantidade, a composição do extrato comercial, provando que a SFE é um método de extração adequado e que tem como grande vantagem a obtenção de produtos livres e resíduos de solventes.

A atividade antioxidante dos extratos supercríticos de pequi não teve efeito para a metodologia adotada. Presume-se que o extrato oleoso, mesmo possuindo antioxidantes naturais, deve estar competindo com o sistema β -caroteno / ácido linolênico, podendo estar agindo como pro-oxidante.

O extrato supercrítico de pequi é rico em antioxidantes naturais com ação comprovada como os carotenóides, os compostos fenólicos e tocóis, além de possuir os ácidos graxos, palmítico e oléico, como majoritários, que lhe conferem propriedades atrativas para a indústria de alimentos e também para a de cosméticos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar análises de atividade antioxidante utilizando outro metil éster, como o ácido oléico, por exemplo, a fim de verificar a influência no tempo de indução da taxa de oxidação do β -caroteno na reação. Muito provavelmente, devido à presença de grande quantidade de ácidos graxos insaturados, como o oléico e o linoléico, nos extratos de pequi, o tempo de indução da autooxidação pode estar sendo acelerado pela oxidação dessas substâncias.

Realizar cálculos dos custos de manufatura de extrato supercrítico de pequi com os dados obtidos na determinação da cinética de extração, realizada na condição otimizada, para a verificação da viabilização de implantação de planta industrial com auxílio de simuladores de processo de extração supercrítica.

Realizar comparação de parâmetros de qualidade do extrato supercrítico de pequi com extratos comerciais e extratos obtidos com solventes (índice de acidez, índice de peróxido, dentre outros).

8 REFERÊNCIAS

1. ALKIO, M. Purification of pharmaceuticals and nutraceutical compounds by sub- and supercritical chromatography and extraction. **VTT Publications** 673 (2008) 84 p. Disponível em <http://www.vtt.fi/vtt_search.jsp?browse=1&fuzz=true&form=sdef>. Acesso em: 21 abril 2008.
2. ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 66(1) (2007) 232-240.
3. **A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) Official of analysis**. 16^a ed. 3^a rev. Washington, 1997.
4. **A.O.C.S. (American Oil Chemists' Society). Official and tentative methods**. 3^a ed. Champaign, 2004.
5. AQUINO, L. P. Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*): influência das variáveis operacionais. Lavras, 2007. **Dissertação** (Mestre em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras.
6. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ**. A História do Café – Origem e Trajetória. Disponível em: <http://www.abic.com.br/safe_historia.html>. Acesso em: 04 novembro 2007.
7. AZEVEDO-MALEIRO, C. H; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis** 17 (2004) 385-396.
8. BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R. S.; TIWARI, S. R. Supercritical dioxide carbon extraction of cottonseed oil. **Journal of Food Engineering** 79 (2007) 892-898.
9. BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Moluscicidal Activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia** 73 (2002) 428-430.
10. BRAGA, M. E. M. Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. Campinas, 2005, **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.
11. BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. New York: Springer, 1994, 387p.

12. BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering** 67 (2005) 21-33.
13. CALDEIRA JR, C. F.; ROCHA, S. L.; SANTOS, W. G.; PAULA, T. O. M; SANTOS, A. M.; ARAÚJO, C. B.; MARTINS, E. R.; LOPES, P. S. N. Ecogeografia e etnobotânica do *Caryocar brasiliensis* no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências** 5 (2007) 477-479.
14. CAMARGOS, R. R. S. Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos. Belo Horizonte, 2005. **Dissertação** (Mestre em Engenharia Química) Universidade Federal de Minas Gerais.
15. CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. Editora UNICAMP 2003 2ª Ed. 207 p.
16. COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. B; GONDIN JR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* MOTs. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Revista Caatinga** 19(2) (2006) 176-182.
17. CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry** 81(2) (2003) 249-255.
18. DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, R. C. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54 (2006) 2441-2469.
19. FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.) **Química Nova** 21(1) (1998) 16-19.
20. FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A.; CABRAL, F.A. Extraction of Essential Oil of Black Pepper with Liquid Carbon Dioxide. **Journal of Food Engineering** 20 (1993) 121-133.
21. FERREIRA, L. C.; JUNQUEIRA, R. G. Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) preserves made from a typical Brazilian fruit. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 23 (2007) 1179-1181.
22. FRANÇA, L. F.; 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** 14 (1999) 247–256.
23. FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. **Princípios das operações unitárias**. Tradução de Horácio Macedo, Rio de Janeiro, 2ª ed. Guanabara Dois, 1982.

24. HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans **Journal of Food Science** 43 (1978) 556-559.
25. HARTMANN, L. & LAGO, R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, 22(8) (1973) 475-476.
26. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53 (2005) 1841-1856.
27. KALIYAN, N.; GAYATHRI, P.; ALAGUSUNDARAN, K.; MOREY, R. V.; WILCKE, W. F. 2007. **Applications of Carbon Dioxide in Food and Processing Industries: Current Status and Future Thrusts**. ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers) Paper n: 076113. St. Joseph.
28. KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogênic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Genetics and Molecular Biology** 30(2) (2007) 442-448.
29. KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry** 75 (2001) 223-230.
30. LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. Curitiba. **Boletim do CEPPA - Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** 19(2) (2001) 319-340.
31. LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MERIELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **J. Agric. Food Chem.** V. 51, p. 2520-2525, 2003.
32. LEAL, P. F. Obtenção de extratos vegetais com propriedades funcionais via tecnologia supercrítica: uso de CO₂ e CO₂ + H₂O. Campinas, 2005. **Dissertação** (Mestre em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas.
33. LEE, A.K.K.; BULLEY, N.R.; FATTORI, M.; MEISEN, A. Modelling of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Canola Oilseed in Fixed Beds. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 63 (1986) 921-925.
34. LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) **Revista Brasileira de Fruticultura** 29(3) (2007) 695-698.
35. LÓPEZ-SEBASTIÁN, S.; RAMOS, E.; IBÁÑEZ, E.; BUENO, J. M.; BALLESTER, L.; TABERA, J.; REGLERO, G. Dearomatization of Antioxidant Rosemary Extracts by

- Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46 (1998) 13-19.
36. LUQUE DE CASTRO, M. D., GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta** 369 (1998) 1-10.
 37. MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição** 12(3) (1999) 205-212.
 38. MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **The Journal of the American Oil Chemists' Society** 45 (1968) 594-598.
 39. MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. **Z Lebensm Unters Forsch A** 204 (1997) 442-444.
 40. MATILHA, A., CARDOZO FILHO, L. e WOLFF, F. Simulação do processo de desterpenação supercrítica do óleo essencial de laranja. **Acta Scientiarum** 23(6) (2001) 1433-1437.
 41. McHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**, 2nd Ed., Butterworth-Heinneman, 1994.
 42. MEIRELES, M. A. A. Supercritical Extraction from Solid: Process Design Data (2001-2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (2003) 321–330.
 43. MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: José Martinez (Org.) *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. Boca Raton: CDC Press – Taylor and Francis Group, **2008**, p. 243-274.
 44. MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova** 28(4) (2005) 637-641.
 45. MOTTER, M. D. S.; SILVA, L. D.; OLIVEIRA, R. B.; YAMADA, A. T.; SANTOS, S. C.; MORAIS, S. M. T. S. Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de Guaru (*Poecilia vivípara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de Pequi (*Caryocar brasiliensis*) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 41 (2004) 221-227.
 46. NIST Mass Spec Data Center, S.E. Stein, director, "Retention Indices" in **NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69**, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, June 2005, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>).
 47. OLIVEIRA, J. S. Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.). Florianópolis, 2005, **Tese** (Doutor em

- Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e de Alimentos/CT, Universidade Federal de Santa Catarina.
48. OLIVEIRA, M. N. S.; GUSMÃO, E.; LOPES, P. S. N.; SIMÕES, M. O. M.; RIBEIRO, L. M.; DIAS, B. A. S. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 28(3) (2006) 380-386.
49. PAULA-JÚNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hidroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(Suplemento) (2006) 625-630.
50. PASSOTTO, J. A., PENTEADO, M. V. C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do β -caroteno e da vitamina A: estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 18(1) (1998) 68-72.
51. PEREIRA, C. G.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Extraction and Isolation of Índole Alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: Technical and Economic Analysis. **Journal of Supercritical Fluids** 30 (2006) 51-61.
52. PEREZ, E. Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb., CARYOCARACEAE. Curitiba, 2004. **Dissertação**. (Mestre em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná.
53. PRADO, J. M.; ASSIS, A. R.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M. R.; MEIRELES, M. A. A. Manufacturing cost of supercritical-extracted oils and carotenoids from Amazonian plants. **Journal of Food Process Engineering** (2008) DOI: 10.1111/j.1745-4530.2008.00279.x.
54. QUISPE-CONDORI, S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi*, *Foeniculum vulgare*. Campinas, 2005. **Tese** (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
55. 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**. 36 (2005) 40-48.

56. REVERCHON, T., TADDEO, R., DELLA PORTA, G. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. **The Journal of Supercritical Fluids** 8 (1995) 302-309.
57. RIZVI, S. S. H., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A., DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology** 40(6) (1986) 55-65.
58. RODRIGUES, J. E.; ARAÚJO, M. E; AZEVEDO, F. F. M.; MACHADO, N. T. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids** 34 (2005) 223-229.
59. ROESLER, R.; MALTA, G. L.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27(1) (2007) 53-60.
60. ROSA, P. T. V, MEIRELES, M. A. A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**. 67 (2005b) 235–240.
61. ROSA, P. T. V, MEIRELES, M. A. A., Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994–2003). **Journal of Supercritical Fluids** 34 (2005a) 109–117.
62. SANDI, D. Extração do óleo e diterpenos do café com CO₂ supercrítico. Viçosa. 2003. **Tese** (Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa.
63. SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. **Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras** 64 (2004).
64. SANTOS, J. L. Projeto de uma unidade de extração supercritical empregando simulador de processos. Belém, 2007. **Dissertação** (Mestre em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Pará.
65. SCHIMDT, S.; POKORNY, J. Potential application of oilseeds as source of antioxidants for food lipids – a review. **Czech Journal of FOOD SCIENCES** 23(3) (2005) 93-102.
66. SIHVONEN, M.; JÄRVENPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALATI, R. Advances in Supercritical Dioxide Carbon Technologies. **Trends in Food Science and Technology** 10 (1999) 217-222.
67. SINGH, P. C.; SINGH, R. K. Choosing an appropriate bioseparation technique. **Trends and Food Science and Technology** 7 (1996) 49-58.

68. SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16 (1965) 144–158.
69. SPEER, K.; SPEER, I. K. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 18(1) (2006) 201-216.
70. SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids** 33 (2005) 35-52.
71. TUBEROSO, C. I. G.; KOWALCZYK, A.; SARRITZU, E.; CABRAS, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. **Food Chemistry** 103 (2007) 1494-1501.
72. TURATTI, J. M. Extração e caracterização de óleo de café. Coffee Break – o portal do agronegócio café: artigos e projetos. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=3&ID=17>>. Acesso em: 2 outubro 2007.
73. UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. **Journal of Food Engineering** 65 (2004) 55-66.
74. VASCONCELLOS, C. M. C. Extração Supercrítica de Óleos Voláteis de *Achyrocline satureioides* (Macela) e *Vetiveria zizanioides* (Vetiver): Determinação da Cinética de Extração e Estimativa de Custos de Manufatura. Campinas, 2007. **Dissertação** (Mestre em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas.
75. VELASCO, R. J., VILLADA, H. S., CARRERA, J. E. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. **Información Tecnológica** 18(1) (2007) 53-65.
76. VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. Caracterização física de frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 35(2) (2005) 71-79.
77. WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd edition. 1996.
78. WEI, P. C.; MAY, C. Y.; NGAN, M. A.; HOCK, C. C. Supercritical fluid extraction of palm carotenoids. **American Journal of Environmental Sciences** 1(4) (2005) 264-269.

9 ANEXOS

9.1 DADOS DAS ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL

Tabela 9.1 – Rendimento global de PQ obtido por SFE em temperatura de 323 K: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2}= 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Amostra PQ					
Pressão [MPa]	20	25	30	35	40
Replicatas	4	3	3	2	2
Rendimento [%]	24,93	39,54	53,34	62,20	62,98
Desvio padrão [%]	6,87	5,44	5,09	0,40	0,18
Valor mínimo [%]	19,00	33,28	48,11	61,91	62,85
Valor máximo [%]	34,17	43,09	58,28	62,48	63,10
Tukey ¹ (IC=95%)		a	ab	b	b

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos rendimentos globais para as pressões estudadas.

Tabela 9.2 - Rendimento global de PQ obtido por SFE em temperatura de 333 K: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2}= 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Amostra PQ					
Pressão [MPa]	20	25	30	35	40
Replicatas	4	3	3	3	2
Rendimento [%]	16,02	31,79	49,5	61,55	64,3
Desvio padrão [%]	7,29	3,72	3,02	2,77	0,184
Valor mínimo [%]	10,36	28,48	46,07	58,44	64,17
Valor máximo [%]	26,72	35,81	51,77	63,74	64,43
Tukey ¹ (IC=95%)			c	cd	d

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos rendimentos globais para as pressões estudadas.

