

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Engenharia de Processos

**Inativação de fungos e extração de
azadiractina e óleo de sementes de nim
(*Azadirachta indica* A. Juss) utilizando
fluidos supercríticos**

Autor: Júlia Natália de Oliveira Mazoni

Orientador: Theo Guenter Kieckbusch

Co-orientador: Álvaro Bandeira Antunes de Azevedo (Petrobrás)
Paulo Mazzafera (IB/UNICAMP)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo

Setembro de 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M458i Mazoni, Julia Natalia de Oliveira
Inativação de fungos e extração de azadiractina e óleo de sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) utilizando fluidos supercríticos / Julia Natália de Oliveira Mazoni. --Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Theo Guenter Kieckbusch, Álvaro Bandeira Antunes de Azevedo.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Extração com fluidos supercrítico. 2. Inseticidas - Microbiologia. I. Kieckbusch, Theo Guenter. II. Paulo Mazzafera. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Fungi inactivation and extraction of azadirachtin and oil from neem seeds (*Azadirachta indica* A. Juss) using supercritical fluids

Palavras-chave em Inglês: Supercritical fluid extraction, Microbiology insecticides

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Theo Guenter Kieckbusch, Maria Regina Wolf Maciel, Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Data da defesa: 26/09/2008

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Julia Natalia de Oliveira Mazoni e aprovada em 26 de setembro de 2008 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Maria Regina Wolf Maciel FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa IQ/UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química de Júlia Natália de Oliveira Mazoni



Theo Guenter Kieckbusch

Orientador

Dedicatória

À minha família:

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, Paulo e Maria José, minha irmã Ana Paula e meus avós Maria e Deoclides (in memoriam), pelo amor, carinho, paciência, confiança e motivação, essenciais para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e a FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo.

Ao professor Theo Guenter Kieckbusch pela orientação, compreensão, estímulo e ensinamentos que contribuíram para a qualidade deste trabalho. Aos professores Paulo Mazzafera e Álvaro Bandeira pela co-orientação, essências a composição deste trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia de Processos e Produtos em Biorrecursos (LEPPbio) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Ao professores Fernando Cabral e Paulo Rosa pela contribuição no trabalho.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras, FEA, pela realização das análises do óleo obtido. Ao ITAL, pela disponibilização dos laboratórios e técnicas, e às pesquisadoras Marta H. Taniwaki e Beatriz T. Iamanaka que contribuíram com ensinamentos e muita paciência nas análises microbiológica.

À minha família pelo amor, carinho e dedicação, que sempre me serviram como referência na vida. Ao Francisco pela paciência e apoio incondicional em todas as situações enfrentadas durante a minha estadia em campinas.

Aos amigos que conquistei nestes dois anos presentes na Unicamp, em especial a Élide, pelo apoio e ajuda durante as etapas do trabalho, á Mariana pela paciência e amizade e Vanessa pela ajuda constante.

“Os poderosos poderão matar uma, duas, ou até três rosas, mas nunca deterão a Primavera. Muitos dirão que sou aventureiro, e sou mesmo, só que de um tipo diferente, daqueles que entregam a própria vida para demonstrar suas verdades. Sim é preciso amadurecer, mas sem jamais perder a ternura. Até a vitória, sempre....” Ernesto Che Guevara

RESUMO

O nim (*Azadirachta indica A. Juss*) é uma árvore originária da Índia e seus extratos são amplamente utilizados na medicina popular como anti-séptico, vermífugo, contraceptivo, sabões, xampus, pastas dentais medicinais e no tratamento de várias moléstias. O principal princípio ativo encontrado nas sementes e em menor proporção no óleo de nim é a azadiractina, um tetranotriterpenóide que possui atividade inseticida. Este trabalho avaliou a aplicação de processos que usam fluidos supercríticos (FSC) em sementes (amêndoas moídas) de nim cultivadas no Estado de Pernambuco, contendo 1,05% de azadiractina (determinado por Soxhlet usando etanol) e 47,4% de óleo (determinado por Soxhlet utilizando hexano). As pressões de operação usadas foram 150, 200 e 250 bar nas temperaturas de 50, 60 e 70°C (ensaios de extração com CO₂ puro) e pressões de 200 e 300 bar nas temperaturas de 50 e 60°C (ensaios de extração com CO₂ contendo 5 ou 10% de etanol como co-solvente). A solubilidade do óleo em CO₂ supercrítico aumenta com o incremento da pressão e diminui com o aumento da temperatura. A 300 bar e 50°C a solubilidade é de 6,8 g de óleo/kg de CO₂. Nos ensaios a 250 bar e 50°C o CO₂ puro foi capaz de remover 90% do óleo, mas apenas 6,4% de azadiractina das sementes. O uso de etanol como co-solvente favoreceu a extração de óleo (aumentos de 25%) e também de azadiractina, observando-se aumentos da ordem de 5 vezes para este princípio ativo. Um ensaio exploratório em duas etapas seqüenciais, a 50°C e 200 bar usando inicialmente 1800 g de CO₂ puro, seguida de 1500 g de CO₂+ 10% etanol, produziu uma fase oleosa na segunda etapa contendo cerca de 1,5% de azadiractina. Ensaios utilizando ciclos de pressão e despressurização de CO₂ puro (entre 100 e 200 bar) a 40 e 60°C visando a inativação de fungos presentes no nim mostraram-se eficientes na redução da contaminação de *Aspergillus* em sementes inteiras de nim (redução de até 80%), mas apresentaram resultados inconclusivos para as sementes moídas. Estes resultados são promissores para o desenvolvimento de uma tecnologia não-térmica de inativação que é quimicamente não-agressiva ao produto, usam temperaturas amenas e pressões que podem ser consideradas moderadas em comparação a processos de inativação a altas pressões (HPT).

Palavras-chaves: Nim, fluidos supercríticos, extração, azadiractina, óleo, inativação, fungos.

ABSTRACT

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) is a tree that grows naturally in India and neem extracts are widely used in the traditional medicine as antiseptic, worm killer, contraceptive, medicinal soaps, shampoos and toothpastes and for the treatment of several health disorders. The main active component found in the seeds and in lesser amount in neem oil is azadirachtin, a tetrano-triterpenoid with insecticide properties. This work evaluated the applicability of processes that use supercritical fluids on milled seeds of neem cultivated in the State of Pernambuco, Brazil, containing 1.05% of azadirachtin (determined by Soxhlet with ethanol) and 47,4% of oil (determined by Soxhlet with hexane). The operational pressures used were 150, 200, 250 bar at 50, 60 and 70°C temperature (extraction runs with pure CO₂) and pressures of 200 and 300 bar and temperatures of 50 and 60°C (extraction runs with CO₂+ethanol as co-solvent). The solubility of neem oil in supercritical CO₂ increases with the increase of pressure and decreases when temperature increases. At 300 bar and 50°C the solubility is 6,8 g of oil/kg of CO₂. Runs with pure CO₂ at 250 bar and 50°C were able to remove 90% of the oil, but only 6.4% of azadirachtin from the seeds. Using ethanol as co-solvent improved the oil extraction in about 20% and boosted the recovery of azadirachtin 5 times. A two-step extraction run, at 50°C and 200 bar using 1800 g of pure CO₂ followed by 1500 g of CO₂+10% ethanol produced an oil phase with 1,5% of azadirachtin. Runs using pure CO₂ under cycling pressure varying between 100 and 200 bar, at 40 and 50°C in order to inactivate naturally occurring molds in neem showed effective reduction of *Aspergillus* contamination in whole seeds (80% reduction), but inconclusive results for milled seeds. These results seems promising for the development of non-thermal inactivation treatments that are chemically non-aggressive to the products, use mild temperatures and pressures that can be considered moderate compared to HPT processes.

Key-words: neem, supercritical fluids, extraction, azadirachtin, oil, mold, inactivation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
I.1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA	1
I.2. OBJETIVOS DA PESQUISA	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
II.1. <i>AZADIRACTHA INDICA A. JUSS</i> (NIM)	5
II.1.1. Ação inseticida do nim	9
II.1.2. Azadiractina	11
II.1.3. Óleo de nim	13
II.2. EXTRAÇÃO DO ÓLEO E DA AZADIRACTINA DO NIM	15
II.2.1. Solventes orgânicos – Soxhlet	15
II.2.2. Fluidos supercríticos (FSC)	17
II.3. UTILIZAÇÃO DE CO-SOLVENTES (MODIFICADORES)	21
II.4. EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS A PARTIR DE MATRIZES SÓLIDAS UTILIZANDO FSC	22
II.4.1. Influência do diâmetro da partícula	24
II.5. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DOS COMPOSTOS DO NIM	25
II.6. FUNGOS PRESENTES NAS SEMENTES DE NIM	26
II.6.1. Metodologias para detecção de aflatoxina e ocratoxina	28
II.7. INFLUÊNCIA DA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS	28
MATERIAIS E MÉTODOS	31
III.1. SOLVENTES	31
III.2. MATÉRIAS-PRIMAS	31
III.3. SEMENTES DE NIM	32
III.3.1. Pré-tratamento: Moagem e distribuição granulométrica	32
III.3.2. Conteúdo de Umidade	32
III.4. MÉTODO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO: SOXHLET	32
III.5. EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	33
III.6. ENSAIOS DE SOLUBILIDADE DO ÓLEO DE NIM	35
III.7. EXTRAÇÃO DA AZADIRACTINA E DO ÓLEO DAS SEMENTES COM CO ₂ -PURO	36
III.8. EXTRAÇÃO DE ÓLEO E AZADIRACTINA COM CO ₂ + CO-SOLVENTE	37
III.9. EXTRAÇÃO FRACIONADA	38
III.10. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS	38
III.10.1. Óleo de nim	38
III.10.2. Teor de azadiractina	38
III.11. ENSAIOS DE INATIVAÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES DE NIM COM FSC	39
III.11.1. Contaminação inicial por fungos nas sementes de nim	40
III.11.2. Sementes inteiras	40
III.11.3. Sementes moídas	41
III.11.4. Inativação por FSC	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
IV.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMÊNDOAS DE NIM	44
IV.2. SEPARAÇÃO GRANULOMÉTRICA DAS SEMENTES MOÍDAS DE NIM	44
IV.3. EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS	45

IV.3.1. Extração do óleo	45
IV.3.2. Extração da azadiractina	46
IV.4. SOLUBILIDADE DO ÓLEO DE NIM EM FSC	47
IV.5. EXTRAÇÃO DE AZADIRACTINA CONTIDA NO ÓLEO	52
IV.6. EXTRAÇÃO DE ÓLEO E DE AZADIRACTINA DE SEMENTES DE NIM COM CO ₂ -SC.....	54
IV.6.1. Ensaios de extração	54
IV.6.1.1. Extração do óleo	54
IV.6.2.2. Extração da azadiractina	58
VI.7. EXTRAÇÃO DE ÓLEO E DE AZADIRACTINA COM CO ₂ + ETANOL	60
IV.7.1.Extração do óleo	61
IV.7.2. Extração da azadiractina	64
IV.8. EXTRAÇÃO FRACIONADA DOS COMPOSTOS DE SEMENTES DE NIM.....	66
IV.9. INATIVAÇÃO DE FUNGOS COM FSC.....	70
IV.9.1. Contaminação inicial das sementes de nim	70
IV.9.1.1. Plaqueamento direto com e sem desinfecção das sementes inteiras	70
IV.9.1.2. Isolamento de fungos para identificação e verificação da produção de toxinas	72
IV.9.1.3. Produção de toxinas	72
IV.9.1.4. Sementes moídas	73
IV.9.2. Ensaios de inativação por FSC	74
IV.9.2.1. Análise microbiológica	74
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
Apêndice A	93
ÓLEO DE NIM	93
A.1. METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE NIM	93
A.2. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO BRUTO DE NIM	94
A.3. COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS OBTIDOS POR PRENSA, SOXHLET E FSC.....	95
Apêndice B	101
B. QUANTIFICAÇÃO DA AZADIRACTINA	101
Apêndice C	103
C. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	103
C.1. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINAS (CCD)	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1: <i>Azadirachta indica</i> A.Juss, Nim.	6
Figura II.2: Flores e frutos de nim (Fonte: Moraes <i>et al.</i> , 2008).	6
Figura II.3: Estruturas de compostos extraídos do nim, propostas por Johnson e Morgan (1997a).	8
Figura II.4: Estrutura da azadiractina (Johnson e Morgan, 1997a). Fórmula molecular: $C_{35}H_{44}O_{16}$ e massa molar 720,7 (g/mol).	11
Figura II.5: Rota de degradação de triterpenos seguidos pelas plantas da ordem <i>Rutales</i> (Santos, 2003).	12
Figura II.6: Síntese da azadiractina, a partir do vepaol (Adaptado de Veitch <i>et al.</i> , 2008).	12
Figura II.7: Diagrama de fases de uma substância pura.	17
Figura II.8: Diagrama P ρ T para o dióxido de carbono (Kopcak, 2003).	19
Figura II.9: Solubilidade da cafeína no CO ₂ (Saldaña <i>et al.</i> , 1999).	20
Figura II.10: Representação gráfica de curvas de extração de produtos naturais típico de sistemas utilizando FSC (método dinâmico).	23
Figura II.11: Influência do diâmetro da partícula na extração de óleo de sementes de uva utilizando CO ₂ -SC (Sovová <i>et al.</i> , 1994).	24
Figura II.12: Efeito do tamanho da partícula no rendimento da extração de nimbina (308 K, 20 MPa) (Tonthubthimthong <i>et al.</i> , 2004).	25
Figura III.1: Esquema do equipamento de extração por FSC, LEPPbio/FEQ/UNICAMP (Azevedo, 2005).	34
Figura III.2: Equipamento de extração supercrítica modular (LEPPbio/FEQ), desenvolvido por Azevedo (2005).	37
Figura III.3: Etapas para a caracterização de fungos presentes nas sementes de nim (Pitt e Hocking, 1999).	41
Figura IV.1: Curvas de extração do óleo de nim a diferentes condições de pressão e temperatura, vazão de CO ₂ de 0,7 L/min.	48
Figura IV.2: Curvas de extração do óleo de nim utilizando CO ₂ -SC puro a 50°C e vazão de 0,7 L/min de CO ₂	48
Figura IV.3: Curvas de extração do óleo de nim utilizando CO ₂ -SC puro, a 60°C e vazão de 0,7 L/min de CO ₂	49
Figura IV.4: Solubilidade do óleo de nim em função da pressão e da temperatura.	51
Figura IV.5: Solubilidade do óleo de nim em função da densidade do CO ₂	51
Figura IV.6: Curvas de extração da azadiractina obtidas nos ensaios de solubilidade do óleo de nim bruto.	53
Figura IV.8: Curvas de extração do óleo de sementes de nim com CO ₂ -SC puro a temperatura de 50°C.	55
Figura IV.9: Curvas de extração do óleo de sementes de nim com CO ₂ -SC puro, a temperatura de 60°C.	55
Figura IV.10: Curvas de extração do óleo de sementes de nim com CO ₂ -SC puro, a temperatura de 70°C.	56
Figura IV.11: Recuperação do óleo de sementes de nim em função da pressão, com a utilização de 1570g de CO ₂ -SC puro, em diferentes condições de operação.	57
Figura IV.12: Recuperação do óleo de sementes de nim em função da densidade, com a utilização de 1570g de CO ₂ -SC puro, em diferentes condições de operação.	57

Figura IV.13: Curvas de extração da azadiractina de sementes de nim, utilizando CO ₂ -SC puro, a 50°C.	58
Figura IV.14: Curvas de extração da azadiractina de sementes de nim, utilizando CO ₂ -SC puro, a 60°C.	58
Figura IV.15: Curvas de extração da azadiractina de sementes de nim, utilizando CO ₂ -SC puro, a 70°C.	59
Figura IV.16: Recuperação de azadiractina das sementes de nim, após a passagem de 1570 g de CO ₂ -SC puro, em diferentes condições de operação.	60
Figura IV.17: Curvas de extração do óleo de nim, com CO ₂ puro e CO ₂ + etanol (5 e 10% m/m), nas pressões de 200 bar e temperatura de 50°C.	62
Figura IV.18: Curvas de extração do óleo de nim, com CO ₂ puro e CO ₂ + etanol (5 e 10% m/m), nas pressões de 200 e 300 bar e temperatura de 60°C.	62
Figura IV.19: Curvas de extração de azadiractina com CO ₂ puro e CO ₂ + etanol, na pressão de 200 e 300 bar, a 50°C e 5 e 10% em etanol (m/m).	65
Figura IV.20: Curvas de extração da azadiractina, com CO ₂ puro e CO ₂ + etanol, nas pressões de 200 e 300 bar, 60°C e 5 e 10% em etanol (m/m).	65
Figura IV.21: Recuperação da azadiractina das sementes de nim, com o uso de CO ₂ puro e CO ₂ + etanol.	66
Figura IV.22: Extração do óleo de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC puro (1º etapa) e 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC + 10% etanol (m/m) (2º etapa).	67
Figura IV.23: Extração de azadiractina de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC puro (1º etapa) e 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC + 10% etanol (m/m) (2º etapa).	68
Figura IV.24: <i>Segunda curva fracionada.</i> Extração do óleo de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC puro (1º etapa) e 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC + 10% etanol (m/m) (2º etapa).	69
Figura IV.25: <i>Segunda curva fracionada.</i> Extração de azadiractina de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC puro (1º etapa) e 200 bar, 50°C e CO ₂ -SC + 10% etanol (m/m) (2º etapa).	69
Figura IV.26: Fotografia de placa contendo colônias de <i>Aspergillus eurotium</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i> (plaqueamento direto com desinfecção, meio DG18).	70
Figura IV.27: Fotografia de placa contendo colônias de fungos diversos (plaqueamento direto sem desinfecção das sementes, meio DG18).	70
Figura IV.28: Diluição (-2), (-3), (-4) e (-5) aplicada a sementes moídas de nim. Fungo <i>Aspergillus eurotium</i>	73
Figura IV.29: Fotografia das placas após a inativação por FSC (Plaqueamento direto). a: sem desinfecção e b: com desinfecção das sementes inteiras.	75
Figura IV.30: Fotografia de placas após a inativação por FSC de sementes moídas método da diluição, sementes moídas, 40°C (método da diluição).	75

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1: Pragas controladas por extrato aquoso de nim (Menezes, 2005).....	10
Tabela II.2: Concentração de azadiractina encontrada em sementes de nim.	13
Tabela II.3: Composição em ácidos graxos (%) do óleo de nim (Kaushik, 2002 e Kumar e Parmar, 1996).	14
Tabela II.4: Aplicação de FSC na extração de óleo vegetal.....	15
Tabela II.5: Propriedades críticas de algumas substâncias.....	18
Tabela II.6: Propriedades físicas de gás, líquido e FSC (Carrilho <i>et al.</i> , 2001).	19
Tabela III.1: Metodologias para a quantificação da azadiractina em CLAE.....	39
Tabela IV.1: Caracterização das amêndoas de nim.....	44
Tabela IV.2: Distribuição de tamanho de partículas de sementes de nim após a moagem. .	45
Tabela IV.3: Conteúdo de azadiractina em sementes de nim, obtido por extração com solventes orgânicos.....	47
Tabela IV.4: Solubilidade do óleo de nim e recuperação do óleo de nim em CO ₂ -SC puro a diferentes temperaturas e pressões.	50
Tabela IV.5: Recuperação da azadiractina do óleo de nim bruto com FSC.....	54
Tabela IV.7: Eficiência do óleo de nim em extrações com FSC (CO ₂ -SC puro e CO ₂ -SC + etanol).	64
Tabela IV.8: Contaminação inicial das sementes inteiras de nim por fungos (plaqueamento direto com desinfecção).....	71
Tabela IV.9: Contaminação inicial das sementes inteiras de nim, por fungos (plaqueamento direto sem desinfecção).	71
Tabela IV.10: Fungos produtores de toxinas (plaqueamento com desinfecção).....	72
Tabela IV.11: Colônias de <i>Aspergillus eurotium</i> em sementes moídas de nim referentes a diluição (-2).....	73
Tabela IV.12: Contaminação das sementes após inativação por FSC em 200 bar (ΔP 100 bar), nas temperaturas de 40 e 60°C (plaqueamento direto), valores em % de contaminação geral por fungos.	76
Tabela IV.13: Concentração de <i>Aspergillus eurotium</i> em sementes moídas, inativadas a 200 bar (ΔP 100 bar), nas temperaturas de 40 e 60°C (método de diluição).....	77

Capítulo I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I.1. Introdução e relevância da pesquisa

O crescimento populacional ao longo das últimas décadas resultou, entre outros problemas, em um aumento na demanda por alimentos. A agricultura que, inicialmente, era praticada em estruturas familiares, passou a ser desenvolvida em grandes propriedades, denominadas monoculturas extensivas, caracterizadas por apresentarem baixo nível de diversidade biológica e alto uso de insumos externos, especialmente fertilizantes químicos sintéticos e agrotóxicos utilizados para prevenir ou combater pragas (Menezes, 2005, Sanches *et al.*, 2003 e Viegas, 2003).

A utilização excessiva de agrotóxicos nas lavouras sem obedecer a um planejamento e sem prévia assistência técnica trouxe, como consequência, uma exposição do produtor rural ou agricultor a riscos de intoxicação, danos à produtividade da agricultura e também um desequilíbrio do ecossistema.

Os impactos ambientais devido à utilização de pesticidas já são evidentes. Dentre os mais graves, estão o acúmulo de organoclorados em espécies aquáticas, a contaminação dos solos, das águas superficiais e dos lençóis freáticos, modificações de ecossistemas pela extinção de espécies não-alvo, a redução na biodiversidade e a formação de resistência contra os pesticidas. A permanência de resíduos nos alimentos ou a contaminação por exposição faz com que compostos ativos se acumulem nos tecidos animais, podendo resultar em doenças neurológicas e câncer (Flores *et al.*, 2004 e Brechelt, 2004).

Historicamente, as primeiras substâncias a serem utilizadas para combater pragas ou doenças foram enxofre, cal e alguns sais de arsênio. Após a Segunda Guerra Mundial, o número de substâncias novas e o uso extensivo de pesticidas na agricultura aumentaram enormemente (Sanches *et al.*, 2003).

Os pesticidas são denominados de “agrotóxicos” pela legislação brasileira e classificados como inseticidas, fungicidas ou herbicidas, de acordo com a sua atuação. Os agrotóxicos englobam uma série de classes de compostos entre as quais se pode citar:

organoclorados, organofosforados, carbamatos, clorofenoxiácidos, triazinas e glifosato (Sanches *et al.*, 2003 e Brechelt, 2004).

As publicações mais recentes da Organização Internacional do Trabalho/Organização Mundial da Saúde (OIT/OMS) estimam que, entre trabalhadores de países em desenvolvimento, os agrotóxicos causam anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito, e pelo menos 7 milhões de ocorrências de doenças agudas e crônicas não-fatais. Estudos brasileiros e em outros países têm destacado os elevados custos para a saúde humana e ambiental e também perdas econômicas na agricultura, devido ao uso destes produtos (Müller *et al.*, 2007).

Como consequência desta situação, as legislações que regulamentam os níveis de agrotóxicos nos alimentos ficaram mais severas, bem como as que regem a conservação ambiental. Nos últimos anos tem se registrado um comportamento de rejeição por grande parte da população a produtos alimentícios cultivados com o uso destas substâncias e uma migração para o consumo de alimentos denominados “orgânicos”. Um produto orgânico é cultivado sem o uso de adubos químicos ou agrotóxicos e sem a utilização de muitos recursos econômicos diminuindo os efeitos nocivos ao meio ambiente e ao homem.

O interesse em desenvolver e usar inseticidas botânicos para o manejo de pragas tem aumentando nos últimos anos e estima-se um crescimento anual na ordem de 10 a 15%. Esse interesse vem ao encontro da necessidade de busca por métodos alternativos de menor impacto ou riscos à saúde humana e ao meio ambiente, bem como pela crescente demanda por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos (Menezes, 2005 e Brechelt, 2004).

Dentre os inseticidas botânicos atualmente estudados, os mais promissores são os subprodutos do nim (*Azadirachta indica A. Juss*). Sua ação está baseada na presença em todas as partes desta planta de substâncias denominadas limonóides.

O nim é uma árvore nativa da Índia e do Paquistão, que apresenta rápido crescimento e tem-se adaptado com grande facilidade ao clima de países localizados nos trópicos (Johnson e Morgan, 1997 a ,b). No Brasil, ela foi introduzida na década de 80 no Estado do Paraná, mas a oferta de seus subprodutos no mercado nacional ainda é pequena. Existem plantações dessa árvore em algumas regiões, como nordeste, centro-oeste e sul do país (Martinez, 2002).

Durante os últimos anos, muitas substâncias ativas foram isoladas do nim. Estes compostos são denominados de tetranotriterpenóides ou meliacinas (devido ao seu sabor amargo) e ainda chamados de limonóides, dos quais a azadiractina, nimbina e salanina são os mais importantes. Todas as partes da planta possuem esses componentes (caule, folhas e sementes), sendo maior a concentração nas sementes de nim. Esta variação na concentração e composição depende das condições ambientais, fatores genéticos e do tratamento feito durante o processamento que inclui as etapas de despulpamento, secagem e armazenamento (Schmutterer, 1990, Sidhu *et al.*, 2003 e Menezes, 2005).

Os limonóides presentes nas folhas e nas sementes de nim têm-se mostrado eficientes no combate a mais de 200 tipos de pragas ou organismos perniciosos (Thejavathi *et al.*, 1995). A sua potente ação inseticida se deve a alguns efeitos sobre os insetos tais como inibição da reprodução e da alimentação e queda da fecundidade e do crescimento (Ambrosino *et al.*, 1999). No mercado existem repelentes e inseticidas formulados a partir das sementes de nim. Entretanto, estes produtos ainda não estão estabelecidos devido à falta de padronização, gerando grande variação de eficiência e da concentração dos princípios ativos (Schaaf *et al.*, 2000).

Para a extração dos limonóides e do óleo presentes nas sementes de nim, utiliza-se uma metodologia convencional baseada no uso de solventes orgânicos. Este tipo de extração possui algumas desvantagens como a necessidade do uso de altas temperaturas do processo podendo degradar os compostos que são termicamente sensíveis e de grande quantidade de solventes tóxicos, além da incapacidade de inativar os fungos presentes nas sementes e nas folhas de nim, que causam redução do tempo de vida de prateleira do produto, um dos objetivos deste trabalho.

A tecnologia de fluidos supercríticos é uma alternativa viável aos métodos convencionais de extração e recomendada na extração de princípios ativos de produtos naturais. Esta técnica de extração possui como características principais a fácil separação do soluto e do solvente, a não geração de resíduos e a utilização de condições brandas de processo. A eficiência desta técnica na inativação dos fungos presentes nas sementes de nim ainda está para ser verificada.

I.2. Objetivos da pesquisa

O objetivo geral deste trabalho é a extração da azadiractina e do óleo presentes nas sementes de nim (*Azadirachta indica A. Juss*) empregando a versátil tecnologia que utiliza solventes supercríticos. A pesquisa visa ainda avaliar a eficiência da tecnologia na inativação de fungos do Gênero *Aspergillus* geralmente presente nas sementes de nim.

Para atingir o objetivo proposto serão realizados os seguintes estudos:

1- Determinação do comportamento da solubilidade do óleo de nim em CO₂-SC puro, em função das condições de pressão e temperatura.

2- Avaliar o processo de extração supercrítica do óleo de nim e da azadiractina com CO₂-SC e co-solventes verificando o efeito das variáveis termodinâmicas (pressão, temperatura e natureza do solvente) na recuperação das extrações.

3- Avaliar o efeito das variáveis de processo (pressão e temperatura) na inativação de fungos contidos nas sementes através do processo de extração supercrítica.

Capítulo II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre os tópicos relevantes desta pesquisa. Inicialmente, serão abordadas as características, aplicações medicinais e inseticidas do nim. Neste contexto, destaca-se o método de extração convencional de princípios ativos de produtos naturais em comparação ao método utilizando fluidos supercríticos.

II.1. *Azadirachta indica* A. Juss (Nim)

Azadirachta indica A. Juss (**Figura II.1**) é uma árvore originária da Índia e do Paquistão pertencente à família *Meliaceae*, ordem *Rutales*, e é encontrada normalmente em todo subcontinente Índico (Sidhu *et al.*, 2003).

No Brasil, esta planta é popularmente conhecida como Nim ou Margosa. O Nim pertence à mesma família do mogno (*Swietenia macrophylla*) e do cedro-rosa (*Cedrela sp*) e caracteriza-se por possuir madeira de alta qualidade, o que justifica o seu uso para diversas finalidades como produção de móveis, construção civil, batentes e portas, caixas e caixotes, lenha, carvão, etc. (Schmutterer, 1990 e Martinez, 2002).

O nim estabelece-se melhor em regiões com baixa atividade pluviométrica e em solos arenosos, com pH variando de 6,5 a 7,5, a uma temperatura média de 20°C. Devido a estas características, esta planta está sendo muito utilizada no reflorestamento de áreas devastadas (Schmutterer, 1990 e Sidhu *et al.*, 2003). O porte desta árvore pode variar de 15 a 25 m de altura, o diâmetro da copa de 8 a 12 m. As flores (**Figura II.2 a**) são pequenas, brancas e bissexuadas, as inflorescências possuem 25 cm de comprimento. Os frutos (**Figura II.2 b**) são lisos e possuem polpa envolvendo as sementes (Schmutterer, 1990 e Mossini e Kemmelmeier, 2005).

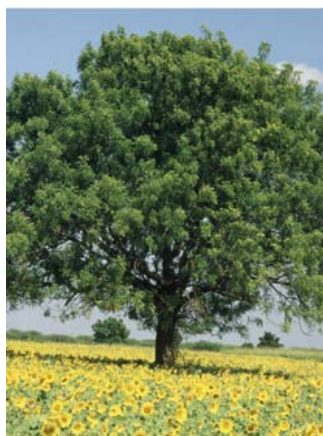


Figura II.1: *Azadirachta indica* A.Juss, Nim.



(a)

(b)

Figura II.2: Flores e frutos de nim (Fonte: Moraes *et al.*, 2008).

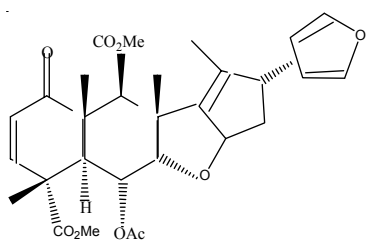
Na Ásia o Nim tem sido usado há séculos como planta medicinal. Possui diversas aplicações, em especial como anti-séptico, vermífugo, contraceptivo (espermicida), preparo de sabões medicinais, xampus, tônicos capilares, cremes e pastas dentais. Ele também tem sido utilizado no tratamento de diabetes, malária e doenças de pele, além de possuir propriedades antibacteriana e antivirais.

Atualmente, o grande interesse por esta planta está direcionado ao uso de seus extratos como inseticida natural, prática que se intensificou nos últimos 30 anos quando seu principal composto, a azadiractina, foi isolado (Butterworth e Morgan, 1968 e 1972, Johnson e Morgan, 1997 a, b, Schaaf *et al.*, 2000, Neves *et al.*, 2003 e Menezes, 2005).

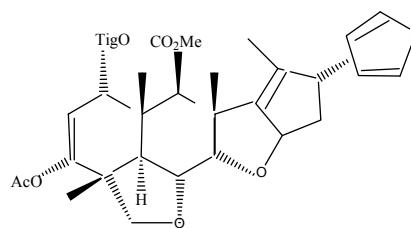
As sementes do nim contêm uma mistura de compostos químicos. Há pelo menos 11 tetranotriterpenóides importantes além da azadiractina, que funcionam como princípios ativos, dos quais 6 possuem estruturas químicas muito semelhantes à azadiractina. A

estrutura destes compostos está apresentada na **Figura II.3** de acordo com Johnson e Morgan (1997a).

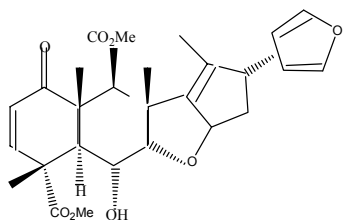
A rota de síntese para a produção de azadiractina é muito complexa, não sendo uma opção viável para a produção comercial de produtos usados como pesticidas. Desta maneira, torna-se necessário desenvolver um eficiente método de extração dos compostos desta planta (Ley *et al.*, 1993, Johnson e Morgan, 1997b e Menezes, 2005). O interesse da indústria na produção de azadiractina só não é maior por causa da dificuldade de extração em grandes quantidades (Viegas, 2003).



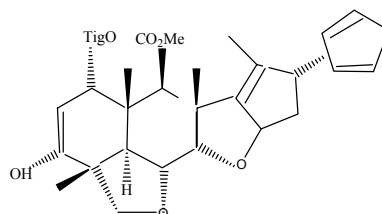
(a) Nimbina



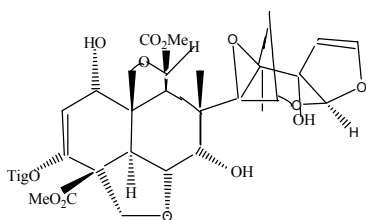
(b) Salanina



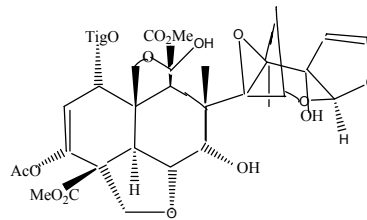
(c) 6-desacetilnimbina



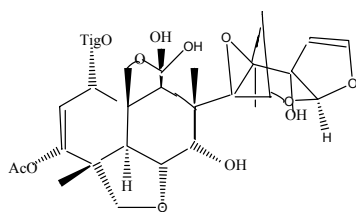
(d) 3-desacetilsalanina



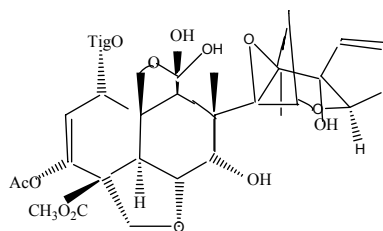
(e) 3-tigliolazadiractol, azadiractina D



(f) Azadiractina A



(g) Azadiractina I



(h) Azadiractina H

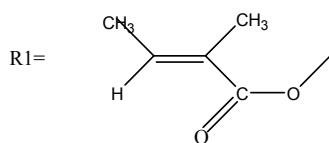


Figura II.3: Estruturas de compostos extraídos do nim, propostas por Johnson e Morgan (1997a).

II.1.1. Ação inseticida do nim

A toxicidade de uma substância química não a classifica como inseticida. Diversas propriedades devem ser levadas em conta para que o produto receba tal denominação, como, por exemplo, a eficácia mesmo em baixas concentrações, a baixa toxicidade em mamíferos e animais superiores, a ausência de fitotoxicidade, seletividade, degradação, método de obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e também não deve ser acumulativo no tecido adiposo humano e de animais domésticos (Viegas, 2003 e Menezes, 2005).

A ação inseticida do nim é devido à grande quantidade de compostos ativos presentes em suas folhas, frutos e sementes, sendo a azadiractina o mais importante componente (Ambrosino *et al.*, 1999). A quantidade deste composto presente na planta varia de acordo com fatores climáticos e genéticos (Sidhu *et al.*, 2003).

A azadiractina possui amplo espectro de ação, não é tóxica ao homem e não é agressiva ao meio ambiente sendo considerada biodegradável (Johnson e Morgan, 1997 b, Neves *et al.*, 2003, Brechelt, 2004 e Menezes 2005). As toxicidades oral e dermal da azadiractina em mamíferos são muito baixas, sendo a LD₅₀ oral de 13000 mg/kg, valor superior ao LD₅₀ 10000 g/kg do piretro, rotenona e nicotina (Menezes, 2005).

A azadiractina pode afetar os insetos tanto por ingestão como por contato, porém por ingestão o efeito é significativamente maior. Esta ação pode ser devido à semelhança da estrutura molecular da azadiractina com a do hormônio da ecdise (processo de troca do esqueleto externo dos insetos) interferindo, assim, no processo de crescimento, sendo que em altas concentrações pode levar o organismo à morte. A presença da azadiractina também reduz o consumo de alimentos pelos insetos (ação supressora de apetite), além de repelir os espécimes adultos diminuindo a postura de ovos nas áreas afetadas. Segundo estudos feitos pelo IAPAR-Instituto Agrônomo do Paraná, as espécies de insetos mais facilmente controladas são as lagartas, pulgões, cigarrinhas e besouros mastigadores (Martinez, 2002). A **Tabela II.1** relaciona alguns cultivos e as principais pragas que os afetam, como também a dose necessária de extrato aquoso dos frutos do nim para combatê-los.

Tabela II.1: Pragas controladas por extrato aquoso de nim (Menezes, 2005).

Cultivo	Praga (nome popular)	Dosagem (g/L)
Berinjela	Mosca-branca	50
Tomate	Mosca-branca	37
	Lagarta da espiga	25
	Mosca minadora	25
Feijão	Mosca-branca	50
Milho	Lagarta do cartucho	25
	Lagarta da espiga	25
Alho	Mosca-branca	50
	Lagarta-militar	25

Os extratos para a aplicação em culturas podem ser preparados com a simples trituração das sementes ou frutos adicionados em água, deixando a mistura descansar por 12 horas. Esta mistura é filtrada e o líquido é pulverizado sobre as áreas infestadas. O mesmo procedimento pode ser usado para folhas, frescas ou secas, embora a concentração de azadiractina nessas partes seja menor.

O óleo inseticida de nim pode ser extraído pela prensagem das sementes, obtendo-se no máximo 47% de óleo (% de massa total), que contém cerca de 10% da azadiractina existente no fruto. A torta restante desta prensagem ainda é muito rica em azadiractina, tendo efeito nematocida e servindo como adubo orgânico, podendo, também, ser seca e utilizada para preparo de extratos inseticidas em mistura com água (Martinez, 2002 e Menezes, 2005).

Dentre as desvantagens do uso de inseticidas botânicos está a baixa permanência no meio (são rapidamente degradados), carência de pesquisas e a dificuldade de registro do produto. Da mesma forma como para os inseticidas sintéticos, as substâncias ativas presentes e suas concentrações devem ser especificadas na formulação e no registro de inseticidas botânicos provenientes do nim. Devido à grande quantidade de substâncias que atuam com propriedades inseticidas nesses extratos, essa exigência tem desestimulado sua comercialização (Schmutterer, 1995).

II.1.2. Azadiractina

O nim apresenta um grande número de compostos biologicamente ativos e quimicamente diversificados. O principal componente responsável pela atividade inseticida do nim é a azadiractina. A azadiractina foi isolada primeiramente em 1968 por Butterworth e Morgan (1968), porém sua estrutura química somente foi elucidada nos últimos anos e está esquematizada na **Figura II.4**.

Os compostos salanina e nimbina (**Figura II.3**) também possuem atividade biológica, porém a ação da azadiractina é mais potente (Viegas, 2003 e Schmutterer, 1995).

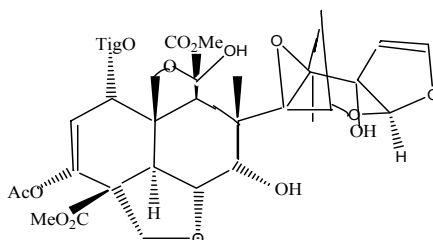


Figura II.4: Estrutura da azadiractina (Johnson e Morgan, 1997a). Fórmula molecular: $C_{35}H_{44}O_{16}$ e massa molar 720,7 (g/mol).

A azadiractina é tida como um metabólito secundário da planta, podendo ser formada através da degradação dos triterpenos, o que ocorre em vários passos, incluindo oxidação de Bayer-Villiger e rearranjos estruturais (Santos, 2003). O esquema apresentado na **Figura II.5** indica uma possível rota de formação dos tetranotriterpenóides em vegetais da ordem *Rutales*, ordem que contém a espécie Nim.

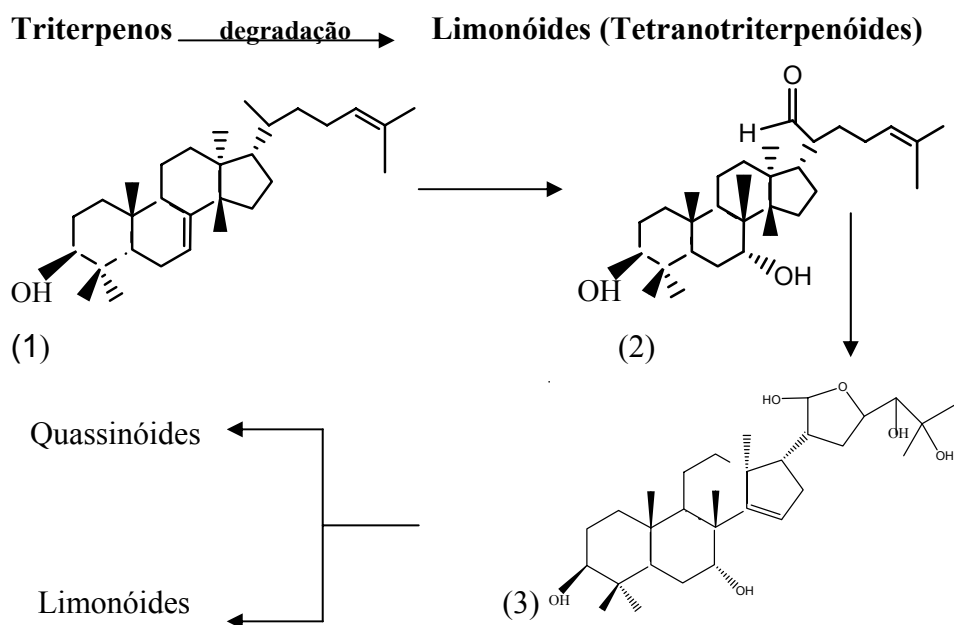


Figura II.5: Rota de degradação de triterpenos seguidos pelas plantas da ordem *Rutales* (Santos, 2003).

Uma proposta para a síntese da azadiractina foi apresentada por Veitch *et al.* (2008), na qual um precursor da azadiractina, denominado vepaol (substância identificada em produtos naturais) é submetido a diferentes tratamentos e etapas como pode ser observado na **Figura II.6** culminando na formação da azadiractina.

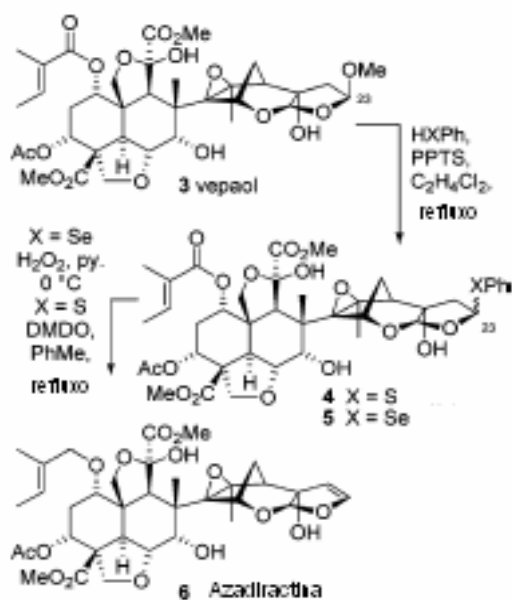


Figura II.6: Síntese da azadiractina, a partir do vepaol (Adaptado de Veitch *et al.*, 2008).

A literatura registra uma variação nos teores de azadiractina presentes nas sementes de nim. A **Tabela II.2.** apresenta um resumo de valores encontrados.

Tabela II.2: Concentração de azadiractina encontrada em sementes de nim.

Azadiractina	Referências
0,2-0,6%	Thejavathi <i>et al.</i> (1995)
0,11%	Deota <i>et al.</i> (2000)
0,2-6,2%	Johnson e Morgan (1997 b)
1%	Schmutterer (1990)

II.1.3. Óleo de nim

O óleo de nim é o principal produto comercial resultante do processamento das sementes de nim. Em pequena escala o óleo é obtido por prensagem, mas ele também pode ser extraído com solventes orgânicos.

As sementes de nim caracterizam-se pelo alto conteúdo de óleo (30-50%), de acordo com Kumar e Parmar (1996) e Kaushik (2002). Este óleo é o principal veículo de solubilização dos limonóides.

A composição em ácidos graxos presentes no óleo é de grande importância para a determinação da qualidade do óleo. Kumar e Parmar (1996) e Kaushik (2002) realizaram análises por cromatografia gasosa em diferentes amostras de nim e os resultados estão apresentados na **Tabela II.3.** Nos dois trabalhos foi observado que o ácido oléico predomina nas amostras, seguido pelo linoleico, palmítico e esteárico. Essa predominância dos ácidos graxos insaturados torna o óleo de nim muito fluido.

Tabela II.3: Composição em ácidos graxos (%) do óleo de nim (Kaushik, 2002 e Kumar e Parmar, 1996).

Ácidos graxos	Kaushik (2002)	Kumar e Parmar (1996)
<i>Saturados</i>		
Palmítico (C16:0)	20,03	17,57
Esteárico (C18:0)	14,43	16,52
<i>Insaturados</i>		
Oléico (C18:1)	43,63	63,62
Linoléico (C18:2)	20,71	0,63

Vários estudos mostram que o CO₂ é eficiente e mais seletivo na extração de triacilgliceróis de sementes, pois o extrato obtido não contém fosfatídeos e outras substâncias complexas que são causadoras do escurecimento do óleo, não necessitando de uma etapa de degomagem no refino, como ocorre no processo de extração do óleo com solvente (Romero, 2007 e Sovová, 1994).

Os fosfatídeos são praticamente insolúveis no CO₂ supercrítico e o óleo extraído por este processo geralmente contém 5 ppm ou menos desta substância (Eggers *et al.*, 1989). Este mesmo nível foi encontrado por List *et al.* (1993) que extraíram óleo de soja com hexano obtendo cerca de 620 ppm em fósforo. Com FSC (na condição de 55 MPa, 70°C) este valor foi inferior a 5 ppm.

No trabalho dos autores Friedrich e List (1982) foram feitas caracterizações entre óleos de soja extraídos através da técnica Soxhlet com hexano (5 horas) e com fluidos supercríticos (a 340 bar e 50°C). Não foram encontradas diferenças significativas no rendimento da extração, índice de peróxido, índice de saponificação e composição em ácidos graxos, porém o conteúdo de fósforo no óleo extraído por fluido supercrítico foi de 60 ppm em comparação com 630 ppm encontrados no óleo extraído com solvente orgânico.

A extração de óleos vegetais com CO₂-SC está sendo avaliada como uma potencial alternativa às extrações utilizando solventes. A **Tabela II.4** apresenta algumas aplicações da tecnologia supercrítica já avaliadas na extração de óleos de diferentes espécies vegetais.

Tabela II.4: Aplicação de FSC na extração de óleo vegetal.

Aplicações	Referências
Óleo de tomate	Roy <i>et al.</i> (1996)
Óleo de amendoim	Marrone <i>et al.</i> (1998)
Óleo de uva	Sovová <i>et al.</i> (1994)
Óleo de abricó	Özkal <i>et al.</i> (2006)
Óleo de amaranto	Westerman <i>et al.</i> (2006)
Óleo de café	Azevedo (2005)

A utilização de FSC na extração de óleo de nim mostrou-se tecnicamente viável como observado nos trabalhos de Ambrosino *et al.* (1999) e Johnson e Morgan (1997b). Nestas pesquisas, o óleo foi extraído sob diferentes pressões e temperaturas e seu rendimento foi comparado com o da técnica de extração por Soxhlet.

II.2. Extração do óleo e da azadiractina do nim

Muitos são os métodos utilizados para a obtenção de compostos ativos de produtos naturais. As substâncias presentes no nim, os limonóides, são em sua maioria extraídos utilizando solventes orgânicos. Este método de extração (método convencional) vem sendo questionado devido à sua toxicidade, sendo prejudicial ao meio ambiente e ao homem.

A busca por uma técnica menos agressiva, mais seletiva e que proporcione produtos com maior qualidade, consolidou a utilização da tecnologia de fluidos supercríticos para o processamento de produtos naturais.

II.2.1. Solventes orgânicos – Soxhlet

O Soxhlet é uma técnica clássica para extrair compostos ativos de matrizes vegetais. Este tipo de extração é utilizado como padrão para a comparação entre processos (Wang e Weller, 2006).

A utilização desta técnica para uma extração quantitativa do óleo é preferível à utilização de prensas, pois a prensagem possui baixo rendimento uma vez que grande parte do óleo e dos princípios ativos permanece na torta residual.

De acordo com o trabalho de Drummond *et al.* (2008) que comparam a extração de óleo de sementes de mamona utilizando Soxhlet com o uso de uma prensa/extrusora desenvolvida no próprio laboratório. Os teores de óleo extraídos por Soxhlet com diferentes solventes foram 51% (com metanol), 47% (com etanol) e 41% (com hexano). Quando a extração foi efetuada pela prensa/extrusora, o teor de óleo obtido foi de 34%. Na extração por solvente o resíduo de óleo na torta é inferior a 1%, um índice 5 vezes menor do que o encontrado com o uso de prensa (Boss, 2000).

A escolha do solvente para a extração é importante, pois solventes diferentes fornecem composições de extrato diferentes. O solvente mais utilizado para a remoção do óleo de sementes é o hexano, devido à sua eficiente solubilização de lipídeos e a fácil recuperação do solvente (Wang e Weller, 2006 e Boss, 2000).

Na extração com solventes o maior tempo de contato do solvente com a matriz vegetal possibilita uma extração mais efetiva de componentes. É um processo relativamente simples, mas apresenta limitações como a alta toxicidade do solvente empregado, inflamabilidade, necessidade de concentração e purificação após a extração, possível decomposição térmica de compostos termolábeis, grandes quantidades de solventes empregados e poucos parâmetros para ajustar a seletividade do processo (Wang e Weller 2006, Boss, 2000 e Lang e Wai, 2001). Um outro problema associado ao processo de extração com solvente é a incapacidade de inativar fungos que muitas vezes são responsáveis pela produção de toxinas, o que resulta em variações de composição dos princípios ativos nos extratos obtidos, podendo levar à inutilização de lotes inteiros do produto devido à presença de toxinas (Ehlers *et al.*, 2006).

A extração do óleo e dos limonóides do nim é conduzida por Soxhlet em dois estágios. Uma etapa inicial onde hexano é utilizado para a remoção do óleo (compostos apolares) que representa de 30 a 50% da massa das sementes (Kaushik, 2002) e uma etapa posterior com etanol ou metanol para extrair os limonóides (compostos polares). Essas etapas foram descritas nos trabalhos de Johnson e Morgan (1997 a), Deota *et al.* (2000), Kumar e Parmar (1996), Schmutterer, (1995) e Gómez *et al.* (1996).

II.2.2. Fluidos supercríticos (FSC)

A aplicação mais amplamente estudada da técnica de FSC é a extração de compostos naturais (Reverchon e de Marco, 2006). A extração por FSC é tida como uma tecnologia limpa, que permite fácil separação do soluto e do solvente (apenas por redução na pressão e/ou temperatura), gera produtos de qualidade, não gera resíduos e adota condições brandas de processo. Essas características a tornam uma tecnologia de uso crescente e recomendada para a extração de princípios ativos de produtos naturais, pois estes compostos em muitos casos são termolábeis e facilmente hidrolisáveis (McHugh e Krukonis, 1994).