Tabela 9.3 - Rendimentos globais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos das SFE de PQ: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2}= 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Pressão [MPa]	Temperatura [K]			
	323	Tukey ¹ (IC=95%)	333	Tukey ¹ (IC=95%)
20	25 $\pm$ 7	A	16 $\pm$ 7	A
25	40 $\pm$ 5	B	32 $\pm$ 4	AB
30	53 $\pm$ 5	C	50 $\pm$ 3	BCDE
35	62,2 $\pm$ 0,4	D	62 $\pm$ 3	CDE
40	63,0 $\pm$ 0,2	E	64,3 $\pm$ 0,2	CDE

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos rendimentos globais para as pressões estudadas.

9.2 DADOS DE CAROTENÓIDES TOTAIS

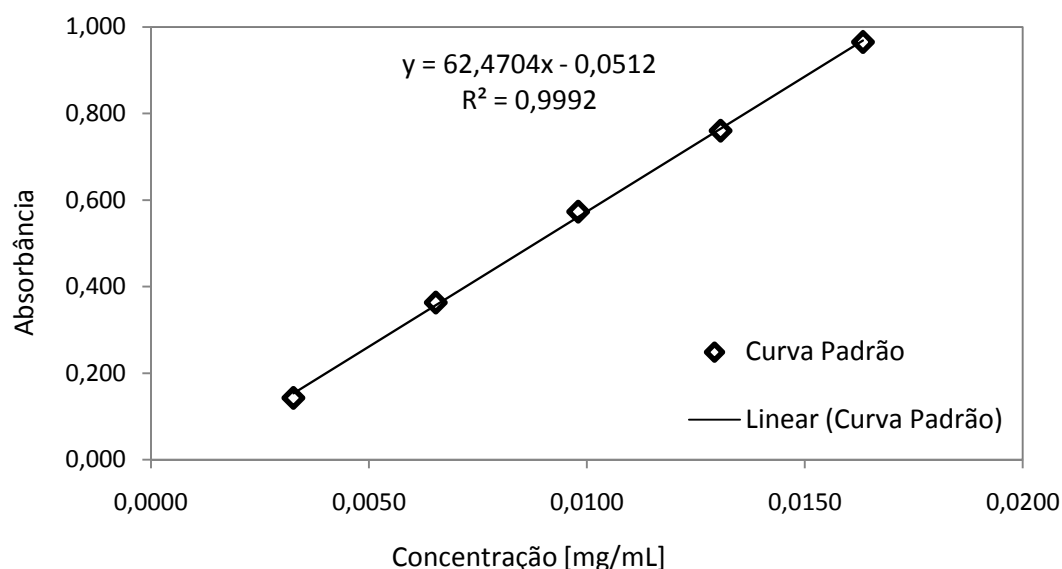


Figura 9.1 – Curva padrão de β-caroteno

Tabela 9.4 – Teor de carotenóides totais de extratos de PQ [mg/100g extrato] obtidos por SFE em temperatura de 323 K: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2} = 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Amostra PQ					
Pressão [MPa]	20	25	30	35	40
Densidade [kg/m³]	784,29	834,19	870,43	899,23	923,32
Replicatas	4	3	3	2	2
Teor [%]	103,60	77,80	134,30	139,30	188,50
Desvio padrão [%]	30,20	26,20	18,20	20,40	26,50
Valor mínimo [%]	67,10	47,60	121,70	124,80	169,80
Valor máximo [%]	136,70	93,70	155,20	153,70	207,20
Tukey ¹ (IC=95%)	a	ab	abc	abc	c

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos teores de carotenóides para as pressões estudadas.

Tabela 9.5 – Teor de carotenóides totais de extratos de PQ [mg/100g extrato] obtidos por SFE em temperatura de 333 K: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2}= 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Amostra PQ					
Pressão [MPa]	20	25	30	35	40
Densidade [Kg/m ³]	723,68	786,55	829,71	862,94	890,14
Replicatas	4	3	3	3	2
Teor [%]	121,20	81,60	94,31	162,17	181,65
Desvio padrão [%]	43,50	34,60	16,66	12,20	5,73
Valor mínimo [%]	68,30	55,90	79,90	148,09	177,60
Valor máximo [%]	171,80	120,80	112,56	169,38	185,70
Tukey ¹ (IC=95%)	a	ab	abc	ac	ac

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos teores de carotenóides para as pressões estudadas.

Tabela 9.6 – Teor de carotenóides totais de extratos de PQ¹ [mg/100g extrato]: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2}= 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Pressão [MPa]	Temperatura [K]			
	323	Tukey (IC=95%)	333	Tukey (IC=95%)
20	104 ± 30	A	121 ± 44	ABCDE
25	78 ± 26	B	82 ± 35	ABCD
30	134 ± 18	C	94 ± 17	ABCD
35	139 ± 20	D	162 ± 12	ACDE
40	189 ± 27	E	182 ± 6	ACDE

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos teores de carotenóides para as pressões estudadas.

9.3 DADOS DE FENÓIS TOTAIS

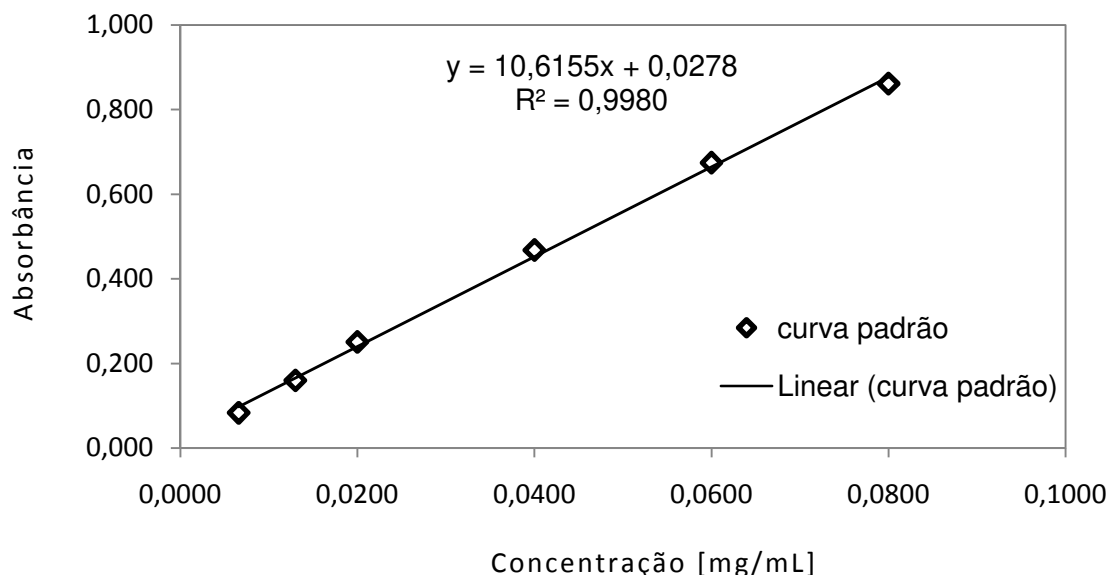


Figura 9.2 - Curva padrão de ácido gálico.