Quando um composto é confinado em um espaço determinado, a fase líquida e o vapor coexistem em equilíbrio. Aquecendo-se o sistema, as propriedades intensivas convergem até serem idênticas no ponto crítico (como por exemplo, densidade, condutividade térmica, etc.). O ponto crítico (**Figura II.7**) marca a temperatura mais alta de coexistência das duas fases. Um aquecimento adicional resulta em uma fase supercrítica (Carrilho *et al.*, 2001).

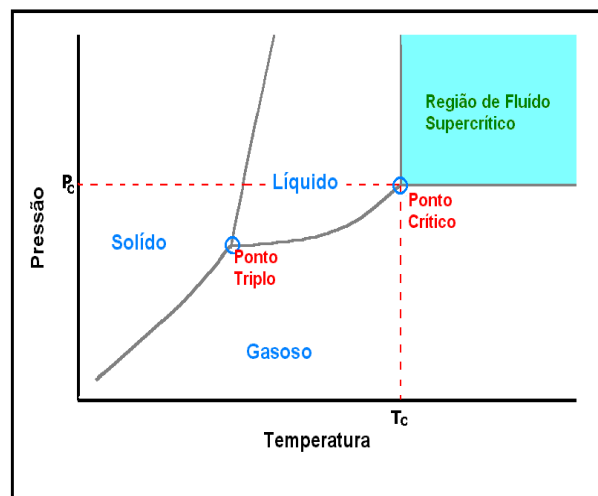


Figura II.7: Diagrama de fases de uma substância pura.

Uma substância está no estado supercrítico quando a sua temperatura e pressão estão acima de seus valores críticos (T_c e P_c). A substância usualmente mais empregada como solvente é o CO_2 (dióxido de carbono) devido a ser não tóxico, não-inflamável e de custo relativamente baixo. Além das qualidades citadas acima, o CO_2 possui P_c (72,9 bar) e

T_c (31°C) moderadas, características importantes quando se deseja extrair princípios ativos termolábeis (Brunner, 1994).

Na **Tabela II.5**, estão listados vários solventes e suas pressões e temperaturas críticas, que têm sido utilizados em pesquisas com FSC. O solvente mais utilizado é o CO_2 , entretanto, os outros solventes são poucos utilizados comercialmente por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, corrosividade e inflamabilidade.

Tabela II.5: Propriedades críticas de algumas substâncias.

Fluidos	T_c (°K)	P_c (bar)
Água	647,3	221,2
Amônia	40,55	113,5
Etano	305,4	48,8
Dióxido de Carbono	304,15	73,8
Propano	369,8	42,5
Metanol	512,6	80,09
Etanol	513,9	38,3
Xenônio	289,7	58,4

(Fonte: Brunner, 1994).

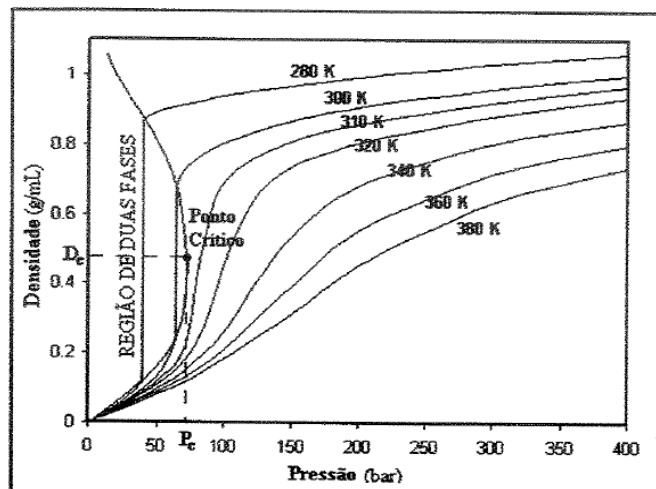
Observando os valores de densidade, difusividade e viscosidade dos líquidos, gases e FSC, apresentados na **Tabela II.6** verifica-se que as propriedades físico-químicas do FSC assumem valores intermediários entre os estados líquidos e o gasoso. A densidade de um FSC que está relacionada à capacidade de solubilização aproxima-se a valores típicos de um líquido, enquanto que as propriedades de transporte, como a difusividade e a viscosidade se assemelham aos dos gases. Os líquidos são excelentes solventes, porém possuem difusão lenta e alta viscosidade, já os gases são péssimos solventes, mas difundem com extrema facilidade e são poucos viscosos. Os FSC combinam as características desejáveis dos gases e dos líquidos, tornando os processos de extração mais eficientes, rápidos e seletivos.

Tabela II.6: Propriedades físicas de gás, líquido e FSC (Carrilho *et al.*, 2001).

Propriedade	Unidades	Gás	FSC	Líquido
Densidade(ρ)	g/mL	$10^{-4}/10^{-3}$	0,2/0,9	≈ 1
Difusividade (D)	cm ² /s	$10^{-2}/1$	$10^{-4}/10^{-3}$	$< 10^{-5}$
Viscosidade (η)	Poise	$\approx 10^{-4}$	$10^{-4}/10^{-3}$	10^{-2}

Deste modo os FSC têm uma grande vantagem sobre os solventes líquidos que podem sofrer variações na densidade apenas pela adição de outro solvente ou por alterações significativas na temperatura. Na região supercrítica, as difusividades das substâncias são uma ordem de grandeza maior do que a difusividade nos líquidos, possibilitando uma penetração mais rápida do solvente na matriz sólida e que pode resultar em processos de transferência de massa mais eficientes reduzindo o tempo de extração necessário (McHugh e Krukoniš, 1994 e Lang e Wai, 2001).

O Diagrama de fases da **Figura II.8** permite acompanhar as variações da densidade do CO₂ com a temperatura e a pressão. Em condições isotérmicas, o aumento progressivo da pressão após o ponto crítico do solvente induz um aumento da densidade. Este é um comportamento normal em sistemas gasosos. Observa-se pela **Figura II.8** que, quanto menor a temperatura e quanto mais próximo ao ponto crítico, mais pronunciado é o aumento da densidade com a pressão.

**Figura II.8:** Diagrama PρT para o dióxido de carbono (Kopcak, 2003).

O efeito da temperatura sobre a densidade, a uma pressão constante, também é mais evidente na região imediatamente após o ponto crítico. Nessa região, uma diminuição de temperatura promove um considerável aumento na densidade e, conseqüentemente, um aumento no poder de solubilização do soluto.

À medida que a pressão é aumentada, a variação da densidade do solvente com o aumento da temperatura é menos significativa e o efeito que passa a controlar a solubilização do soluto é o aumento da pressão de vapor do mesmo. A pressão de vapor está ligada diretamente à fugacidade do composto favorecendo o processo de solvatação, resultando em aumento da solubilidade com o aumento da temperatura. O valor da pressão onde estes efeitos concorrentes se equivalem e se compensam é denominado de pressão de cruzamento (Azevedo, 2005). Esta variação no efeito da temperatura é conhecida como “comportamento retrógrado”.

Como exemplo dessas características, a **Figura II.9** apresenta os resultados obtidos por Saldaña *et al.* (1999), que determinaram a solubilidade de cafeína em CO₂-SC. A elevada solubilidade de cafeína é um exemplo típico do comportamento de solubilidade de sólidos em FSC. Aumentos significativos da solubilidade com o aumento da pressão, à temperatura constante, são observáveis para todas as condições experimentais. A **Figura II.9** explicita também o chamado “comportamento retrógrado” definido como a inversão do efeito da temperatura sobre a solubilidade, que no sistema estudado ocorre a partir da pressão de operação em torno de 19 MPa.

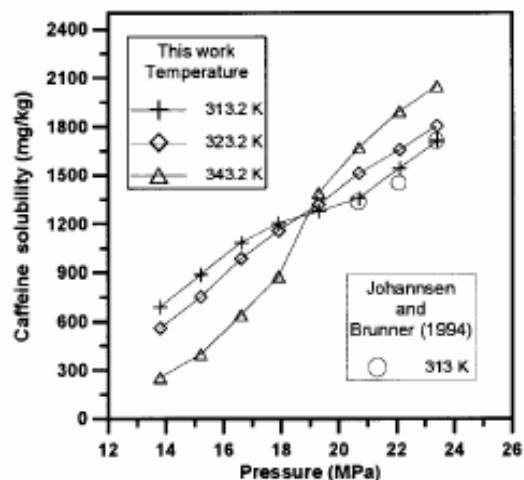


Figura II.9: Solubilidade da cafeína no CO₂ (Saldaña *et al.*, 1999).

II.3. Utilização de co-solventes (modificadores)

O solvente mais comumente utilizado na extração supercrítica de produtos naturais é o CO₂, caracterizado por ser uma substância apolar (solvente lipofílico). É conhecido que a solubilidade de substâncias polares neste solvente é muito baixa. Este fato torna-se um obstáculo para o desenvolvimento de processos utilizando CO₂-SC (Ke *et al.*, 1996). Muitos estudos têm indicado que pequenas quantidades de um segundo solvente polar (co-solvente ou modificadores) quando adicionadas ao CO₂-SC, produzem uma mistura supercrítica polar (Dobbs *et al.*, 1986 e Gurdial *et al.*, 1993) capaz de incrementar significativamente a solubilidade das substâncias polares. A adição de um co-solvente modifica a polaridade do CO₂ e as propriedades críticas do solvente.

A habilidade do FSC em extrair os compostos origina-se das fortes interações entre soluto e solvente ou das associações químicas entre eles. A adição de co-solvente proporciona um aumento da solubilidade em função de um aumento das forças de interação do fluido com o soluto (químicas ou físicas), e/ou através do aumento da densidade, que promove um aumento do poder de solvatação. O fator predominante depende da natureza química dos componentes bem como das condições experimentais.

Segundo Ting *et al.* (1993), o efeito do co-solvente está relacionado com a formação de uma agregação mais compacta ou *cluster* ao redor da molécula de soluto, devido às interações deste com as moléculas do co-solvente, tornando a densidade local (ao redor da molécula de soluto) maior em relação ao meio. Ting *et al.* (1993) afirmam que pontes de hidrogênio são formadas entre as moléculas do soluto e as moléculas do co-solvente. Estas conclusões foram obtidas a partir do estudo da solubilidade de naproxeno em misturas com CO₂-SC e co-solventes. Os autores utilizaram uma série de álcoois (metanol, etanol, 1-propanol e isopropanol) como co-solvente. Os resultados demonstraram que o efeito do co-solvente (definido como a razão entre a solubilidade do soluto na mistura solvente + co-solvente e a solubilidade do soluto no solvente puro) aumenta com o aumento da cadeia carbônica do álcool, sendo que o 1-propanol é o co-solvente que maximiza este efeito. Os resultados indicaram que o efeito de co-solvente, para as condições e substâncias utilizadas, diminuiu com o aumento da pressão.

Os pesquisadores Yu *et al.* (2007) tiveram como objetivo extrair limonóides e naringina de pomelos (*Citrus paradisi Macf.*) utilizando a técnica de FSC. A extração

destes compostos foi realizada sequencialmente, mantendo uma vazão de 5,0 L/min. Na primeira etapa foi feita a extração do limonin (menos polar) utilizando CO₂-SC puro, e posteriormente a naringina (altamente polar) foi extraída com CO₂-SC + etanol. O rendimento mais elevado do limoneno (6,3 mg/g de sementes) foi obtido nas condições de 48,3 MPa e 50°C, em 60 min de extração. O maior rendimento de naringina (0,2 mg/g de sementes) foi atingido em 41,4 MPa, 50°C e 20% de etanol, num tempo de extração de 40 min.

A extração supercrítica de produtos naturais foi abordada por Hamburguer *et al.* (2004). Compostos ativos de interesse farmacêutico foram extraídos de camomila, calêndula e crataegus e quantificados por CLAE. Os ensaios foram efetuados com CO₂-SC puro e CO₂-SC + etanol como co-solvente, na temperatura de 50°C, pressões de 300, 400, 500, 600 e 689 bar e concentrações de 0,5, 5, 10 e 20% em etanol (v/v). Nas extrações destas plantas medicinais houve um acréscimo do rendimento com o aumento da pressão e da concentração do etanol.

O uso de co-solvente pode acarretar em uma perda de seletividade dos compostos de interesse, pois pode aumentar a taxa de extração de outros compostos da matriz vegetal e que também tenham afinidade com o co-solvente utilizado.

Se o produto final não admite a presença de co-solventes, etapas subsequentes de separação devem ser incluídas ao processo para fornecer extratos livres de solvente (Bertucco e Vetter, 2001). A legislação de alguns países está proibindo processos que usam esses solventes (inclusive o etanol) em produtos farmacêuticos. Portanto, quando possível, é conveniente evitar o uso de co-solventes já que a maior vantagem da tecnologia de extração com FSC é a obtenção de extratos livres de solvente (Cavalcanti, 2008).

II.4. Extração de produtos naturais a partir de matrizes sólidas utilizando FSC

Na extração de produtos naturais, a complexa interação entre termodinâmica (solubilidade) e cinética (transferência de massa) tem que ser entendida para se obter um bom rendimento com FSC. É preciso levar em consideração não somente a solubilidade dos compostos de interesse (e de compostos indesejáveis), mas também mecanismos de transferência de massa, devido à resistência das estruturas das matérias-primas utilizadas (Reverchon e de Marco, 2006). A cinética de extração utilizando FSC envolve diversas

variáveis, dentre elas pode-se destacar: pressão, temperatura, vazão e tamanho das partículas (Kopcak, 2003).

Na **Figura II.10** estão apresentadas curvas de extração típicas de FSC, nas quais se detecta três regiões distintas. Nesta figura, a ordenada é o rendimento da extração (material de interesse extraído/quantidade total de amostra) e a abscissa a quantidade de solvente utilizada.

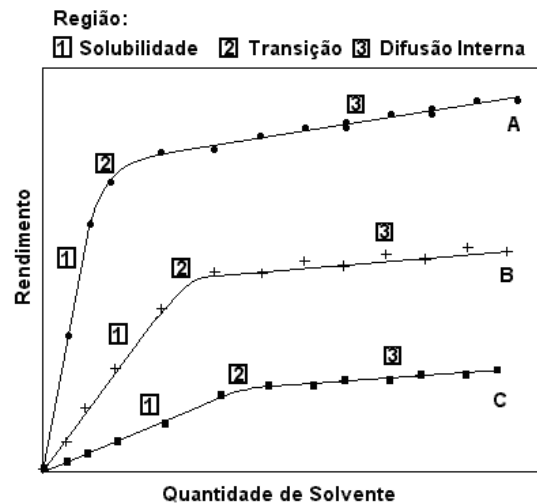


Figura II.10: Representação gráfica de curvas de extração de produtos naturais típico de sistemas utilizando FSC (método dinâmico).

A primeira região (1) corresponde à solubilização do soluto facilmente acessível e é controlada pela solubilidade do soluto no fluido. Quanto maior a solubilidade do soluto, maior será a inclinação da curva e, portanto dentre as três curvas apresentadas, a condição de operação da curva A foi a que apresentou maior solubilidade de soluto e a da curva C a menor.

A segunda região (2) é denominada de transição, onde há uma desaceleração das taxas de extração devido à diminuição da quantidade de soluto acessível na superfície das partículas e inicia-se a difusão do soluto, do interior da partícula para a superfície. Na terceira região (3), como não há mais soluto disponível na superfície do sólido o processo é controlado pela difusão (soluto contido no interior das células). Observam-se taxas de extração menores, devido à resistência à transferência de massa (Kopcak, 2003).

II.4.1. Influência do diâmetro da partícula

O diâmetro de partícula do material vegetal a ser processado pode influenciar significativamente na extração. No trabalho de Sovová *et al.* (1994) foram realizados ensaios para a extração de óleo de sementes moídas de uva com CO₂-SC (puro), variando o tamanho da partícula para verificar sua influência na extração do óleo de uva (**Figura II.11**). Observa-se que a região na qual a transferência de massa é controlada pela solubilidade diminui com o aumento do diâmetro da partícula. A diminuição do diâmetro da partícula implica numa maior área de contato entre a matriz (soluto) com o FSC, indicando uma maior quantidade de soluto facilmente acessível ao solvente.

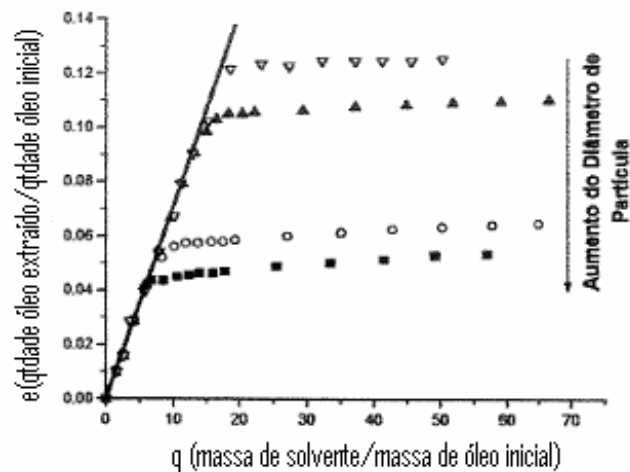


Figura II.11: Influência do diâmetro da partícula na extração de óleo de sementes de uva utilizando CO₂-SC (Sovová *et al.*, 1994).

Tonthubthimthong *et al.* (2004) efetuaram um estudo sobre a influência do diâmetro de partícula das sementes de nim na extração de nimbina, limonóide que também possui atividade inseticida. Dentre os diâmetros investigados conseguiu-se maior rendimento usando partículas de 575 μm , o que pode ser observado na **Figura II.12**.

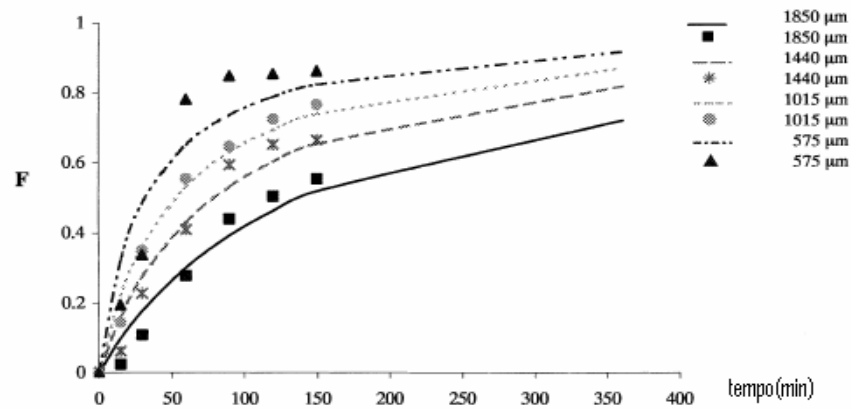


Figura II.12: Efeito do tamanho da partícula no rendimento da extração de nimbina (308 K, 20 MPa) (Tonthubthimthong *et al.*, 2004).

II.5. Extração supercrítica dos compostos do Nim

O processo de extração utilizando FSC para a recuperação dos limonóides e do óleo das sementes de nim começou a ser estudado recentemente, devido, principalmente, as suas características inseticidas. Ambrosino *et al.* (1999) estudaram a extração e recuperação do óleo e da azadiractina presentes no nim utilizando CO₂-SC como solvente no intervalo de temperatura de 20 e 40°C e pressão de 300 bar (vale ressaltar que a 20°C o CO₂ ainda está no estado subcrítico). Além da etapa de extração, esses autores utilizaram três estágios de separação, nos quais as condições de pressão e temperatura foram controladas para precipitar seletivamente diferentes classes de compostos. Observou-se que maiores rendimentos de azadiractina são obtidos utilizando sementes frescas em lugar de sementes desengorduradas e que os rendimentos de extração obtidos para o óleo e para a azadiractina são da ordem de 57 e 45%, respectivamente. Os autores concluíram que a utilização da técnica de fluidos supercríticos na extração de azadiractina é factível e eficiente.

Johnson e Morgan (1997b) tiveram como objetivo, a extração dos limonóides das sementes de Nim utilizando FSC. Constataram que o óleo e os limonóides azadiractina, salanina e nimbina eram extraídos em conjunto. A eficiência da extração por FSC foi comparada com a técnica de Soxhlet. Com a utilização de CO₂-puro observaram que apenas 30 minutos de extração não foram suficientes para remover toda salanina, nimbina e azadiractina das sementes. Como a extração com CO₂-SC puro não se mostrava completa foram efetuadas extrações com co-solvente (metanol). Com o aumento da porcentagem de metanol de 10 para 25% (m/m) houve um acréscimo da extração da azadiractina no extrato,

indicando que a maior quantidade desta substância pode ser extraída sob maiores pressões e com maiores concentrações de metanol. A melhor condição encontrada foi 20,6 MPa com 6% de metanol, tendo-se obtido 45% do óleo, 85% de nimbina, 70% de salanina e 40% de azadiractina.

Tonthubthinthong *et al.* (2001) estudaram o processo de extração da nimbina por FSC utilizando CO₂-puro, avaliando os efeitos da temperatura, pressão, vazão do solvente e tamanho de amostra. Os dados mostram que aproximadamente 35% da nimbina presente nas sementes foram extraídas em conjunto com o óleo, e indicam que um aumento na pressão culminaria numa maior extração em consequência do aumento da densidade do CO₂. Na faixa de pressão estudada pelos autores, o sistema encontra-se na região do comportamento retrógrado, ou seja, aumentos de temperatura reduzem o rendimento de extração.

Em trabalho posterior, Tonthubthimthong *et al.* (2004) estudaram novamente a extração de nimbina, com a utilização de metanol como co-solvente, mesmo sendo o metanol um solvente muito tóxico. Neste trabalho, os autores observaram que a adição de 10% de metanol aumenta o rendimento do processo de 85% para 90%. Comparando estes dados com os previamente reportados, é possível atribuir rendimentos ligeiramente superiores ao maior tempo de extração e também à adição do co-solvente, que modifica a polaridade do CO₂, uma vez que as condições de processo utilizadas (pressão, temperatura, vazão) foram as mesmas nos dois trabalhos.

II.6. Fungos presentes nas sementes de nim

As sementes e os alimentos são susceptíveis á contaminação por microorganismos. Esta contaminação pode ocorrer em diferentes etapas tais como nos estágios de produção, processamento, transporte e armazenamento. Os microorganismos que causam maiores danos aos grãos nos períodos da colheita e de estocagem são pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (Baptista *et al.*, 2004).

Dentre as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos nos produtos do nim (óleo e sementes) citam-se condições impróprias de secagem e de armazenamento das sementes (Schmutterer, 1995).

A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também pelo risco que a produção de micotoxinas representa para o consumidor. Os fungos que são produtores de toxinas são tidos como toxigênicos, porém nem todos os fungos produzem estas substâncias, conhecidas como metabólitos secundários. Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* estão entre os mais importantes fungos produtores de micotoxinas. Dentre as micotoxinas de importância para a saúde pública e para a agro-economia estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e fusariotoxinas (Sartori, 2005). As principais correspondem a aflatoxinas e a ocratoxinas.

As micotoxinas apresentam efeitos bioquímicos e biológicos no organismo humano e animal, podendo afetar o metabolismo de carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e das proteínas, e ainda causar carcinogenicidade, mutagenicidade e micotoxicoses (Baptista *et al.*, 2004).

Dentre os maiores produtores de aflatoxinas tem-se o *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Pitt e Hocking, 1999). Há quatro principais aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2, que podem aparecer em conjunto ou isoladamente. A aflatoxina B1 é a mais encontrada em cereais, sendo considerada a mais potente, tóxica, mutagênica e carcinogênica, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ehlers *et al.*, 2006, Klich, 2007). Eles apresentam propriedades fluorescentes de cor azul na presença de luz ultravioleta à 365 nm.

O controle da porcentagem de aflatoxinas presente nos produtos do nim já é assumido como um parâmetro de qualidade complementar, juntamente com a quantidade de azadiractina (Schmutterer, 1995).

O grupo das ocratoxinas é composto por três tipos de substâncias, A, B e C, sendo a ocratoxina A, a mais comum e mais tóxica. As ocratoxinas são consideradas como as micotoxinas mais tóxicas e causam, basicamente, disfunção hepática e renal e ainda imunossupressão aos animais a elas expostos. Apresenta fluorescência na cor verde, a 365 nm.

Essas toxinas podem ser produzidas pelo gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Em países tropicais, o gênero *Aspergillus* tornou-se maior responsável pela produção de ocratoxinas. As ocratoxinas são encontradas em diversos fungos, como *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius*.

II.6.1. Metodologias para detecção de aflatoxina e ocratoxina

Vários métodos podem ser utilizados para a detecção de aflatoxinas em sementes e em alimentos, como exemplo a cromatografia em camada delgada (CCD), CLAE e métodos imunológicos. A cromatografia em camada delgada é uma das técnicas mais empregadas devido a sua facilidade na separação, identificação e quantificação das substâncias (Aquino e Nunes, 2003).

II.7. Influência da pressão na inativação de fungos e bactérias

Um dos métodos mais utilizados para a inativação de microorganismos nas indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos, materiais poliméricos e em aplicações biomédicas é o tratamento térmico com altas temperaturas. Esta técnica assegura total inativação devido aos danos irreversíveis à parede celular causados pelas altas temperaturas (acima de 145°C) (Spilimbergo *et al.*, 2002). Desde os anos 70, técnicas alternativas ao processo térmico utilizando altas pressões estão sendo propostas e estudadas, como o HPT (*High Hydrostatic Pressure Treatment*) e o tratamento com CO₂-SC.

Os métodos que usam pressão hidrostática para a esterilização necessitam de 1.200 a 8.000 bar para que haja a ruptura das células e esporos. O mecanismo de inativação por este processo ainda não está totalmente esclarecido e presume-se que a inativação seja causada por fatores mecânicos ativados pelas altas pressões (Spilimbergo *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias na medicina como cirurgias ortopédicas, enxertos com tecidos humanos, operações cardiovasculares, há a necessidade de novas técnicas de esterilização, pois os materiais utilizados envolvem moléculas biologicamente ativas como DNA, proteínas e biopolímeros que são degradados em condições muito adversas (White *et al.*, 2006). Na esterilização pela técnica de FSC as condições de trabalho utilizadas (pressão e temperatura) são moderadas em comparação a outros métodos.

O interesse no uso do CO₂-SC baseia-se na grande habilidade de penetração nas células (por causa de suas propriedades de solubilidade e de transferência de massa), por ser não tóxico e de fácil remoção do produto (White *et al.*, 2006). Foster *et al.* (2003), citam os avanços tecnológicos obtidos com o uso do FSC em processos de esterilização em alimentos, bebidas e na indústria farmacêutica.

Dillow *et al.* (1999) reportaram o sucesso do método de FSC na inativação das bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua*, *S. salford*, *P. vulgaris*, *L. dunnifii*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, utilizando uma pressão de 205 bar e temperaturas que variaram entre 25 e 60°C. O processo baseou-se em ciclos de pressurização e despressurização ($\Delta P = 100$ bar), sendo que a inativação completa foi verificada entre 0,6 e 4 horas para as diferentes bactérias. Os autores verificaram que o processo é fortemente influenciado pela natureza da bactéria a ser inativada, pela eficiência do contato célula - CO₂-SC e também pela presença de água.

O processo de inativação de bactérias e esporos utilizando CO₂-SC foi aplicado com sucesso por Spilimbergo *et al.* (2002), na inativação de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e dos esporos de *Bacillus subtilis*. O processo foi estudado na faixa de temperatura de 35 a 75°C e pressões de 75 a 150 bar. Os autores efetuaram 30 ciclos de pressurização e despressurização por hora com uma amplitude do ΔP entre 80-110 bar e concluíram que a inativação completa dos esporos depende da quantidade de ciclos efetuados.

O exato mecanismo de inativação ainda não está completamente elucidado e entre as teorias propostas, cita-se o rompimento da célula, acidificação, modificação lipídica, inativação de enzimas essenciais e ainda extração de substâncias intracelulares (White *et al.*, 2006). No trabalho de Spilimbergo *et al.* (2002) uma das hipóteses analisadas foi a inativação devido ao decréscimo do efeito sinérgico do pH intracelular e a modificação da membrana citoplasmática causada pela dissolução do CO₂ no meio. O CO₂ dissolvido pode formar ácido carbônico (juntamente com a água presente no meio) contribuindo para a mudança de pH no meio podendo ser responsável pela inativação dos microorganismos (Spilimbergo *et al.*, 2002, Hong e Pyun, 1999 e White *et al.*, 2006).

Calvo *et al.* (2007), tentaram realizar uma inativação microbiana de manteiga de cacau utilizando CO₂-SC. Dois microorganismos isolados do cacau foram monitorados: *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*. Foram estabelecidos ciclos de pressurização e despressurização a 300 bar e 80°C. Verificou-se que a pressão tem influência na extração de sub-produtos, porém este efeito não foi observado sobre a inativação microbiana. Os resultados encontrados não foram satisfatórios, porque não houve redução do teor microbiano, além de promover o mau funcionamento do equipamento.

Hong e Pyun (1999) utilizaram FSC na inativação da bactéria *Lactobacillus plantarum* a diferentes parâmetros temperaturas (30 e 40°C), pressões (50 a 80 bar) e tempos de exposição ao CO₂. Eles concluíram que a inativação também é influenciada pela quantidade de água, pH, constituintes do meio, condições de crescimento celular e espécies de microorganismos.

Capítulo III

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são especificados os materiais de consumo utilizados nos ensaios, as metodologias de análise das amostras e os equipamentos utilizados na realização dos experimentos.

III.1. Solventes

O CO₂ (99,8% de pureza) foi fornecido pela White Martins (Campinas). O etanol utilizado como co-solvente e no preparo das amostras, foi adquirido da marca Synth, com grau P.A.

Para a quantificação da azadiractina em CLAE, solventes com grau cromatográfico (metanol e acetonitrila) foram adquiridos da J.T.Baker. Na extração convencional utilizaram-se os solventes hexano e metanol adquiridos da Merck e etanol, da marca Synth.

Os materiais e solventes utilizados nas análises microbiológicas foram disponibilizados pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas), de acordo com o andamento dos ensaios.

III.2. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram doadas pela empresa Base Fértil, Campinas, São Paulo (sementes despulpadas (amêndoas) de nim cultivadas em Pernambuco, Brasil e o óleo de nim bruto).

Para a quantificação da azadiractina nas amostras, o padrão azadiractina A foi obtido do Sigma-Aldrich, com 99,5% de pureza.

II.3. Sementes de nim

III.3.1. Pré-tratamento: Moagem e distribuição granulométrica

Como as sementes de nim adquiridas já estavam despulpadas (denominadas de amêndoas de nim) esta etapa do beneficiamento foi desnecessária no trabalho. As amêndoas, contendo de 30 a 50% de óleo, foram moídas em moinho de facas (Tecnal TE-648), sob atmosfera de nitrogênio líquido para manter o produto a baixa temperatura e impedir a excessiva separação do óleo durante o processo.

A separação granulométrica foi realizada com a utilização de um vibrador magnético de peneiras (Bertel, São Paulo, SP). Foram usadas quatro peneiras com malhas de 16, 20, 28 e 32 mesh de abertura. Após esta etapa, as amostras foram guardadas em sacos plásticos hermeticamente fechados para uso em extrações.

As sementes moídas foram separadas em três frações de diferentes diâmetros de partículas que foram utilizadas nos experimentos para verificar a influência deste parâmetro na extração do óleo: 0,925, 0,725 e 0,550 mm.

III.3.2. Conteúdo de Umidade

O conteúdo de umidade das sementes de nim foi determinado em triplicata. Uma amostra de 1 g (amêndoas de nim moída) foi pesada em balança analítica (Ohaus Analytical Plus) e transferida para estufa a vácuo e mantida por 48 horas a uma temperatura de 60°C.

O percentual de umidade é determinado através da diferença entre a massa inicial e após a secagem.

III.4. Método convencional de extração: Soxhlet

A quantidade de óleo total e de azadiractina presentes nas amêndoas de nim foi quantificada por Soxhlet, para servir de comparação com o método de extração por FSC. Inicialmente, a extração foi realizada em duas etapas. A primeira etapa para a extração do óleo de nim (compostos apolares) e a segunda para a extração dos limonóides (compostos polares).

Foram consideradas seis diferentes seqüências de extrações do óleo e de azadiractina das sementes de nim, conforme os solventes utilizados e as combinações de métodos. Foram também realizados ensaios, combinando as duas etapas em uma única extração, visando simplificar os procedimentos.

Ensaio propostos:

- 1- Soxhlet com hexano + Maceração a frio com etanol
- 2- Soxhlet com hexano + Maceração a frio com metanol
- 3- Soxhlet com hexano + Soxhlet com etanol
- 4- Soxhlet com hexano + Soxhlet com metanol
- 5- Soxhlet com etanol
- 6- Soxhlet com metanol

As sementes de nim previamente moídas (cerca de 3g) foram alimentadas a extratores tipo Soxhlet. A extração do óleo foi efetuada com 300 mL de hexano (Extrações **1 a 4**) durante 8 horas. Nas Extrações **5 e 6** foram utilizados 300 mL de etanol ou metanol para a extração do óleo e também da azadiractina (duração 8 horas).

Na extração do óleo com solventes, o material obtido, de aparência amarelada, foi levado a um rota-evaporador (Fisatom, modelo 802) para a eliminação do solvente e todo o resíduo oleoso foi quantificado por pesagem.

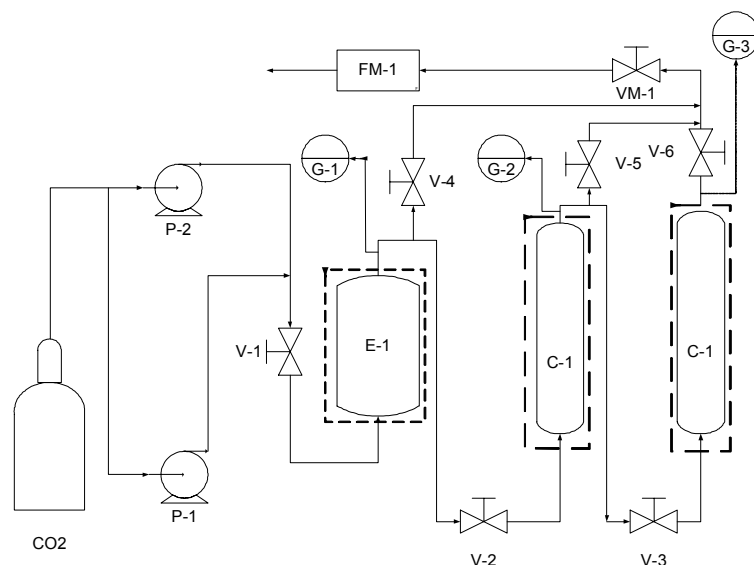
Nas extrações a frio (**1 e 2**) o material previamente desengordurado com hexano, foi deixado em contato com etanol ou metanol por 48 horas. A cada 24 horas o solvente era trocado, o material filtrado a vácuo e as sementes novamente colocadas em contato com solvente novo. O material extraído foi mantido em geladeira para posterior análise em CLAE, de acordo com metodologia descrita no **Item III.10.2**.

III.5. Equipamento de extração supercrítica

O equipamento utilizado nos ensaios de solubilidade, extração de óleo e de azadiractina e também na inativação dos fungos nas sementes está esquematizado na **Figura III.1**. Ele foi construído por Azevedo (2005) na oficina da Faculdade de Engenharia

Química (FEQ), UNICAMP, Campinas, São Paulo e instalado no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos (LEPPbio).

Este equipamento possibilita o controle independente das variáveis de operação (pressão e temperatura) e da vazão de solvente, além da possibilidade de mudança de configuração através de um sistema de dutos e válvulas.



E-vaso de extração, G-manômetro, P-bomba, C-coluna de separação, V-válvula de bloqueio, Vm-válvula micrométrica, FM-medidor totalizador de vazão.

Figura III.1: Esquema do equipamento de extração por FSC, LEPPbio/FEQ/UNICAMP (Azevedo, 2005).

O equipamento da **Figura III.1**, possui duas bombas (P-1 e P-2, Thermo Separation Products, B.B Motor and Control) em paralelo que dispõem de válvula de retenção para garantir o fluxo de gás em um único sentido. Há também um filtro de linha que impede a contaminação por possíveis solventes. Para garantir que o solvente chegue à bomba no estado líquido, cada linha possui um trocador do tipo casco-tubo. Estes refrigeradores são supridos com uma solução refrigerante aquosa de etilenoglicol 30% v/v imerso em banho criostático (Tecnal, TE 2000) que mantém a temperatura em torno de -6°C .

O extrator (E-1) tem volume útil de 300 mL e foi construído em aço inoxidável do tipo 316SS. As colunas são mantidas dentro de fornos e o controle da temperatura é feito através de regulador de voltagem. As válvulas do tipo gaveta (V-1 a V-6) na tubulação entre a bomba, o extrator e os separadores permitem operar separadamente cada um dos vasos. A válvula de segurança V-4 possui disco de ruptura de 42,7 MPa para proteger o extrator de pressões acima do limite do equipamento.

A pressão no extrator é monitorada por manômetros (Autoclave Engineers) instalados na saída da tubulação. A fase fluida, após deixar o extrator passa por uma válvula micrométrica que permite regular a vazão e controlar a pressão de saída mantendo-a em condições ligeiramente superiores à pressão atmosférica. Neste processo ocorre a condensação/precipitação do soluto que é recolhido no separador. Para evitar o congelamento deste material na válvula em função da expansão do gás, utiliza-se uma chapa de aquecimento que mantém a válvula (VM-1) em torno de 100°C.

A tubulação de saída possui dois filtros, um coalescente e um de carvão-ativo com a função de eliminar eventuais impurezas da corrente do gás que segue para o medidor de fluxo (FM-1).

III.6. Ensaios de solubilidade do óleo de nim

Solubilidade é a máxima quantidade do soluto que pode ser dissolvido em um solvente em uma determinada condição de temperatura e pressão. Esta propriedade é função da densidade e da temperatura do solvente. Com solventes em condições supercríticas, a solubilidade em geral aumenta com a densidade do solvente. O método de determinação da solubilidade utilizado foi o método dinâmico.

A solubilidade do óleo de nim foi determinada pelo método dinâmico, utilizando o equipamento descrito no **Item III.5**. Para a realização dos ensaios de solubilidade, cerca de 10 g de óleo de nim bruto são alimentados ao extrator supercrítico. A azadiractina extraída em conjunto com o óleo também foi analisada e a metodologia utilizada está apresentada no **Item III.10.2**. Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 50 e 60°C, e 150, 220, 250 e 300 bar de pressão, mantendo a vazão de CO₂ em 0,7 L/min medida nas condições padrões CNTP. Os experimentos utilizaram CO₂ como solvente (sem a utilização de co-solvente).

A vazão adotada neste trabalho foi baseada no trabalho de Neves (1996) que testou diferentes vazões para o sistema binário CO₂/tricaprilina obtendo um valor ótimo para a extração de triacilgliceróis de 0,7L/min de CO₂.

O CO₂ era alimentado lentamente até que a pressão se igualasse à pressão do cilindro e o aquecimento do extrator era então ativado. Após atingir a temperatura pré-definida as bombas eram acionadas e o sistema levado à condição de pressão de processo. Atingidas estas condições (pressão e temperatura) a válvula micrométrica, localizada na saída do módulo de medição e coleta, foi aberta até que a vazão pré-definida para o ensaio se estabeleça. O material extraído que escoou através da válvula micrométrica é recolhido em um kitassato contendo etanol para posterior análise. O CO₂ segue para o medidor totalizador de vazão. Havendo necessidade, o fluxo das bombas era corrigido para que o sistema mantivesse a pressão constante. As amostras coletadas tiveram seu volume corrigido para 100 mL com etanol, em balão volumétrico, para permitir a quantificação.

Para o cálculo da solubilidade do óleo, foi necessária uma etapa de eliminação do etanol em rota-evaporador, para avaliar a quantidade de óleo extraído nas condições de operação.

III.7. Extração da azadiractina e do óleo das sementes com CO₂-puro

Os ensaios de extração da azadiractina e do óleo das sementes moídas de nim foram realizados no equipamento descrito na **Figura III.1 (Item III.5)** em regime de escoamento permanente do FSC. O extrator foi alimentado com 10 g de sementes de nim moídas com diâmetro de partícula médio de 0,925 mm, misturado com esferas de vidro, até completar o volume do extrator (300 mL).

A azadiractina e o óleo foram extraídos ao mesmo tempo, nos ensaios em um total de nove condições diferentes sendo que, para algumas destas condições, foram feitas repetições. Os ensaios foram realizados em temperaturas de 50, 60 e 70°C e nas pressões de 150, 200 e 250 bar, utilizando uma vazão de 1L/min de CO₂ medido em condições ambientais (vazão adotada com base no trabalho de Azevedo (2005)). O óleo extraído foi quantificado por gravimetria e a azadiractina extraída foi analisada de acordo com a metodologia do **Item III.10.2**. Estes ensaios foram realizados usando CO₂-puro.

Estas extrações foram efetuadas com os mesmos cuidados e procedimentos de operação do equipamento, coleta de amostras, e análises como descritos no **Item III.6**.

III.8. Extração de óleo e azadiractina com CO₂ + co-solvente

As extrações da azadiractina e do óleo com co-solvente foram realizadas em outro equipamento de extração supercrítica instalado no LEPPbio/FEQ/UNICAMP (**Figura III.2**). Este equipamento modular foi projetado e desenvolvido pelo laboratório em parceria com a AUTIC (Automação e Instrumentação Industrial Ltda.). Um detalhamento completo deste sistema de extração encontra-se descrito em Azevedo (2005).



Figura III.2: Equipamento de extração supercrítica modular (LEPPbio/FEQ), desenvolvido por Azevedo (2005).

No decorrer dos experimentos aproximadamente 10 g de sementes de nim moídas foram adicionadas ao extrator, acrescidas de esferas de vidro. Os ensaios exploraram as seguintes variáveis: concentração de etanol de 5 e 10% (m/m), temperatura 50 e 60°C, e pressão 200 e 300 bar, utilizando uma vazão de 1 L/min de CO₂.

O óleo extraído foi quantificado por gravimetria seguindo os mesmos procedimentos descritos no **Item III.6**, e a azadiractina extraída junto com o óleo foi analisada de acordo com a metodologia do **Item III.10.2**.

III.9. Extração fracionada

O ensaio de extração fracionada das sementes de nim teve como objetivo a obtenção de um extrato enriquecido em azadiractina e contendo uma menor quantidade relativa de óleo.

Este ensaio foi realizado no equipamento apresentado no **Item III.8 (Figura III.2)** sendo o extrator alimentado com 10g de sementes moídas de nim. Foram realizadas duas etapas seqüenciais de extração com as mesmas sementes e as condições estabelecidas de acordo com os resultados obtidos nas extrações com CO₂-SC puro e CO₂-etanol.

Na primeira etapa, privilegiou-se a extração de óleo em detrimento da azadiractina. Usou-se uma pressão de 200 bar, temperatura de 50°C e CO₂-SC puro. Na segunda etapa a amostra pré-desengordurada com CO₂-SC puro foi mantida na mesma condição de pressão e temperatura, mas o solvente era CO₂ com a adição de 10% etanol (m/m), para melhorar a recuperação da azadiractina das sementes. As amostras foram coletadas após as passagens sucessivas de 100 L de CO₂ e a vazão foi fixada em 1L/min de CO₂.

III.10. Determinação da composição dos extratos

III.10.1. Óleo de nim

O óleo de nim comercial, e o óleo de nim obtido nas extrações foi caracterizado de acordo com os índices tecnológicos e a composição de seus principais ácidos graxos. Os resultados, assim como a metodologia de análise, estão apresentados no **Apêndice A**.

III.10.2. Teor de azadiractina

As análises dos extratos obtidos através do método convencional por FSC foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O LEPPbio/FEQ/UNICAMP dispõe de um cromatógrafo da marca Shimadzu (Japão), que possibilita análises em modo isocrático. Este equipamento possui bomba LC-10AD, detector de ultravioleta SPD-10AV, e forno com rampa de temperatura programável. Para definir a metodologia de determinação da azadiractina, várias estratégias foram

inicialmente exploradas, de acordo com as informações da literatura e que estão listadas na **Tabela III.1.**

A metodologia escolhida foi a de Kaushik (2002) com coluna cromatográfica C18 (Shimadzu) de 250 x 4,6 mm e filtragem das amostras efetuada em membranas de 0,22 µm. A vazão de trabalho foi estabelecida em 1 mL min⁻¹. A fase móvel foi acetonitrila:água (40:60) e a presença da azadiractina foi monitorada a 217 nm.

Tabela III.1: Metodologias para a quantificação da azadiractina em CLAE.

Método	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Comprimento de onda (nm)	Coluna	Referência
Isocrático	Metanol:água (60:40)	1	217	C ₁₈	Deota et al. (2000)
Isocrático	Clorofórmio:metanol (95:5)	-----	215	C ₈	Ambrosino et al. (1999)
Isocrático	Acetonitrila:água(40:60)	1	214	C ₁₈	Kaushik (2002)
Isocrático	Metanol:água (65:35)	1	214-250	C ₁₈	Kumar e Parmar (1999)
Isocrático	Acetonitrila:metanol: água (23:25: 55)	1	220	C ₈	Sidhu et al. (2003)
Isocrático/ Gradiente	Acetonitrila:água (40:60),por 5 min,100% acetonitrila por 3 mim.	1	-----	C ₁₈	Thejavathi et al. (1995)
Gradiente	Acetonitrila:água gradiente de 16-100% de acetonitrila por 40 min	0,4	215	C ₁₈	Barrek et al. (2004)
Gradiente	Acetonitrila:água (15:85) inicial, depois 85:15, por 15 min	1	215	C ₁₈	Caboni et al. (2002)

III.11. Ensaios de inativação de fungos em sementes de nim com FSC

A inativação dos fungos em ambiente supercrítico foi avaliada em ensaios que empregaram ciclos de variação da pressão, mantendo a temperatura constante. Inicialmente foram identificados os microrganismos-alvo, isto é, os fungos que naturalmente contaminam as sementes de nim utilizadas nos ensaios.

Os fungos encontrados foram utilizados para monitorar o efeito dos ciclos de pressão e despressurização na sua inativação. Esses ensaios utilizaram sementes inteiras e sementes moídas.

III.11.1. Contaminação inicial por fungos nas sementes de nim

Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), Campinas, São Paulo.

Amostras do mesmo lote de sementes de nim utilizado em todos os ensaios de extração do óleo e da azadiractina foram analisadas para identificar e realizar a contagem dos microorganismos inicialmente presentes.

A metodologia utilizada foi a de plaqueamento direto das sementes inteiras (com desinfecção externa e sem desinfecção) e de diluições decimais seriadas e plaqueamento por superfície para as sementes moídas. A contaminação microbiológica das sementes inteiras foi avaliada com e sem desinfecção para distinguir se os fungos se localizam apenas na camada superficial do grão ou também no seu interior.

III.11.2. Sementes inteiras

No procedimento com desinfecção, cerca de 150 sementes, divididas em três lotes de 50 grãos, foram descascadas manualmente e deixadas em contato com solução de hipoclorito de sódio (1%) por 2 minutos para promover a esterilização externa das sementes. Em seguida, foram plaqueadas 10 sementes por placa em meio de cultura Dicloran 18%glicerol Agar (DG18). As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 5 dias para promover o crescimento dos microorganismos presentes nas sementes.

Para o isolamento e identificação dos fungos presentes nas sementes usou-se ágar de extrato de malte (MEA) e incubação por 5 dias a 25°C. As colônias foram repicadas para o meio Agar Czapek extrato de levedura (CYA), para a confirmação da identificação dos fungos, de acordo com a chave de classificação proposta por Pitt e Hocking (1999).

Os fungos isolados foram testados quanto à produção de micotoxinas usando meio extrato de levedura sacarose (YESA), que favorece a produção de toxinas pelas cepas produtoras, incubados por 7 dias a 25°C. A produção de toxinas foi avaliada com a utilização de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), juntamente com a técnica de Agar *plug*, proposta por Filtenborg *et al.* (1983) (**Apêndice C**). As etapas realizadas nas análises microbiológicas estão apresentadas na **Figura III.3**.

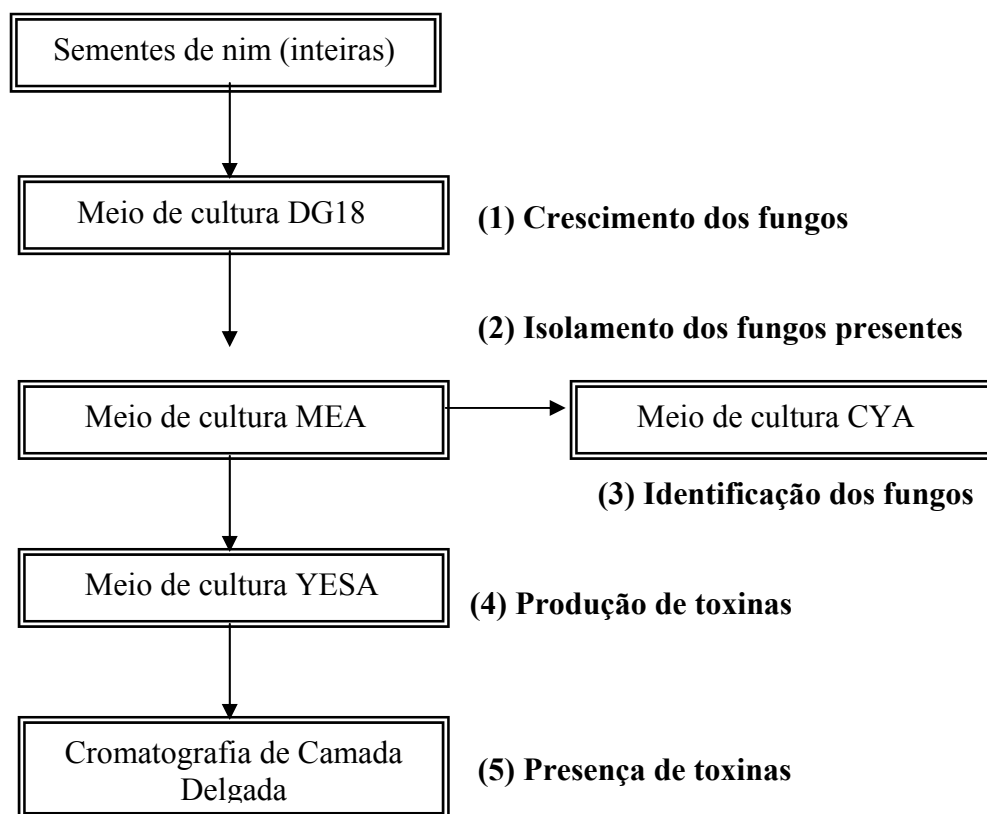


Figura III.3: Etapas para a caracterização de fungos presentes nas sementes de nim (Pitt e Hocking, 1999).