Tabela 9.7 - Teor de fenóis totais de extratos de PQ obtidos para a temperatura de 323 K [mg GAE/100g extrato]: t=60 min.; S/F= 60; $Q_{CO_2} = 8,35 \times 10^{-5}$ kg/s.

Pressão [MPa]	20	25	30	35	40
Densidade [Kg/m ³]	784,29	834,19	870,43	899,23	923,32
Replicatas	4	3	3	2	2
Teor [%]	1040,10	884,40	1210,00	798,55	530,40
Desvio padrão [%]	182,1	62	182	13,51	114,1
Valor mínimo [%]	822	846,7	1001	789	449,7
Valor máximo [%]	1259,5	956	1323	808,1	611
Tukey ¹ (IC=95%)	a	ab	abc	abcd	d

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos teores de fenóis totais globais para as pressões estudadas.

Tabela 9.8 – Teor de fenóis totais de extratos de PQ obtidos para a temperatura de 333 K [mg GAE/100g extrato]: t=60 min.; S/F= 60; Q_{CO2}= 8,35×10⁻⁵ kg/s.

Pressão [MPa]	20	25	30	35	40
Densidade [Kg/m ³]	723,68	786,55	829,71	862,94	890,14
Replicatas	4	3	3	3	2
Teor [%]	783,80	1146,80	671,00	781,20	1559,00
Desvio padrão [%]	21,1	49,5	218	172,6	161
Valor mínimo [%]	756	1095	460	591,5	1445
Valor máximo [%]	801,6	1193,5	896	929	1672
Tukey (IC=95%)	a	b	ac	abc	

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos teores de fenóis totais para as pressões estudadas.

Tabela 9.9 - Teor de fenóis totais de extratos de PQ¹ [g GAE /100g extrato]: t=60min.; S/F= 60; Q_{CO2}= 8,35×10⁻⁵ kg/s.

Pressão [MPa]	Temperatura [K]			
	323	Tukey (IC=95%)	333	Tukey (IC=95%)
20	1,0 ± 0,2	A	0,80 ± 0,02	ABDE
25	0,9 ± 0,1	B	1,15 ± 0,05	ABCD
30	1,2 ± 0,2	C	0,7 ± 0,2	ABDE
35	0,80 ± 0,01	D	0,8 ± 0,2	ABDE
40	0,5 ± 0,1	E	1,6 ± 0,2	C

¹ letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos teores de fenóis totais para as pressões estudadas.

9.5 DADOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tabela 9.10 – Dados brutos da determinação de atividade antioxidante de extratos de PQ obtidos por SFE em 323 K: valores das absorbâncias para os intervalos de tempo $t = 0, 1, 2$ e 3 horas.

ID Extrato	Tempo [h]			
	0	1	2	3
controle1	2,4734	1,0386	0,8545	0,7774
502001	3,3845	1,7105	1,4215	1,3202
502002	3,2884	1,6491	1,3576	1,2571
502004	3,1131	1,5462	1,2362	1,1451
502501	3,2822	1,6687	1,3777	1,2813
502502	3,1169	1,5516	1,2512	1,1561
502503	2,9184	1,3565	1,0781	0,9868
503001	3,2538	1,6577	1,3785	1,2852
503002	2,9021	1,3587	1,1050	1,0407
503003	3,0235	1,4906	1,2322	1,1436
503501	3,1851	1,5911	1,3488	1,2579
503502	3,1473	1,5646	1,3421	1,2536
504001	3,1557	1,5774	1,3711	1,2483
504002	3,0259	1,4655	1,2426	1,1513
comercial1	4,0168	2,2395	2,0082	1,9347
comercial2	4,0906	2,2624	2,0029	1,9382

Tabela 9.11 – Dados brutos da determinação de atividade antioxidante de extratos de PQ obtidos por SFE em 333 K: valores das absorbâncias para os intervalos de tempo t= 0, 1, 2 e 3 horas.

ID Extrato	Tempo [h]			
	0	1	2	3
controle1	1,7314	0,5263	0,3895	0,3503
602004	2,5884	1,3446	1,0628	0,9976
602004	2,2396	0,9727	0,7522	0,6889
602501	2,4954	1,2602	0,9828	0,9122
602502	2,2491	1,0247	0,7921	0,7288
602503	2,5128	1,2710	1,0315	0,9680
603001	2,5848	1,3256	1,1046	1,0362
603002	2,3352	1,0829	0,8881	0,8232
603003	2,3638	1,0976	0,8943	0,8442
603501	2,2024	0,9061	0,7519	0,7069
603502	2,2857	1,0305	0,9015	0,8577
603503	2,3851	1,1691	0,9977	0,9417
604001	2,1867	0,9562	0,8467	0,7953
604002	2,5121	1,2224	1,0109	0,9507

9.6 PDSA – PROGRAMA BLACK BELT: MELHORIA DE PROCESSOS

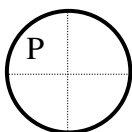
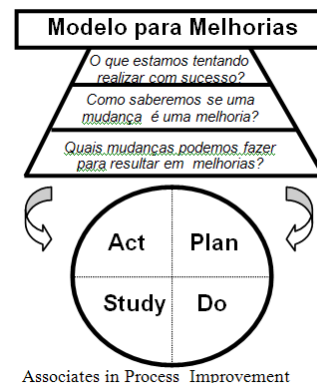
CICLO DE MELHORIA PDSA

UNICAMP
Programa Black Belt

Data: 28/04/2008

Equipe: Carolina

Ciclo nº: 1



PLANEJAR

OBJETIVO DO CICLO

- Verificar a causa do comportamento não esperado do padrão β -caroteno (22040, FLUKA, lote: 41507273, BioChemika, purum, $\geq 97\%$ (UV), Darmstadt, Alemanha) na solução de substrato utilizada na determinação de atividade antioxidante de extratos supercríticos de PQ.

EVIDÊNCIAS

- Metodologia adotada:

A referência utilizada para a metodologia da análise antioxidante foi o artigo de LEAL et al. (2003). A referência modificou a metodologia de HAMMERSCHIMIDT and PRATT (1978) para os extratos obtidos via fluido supercrítico (SFE = Supercritical fluid extraction) ou extração tradicional. Neste trabalho, o substrato foi preparado com 10 mg de β -caroteno (99% Acros, 723540-7, B0070834, Fw 536.88, EUA), 10 mL de clorofórmio (99%, U-59A-D4-G, Nu-chek, EUA), 60 mg de ácido linolênico (99%, U-59A-D4-G, Nu-chek, EUA) e 200 mg de Tween® 80 (P. A, Synth). Essa solução foi concentrada em rotaevaporador (Laborota 4001 WB, Heidolph e CH-9230, Buchi, Flawil, Switzerland) a 323 K e, em seguida, diluída com 50 mL de água bidestilada. Esta solução deve ser de cor laranja e de aspecto translúcido. A reação foi conduzida usando-se 1 mL de substrato adicionado a 2 mL de água bidestilada e 0,05 mL de extrato diluído em etanol (99,8%, P. A, Merck, lot 1216046030, Rio de Janeiro, Brasil) (0,02 g de extrato/1 mL de etanol). A solução foi colocada em banho (Tecnal, TE 159, Piracicaba, Brasil) a 313 K e foi monitorada com o espectrofotômetro (HITACHI, U-3010, Tokyo, Japão) com leituras em 470 nm para 0, 1, 2 e 3 h de reação.