No plaqueamento sem desinfecção das sementes, essa mesma metodologia foi utilizada, apenas sem o tratamento com hipoclorito.

III.11.3.Sementes moídas

O método utilizado para verificar a presença de fungos nas sementes moídas foi a diluição, conforme proposto por Downes e Ito (2001). Estes ensaios foram realizados em triplicatas.

Em sacos plásticos estéreis foram adicionados 25 g das sementes moídas juntamente com 225 mL de água peptonada 0,1%. Esta mistura foi levada a um homogeneizador por 30 segundos. Após esta etapa, iniciam-se as diluições decimais seriadas.

Prevedo uma grande contaminação nas sementes optou-se em fazer diluições nas proporções (-1), (-2), (-3), (-4), (-5). Esta contaminação inicial é devida, principalmente, a manipulação nas etapas de trituração das amostras (moinho de faca), determinação da granulometria (peneiras) e no armazenamento, que não foram realizados em ambiente estéril.

Após as diluições, o plaqueamento foi realizado em meio de cultura DG18. As placas receberam 0,1 mL de cada diluição e foram incubadas a 25°C, por 5 dias para promover o crescimento dos fungos. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g).

III.11.4. Inativação por FSC

A adequação das condições de inativação dos fungos neste trabalho baseou-se nos estudos propostos pelos autores Dillow *et al.* (1999), Calvo *et al.* (2007), Spilimbergo *et al.* (2002), White *et al.* (2006), Hong e Pyun (1999) e Cinquemani, *et al.* (2007), fazendo-se a inativação dos fungos já presentes nas amostras de sementes de nim.

De acordo com Calvo *et al.* (2007), a utilização de altas temperaturas melhora a inativação microbiana, porém diminui o poder de solvatação do CO₂, devido à diminuição da densidade. Devido a esta característica foram testadas duas temperaturas distintas, 40°C (0,8293 g/cm³) e 60°C (0,6932 g/cm³) a 200 bar.

Os ensaios foram realizados em triplicatas usando sementes inteiras (150 sementes em cada ensaio) ou sementes moídas (30 g) no equipamento descrito no **Item III.5**.

O vaso extrator do equipamento foi alimentado com as sementes de nim, e em seguida submetido a ciclos de pressurização e despressurização ($\Delta P=100$ bar), durante duas horas de operação (7 ciclos por hora). As condições de trabalho utilizadas foram: pressão máxima de 200 bar e mínima de 100 bar, temperaturas de 40 e 60°C e vazão de 1L/min de CO₂.

Após os ciclos de pressurização e despressurização, o material contido no extrator foi recolhido de modo estéril em sacos plásticos e foi avaliado no Laboratório de Microbiologia do ITAL, seguindo os mesmos procedimentos usados na caracterização

microbiológica inicial das sementes de nim (**Item III.11.1**). Antes e após cada ensaio o equipamento foi limpo com água destilada e álcool 70%, a fim de garantir sua esterilidade.

Capítulo IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos no decorrer da pesquisa de mestrado. Os resultados são discutidos com base em fundamentos teóricos e observações experimentais previamente reportados na literatura.

IV.1. Caracterização das amêndoas de nim

A **Tabela IV.1** apresenta a caracterização geométrica das amêndoas de nim medidas com um paquímetro e seu teor de umidade, amostradas antes da etapa de moagem. Utilizou-se uma população de 50 amêndoas de nim para o cálculo do desvio padrão apresentando na tabela abaixo.

Tabela IV.1: Caracterização das amêndoas de nim.

Características	
Comprimento (mm)	11,56 ± 0,17
Largura (mm)	4,76 ± 0,35
Espessura (mm)	4,39 ± 0,05
Umidade (% B.U.)	6,5 ± 0,15

IV.2. Separação granulométrica das sementes moídas de nim

As sementes de nim moídas em moinho de faca, de acordo com a metodologia apresentada no **Item III.3.1**, foram separadas em diferentes frações por faixas de diâmetro por meio de um conjunto de peneiras.

A **Tabela IV.2**, apresenta a massa das frações obtidas para 3 diâmetros médios das sementes utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito do grau de moagem na taxa de extração.

Tabela IV.2: Distribuição de tamanho de partículas de sementes de nim após a moagem.

Abertura das peneiras	Diâmetro médio (mm)	Fração retida (% em massa)
1,0 – 0,850 mm	0,925	80
0,850 - 0,6 mm	0,725	15
0,6 – 0,5 mm	0,550	5

O re-processamento das partículas de maior diâmetro por meio de uma moagem mais fina não foi possível no moinho existente devido ao grande teor de óleo nas sementes. Devido a grande quantidade de ensaios propostos no estudo da extração do óleo e da azadiractina das sementes de nim, optou-se em utilizar o diâmetro médio de 0,925 mm.

De acordo com Reverchon e de Marco (2006) as extrações de produtos naturais em FSC geralmente são realizadas com partículas variando de 0,25 a 2 mm e o tamanho de partículas usadas no presente trabalho esta incluído nesta faixa. Partículas de tamanho semelhantes foram usadas por Tonthubthimthong *et al.* (2004), no estudo da extração de nimbina de sementes de nim.

IV.3. Extração com solventes orgânicos

IV.3.1. Extração do óleo

As extrações do óleo das sementes de nim, por métodos convencionais foram realizadas em extratores do tipo Soxhlet, tendo-se avaliado a eficiência de três solventes com polaridades diferentes: hexano, etanol e metanol, como descrito no **Item III.4** da metodologia. Estes ensaios foram realizados em triplicatas.

O conteúdo médio de óleo nas sementes de nim moídas (0,925 mm) obtido com hexano foi de $47,37 \pm 1,85\%$. Na extração com etanol, o valor médio encontrado foi de $53,47 \pm 0,3\%$, e na extração com metanol de $66,49 \pm 0,64\%$. O conteúdo de óleo extraído com metanol mostrou-se superior aos obtidos por hexano e etanol, demonstrando a maior eficiência do solvente polar. As diferenças nas porcentagens de extração do óleo de nim encontradas estão de acordo com os valores apresentadas por Drummond *et al.* (2008), que

obtiveram a maior extração do óleo de mamona com a utilização de metanol (51%) em comparação ao etanol (47%) e hexano (41%).

Os teores de óleo de nim encontrados por Soxhlet estão dentro da faixa de valores obtida pelos autores Kumar e Parmar (1996) e Kaushik (2002).

Apesar do metanol ter sido o solvente mais eficiente na extração do óleo de nim, neste trabalho, optou-se pela utilização do valor encontrado com hexano (47,37%) como referência para a comparação com a técnica por FSC. Essa decisão está baseada no fato do produto extraído com hexano ter aparência mais clara e límpida. O etanol e o metanol, por serem solventes polares, extraíram outros compostos presentes nas sementes além dos triacilgliceróis como, por exemplo, os fosfolípidios, pigmentos e os compostos de interesse neste trabalho, os limonóides.

IV.3.2. Extração da azadiractina

Após a extração do óleo das sementes de nim com a utilização de Soxhlet e dos solventes hexano, metanol ou etanol (**Item IV.3.1**), a semente desengordurada foi submetida a diferentes tratamentos para a extração da azadiractina, de acordo com a metodologia disposta no **Item III.4**. Foram realizadas extrações a frio (maceração) e etapas contendo uma segunda extração em Soxhlet, com os solventes polares metanol e etanol. A azadiractina encontrada nos extratos por estes métodos foi quantificada por CLAE (**Item III.11.2**).

Na **Tabela IV.3** são apresentados os valores encontrados em fração de massa de azadiractina das semente de nim. A maior extração da azadiractina ocorreu com a utilização de etanol (em uma única etapa, Soxhlet), sendo que neste método a azadiractina é extraída em conjunto com o óleo.

De acordo com os dados apresentados na **Tabela IV.3**, os ensaios realizados em duas etapas não foram eficientes para o fracionamento da azadiractina. O limonóide provavelmente já havia sido solubilizado no hexano, durante a etapa inicial para a remoção do óleo, porém este extrato oleoso não foi avaliado quanto ao seu teor de azadiractina. O valor de 1,05 g de azadiractina por 100 g de sementes encontrado na extração com etanol está de acordo com dados da literatura (**Tabela II.2**) e será usado como referência neste trabalho.

Tabela IV.3: Conteúdo de azadiractina em sementes de nim, obtido por extração com solventes orgânicos.

Métodos	Azadiractina (g/100g de semente)
Soxhlet hexano + maceração à frio etanol	0,17±0,16
Soxhlet hexano + maceração à frio metanol	0,561±0,25
Soxhlet hexano + Soxhlet etanol	0,39±0,32
Soxhlet hexano + Soxhlet methanol	0,314±0,10
Soxhlet etanol	1,05±0,27
Soxhlet methanol	0,809±0,17

IV.4. Solubilidade do óleo de nim em FSC

Foram realizados ensaios exploratórios para determinar a solubilidade do óleo de nim em CO₂-SC, visando obter subsídios para definir a melhor faixa de operação do equipamento. Para a realização destes ensaios utilizaram-se os procedimentos descritos no **Item III.7** e a carga do extrator foi feita com 10 g de óleo bruto de nim obtido por prensagem.

Os experimentos foram realizados nas pressões de 150, 220, 250 e 300 bar, nas temperaturas de 50 e 60°C e uma vazão de 0,7 L/min de CO₂ (CNTP). As amostras (frações) foram coletadas em seqüência, após a passagem de volumes de 100 L de CO₂ (CNTP), que correspondem a, aproximadamente, 200 g de CO₂.

O óleo de nim bruto utilizado nestes experimentos apresentava coloração marrom-escuro, devido, provavelmente, à presença de fosfolipídeos e outros compostos pigmentados que foram extraídos durante a prensagem das sementes. O óleo extraído por FSC apresentou coloração amarelada, cuja intensidade foi diminuindo ao longo da passagem do solvente, fato que pode ser interpretado como um certo grau de refino do material.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura IV.1**, que contempla a massa de óleo acumulado no vaso coletor em função da massa total de CO₂ utilizada como solvente. Não foram efetuados ensaios a pressões maiores, devido à limitação do equipamento.

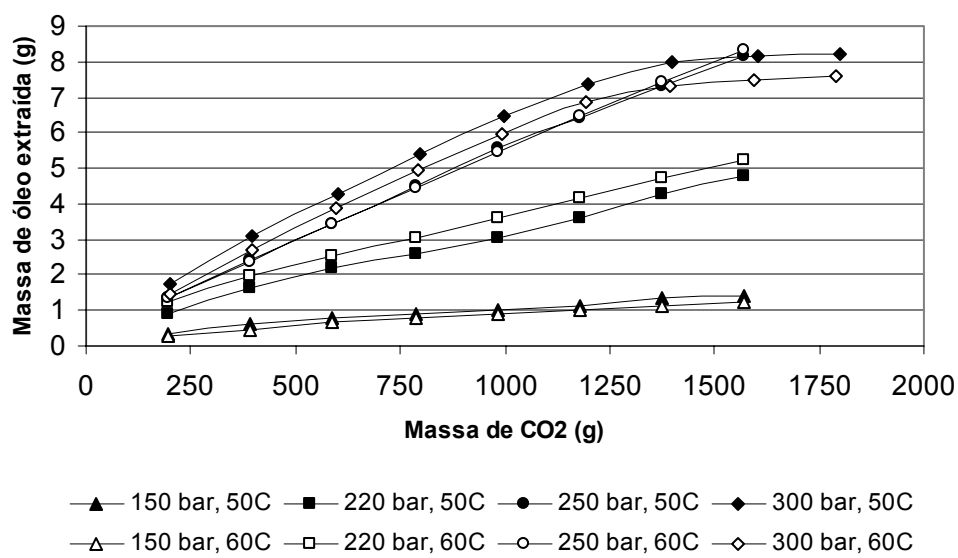


Figura IV.1: Curvas de extração do óleo de nim a diferentes condições de pressão e temperatura, vazão de CO₂ de 0,7 L/min.

Para uma melhor distinção do efeito da pressão, estes mesmos dados foram relocados na **Figura IV.2** (extrações a 50°C) e na **Figura IV.3** (extrações a 60°C).

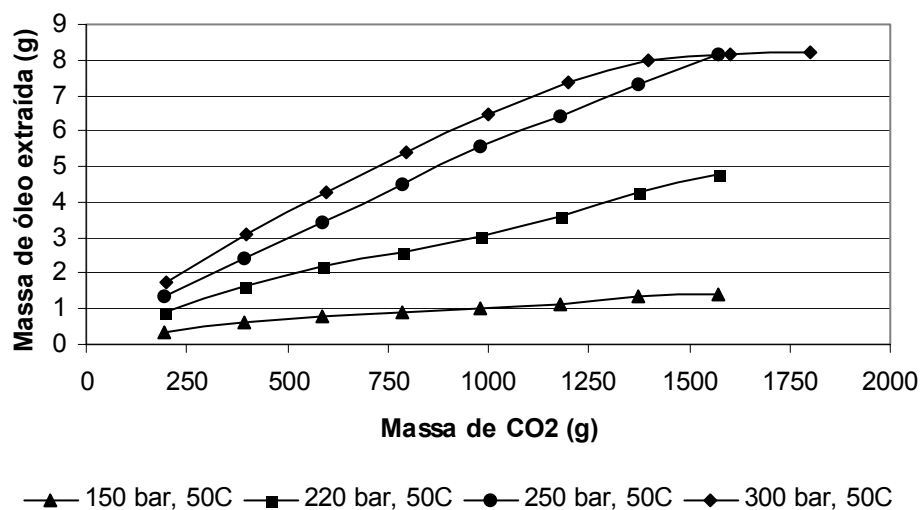


Figura IV.2: Curvas de extração do óleo de nim utilizando CO₂-SC puro a 50°C e vazão de 0,7 L/min de CO₂.

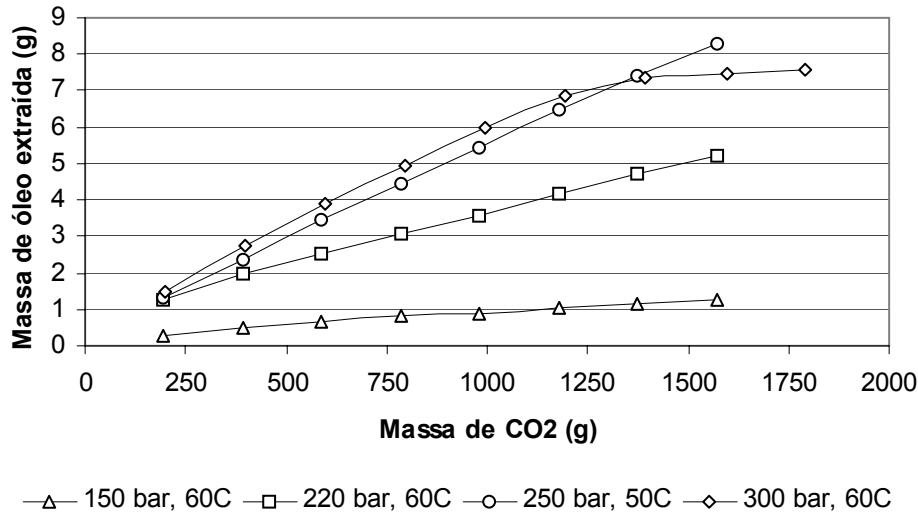


Figura IV.3: Curvas de extração do óleo de nim utilizando CO₂-SC puro, a 60°C e vazão de 0,7 L/min de CO₂.

Observa-se que aumentos de pressão à temperatura constante resultam em aumento na taxa de extração do óleo. Este resultado experimental é explicado pelo aumento da densidade do solvente e, portanto das forças de interação intermoleculares.

Os pontos experimentais iniciais do ensaio estão situados em uma linha reta, uma condição necessária (porém não suficiente) para indicar que nas condições usadas o equilíbrio de solubilidade foi atingido. A pequena diferença encontrada na composição do óleo bruto e do óleo refinado (ver **Apêndice A**) é um indicio adicional de que a condição de saturação pode ter sido atingida.

A inclinação das retas no início da extração fornece valores de solubilidades para o óleo de nim em CO₂-SC, que estão apresentadas na **Tabela IV.4**. O valor encontrado para a condição de 300 bar (50°C) para o óleo de nim está dentro da faixa de solubilidade encontrada por Soares *et al.* (2007) nesta condição de extração, para diferentes óleos vegetais.

Azevedo (2005) determinou a solubilidade do óleo de café neste mesmo equipamento. As solubilidades (g óleo/kg CO₂) encontradas na pressão de 150 bar nas temperaturas de 50 e 60°C foram respectivamente 1,8 e 5,0 e na pressão de 250 bar, 6,3 e 5,0.

Comparando-se os valores de solubilidade do óleo de café (Azevedo, 2005) e do óleo de nim (**Tabela IV.4**) verifica-se que as solubilidades são semelhantes. Pequenas diferenças de solubilidade podem ser atribuídas à variação do número de carbonos e, conseqüentemente, da massa molar e também do grau de insaturação do óleo de nim. O óleo de café tem predominância do ácido graxo palmitoleico (C16:1) e o óleo de nim (dados no **Apêndice A**) do oleico (C18:1). Romero (2007) enfatiza a necessidade de pesquisas adicionais para a melhor compreensão da relação do grau de insaturação e a solubilidade dos óleos.

Tabela IV.4: Solubilidade do óleo de nim e recuperação do óleo de nim em CO₂-SC puro a diferentes temperaturas e pressões.

Condições (bar, °C)	Densidade CO₂ (g/cm³)	Solubilidade (g óleo/kg CO₂)	Recuperação do óleo (% total alimentado)
150, 50	0,655	2,1	14,15
220, 50	0,792	3,7	47,71
250, 50	0,829	5,3	81,71
300, 50	0,879	6,8	81,78
150, 60	0,560	1,0	12,51
220, 60	0,729	3,5	52,39
250, 60	0,773	5,2	83,06
300, 60	0,830	6,1	76,00

O comportamento da solubilidade do óleo de nim com a temperatura de extração pode ser observado na **Figura IV.4**, que apresenta isotermas de solubilidade do óleo em função da pressão. O formato das curvas indica uma tendência linear com a pressão, isto é, um incremento da solubilidade com o aumento da pressão que fica mais acentuado a pressões superiores a 250 bar. Houve pouca diferença na solubilidade do óleo comparando-se as temperaturas de 50 e 60°C nas condições de extração estudadas.

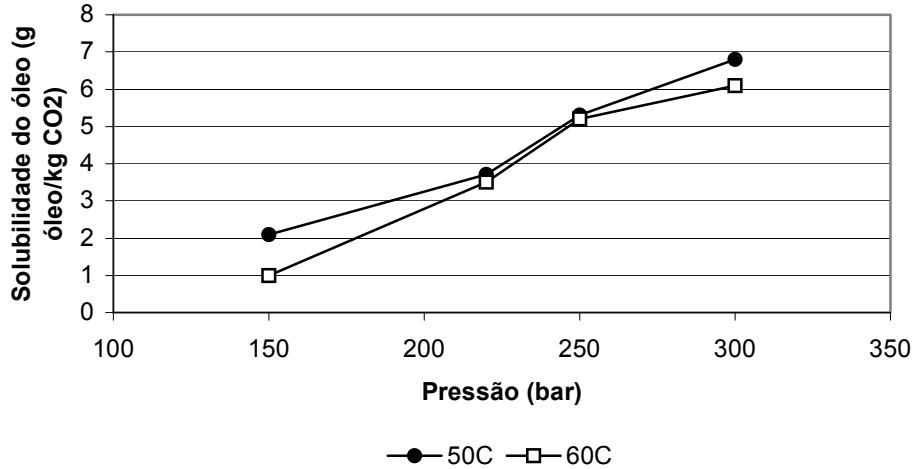


Figura IV.4: Solubilidade do óleo de nim em função da pressão e da temperatura.

A **Figura IV.5** apresenta a curva de solubilidade traçada em função da densidade do solvente para cada isoterma. Como esperado, o aumento da solubilidade se correlaciona bem com o aumento da densidade do solvente. Observa-se, também, que para uma mesma densidade, a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura devido ao aumento da pressão de vapor dos diversos triacilgliceróis presentes no óleo de nim.

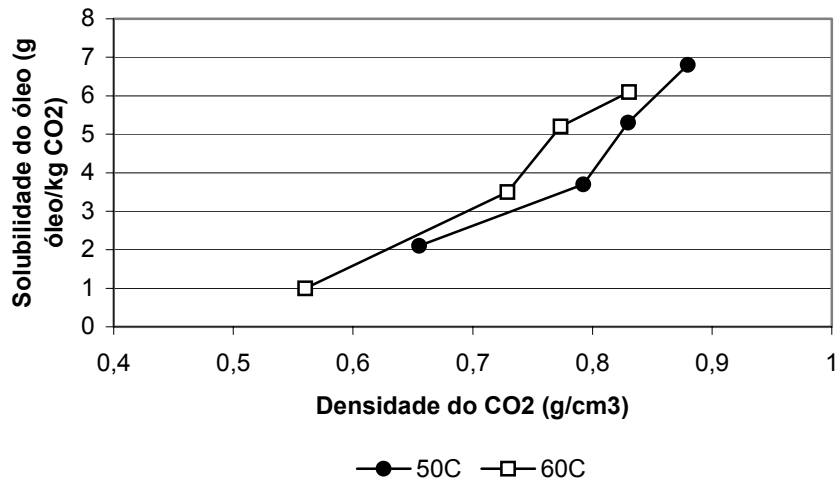


Figura IV.5: Solubilidade do óleo de nim em função da densidade do CO₂.

IV.5. Extração de azadiractina contida no óleo

A solubilidade da azadiractina em CO₂-SC utilizando produto padrão puro não pode ser determinada devido à dificuldade de se encontrar esse material no mercado. Como uma alternativa, e na tentativa de obter tendências sobre o efeito da temperatura e da pressão no comportamento de solubilidade da azadiractina no CO₂-SC, os dados de extração deste princípio ativo obtidos durante os ensaios de solubilidade do óleo foram usados nesses cálculos.

As curvas de extração obtidas estão traçadas na **Figura IV.6** e se pode constatar que, na maioria das isotermas obtidas, as partes iniciais das curvas tendem a ser lineares. Essa linearidade não é garantia de que se atingiu a saturação do CO₂ com azadiractina, sobretudo porque as curvas não têm formato característico de extrações supercríticas. A parte inicial das curvas na extrapola adequadamente até a origem, indicando que, com exceção da extração à pressão a 150 bar, outro mecanismo favoreceu a solubilização. É possível que o óleo tenha interferido na volatilidade da azadiractina ou o processo tenha sido afetado pela ação co-solvente do óleo.

O efeito de co-solvência nos ensaios pode ser relacionado aos efeitos sinérgicos positivos entre os compostos presentes no óleo de nim, conforme Vasapollo *et al.* (2004), que verificaram que o efeito da adição de um óleo vegetal ao CO₂ no sistema de extração do licopeno do tomate aumentava o rendimento de processo em 60% atuando como co-solvente para o composto de interesse. Azevedo (2005) também constatou um efeito co-solvente do óleo (de café) na extração de cafeína, do grão verde de café.

Em conseqüência desse comportamento anômalo, não se calculou uma possível “solubilidade efetiva” da azadiractina no CO₂-SC e se ateve, apenas, a cálculos da capacidade de extração.

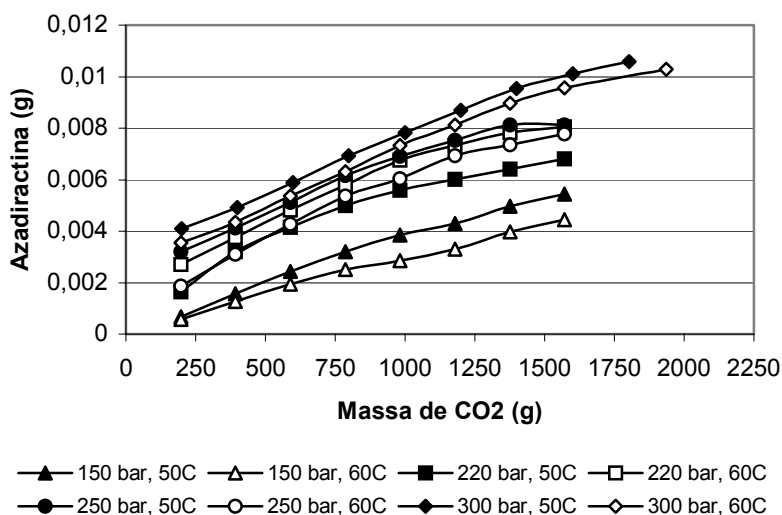


Figura IV.6: Curvas de extração da azadiractina obtidas nos ensaios de solubilidade do óleo de nim bruto.

O óleo bruto inicial utilizado nestes experimentos foi quantificado quanto ao seu teor de azadiractina, tendo sido encontrado uma concentração de 850 ppm. A **Tabela IV.5**, apresenta a recuperação da azadiractina presente no óleo de nim bruto calculada quando 1570 g de CO₂ foram utilizados no sistema. Os valores de recuperação da azadiractina são consideravelmente maiores do que a extração a partir das sementes (ver **Item IV.6.2.2**).

Através dos dados de recuperação da azadiractina apresentados na **Tabela IV.5** e de recuperação de óleo na **Tabela IV.4 (Item IV.4)**, verifica-se a obtenção de um extrato mais enriquecido em azadiractina (52,18%) e em menor quantidade de óleo (12,51%) na condição de 150 bar e 60°C.

Tabela IV.5: Recuperação da azadiractina do óleo de nim bruto com FSC.

Condições (bar, °C)	Densidade CO₂ (g/cm³)	Recuperação da azadiractina (%)
150, 50	0,655	63,94
220, 50	0,792	80,17
250, 50	0,829	95,46
300, 50	0,879	152,82
150, 60	0,560	52,18
220, 60	0,729	92,38
250, 60	0,773	91,38
300, 60	0,830	141,17

IV.6. Extração de óleo e de azadiractina de sementes de nim com CO₂-SC

IV.6.1. Ensaios de extração

A extração da azadiractina e do óleo das sementes de nim foi inicialmente avaliada com a utilização de CO₂-SC puro como solvente. Foram exploradas as condições de 150, 200 e 250 bar, temperaturas de 50, 60 e 70°C e diâmetro de partícula médio de 0,925 mm, conforme descrito no **Item III.8**.

IV.6.1.1. Extração do óleo

As Figuras **IV.8**, **IV.9** e **IV.10** apresentam as curvas de extração do óleo de nim, obtidas a diferentes pressões, nas temperaturas de 50, 60 e 70°C.

As curvas de extração do óleo de nim apresentam o mesmo formato das curvas obtidas na extração do óleo das sementes de uva por Sovová *et al.* (1994), isto é uma região linear inicial, com uma inclinação próxima aos valores de solubilidade do óleo em CO₂. Em seguida há um período de transição, durante o qual a taxa de extração cai rapidamente, e, na parte final a extração continua com um ritmo mais lento. O óleo mais acessível encontrado na superfície nas sementes (através da moagem) é solubilizado rapidamente no início. A

extração se torna mais lenta devido ao óleo restante estar menos disponível, contido no interior das partículas das sementes. Nessa região final, o processo de extração é controlado pelo mecanismo de difusão.

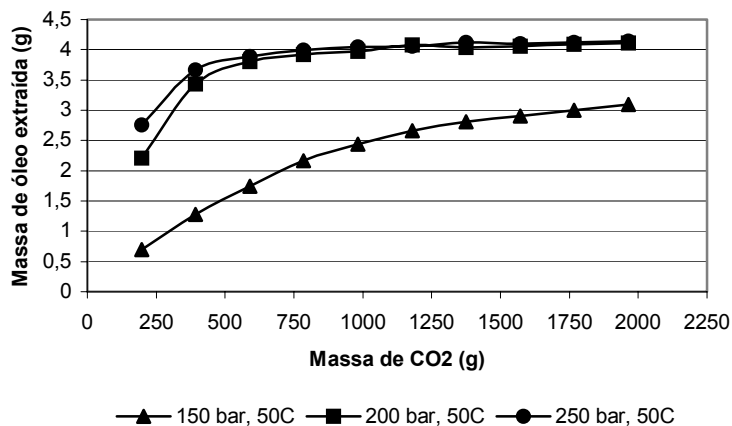


Figura IV.8: Curvas de extração do óleo de sementes de nim com CO₂-SC puro a temperatura de 50°C.

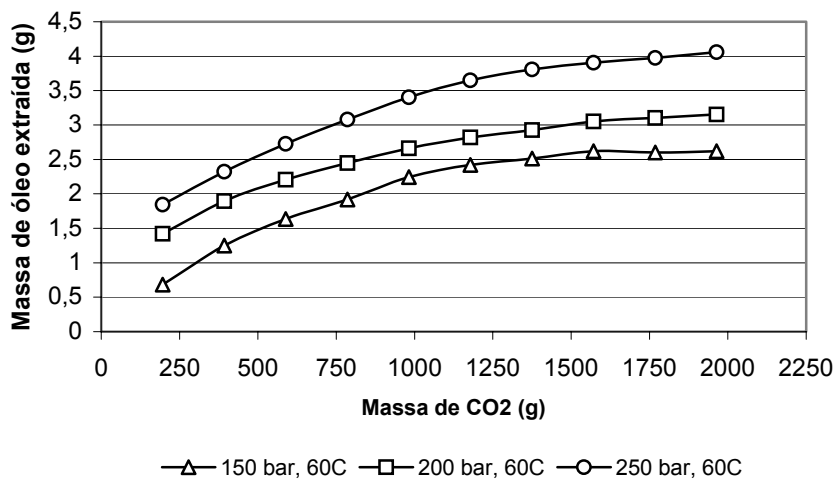


Figura IV.9: Curvas de extração do óleo de sementes de nim com CO₂-SC puro, a temperatura de 60°C.

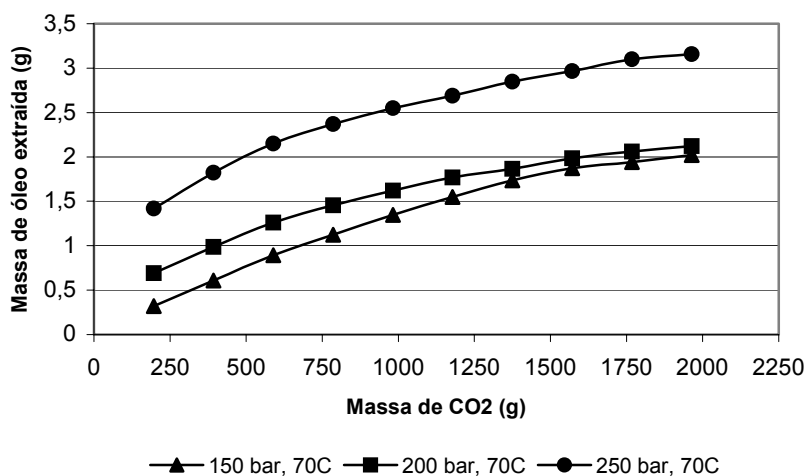


Figura IV.10: Curvas de extração do óleo de sementes de nim com CO₂-SC puro, a temperatura de 70°C.

A **Figura IV.8** contém as extrações realizadas em temperatura constante de 50°C e pressões de 150, 200 e 250 bar. Nas pressões de 250 bar (densidade 0,829 g/cm³) e 200 bar (densidade 0,762 g/cm³), verificou-se pouca influência do parâmetro da pressão na extração do óleo, o que pode ser explicado pelos valores de densidade do solvente supercrítico serem muito próximos. Já na extração feita a 150 bar (densidade 0,655 g/cm³), há uma menor extração de óleo devido à sua menor densidade em comparação as outras condições (200 e 250 bar).

Nas **Figuras IV.9 e IV.10**, são apresentadas as curvas de extração do óleo nas temperaturas de 60 e 70°C. Verifica-se novamente que com o aumento da pressão, ocorre aumento na taxa de extração do óleo, devido às diferenças de densidade nestas condições. Nessas duas temperaturas, as extrações a uma pressão de 250 bar se sobressaíram em relação aos processos a 150 bar e 200 bar.

A **Figura IV.11** apresenta a recuperação de óleo (razão da massa extraída de óleo pela massa inicial de óleo contido nas sementes) nas diferentes condições de extração em função da temperatura, calculadas usando a quantidade de óleo extraída com a passagem de 1570 g de CO₂ pelo sistema. Nestes cálculos assumiu-se novamente que o conteúdo total de óleo nas sementes de nim foi 47,37%, valor obtido por Soxhlet com hexano.

De um modo geral, a **Figura IV.11** indica que houve uma maior recuperação do óleo com incremento da pressão a uma temperatura constante e uma diminuição na

recuperação com o aumento da temperatura em uma mesma pressão. Esse comportamento deixa claro que um aumento de densidade do CO₂-SC favoreceu a extração, conforme pode ser observado pelas curvas da **Figura IV.12**. Nessa figura, o efeito da temperatura é salientado e, portanto, pode-se concluir que altas densidades do CO₂, obtidas com baixas temperaturas favorecem a extração de óleo de nim.

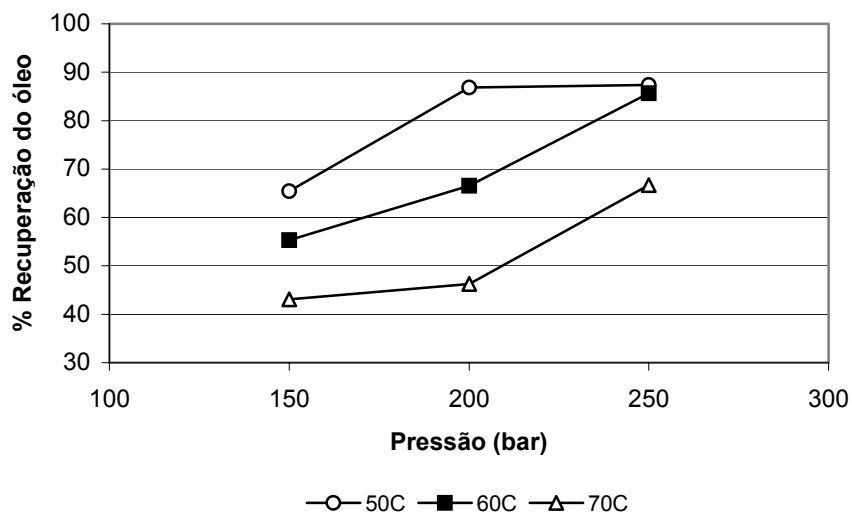


Figura IV.11: Recuperação do óleo de sementes de nim em função da pressão, com a utilização de 1570g de CO₂-SC puro, em diferentes condições de operação.

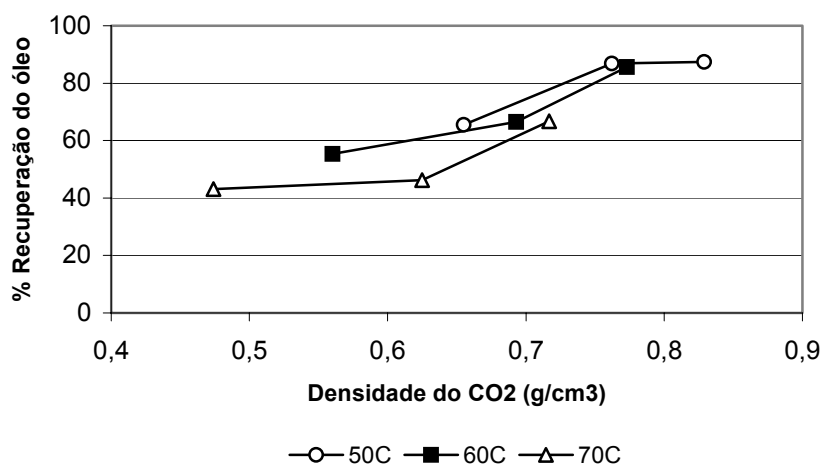


Figura IV.12: Recuperação do óleo de sementes de nim em função da densidade, com a utilização de 1570g de CO₂-SC puro, em diferentes condições de operação.

IV.6.2.2. Extração da azadiractina

As **Figuras IV.13, IV.14 e IV.15** apresentam as curvas de extração de azadiractina das sementes com CO₂-SC puro obtidas nos mesmos ensaios de extração do óleo. As curvas indicam a massa de azadiractina acumulada (analisada por CLAE, **Item III.10.2**) em função das massas acumuladas de CO₂ utilizada neste processo.

O formato das curvas sugere que a extração da azadiractina das sementes com CO₂-SC é um processo lento devido à baixa solubilidade e que o óleo é extraído mais rapidamente do que a azadiractina das amêndoas de nim, pois a extração de óleo estabiliza em cerca de 1000 g de CO₂ (250 bar, 50°C) e a extração de azadiractina mesmo após a passagem de quase 1570 g de CO₂ ainda não mostra indícios de nivelamento da curva.

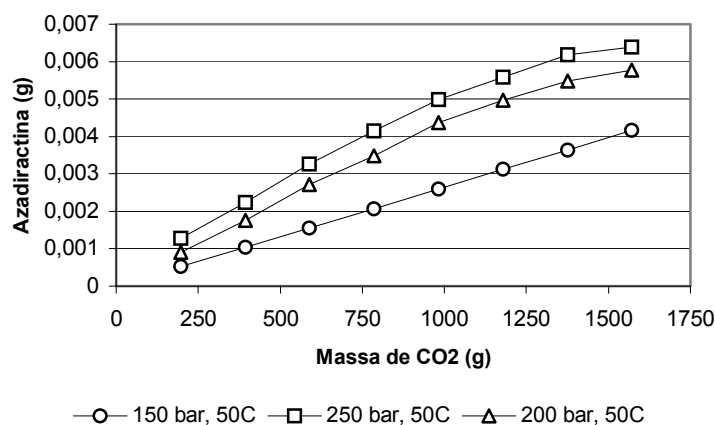


Figura IV.13: Curvas de extração da azadiractina de sementes de nim, utilizando CO₂-SC puro, a 50°C.

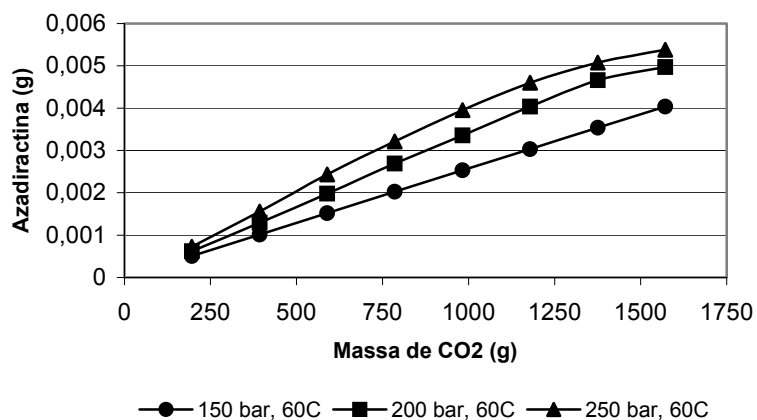


Figura IV.14: Curvas de extração da azadiractina de sementes de nim, utilizando CO₂-SC puro, a 60°C.

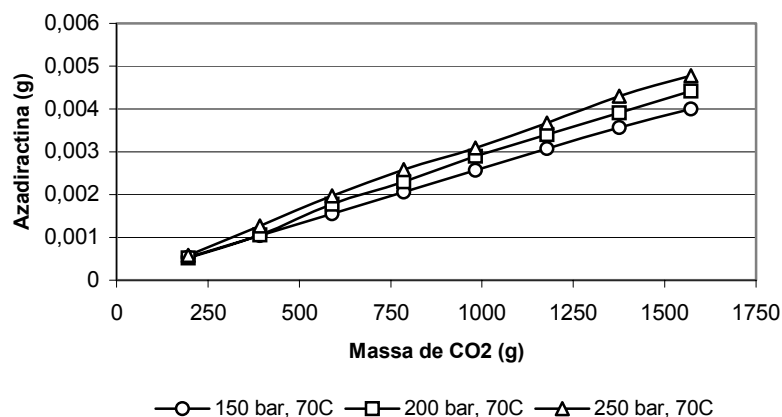


Figura IV.15: Curvas de extração da azadiractina de sementes de nim, utilizando CO₂-SC puro, a 70°C.

A ordenação das curvas nas extrações a 50°C (**Figura IV.13**) e a 60°C (**Figura IV.14**) é a mesma dos ensaios de solubilidade, isto é, um aumento da pressão favorece a extração e as isobáricas estão distintamente afastadas entre si. Uma comparação entre as curvas destas duas figuras confirma que a melhor condição para a extração é a 50°C e pressão de 250 bar, isto é nas mesmas condições ótimas da extração do óleo. A explicação para este fato está baseada na maior densidade do solvente nesta condição.

As curvas de extração de azadiractina a 70°C (**Figura IV.15**) tem um comportamento semelhante, mas o efeito da pressão é menos pronunciado, ocorrendo uma aproximação das curvas. A massa extraída é menor, seguindo a tendência encontrada nos ensaios de extração deste composto no óleo de nim (**Item IV.5**).

A **Figura IV.16** apresenta a recuperação da azadiractina com CO₂-SC puro, após a passagem de 1570 g de CO₂. Os baixos valores podem ser atribuídos à pouca afinidade do composto pelo solvente, devido à grande diferença de polaridade entre eles.

Uma comparação entre esses valores confirma que a melhor extração ocorre a 50°C e 250 bar de pressão. Devido a estes resultados com CO₂-SC puro, ensaios de extrações com o uso de co-solvente foram programados, com a finalidade de tentar aumentar a recuperação da azadiractina.

O cálculo da recuperação da azadiractina (%) foi baseado nos valores encontrados na extração convencional da azadiractina em Soxhlet com etanol (1,05 g de azadiractina/100 g semente). Como nos ensaios de extração do óleo, a maior recuperação

da azadiractina também foi constatada nas condições de extração de maior pressão (250 bar) e menor temperatura (50°C) como pode ser observado na **Figura IV.16**.

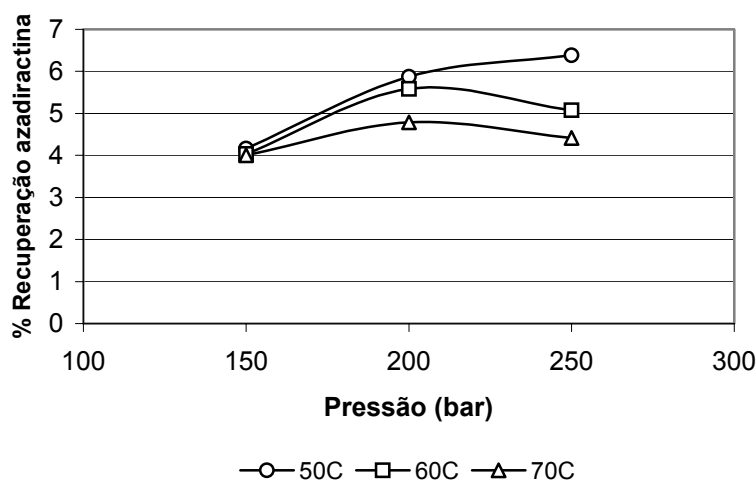


Figura IV.16: Recuperação de azadiractina das sementes de nim, após a passagem de 1570 g de CO₂-SC puro, em diferentes condições de operação.

O melhor fracionamento da azadiractina em relação ao óleo ocorre nos ensaios a 150 bar e 70°C, condição onde há uma menor extração do óleo das sementes (40%) e uma recuperação de azadiractina em 4%. As outras situações estudadas conseguem extrair mais azadiractina, mas a extração de óleo é muito maior. Este comportamento antagônico de rendimento e seletividade, onde maiores rendimentos reduzem a seletividade e maiores seletividades reduzem o rendimento, é típico de extrações de produtos naturais em solventes supercríticos (Azevedo, 2005).

VI.7. Extração de óleo e de azadiractina com CO₂ + etanol

A utilização de co-solvente no processo de extração tem como objetivo aumentar a solubilidade e interferir na seletividade de extração da azadiractina. Com a adição do co-solvente, além de alterar a polaridade do CO₂, há também a interação entre co-solvente e o solvente, aumentando a densidade e resultando em um maior poder de solvência. Outro efeito possível reportado por Azevedo (2001) é formação de ligações específicas como pontes de hidrogênio entre a molécula de álcool e o núcleo esterificado da molécula de triacilglicerol, explicando a maior extração do óleo com a utilização do etanol.

A extração do óleo e da azadiractina com o uso do co-solvente etanol foi realizada no equipamento de extração supercrítica modular, apresentado no **Item III.9** e **Figura III.2**. Esse equipamento possui maiores recursos de controle do processo e bombas mais eficientes, possibilitando extrações a pressões superiores a 300 bar. Aproximadamente 10 g de sementes de nim moídas foram alimentadas ao extrator com esferas de vidro. Nos ensaios foram exploradas duas concentrações de etanol, 5 e 10% (m/m), pressões de 200 e 300 bar e temperaturas de 50 e 60°C. Essas condições de temperatura e pressão foram pré-definidas, pelos resultados obtidos nas extrações com CO₂-SC puro que indicaram maior massa extraída, quanto maior a pressão de trabalho.

IV.7.1.Extração do óleo

As **Figuras IV.17** e **IV.18** apresentam as curvas de extração do óleo (g) em função da massa de CO₂ acumulada (g), nas temperaturas de 50 e 60°C respectivamente a pressões de 200 e 300 bar e usando duas concentrações de etanol (5 e 10% m/m). Na mesma figura como comparação estão lançados os dados obtidos na extração do óleo com CO₂ puro.

As amostras extraídas com a utilização de etanol apresentaram forte coloração amarelada, que diminuía de intensidade com o decorrer da extração, mostrando-se bem diferentes das obtidas com CO₂-puro, que eram transparentes e claras. Esta aparência indica que o etanol extraiu também pigmentos presentes nas sementes.

Uma comparação entre as curvas das duas figuras indica que a temperatura praticamente não influi na extração do óleo com etanol, pois o formato da curva é semelhante e a tendência em todos os ensaios é extrair em torno de 5,2 g de óleo com 1570 g de CO₂. Observa-se, também, que um aumento na concentração de etanol de 5 para 10% promoveu pequeno aumento na massa extraída.

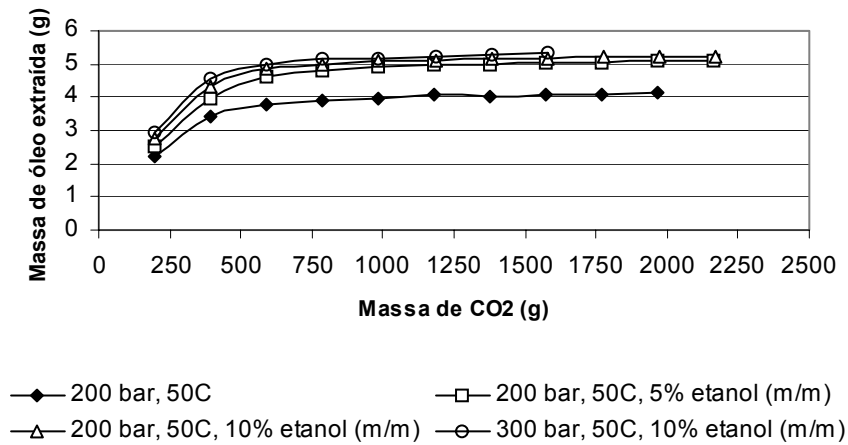


Figura IV.17: Curvas de extração do óleo de nim, com CO₂ puro e CO₂ + etanol (5 e 10% m/m), nas pressões de 200 bar e temperatura de 50°C.

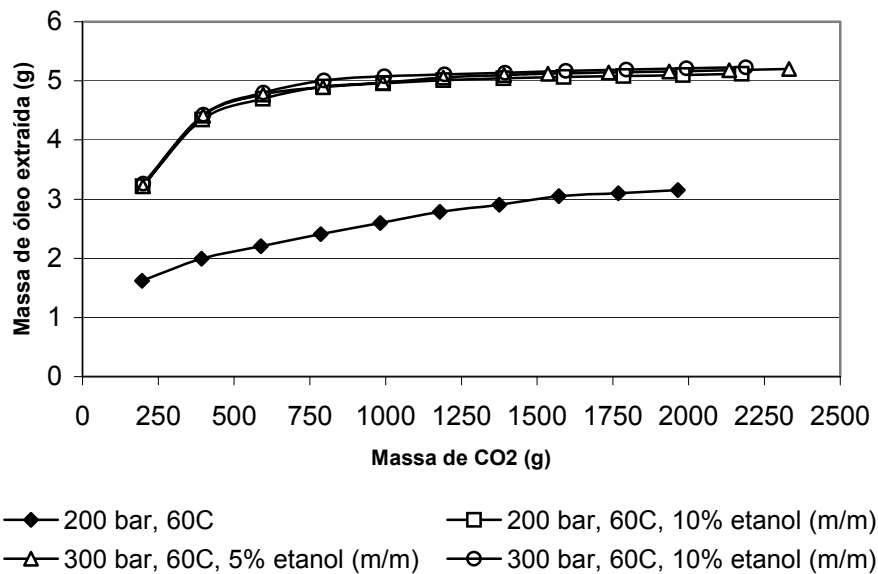


Figura IV.18: Curvas de extração do óleo de nim, com CO₂ puro e CO₂ + etanol (5 e 10% m/m), nas pressões de 200 e 300 bar e temperatura de 60°C.

Essa mesma conclusão pode ser obtida analisando os valores de recuperação de óleo apresentados na **Tabela IV.7**.

A **Tabela IV.7** apresenta a recuperação do óleo das sementes de nim obtida através do uso de CO₂-SC puro e com a adição de etanol como co-solvente, após a passagem de 1750 g de CO₂ pelo sistema. Estes valores são calculados com o conteúdo de

óleo obtido por Soxhlet usando hexano. Nas condições analisadas a extração do óleo em CO₂-SC + etanol foi superior a 100%. Em termos matemáticos, estas recuperações superiores a 100% são inaceitáveis e indicariam erros experimentais. No presente caso, entretanto, a situação é explicável pela maior solubilização de compostos lipídicos (e mesmo de outra origem) por parte do etanol, conforme já discutido no **Item IV.3**. Todo o extrato obtido com CO₂ + co-solvente foi assumido como óleo e uma comparação mais apropriada seria usar o valor de 53,5% para o conteúdo de óleo nas sementes, obtido por Soxhlet, com etanol.

Preferiu-se, entretanto, manter o valor de 47,4% de óleo (obtido com hexano) como referência, devido à qualidade do óleo obtido nas extrações com CO₂ puro (ver **Apêndice A**) e sua aparência. Uma avaliação mais precisa deveria se basear em análise da composição do óleo obtido, e que neste trabalho não foi realizado com o extrato obtido com CO₂ + co-solvente.

A maior recuperação do óleo nas extrações utilizando co-solventes está de acordo com os relatos experimentais encontrados na literatura para as extrações de óleos vegetais como, por exemplo, Cocero e Calvo (1996) na extração de óleo de girassol e Azevedo (2005) na extração do óleo de café. Aumentos nos percentuais de etanol, juntamente com as elevadas pressões, aumentam significativamente a solubilidade do óleo.