- Variações entre as metodologias:

Outras metodologias foram consultadas e observaram-se variações entre reagentes e procedimentos utilizados, como o Tween® 80 que foi utilizado por Zancan et al., (2002) e Leal et al., (2006), e o Tween® 20 que

foi utilizado por Burda & Oleszek (2001) e Skerget et al., (2005). A metodologia de Hammerschmidt and Pratt (1978) utilizou o reagente Tween[®] 40.

- Variações dentro da metodologia adotada:

Durante o procedimento da preparação da solução de substrato, percebeu-se que a solução ficara com partículas em forma de cristais, as quais permaneceram suspensas mesmo após várias tentativas de homogeneização. Seguiu-se com o procedimento até o final da análise.

Em ensaio posterior não houve a formação de cristais na solução de substrato, mas a solução continuou apresentando-se com partículas suspensas. Neste, seguiu-se com o procedimento da análise até o momento em que a leitura da absorbância da solução de reação não pôde ser detectada no espectrofotômetro, sendo detectada só após 20 horas.

A partir desse fato decidiu-se realizar um experimento testando as possíveis variáveis que poderiam causar o comportamento não esperado do padrão assim como a incapacidade da leitura das absorbâncias pelo espectrofotômetro.

QUESTÕES A SEREM RESPONDIDAS A PARTIR DOS DADOS OBTIDOS NESTE CICLO

- A não solubilidade do padrão β -caroteno (22040) é por causa do reagente Tween[®]?
- A não solubilidade do padrão β -caroteno (22040) é por causa do tempo de permanência no rotaevaporador?
- O padrão β -caroteno (22040) está degradado?

PREDIÇÕES

- Supõe-se que o reagente Tween[®] não interfira na solubilidade do β -caroteno já que tem a função de emulsificar a solução ao se inserir a água no final do preparo da solução do substrato;
- Supõe-se que o tempo de permanência no rotaevaporador não tenha influência na solubilidade do β -caroteno, pois, como não foi encontrado na literatura dados de tempo de permanência da solução de substrato no rotaevaporador para concentrar a mesma, a evaporação do clorofórmio foi total nos ensaios realizados.
- Supõe-se que o padrão de β -caroteno esteja degradado.

PLANO PARA RESPONDER ÀS QUESTÕES

- Metodologia:

A metodologia de Leal et al. (2006) foi seguida variando os reagentes. Para verificar a influência do Tween[®], experimentou-se entre o 40 e o 80; Para verificar a influência do padrão, experimentaram-se o β -caroteno 22040 e o β -caroteno C9750; e para verificar a influência do tempo de concentração da solução de substrato no rotaevaporador, experimentaram-se tempos de 5, 10 e 20 minutos.

Os reagentes, β -caroteno 22040 e Tween[®] 80 P1754, foram adquiridos para o projeto da dissertação e o β -caroteno C9750 e o Tween[®] 40 P1504, foram de projetos anteriores do LASEFI, onde todos são da empresa SIGMA (Darmstadt, Alemanha) e estão especificados na Tabela 9.12.

Tabela 9.12 - Reagentes utilizados nas soluções de substratos testadas.

Solvente	β -caroteno	β -caroteno	Tween [®] 40	Tween [®] 80
Identificador	22040	C9750	P1504	P1754
Marca	Fluka	Sigma	Sigma	Sigma-aldrich
Lote	2306366	104k2514	032k0104	046k0128

Na solução de substrato, não foi adicionado o reagente ácido linolênico por se tratar de um reagente oneroso e de quantidade limitada. Como o propósito deste experimento era saber o comportamento do β -caroteno na solução, não se julgou imprescindível a presença do ácido linolênico para a realização dos testes.

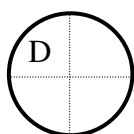
As etapas do procedimento de preparação da solução de substrato estão descritas a seguir:

1. Pesou-se 0,0100 g de β -caroteno em balão de fundo redondo de 50 mL apoiado em béquer na balança analítica, previamente tarado; com o auxílio de pipeta automática, pesou-se 0,2000g de Tween[®] 80; adicionou-se 10 mL de clorofórmio ao balão e homogeneizou.
2. A solução foi concentrada em rota evaporador até completa remoção do clorofórmio, observado visivelmente;
3. 50 mL de água destilada foram adicionadas ao balão e homogeneizou-se bem.
4. Compararam-se os aspectos das soluções nos balões;

As soluções dos substratos foram preparadas com os reagentes como descrito na Tabela 9.13.

Tabela 9.13 – Planejamento dos experimentos

Balão	β -caroteno	Tween [®]	Clorofórmio [mL]	Tempo rota [min.] 323 K	observações
1º experimento:					
1	22040	40	10	5	
2	22040	80	10	5	
3	C9750	40	10	5	
4	C9750	80	10	10	
2º experimento:					
1	22040	80	10	20	T= 323 K
2	22040	80	10	20	T= 308 K
3º experimento:					
1	22040	80	10	10	
2	C9750	80	10	10	

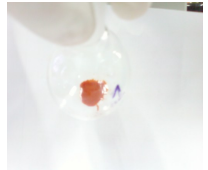
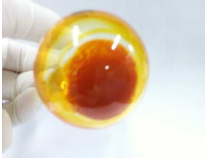
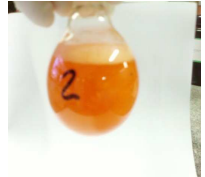
**FAZER**

OBSERVAÇÕES AO CONDUZIR O PLANO

À medida que os experimentos foram sendo realizados, os aspectos observados foram registrados através de fotografias digitais e as observações descritas em seguida.

1º experimento: Verificar o aspecto da solução de substrato variando os reagentes e o tempo no rotaevaporador.

Tabela 9.14 – 1º experimento: Aspectos das soluções de substrato durante as etapas de procedimento de preparação.

Etapa	Balão 1	Balão 2	Balão 3	Balão 4	Balão 5
1					
2					
3					
4					

Observações:

- Observou-se, na Tabela 9.14, que os aspectos das soluções de substratos foram os mesmos para os balões 1, 2 e 3, diferindo apenas na cor das soluções preparada com o β -caroteno 22040;
- Por isso, decidiu-se aumentar o tempo de concentração da solução no rota evaporador para 10 min. para o balão 4, o que resultou numa solução translúcida (Tabela 9.14, etapa 3 e 4, balão 4);
- Então, decidiu-se preparar uma 5ª solução de substrato (balão 5) utilizando β -caroteno 22040 e Tween® 80, com o tempo igual a 10 min. no rotaevaporador, resultando numa solução com partículas em suspensão com brilho (Tabela 9.14, etapa 3, balão 5).

2º experimento: Verificar o comportamento das absorbâncias da solução de substrato.

1. Com as 5 soluções foi realizada leitura no espectrofotômetro (470nm): foram utilizados 5 tubos de ensaio com 2 mL de água destilada cada um e adicionou-se 1mL de substrato de cada balão;
2. A leitura foi realizada em 0,1, 2 e 3 horas para verificar o comportamento do padrão β -caroteno;

3. Como a solução do balão 4 obteve aspecto translúcido esperado, realizou-se leitura no espectro com extrato;
4. Os resultados da queda de absorvância dos 5 tubos de solução de reação estão apresentados na Figura 9.3, identificados como “nº identificador do padrão / nº do Tween®”;
5. Comparou-se também os resultados da leitura do substrato do balão 4 com o substrato do balão 4 + extrato, apresentados na Figura 9.4;

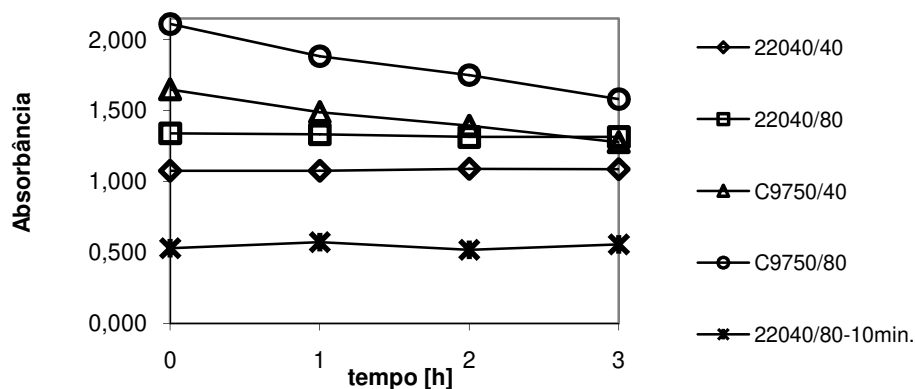


Figura 9.3 - 2º experimento: Absorvâncias das soluções de reação para cada solução de substrato testada em função do tempo.

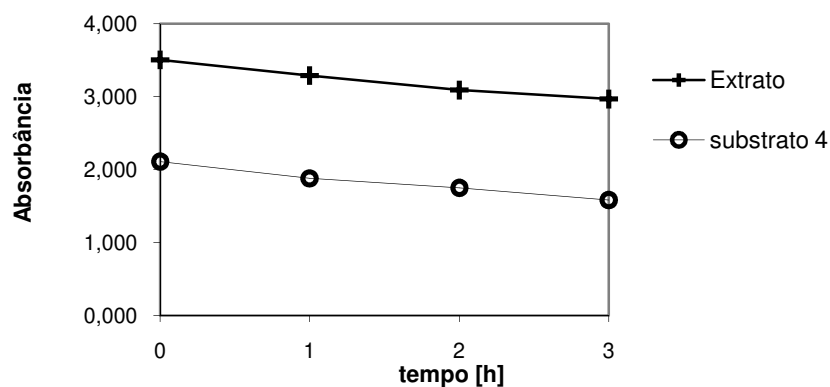


Figura 9.4 – 2º experimento: Absorvâncias da solução de reação com extrato e sem extrato (substrato 4).

Observações:

- Absorvâncias das soluções de substrato 3 e 4 tiveram decrescimento mais evidente que as dos substratos 1 e 2;

3º experimento: Verificar a influência do tempo e da temperatura no aspecto da solução de substrato.

1. Para verificar se a quantidade de tempo no rotaevaporador estava insuficiente, realizou-se um 3º experimento com o β -caroteno 22040, mudando o tempo no rota para 20 min;
2. Variou-se a temperatura do banho do rotaevaporador, onde o balão 1 ficou 20 min. em 323 K e o balão 2 ficou 20 min. em 308 K;



1)



2)

Figura 9.5 – 3º experimento: Aspectos de soluções de substrato preparados com β -caroteno 22040, concentrados por 20 min. em 323 K (1) e em 308 K (2).

Observações:

- O balão que permaneceu por 20 min. em 323 K não apresentou cristais, mas apresentou turbidez (Figura 9.5-1);
- O balão que permaneceu por 20 min. em 308 K apresentou cristais, mas não apresentou turbidez (Figura 9.5-2);

A partir destes resultados, decidiu-se realizar um 4º experimento para verificar o comportamento das soluções de substrato com os extratos seguindo as etapas descritas abaixo:

4º experimento: Verificar o comportamento das absorbâncias da solução de substrato com extrato.

1. Preparou-se 2 soluções de substratos: Tween® 80 + β -caroteno 22040 (substrato 1) e Tween® 80 + β -caroteno C9750 (substrato 2); e concentrou-se por 10 min. no rotaevaporador;
2. Prepararam-se 4 tubos para as soluções de reação: em 2 tubos adicionou-se 2mL de DH_2O e 0,05 mL de extrato (tubo EN e tubo EV); em outros 2 adicionou-se 2mL de DH_2O e 0,05 mL de EtOH (controle:tubo CV e tubo CN);
3. Adicionou-se 1 mL de substrato 1 no tubo CN e no tubo N e 1 mL de substrato 2 no tubo CV e no tubo V;
4. Realizou-se a leitura nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas para verificar o comportamento das soluções de reação;



Figura 9.6 – 4º experimento: Soluções de reação sem a adição de substrato. (CN= DH_2O +EtOH; N= DH_2O +Extrato)

Tabela 9.15 - 4º experimento: Aspectos das soluções de substrato durante as etapas de procedimento de preparação.

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Solução de reação
Substrato 1				
Substrato 2				

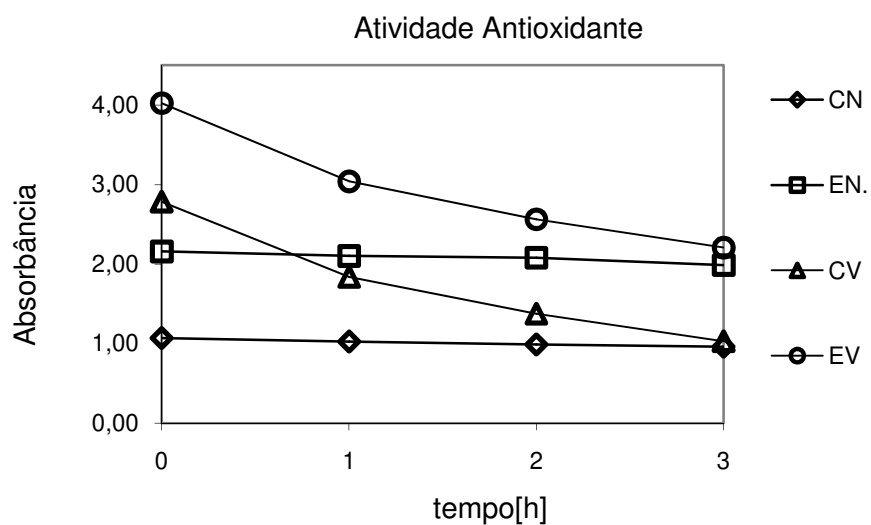
**Figura 9.7** – 4º experimento: absorbâncias das soluções de reação, com e sem extrato, em função do tempo.