Tabela IV.7: Eficiência do óleo de nim em extrações com FSC (CO₂-SC puro e CO₂-SC + etanol).

Condições de extração (bar, °C)	CO ₂ -SC puro Recuperação do óleo (%)	CO ₂ -SC + etanol Recuperação do óleo (%)
150, 50	61,40	-----
150, 60	55,34	-----
150, 70	39,52	
200, 50	85,71	108,0 (5% et) 110,4 (10% et)
200, 60	64,45	108,2 (10 % et)
200, 70	41,90	-----
250, 50	86,56	-----
250, 60	82,40	-----
250, 70	62,63	
300, 50		113,1 (10% et)
300, 60	-----	110,6 (5 % et) 109,9 (10% et)

IV.7.2. Extração da azadiractina

A extração da azadiractina das sementes de nim com a utilização do co-solvente etanol foi avaliada nos mesmos ensaios de extração do óleo de nim, isto é, temperatura de 50 e 60°C, pressões de 200 e 300 bar e etanol como co-solvente na proporção de 5 e 10% m/m.

As **Figuras IV.19** e **IV.20** apresentam as curvas de extração de azadiractina obtidas a 50°C e a 60°C, respectivamente, em comparação à extração com CO₂-SC puro.

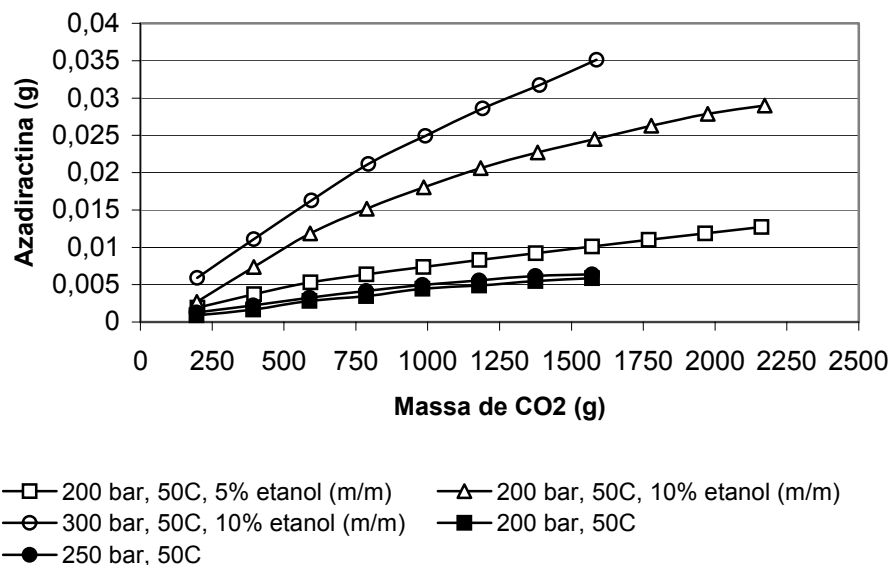


Figura IV.19: Curvas de extração de azadiractina com CO₂ puro e CO₂ + etanol, na pressão de 200 e 300 bar, a 50°C e 5 e 10% em etanol (m/m).

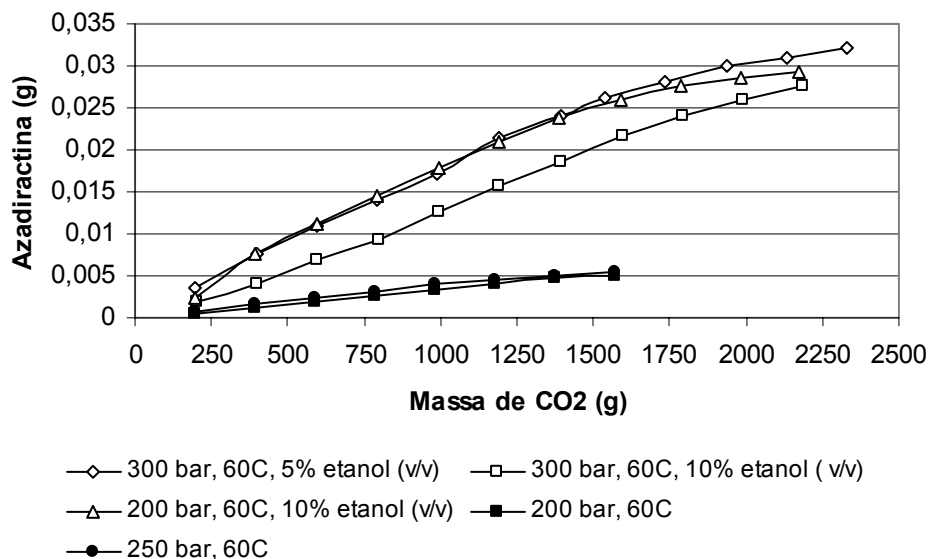


Figura IV.20: Curvas de extração da azadiractina, com CO₂ puro e CO₂ + etanol, nas pressões de 200 e 300 bar, 60°C e 5 e 10% em etanol (m/m).

Através dos resultados apresentados, pode-se concluir que maiores extrações da azadiractina ocorreram com a adição de co-solvente em comparação às extrações com CO₂-puro. Este comportamento também é observado por Johnson e Morgan (1997b), onde a maior extração da azadiractina foi obtida com 20% de etanol (m/m).

Comparando-se as extrações a 200 bar, observa-se que a 50°C, a extração com 5% de etanol foi 2 vezes melhor que sem etanol, e com 10% essa razão passa para 5 vezes. A 60°C, o uso de 10% em etanol também aumentou a quantidade extraída em 5 vezes.

As curvas de extração indicam que a concentração de etanol influi na quantidade de azadiractina extraída, mas de formas distintas: a 200 bar e 50°C um aumento de 5 vezes para 10% de etanol no CO₂ aumentou consideravelmente a massa extraída; a 300 bar e 60°C, porém o efeito é o inverso, um aumento de etanol promoveu uma diminuição da extração da azadiractina. Esta tendência também foi encontrada por Kopcak *et al.* (2004), na extração da cafeína de sementes moídas de guaraná.

A recuperação da azadiractina com CO₂ puro e com co-solvente estão apresentados na **Figura IV.21**. Confirma-se que as condições de extração com acréscimo de etanol resultaram em recuperação maior que as com CO₂ puro, pois com etanol atingiu-se níveis de valores em torno de 30%.

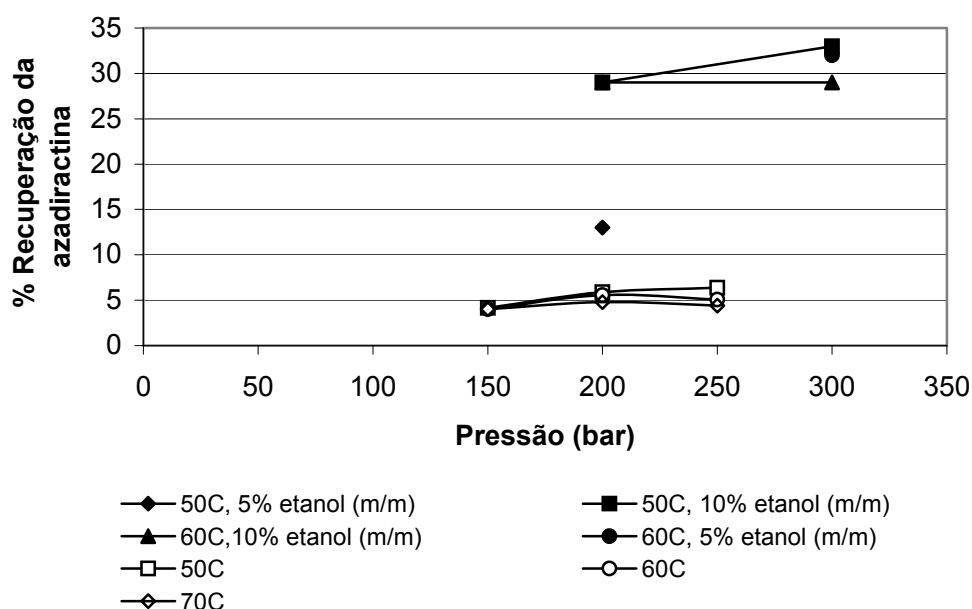


Figura IV.21: Recuperação da azadiractina das sementes de nim, com o uso de CO₂ puro e CO₂ + etanol.

IV.8. Extração fracionada dos compostos de sementes de nim

A extração fracionada do óleo e da azadiractina das sementes de nim foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no **Item III.9** em duas etapas: a primeira etapa,

privilegiou-se a extração do óleo usando pressão de 200 bar, 50°C e CO₂-SC puro e na segunda etapa processou-se uma maior extração da azadiractina com 200 bar, 50°C e CO₂-SC + 10% etanol (m/m).

Os valores do óleo estão apresentados na **Figura IV.22**, e observa-se uma maior extração na primeira etapa, com a passagem de 1900 g de CO₂ (recuperação do óleo em 87,52%). Na segunda etapa ocorreu extração complementar do óleo (recuperação do óleo em 26,72%) indicando um possível esgotamento do óleo no leito. Os resultados estão de acordo com os objetivos propostos para este ensaio, obtendo-se novamente uma recuperação acima de 100%, pois o óleo da 2^o etapa tinha uma qualidade inferior (presença de pigmentos).

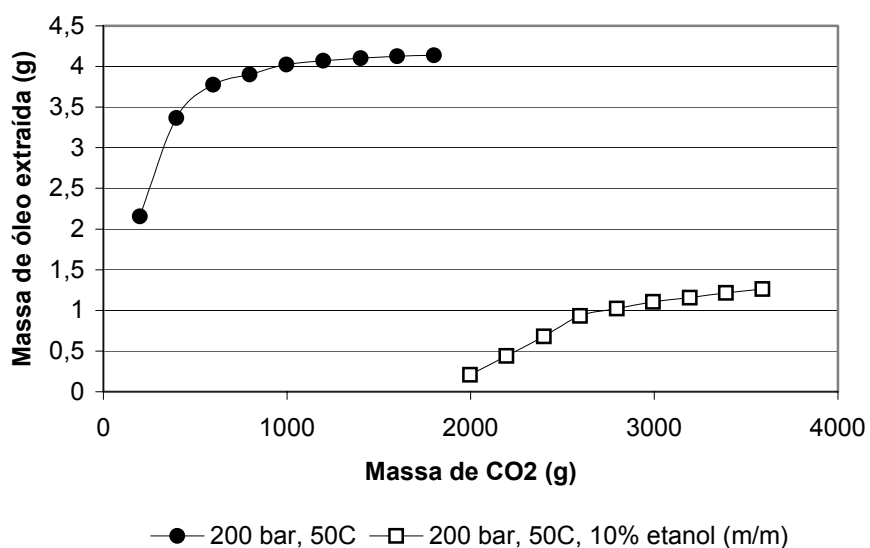


Figura IV.22: Extração do óleo de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO₂-SC puro (1^o etapa) e 200 bar, 50°C e CO₂-SC + 10% etanol (m/m) (2^o etapa).

Uma extração da azadiractina (**Figura IV.23**) também foi verificada nas duas etapas, porém inicialmente ocorreu uma estabilização da extração com CO₂-SC puro (recuperação inicial de 5,9% e concentração de azadiractina de 0,30% na fase oleosa) e na segunda etapa, com a adição de etanol, houve um aumento significativo da extração, melhorando a recuperação de azadiractina para 15% e concentração de azadiractina de 1,5% na fase oleosa.

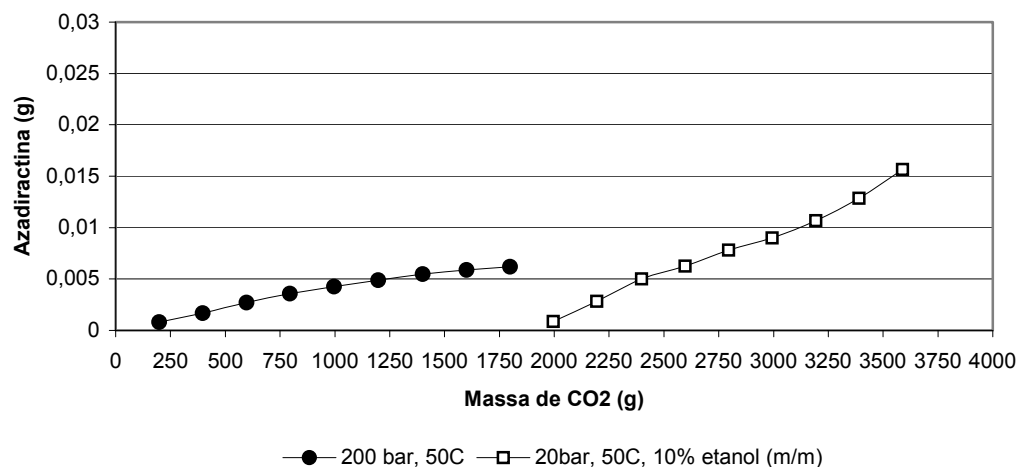


Figura IV.23: Extração de azadiractina de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO₂-SC puro (1ª etapa) e 200 bar, 50°C e CO₂-SC + 10% etanol (m/m) (2ª etapa).

A mesma tendência no aumento de extração do princípio ativo na segunda etapa de operação foi observada na extração fracionada de *Curcuma longa L.* por Braga (2005). Essa pesquisadora pré-definiu duas condições de operação para extrair a oleoresina, retirada separadamente do óleo volátil.

O formato da curva de extração do óleo na 1ª etapa (**Figura IV.22**) indica que após a passagem de 1000 g de CO₂, a recuperação de óleo é marginal. Desta maneira o processo poderia ser otimizado se a 2ª etapa (com CO₂+etanol) fosse iniciada a partir de 1000 g, pois uma maior quantidade de azadiractina seria recolhida nesta etapa. Outras condições de temperatura e pressão tanto no 1º como no 2º estágio poderiam ser avaliados para aumentar a seletividade da azadiractina.

A partir da análise da primeira extração fracionada, uma segunda curva fracionada foi realizada, seguindo os mesmos procedimentos. A **Figura IV.24** apresenta a extração de óleo, com a 1ª etapa interrompida em 1000 L de CO₂ (recuperação do óleo em 82,40%). Na segunda etapa, com etanol ocorreu novamente uma extração complementar do óleo (recuperação do óleo em 13,51%).

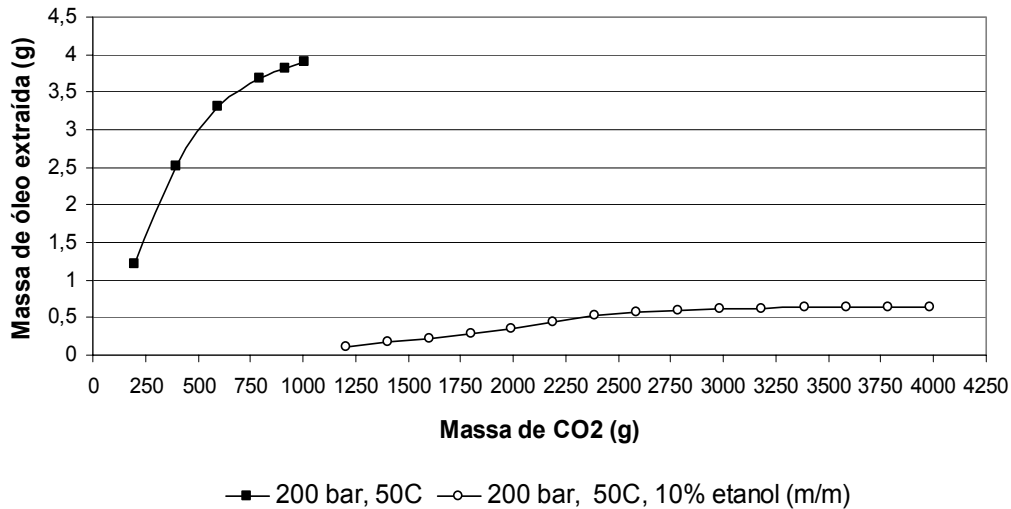


Figura IV.24: Segunda curva fracionada. Extração do óleo de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO₂-SC puro (1^o etapa) e 200 bar, 50°C e CO₂-SC + 10% etanol (m/m) (2^o etapa).

A extração da azadiractina da segunda curva fracionada (**Figura IV.25**) foi conduzida também em duas etapas. Inicialmente a extração da azadiractina não apresentou estabilização com CO₂-SC puro (900 L), com recuperação inicial de 7,67% e concentração de azadiractina de 0,20% na fase oleosa. Na segunda etapa (CO₂+ etanol) etanol, houve um aumento significativo da extração, melhorando a recuperação de azadiractina para 16,19% e concentração de azadiractina de 2,69% na fase oleosa.

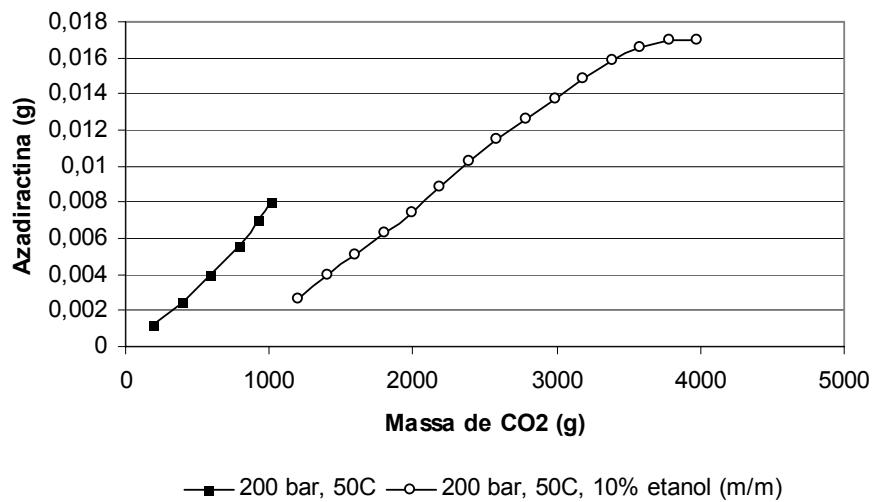


Figura IV.25: Segunda curva fracionada. Extração de azadiractina de sementes de nim em duas etapas: 200 bar, 50°C e CO₂-SC puro (1^o etapa) e 200 bar, 50°C e CO₂-SC + 10% etanol (m/m) (2^o etapa).

IV.9. Inativação de fungos com FSC

IV.9.1. Contaminação inicial das sementes de nim

Conforme descrito no **Item III.11.1**, a contaminação inicial das sementes foi avaliada por dois métodos distintos: Plaqueamento direto com desinfecção externa e sem desinfecção para sementes inteiras e através do método de diluição para as sementes moídas de nim.

IV.9.1.1. Plaqueamento direto com e sem desinfecção das sementes inteiras

O crescimento dos fungos observado nas placas após a incubação indicou considerável contaminação das sementes inteiras (com e sem desinfecção). A **Figura IV.26** apresenta a fotografia de uma placa em meio de cultura DG18, obtida com desinfecção externa das sementes e a **Figura IV.27**, sem desinfecção.



Figura IV.26: Fotografia de placa contendo colônias de *Aspergillus eurotium*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (plaqueamento direto com desinfecção, meio DG18).



Figura IV.27: Fotografia de placa contendo colônias de fungos diversos (plaqueamento direto sem desinfecção das sementes, meio DG18).

A **Tabela IV.8** apresenta a contaminação inicial das sementes encontrada nas triplicatas de amostras analisadas com desinfecção externa das sementes. Em média obteve-se 58% de contaminação dos grãos. No plaqueamento direto sem desinfecção, a contaminação inicial atingiu 100% dos grãos. Os fungos encontrados estão listados na **Tabela IV.9**.

Tabela IV.8: Contaminação inicial das sementes inteiras de nim por fungos (plaqueamento direto com desinfecção).

Fungo	Contagem nas repetições		
	1	2	3
<i>Aspergillus Níger</i>	9	1	7
<i>Aspergillus eurotium</i>	27	23	24
<i>Aspergillus flavus</i>	1	---	---
<i>Aspergillus carbonarius</i>	1	---	1
<i>Aspergillus tamarii</i>	---	---	1
Contaminação por fungos em geral	Média: 58%		

Tabela IV.9: Contaminação inicial das sementes inteiras de nim, por fungos (plaqueamento direto sem desinfecção).

Fungo	Contagem
<i>Aspergillus Níger</i>	40
<i>Gênero eurotium</i>	50
<i>Aspergillus flavus</i>	3
Fungo não identificado	32
Contaminação por fungos em geral	100%

IV.9.1.2. Isolamento de fungos para identificação e verificação da produção de toxinas

Foram isolados 21 fungos dos ensaios em plaqueamento direto com desinfecção e 51 fungos dos ensaios sem desinfecção para a identificação e a avaliação de uma possível produção de toxina pelas cepas. As etapas realizadas nestes procedimentos estão descritas no **Item III.11.2** e na **Figura III.4**.

Nos dois métodos de plaqueamento direto da semente foi constatada a presença de um fungo de coloração marrom e branco pertencente ao grupo *nigri*, não identificável pelas técnicas de CYA e nem com o preparo de lâminas e observação ao microscópio. Como referência neste trabalho, a denominação deste fungo será *Aspergillus x*.

IV.9.1.3. Produção de toxinas

Os fungos isolados acima foram testados quanto à produção de toxinas, através da técnica de CCD (Cromatografia em Camada Delgada, **Apêndice C**) e os resultados estão apresentados na **Tabela IV.10**.

Todos os fungos, exceto o *Aspergillus flavus* mostraram-se produtores de ocratoxinas. O *Aspergillus flavus* produziu aflatoxinas B1 e B2. Nas sementes sem desinfecção, nenhum dos fungos mostrou-se produtor de toxinas.

Tabela IV.10: Fungos produtores de toxinas (plaqueamento com desinfecção).

Nomenclatura	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	B1 e B2 – Aflatoxina
<i>Aspergillus niger</i>	Ocratoxina
<i>Aspergillus niger</i>	Ocratoxina
<i>Aspergillus x</i>	Ocratoxina
<i>Aspergillus niger</i>	Ocratoxina
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina

IV.9.1.4. Sementes moídas

O método de diluição das sementes moídas foi aplicado de acordo com os procedimentos descritos no **Item III.10.3**.

O meio de cultura utilizado nestes ensaios, MEA, é indicado para amostras que se desenvolvem em baixa atividade de água e como consequência somente os fungos que possuem esta característica se desenvolveram, como, por exemplo, o *Aspergillus eurotium*. A presença deste fungo se sobressaiu em todos os ensaios, tanto no método de plaqueamento direto com e sem desinfecção, quanto na diluição das sementes moídas de nim.

A recomendação para a contagem de fungos e bolores explicita ser preciso contabilizar placas contendo de 15-150 colônias. Observando as placas da **Figura IV.28**, verifica-se que a diluição (-2) deve ser a escolhida para a avaliação do nível de contaminação. Os valores encontrados em unidades formadoras de colônias por grama de semente (UFC/g), estão lançados na **Tabela IV.11** e confirmam uma alta contaminação das sementes.

Tabela IV.11: Colônias de *Aspergillus eurotium* em sementes moídas de nim referentes a diluição (-2).

Repetições	1	2	3
UFC/g	$3,9 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
Média: $3,66 \times 10^4$ (UFC/g)			

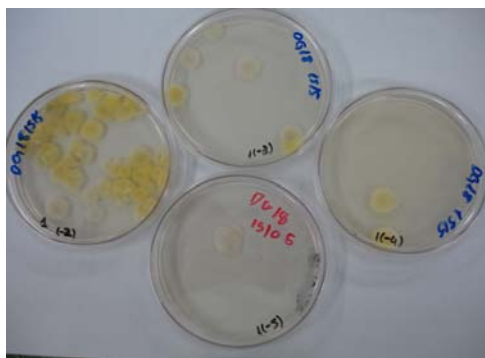


Figura IV.28: Diluição (-2), (-3), (-4) e (-5) aplicada a sementes moídas de nim. Fungo *Aspergillus eurotium*.

A necessidade de promover uma contaminação artificial das amostras para facilitar o monitoramento das inativações por FSC foi descartada devido à alta contaminação constatada nas sementes de nim.

IV.9.2. Ensaio de inativação por FSC

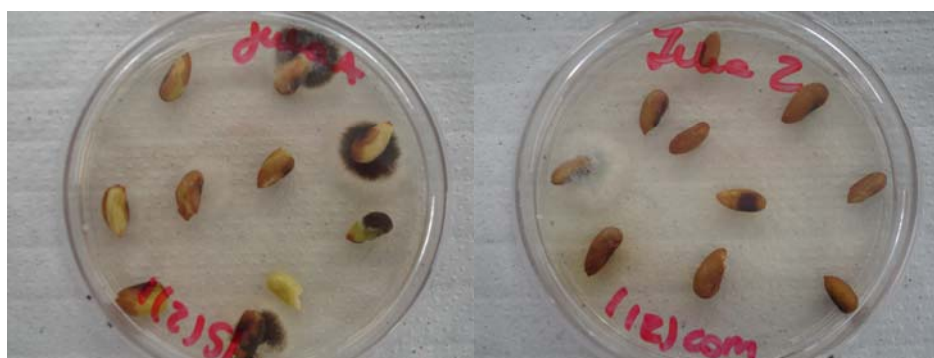
Os ensaios de inativação dos fungos presentes nas sementes de nim seguiram os procedimentos descritos no **Item III.10.4**. A pressão máxima de 200 bar foi utilizada com ciclos de pressurização e despressurização ($\Delta P=100$ bar, 7 ciclos) e temperaturas de 40 e 60°C, em um total de em 60 minutos de operação. O equipamento descrito no **Item III.5 (Figura III.1)** foi utilizado.