Tabela 9.16 – 4º experimento: absorvâncias e atividade antioxidante das soluções de reação, com e sem extrato.

		Absorbâncias					
		Tubo	triplicata	tempo [h]			
				0	1	2	3
Substrato 1	CN	1		1,0750	1,0497	1,0079	0,9655
		2		1,0720	1,0121	0,9814	0,9630
		3		1,0591	1,0095	0,9769	0,9570
		MEDIA		1,0687	1,0238	0,9887	0,9618
	EN.	1		2,1735	2,1113	2,0809	1,9830
		2		2,1536	2,1025	2,0838	2,0002
		3		2,1469	2,0943	2,0731	1,9825
		MEDIA		2,1580	2,1027	2,0793	1,9886
Substrato 2	CV	1		2,7868	1,8366	1,3746	1,0306
		2		2,7863	1,8363	1,3751	1,0301
		3		2,7825	1,8362	1,3738	1,0300
		MEDIA		2,7852	1,8364	1,3745	1,0302
	EV	1		4,0752	3,0353	2,5631	2,2053
		2		3,9974	3,0416	2,5636	2,2057
		3		3,9970	3,0444	2,5647	2,2075
		MEDIA		4,0232	3,0404	2,5638	2,2062

Observações:

1. Observando a Figura 9.7 percebe-se que quase não há mudança nos valores das absorvâncias das soluções nos tubos CN e EN. (substrato 1), o que não ocorre com os valores das absorvâncias das soluções nos tubos CV e EV (substrato 2);
2. Observando-se a
- 3.
- 4.
5. Tabela 9.16, percebe-se através dos os comportamentos das soluções de reação: enquanto que para as soluções do substrato 2 os intervalos das absorvâncias permaneceram constantes com o tempo, para as soluções do substrato 1, tubo EN., isto não ocorreu;

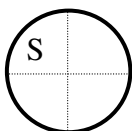
Diante do exposto, decidiu-se procurar o laboratório de estudos em carotenóides, através da Prof.^a Dr.^a Delia Rodriguez Amaya, para apresentar os resultados deste estudo. A Prof.^a Delia, ao analisar o comportamento da absorvância dos substratos apresentados na Figura 9.7, sugeriu que se realizasse uma análise em HPLC, no laboratório de estudos em carotenóides no DEA/FEA/UNICAMP, para determinar a pureza dos padrões e detectar outras substâncias que possivelmente estivessem presentes, como antioxidantes, por exemplo, pois se poderia concluir que o padrão β -caroteno 22040 poderia estar com substância antioxidante ou micro encapsulado para mantê-lo estabilizado por mais tempo.

A análise em HPLC foi realizada pela aluna de doutorado Cintia Nanci Kobori. Os resultados da pureza foram expressos como porcentagem em área e estão apresentados na Tabela 9.17.

Tabela 9.17 – Pureza dos padrões de β -caroteno [%em área]

Padrão β -caroteno	Pureza [%área]		
	cis	trans	Não identificado
22040	94,08	5,92	-
C9750	95,38	3,48	1,14

Como nenhuma outra substância foi detectada no padrão 22040, a Prof.a Delia concluiu que o mesmo provavelmente estaria micro encapsulado para permanecer estável por mais tempo. Diante da impossibilidade do uso desse padrão para a determinação de AA, onde se espera a oxidação do β -caroteno, a Prof.a Delia garantiu que o padrão C9750 estava em boas condições para o uso em análises, permitindo a publicação dos espectros (Figura 9.8 e Figura 9.9) neste trabalho para atestar a pureza e validar o seu uso.



ESTUDAR

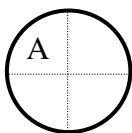
O QUE FOI APRENDIDO COM OS DADOS?

- Possivelmente o espectrofotômetro não tenha detectado a absorbância por causa dos cristais presentes que podem ter aumentado a absorbância para um valor que não pôde ser detectado pelo equipamento (Hitachi, modelo U-3010, $-2,0 < \text{Abs} < 3,0$);
- No 1º experimento, o tempo de permanência no rotaevaporador influenciou o aspecto da solução de substrato apenas para o padrão C9750, resultando em uma solução translúcida para um tempo igual a 10 min., o que não ocorreu para o padrão 22040;
- No 2º experimento, observa-se na Figura 9.3 que o decrescimento, com o tempo, dos valores das absorbâncias das soluções com substrato 3 e 4 foram mais evidentes que decrescimento dos valores das soluções com substrato 1 e 2; e que o reagente Tween pode estar influenciando no valor da absorbância, resultando num valor menor na leitura inicial, para soluções com o mesmo padrão;
- No 3º experimento, nem a temperatura do banho, nem o tempo de permanência no rotaevaporador influenciaram o aspecto da solução de substrato do padrão 22040;
- No 4º experimento, observando o gráfico da Figura 9.7 e os valores de absorbância da Tabela 9.16, concluiu-se que o padrão β -caroteno 22040 estava possivelmente alterado/degradado;
- De acordo com a Tabela 9.17, concluiu-se que o padrão β -caroteno 22040 estava possivelmente micro encapsulado;

CONCLUSÕES

Portanto, os resultados deste estudo foram de acordo com as previsões feitas na fase de planejamento apenas em relação ao padrão β -caroteno 22040 estar alterado/degradado. Em relação ao tempo necessário para a concentração da solução de substrato no rotaevaporador, foi necessário aumentar o tempo para 10 min.; e não se pode concluir sobre

a influência do reagente Tween® na absorbância da solução de substrato;



AGIR

QUAIS MUDANÇAS DEVEM SER FEITAS AO PROCESSO?

Para a determinação de AA e para a construção da curva padrão de carotenóides, na determinação de carotenóides totais, deverá ser usado o padrão de β -caroteno C9750.

REFERÊNCIAS

1. BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49 (2001) 2774-2779.
2. HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans **Journal of Food Science** 43 (1978) 556-559.
3. LEAL, P. F.; CHAVES, F. C. M; MING, L. C; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Global Yields, Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Clove Basil (*Ocimum gratissimum* L.) Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction. **Journal of Food Process Engineering** 29 (2006) 547-559.
4. SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HALDOLIN, M.; HRĀS, A. R.; SIMONIC, M. and KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry** 89 (2005) 191-198.
5. ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J., MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids** 24 (2002) 57-76.

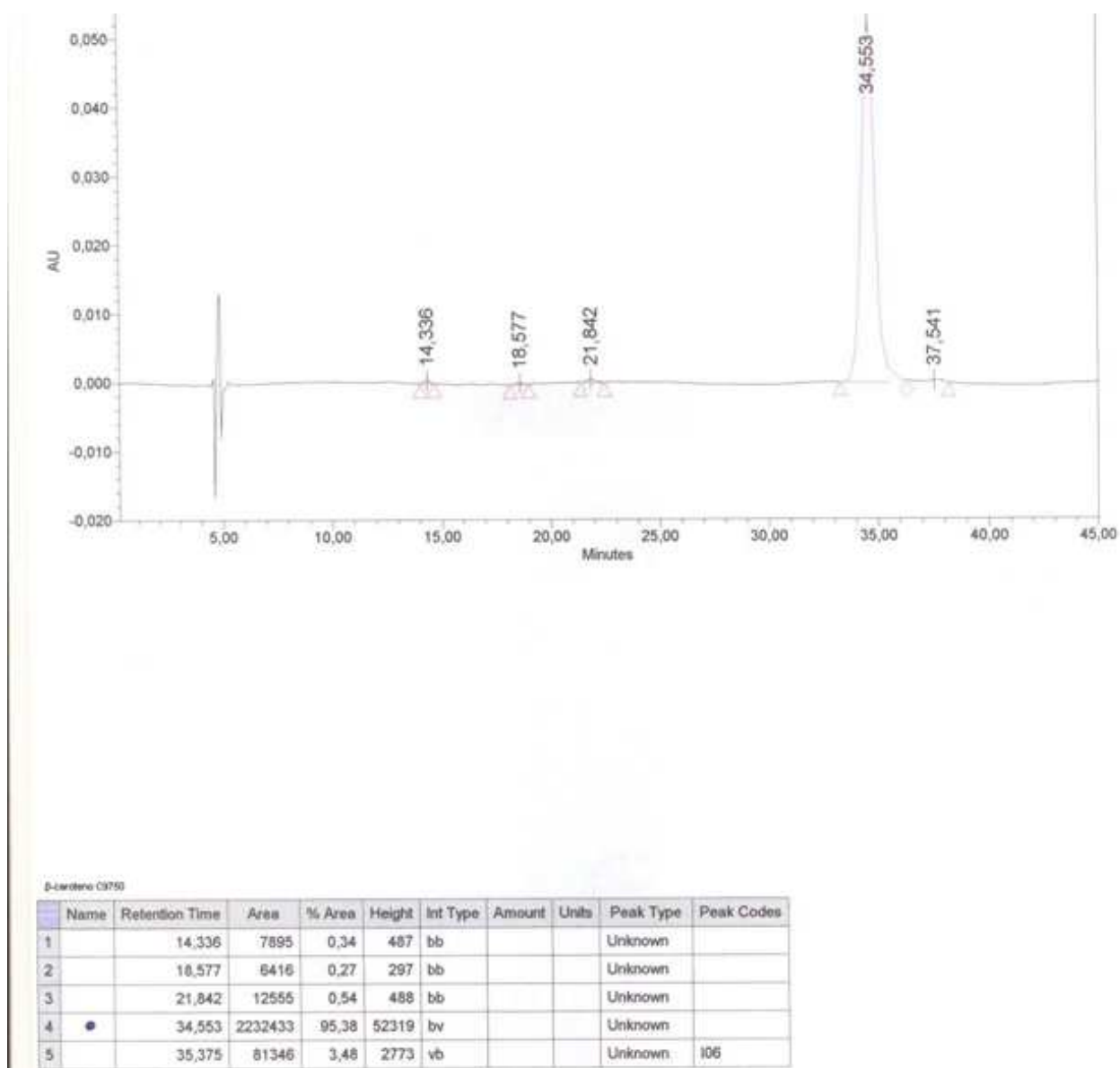
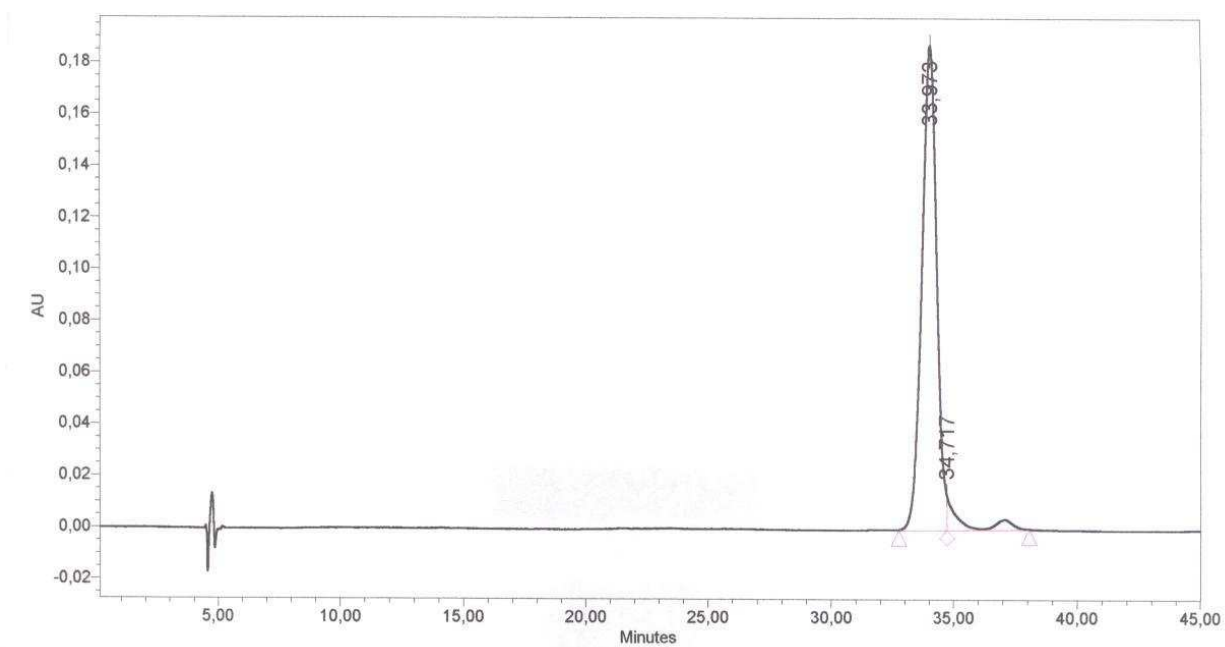


Figura 9.8 - Porcentagem em área da pureza do padrão β -caroteno C9750.



β-caroteno 22040

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1		33,973	7846790	94,08	187577	bv			Unknown	
2		34,717	493693	5,92	13468	vb			Unknown	I06

Figura 9.9 - Porcentagem em área da pureza do padrão β-caroteno 22040.