Após a inativação, as amostras contidas no extrator foram colocadas em sacos plásticos estéreis, tomando-se a precaução de retirar todo o ar presente no interior da embalagem. Os sacos plásticos foram deixados em geladeira até a realização das análises microbiológicas no ITAL. O óleo extraído ao longo da inativação não foi analisado, pois se priorizou o produto principal, que neste caso era a semente.

IV.9.2.1. Análise microbiológica

As análises microbiológicas realizadas nas amostras que sofreram inativação por FSC seguiram os mesmos procedimentos descritos no **Item III.10.1**, isto é uma avaliação da contaminação por fungos através do plaqueamento direto, com e sem desinfecção das sementes inteiras e o método de diluição para as sementes moídas. Todos os fungos encontrados já eram conhecidos, não sendo necessário proceder a uma nova identificação.

Nas placas obtidas por plaqueamento direto (com e sem desinfecção), somente foi constatada a presença dos fungos *Aspergillus eurotium* e *Aspergillus niger* (**Figura IV.29**). Pelo método de diluição, somente foi encontrado o fungo *A. eurotium*, porém em colônias menores e mais debilitadas (**Figura IV.30**).



(a)

(b)

Figura IV.29: Fotografia das placas após a inativação por FSC (Plaqueamento direto). a: sem desinfecção e b: com desinfecção das sementes inteiras.

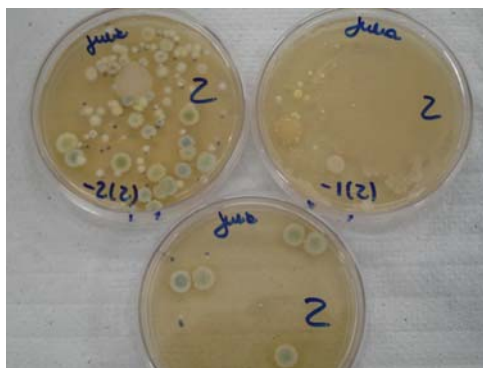


Figura IV.30: Fotografia de placas após as inativação por FSC de sementes moídas método da diluição, sementes moídas, 40°C (método da diluição).

A contagem obtida no plaqueamento está apresentada na **Tabela IV.12**. Observa-se que no plaqueamento sem desinfecção das sementes houve uma diminuição na contaminação por fungos em 80,0% (40°C) e de 74,4% (60°C), em comparação à contaminação inicial da semente, assumida 100 %. No plaqueamento com desinfecção, houve uma diminuição na contaminação por fungos em 46,7% (40°C) e 54,5% (60°C), comparando-se estes valores aos da contaminação inicial das sementes de 58%. Os ensaios de inativação realizados à 40°C alcançaram uma maior redução de fungos, devido a maior densidade do CO₂, nesta condição, possibilitando ao solvente um maior poder de solubilização e assim uma maior penetração nas células dos fungos, podendo ter causado a inativação através deste mecanismo.

Tabela IV.12: Contaminação das sementes após inativação por FSC em 200 bar (ΔP 100 bar), nas temperaturas de 40 e 60°C (plaqueamento direto), valores em % de contaminação geral por fungos.

Plaqueamento direto	40°C (%) *	60°C (%) *
Sementes inteiras		
Sem desinfecção	20,02	25,63
Com desinfecção	11,25	3,51

* média das triplicatas

Nos dois métodos aplicados às sementes inteiras, verificou-se redução apreciável da infestação de fungos, indicando que a técnica de FSC é eficiente na inativação das sementes de nim. Uma validação estatística baseada em um planejamento experimental completo poderá indicar as condições ótimas de processo, mas em princípio, a temperatura mostrou ter um efeito muito pequeno.

Os autores Calvo *et al.* (2007) não conseguiram resultados eficientes na inativação dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceous* existentes na manteiga de cacau com FSC, tendo utilizado pressões e temperaturas maiores das que foram utilizadas neste trabalho. Esses autores constataram que altas pressões aumentam a extração dos subprodutos, porém não conseguiram uma eficiente inativação dos microorganismos.

O nível de contaminação pelo fungo *Aspergillus eurotium* utilizando o método de diluição está apresentado na **Tabela IV.13**. Não foi observado redução dos fungos nas operações com FSC a temperatura de 40°C, ocorrendo, inclusive, um aumento na contaminação em comparação ao valor inicial ($3,66 \times 10^4$ UFC/g). Este fato pode ser explicado por procedimentos incorretos na coleta do material processado, promovendo a recontaminação do material, devido a maiores dificuldades de manuseio das partículas moídas na alimentação e retirada do extrator. A alta contaminação inicial por *Aspergillus eurotium* nas amostras pode também ter favorecido a esporulação, aumentando o crescimento deste fungo no material até o momento da realização dos ensaios de inativação ou no intervalo de tempo para as análises no ITAL. Uma complementação destes ensaios deveria considerar um aumento nos ciclos de pressurização e despressurização, pois este

parâmetro pode vir a ter influência na inativação como reportado pelos autores Spilimbergo *et al.* (2002).

Tabela IV.13: Concentração de *Aspergillus eurotium* em sementes moídas, inativadas a 200 bar (ΔP 100 bar), nas temperaturas de 40 e 60°C (método de diluição).

Tratamento	40°C	60°C
UFC/g	6,98 x10 ⁴	8,2 x10 ³

média das triplicatas

Nos ensaios a 60°C, verificou-se uma diminuição de 22% da concentração de fungos em comparação à contaminação inicial das sementes moídas. Esta diminuição pode ser atribuída á inativação dos fungos, devido a maior temperatura de exposição, mas serão necessários mais ensaios para sua confirmação.

Esses resultados preliminares obtidos, sobretudo com as sementes inteiras, indicam que essa técnica é promissora para o desenvolvimento de uma tecnologia não térmica de inativação de fungos que é quimicamente não agressiva e que usa pressões que podem ser consideradas moderadas em comparação á inativação que usa altas pressões (HPT).

Capítulo V

CONCLUSÕES

Esta pesquisa demonstrou ser factível a extração de azadiractina e a inativação de fungos em sementes de nim, usando a tecnologia de fluidos supercríticos. Abaixo estão relacionadas algumas conclusões que deverão servir de subsídios para a otimização desses processos.

Com relação à extração:

1. A extração da azadiractina e do óleo contido no nim é mais afetada pela pressão do que pela temperatura do processo.
2. Altas pressões e baixas temperaturas favoreceram a extração tanto da azadiractina como do óleo de nim.
3. A solubilidade do óleo em CO₂-SC é muito maior do que a solubilidade da azadiractina.
4. Nos ensaios com CO₂ puro, o óleo e a azadiractina são extraídos ao mesmo tempo. Como a solubilidade do óleo é alta, ele é esgotado antes. A baixa solubilidade da azadiractina torna o processo de extração muito lento e dispendioso, pois mesmo na melhor condição utilizada (250 bar, 50°C, 1,6 kg CO₂/10g de semente) não se alcançou o patamar de estabilização de extração.
5. O uso do etanol como co-solvente intensifica a extração tanto da azadiractina como do óleo, mas também extrai outros componentes (como pigmentos e fosfolípidos) que contaminam o extrato.
6. O uso de etanol, como co-solvente aumenta significativamente os níveis de extração de azadiractina e as curvas de extração apresentam uma tendência a uma estabilização após a passagem de 2,2 kg CO₂/10g de sementes.

7. O etanol como co-solvente, a 5 ou 10%, uniformiza o processo de extração de óleo. As curvas de extração a 200 ou 300 bar e 50 ou 60°C tendem a coincidir e o esgotamento do óleo já ocorre com 0,75 kg CO₂/10g de sementes.
8. Um processo de extração em duas etapas, a primeira com CO₂ puro para extrair preferencialmente o óleo, seguido de uma extração com CO₂+ etanol para extrair preferivelmente a azadiractina produz um extrato rico em azadiractina.

Com relação à inativação de fungos:

9. A inativação de fungos por Fluidos Supercríticos mostrou resultados preliminares eficientes na redução da contaminação por *Aspergillus*, sobretudo de sementes inteiras de nim.
10. Na inativação de fungos, a temperatura de 40°C mostrou ser mais eficiente do que 60°C.

Recomendações para trabalhos futuros

Essa pesquisa não conseguiu uma separação adequada de azadiractina do óleo de nim e sua purificação, um dos objetivos deste trabalho. Esforços futuros nesse sentido deverão contemplar os seguintes aspectos:

Com relação à extração:

1. Ensaios mais abrangentes de extração da azadiractina e do óleo de nim na tentativa de encontrar a pressão de cruzamento e o comportamento retrógrado, necessários para otimizar o processo.
2. Re-processamento do óleo rico em azadiractina obtido na primeira extração.
3. Modelagem matemática, abordando o modelo de Sovová (1994) para a solubilidade do óleo de nim.

Com relação à inativação de fungos:

4. Avaliação de novas condições de temperatura e pressão para aumentar a eficiência da inativação dos fungos encontrados nas sementes de nim.
5. Avaliação do uso de co-solventes (água, etanol, metanol, por exemplo) e mesmo alguns componentes com conhecida atividade anti-micótica (como a natamicina), na eficiência de inativação de fungos.

Capítulo VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSINO, P., FRESA, R., FOGLIANO, V., MONTI, S.M., RITIENI, A. Extraction of Azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *J. Agric. Food Chem.*, v.47 (12), p. 5252-5256, 1999.

AQUINO, F. R. N., NUNES, D. S. S. *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Editora Interciência, 2003.

AOCS, *Official Methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society*, Champagain, II, USA, 1993.

AOCS, *Official Methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society*. 16^o Edição, Washington USA, 1997.

AZEVEDO, ÁLVARO BANDEIRA AZEVEDO. *Extração e fracionamento de gordura de Cupuaçu (Theobroma grandiflorum) com fluidos supercríticos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, Brasil, 2001.

AZEVEDO, ÁLVARO BANDEIRA AZEVEDO. *Extração e recuperação dos princípios ativos do café utilizando fluidos supercríticos*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, Brasil, 2005.

BARREK, S., PAISSE, O., GRENIER-LOUSTALOT, M. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin a controlled environment. *Anal Bional Chem.*, v. 378, p. 753-763, 2004.

BERTUCCO, A., VETTER, G. *High pressures process technology: Fundamentals and applications*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., p.659, 2001.

BAPTISTA, A.S., HORRI, J., BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados á produção de micotoxinas. *B. CEPPA*, Curitiba, v. 22(1), p.1-14, 2004.

BOSS, EDINARA ADELAIDE. *Análise do desempenho de plantas de extração de óleos convencionais e de processos supercríticos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, Brasil, 2000.

BJÖRKLUND, E, JÄREMO, M., MATHIASON, L., JÖNSSON, J.A, KARLSSON, L. Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction. *Analytica Chimica Acta*, v.368, p.117-128, 1998.

BRAGA, MARA ELGA MEDEIROS. *Obtenção de compostos bioativos de Curcuma longa L. e Lippia alba M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento de resíduo amiláceo*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2005.

BRECHELT, A. O manejo ecológico de pragas e doenças. *Rede de Ação em Praguicidas e suas alternativas para a América Latina (RAP-AL)*, p. 1-33, 2004.

BRUNNER, G. *Gas extraction. An Introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*. Editora Steinkopff Darmstadt Springer, New York, 1994.

BUTTERWORTH, J. H., MORGAN, E. D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. Chem. Soc. Comm.*, p.23-24, 1968.

BUTTERWORTH, J. H., MORGAN, E. D. Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. *J. Insect Physiol*, v.17, p. 969-977, 1972.

CABONI, P., CABRAS, M., ANGIONI, A., RUSSO, M., CABRAS, P. Persistence of azadirachtin residues on olive after field treatment. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 3491-3494, 2002.

CALVO, L., MUGUERZA, B., CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high-pressure CO₂. *J. of Supercritical Fluids*, v. 42, p. 80-87, 2007.

CARRILHO, E., TAVARES, M. C. H., LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica I. Cromatografia com fluidos supercríticos: conceitos termodinâmicos. *Química Nova*, v.24 (4), p. 509-515, 2001.

CAVALCANTI, VANESSA MENDES SANTOS. *Extração de espilantol de Spilanthes acmella var oleraceae com dióxido de carbono supercrítico*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2008.

CINQUEMANI, C., BOYLE, C., BACH, R., SCHOLLMAYER, E. Inactivation of microbes using compressed carbon dioxide- An environmentally sound disinfection process for medical fabrics. *J. of Supercritical Fluids*, v. 42, p. 392-397, 2007.

COCERO, M.J., CALVO, L. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. *J. American Oil Chemistry Society*, v. 73, p. 1573-1578, 1996.

DEOTA, P.T., UPADHYAY, P. R., PATEL, K. B., MEHTA, K. J., KAMATH, B. V., MEHTA, M.H. Estimation and isolation of azadirachtin-a from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernels using high performance liquid chromatography. *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 23 (14), p. 2225 – 2235, 2000.

DILLOW, A.K., DEHGHANI, F., HRKACH, J.S., FOSTER, N.R., LANGER, R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Prod. Natl. Acad. Science*, v.96, p. 10344- 10348, 1999.

DOBBS, J.M, WONG, J.M, JOHNSTON, K.P. Nonpolar co-solvents for solubility enhancement in supercritical fluids. *J. Chem. Eng. Data*, v.31, p. 303-308, 1986.

DOWNES, F. P., ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, *American Public Health Association*, Washington, 4^o ed, 2001.

DRUMMOND, A. R.F., GAZINEU, M. H. P., ALMEIDA, L., SILVA, R.C.L., SOUTO MAIOR, A. *Desenvolvimento de aparelho para extração de óleo de alta viscosidade*. Acessado em 11 de abril de 2008. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/16.pdf>>.2007.

EGGERS, R., SIEVERS, U. Processing of oilseed with supercritical carbon dioxide. *J. of chemical Engineering of Japan*, v.22 (6), p. 641, 1989.

EHLERS, D., CZECH, E., QUIRIN, K., WEBER, R. Distribution of aflatoxins between extract and extraction residue of paprika using supercritical carbon dioxide. *Phytochemical Analysis*, v.17, p.114-120, 2006.

FILTENBORG, O., FRISVALD, J. C., SVENDENSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p. 581–585, 1983.

FLORES, A. V., RIBEIRO, J. N., NEVES A. A., QUEIROZ E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambient Soc.* v.7 (2), p.111-124, 2004.

FOSTER, A., SPILIMBERGO, S., DEGHANI, F., BERTUCCO, N. R. Inactivation of bacteria and spores by pulsed electric field and high pressure CO₂ at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, v.82 (1), p. 118-125, 2003.

FRIEDRICH, J. P., LIST, G. R. Characterization of soybean oil extraction by supercritical carbon dioxide and hexane. *J. Agric. Food Chem.*, v.30, p. 192-193, 1982.

GÓMEZ, A. M., LÓPEZ, C. P., DE LA OSSA, E. M. Recovery of grape oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal*, v.61, p. 227-231, 1996.

GURDIAL, G. S., MACNAUGHTON, S. J., TOMASKO, D. L., FOSTER, N. R. Influence of chemical modifiers on the solubility of o- and m-hydroxybenzoic acid in supercritical CO₂. *Ind. Chem. Eng. Res.*, v.32, p.1482, 1993.

HAMBURGUER, M., BAUMANN, D., ADLER, S. Supercritical carbon dioxide extraction of select medicinal plants- Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, v.15, p. 46-54, 2004.

HONG, S. -I., PYUN, Y. -R. Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high-pressure carbon dioxide. *J. of Food Science*, v.64 (4), p. 728-733, 1999.

JARVIS A. P., MORGAN, E.D. Isolation of plant products by supercritical-fluid extraction. *Phytochemical Analysis*, v.8, p. 217-222, 1997.

JOHNSON, S., MORGAN, E. D. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J. of Chromatography A.*, v.761 (1-2), p. 53-63, 1997a.

JOHNSON, S., MORGAN, E. D. Supercritical fluid extraction of oil and triterpenoid from neem seeds. *Phytochemical Analysis*, v.8, p. 228-232, 1997b.

KAUSHIK, N. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Anal Bioanal Chem.*, p.1199-1204, 2002.

KE, J., CAN, M., MINGHONG, Z., BUXING, H., HAIKE, Y. Solubilities of salicylic acid in supercritical carbon dioxide with ethanol co-solvent. *J. of Supercritical Fluids*, v. 9, p.82-87, 1996.

KILCH, M. A. Pathogen profile: *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, v. 8 (6), p. 713-722, 2007.

KLICH, M. A., PITT, J. I. *A laboratory guide to common Aspergillus species and their Teleomorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Science and Technology, North Ryde, New South Wales, Australia, p.116, 1988.

KOPCAK, UIRAM. *Extração de cafeína das sementes da planta do guaraná (Paullinia cupana) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, Brasil, 2003.

KOPCAK, U, AZEVEDO, A.B.A., MOHAMED, R.S. Extraction of caffeine from guaraná (paullinia cupana) seeds using supercritical mixed solvents. *Trabalho publicado nos anais de V EBFS*, Florianópolis, 2004.

KUMAR, J., PARMAR, B. Physicochemical and chemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* F. *J. Agric. Food Chem.*, v.44, p. 2137-2143, 1996.

LANG, Q., WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. *Talanta*, v.53 (4), p.771-782, 2001.

LEY, S. V., DENHOLM, A. A., WOOD, A. The chemistry of azadirachtin. *Natural Product Reports*, p. 109-156, 1993.

LIST, G. R., KING, J. W., JOHNSON, J. H., WARNER, K., MOUNTS, T. L. Supercritical CO₂ degumming and physical refining of soybean oil. *J. of the American Oil Chemists' Society*, v.70 (5), p.473-476, 1993.

MARRONE, C., POLETTO, M., REVERCHON, E. Almond oil extraction by supercritical CO₂: experiments and modelling. *Chemical Engineering Science*, v.53 (21), p. 3711-3718, 1998.

MARTINEZ, S.S. *O Nim - Azadirachta indica - Natureza, usos múltiplos, produção*. Londrina, IAPAR, p. 142, 2002.

McHUGH, M.A., KRUKONIS, V. J. *Supercritical fluid extraction: Principles and practice*. Butterworths Publishers; Boston; MA; 1994.

MENEZES, E.L.A. *Inseticidas Botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola*. EMBRAPA, Documentos 205, ISSN 1517-8498, p. 36-43, 2005.

MORAES, A.R.A., MAY, A., LOURENÇÃO, A. L., PINHEIRO, M. Q. *NIM (Azadirachta indica A. Juss)*. Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo, Campinas Disponível em:< <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Nim/nim.htm>>. Acessado em 28 de maio de 2008.

MORETTO, E., FETT, R. *Tecnologia de óleos de gorduras vegetais na indústria de alimentos*. Livraria Varela, p. 39-45, 55-70, 1998.

MOSSINI, S.A.G., KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica A. Juss*): Múltiplos usos. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 24(1), p. 139-148, 2005.

MÜLLER N. X. F., FASSA A. G., AUGUSTO L. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência Saúde Coletiva*, v.12 (1), Rio de Janeiro, 2007.

NEVES, GUILHERME BRIGIDO METELLO. *Remoção do colesterol e fracionamento do óleo da manteiga com dióxido de carbono supercrítico*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, Brasil, 1996.

NEVES, B. P., OLIVEIRA, I. P., NOGUEIRA, J. C. M. *Cultivo e utilização do nim indiano*. Circular Técnica da Embrapa, 2003.

ÖZKAL, S.G., YENER, M.E, BYNDIRLI, L. The solubility of apricot kernel oil in supercritical carbon dioxide. *International J. of Food Science e Technology*, v.41, p. 399-404, 2006.

PITT, J. L., HOCKING, A. D. *Fungi and Food spoilage*. Editora An Aspen, 6^o Edição, 1999.

PAPA, DANIELA CRISTINA PANSANI. *Fracionamento do óleo de palma com dióxido de carbono supercrítico*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. of Supercritical Fluids*, v. 10, p. 1-37, 1997.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. of Supercritical Fluids*, v.38, p. 146-166, 2006.

ROMERO, LUIS ALBERTO FOLLEGATTI. *Extração de óleo de Sacha inchi (Plukentia volubilis L.) CO₂-SC*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2007.

ROY, B. C., GOTO, M., HIROSE, T. Temperature and pressure effects on supercritical CO₂ extraction of tomato seed oil. *International J. of Food Science and Technology*, v.31, p. 137-141, 1996.

SALDAÑA, M.D.A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R.S. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. *J. of Agric. and Food Chemistry*, v.47 (9), p.3804-3808, 1999.

SANCHES, S. M., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, S. X., VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p.53-58, 2003.

SANTOS, REGINA MARIA GERIS. *Metabolismo secundário dos Fungos Penicillium sp e Fusarium moniliforme isolados como endófitos de Melia azederach (MELIACEAE)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2003.

SARTORI, DANIELE. *Marcadores moleculares para detecção de espécies de Aspergillus produtores de ocratoxina A em grãos de café*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2005.

SCHAAF, O., JARVIS, A. P., VAN DER ESCH, S.A., GIAGNACOVO, G., OLDHAM N. J.; Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, v. 886 (1-2), p. 89-97, 2000.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol*, v. 35, p. 271-297, 1990.

SCHMUTTERER, H. *The Neem Tree, source of unique products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. Cambridge; Tóquio, New York, Basel, VCH, Cambridge, 1995.

SIDHU, O.P., KUMAR, V., BEHL, H.M. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* v.51, p. 910-915, 2003.

SOARES, B.M.C., GAMARRA, F.M.C., PAVIANI, L.C., GONÇALVES, L.A.G.; CABRAL, F.A. Solubility of triacylglycerols in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*, 2007.

SOVOVÁ, H.R., KUCERA, J., JEZ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-II. Extraction of grape oil. *Chemical Eng. Science*, v. 49 (3), p.415-420, 1994.

SPIILIMBERGO, S., ELVASSORE, N., BERTUCCO, A., Microbial inactivation by high-pressure. *J. of Supercritical Fluids*, v. 22, p.55–63, 2002.

THEJAVATHI, R., YAKKUNDI, S.R., RAVINDRANATH, B. Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *J. of Chromatography A.*, v. 705 (2), p. 374-379, 1995.

TING, S.S.T., MACNAUGHTON, S.J., TOMASKO, D.L., FOSTER, N.R. Solubility of naproxen in supercritical carbon dioxide with and without co-solvents. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.32, p.1471-1481, 1993.

TONTHUBTHIMTHONG, P., CHUAPRASERT, S., DOUGLAS, P. Supercritical CO₂ extraction of nimbin from neem seeds – an experimental study. *J. of Food Eng.*, v.47, p. 289-93, 2001.

TONTHUBTHIMTHONG, P., DOUGLAS, P.L., DOUGLAS, S., LUEWISUTTHICHAT, W., TEPPAITOON, W., PENG SOPA, L.E. Extraction of nimbin from neem seeds using supercritical CO₂ and a supercritical CO₂–methanol mixture. *J. of Supercritical Fluids*, v.30 (3), p. 287-301, 2004.

VASAPOLLO, G., LONGO, L., RESCIO, L., CIURLIA, L. Inovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *J. of Supercritical Fluids*, v. 29, p. 87-96, 2004.

VIEGAS, C.J. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v.26 (3), p. 390-400, 2003.

VEITCH, G.E., PINTO, A., BOYER, A., BECKMANN, E., ANDERSON, J., LEY, S.V. Synthesis of natural products from the Indian neem tree *Azadirachta indica*. *Organic Letters*, v. 10(4), p.569-572, 2008.

YU, J., DANDEKAR, D. V., TOLEDO, R. T., SINGH, R. K., PATIL, B. S. Supercritical fluid extraction of limonoids and narigin from grapefruit (*Citrus paradisi Macf.*) seeds. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1026-1031, 2007.

WANG, L., WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science e Technology*, v. 17, p. 300-312, 2006.

WESTERMAN, D., SANTOS, R.C.D., BOSLEY, J.A., ROGERS, J.S., AL-DURI, B. Extraction of Amaranth seed oil by supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 38–52, 2006.

WHITE, A., BURNS, D., CHRISTENSEN, T. W. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J. of Biotechnology*, v. 123, p. 504-515, 2006.

Apêndice A

Óleo de nim

A.1. Metodologia de caracterização do óleo de nim

As análises para a caracterização do óleo de nim foram realizadas no Laboratório de Óleos e Gorduras-Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/ UNICAMP. Foram caracterizados os óleos obtidos por três diferentes processos de extração, prensa, FSC e Soxhlet. Os seguintes parâmetros de caracterização foram considerados:

- **Índice de refração:** Realizado em refratômetro da marca Milton Roy Company com a temperatura controlada por banho termostático a 20°C.
- **Cor:** A coloração do óleo foi medida em escala de cor Lovibond (Lovibons Tintometer model E), em célula de 1 polegada.
- **Índice de Saponificação:** Para esta determinação utilizou-se o método recomendado pela Cd 3a-94 (AOCS, 1997). O índice de saponificação indica o peso molecular médio dos ácidos graxos contidos na amostra. É definido como a quantidade de base (KOH) necessária para saponificar (hidrólise e esterificação) 1,0 g de óleo.
- **Índice de Iodo:** Estes ensaios foram realizados de acordo com o método Cd-1c-85 (AOCS, 1997). O Índice de Iodo é uma medida do grau da insaturação dos lipídeos, expressa em números de gramas de iodo absorvidos por 100,0 g de óleo.
- **Índice de Acidez:** Utilizou-se o método Cd 3d-63 (AOCS, 1993). O Índice de Acidez é definido com o número de mg de NaOH necessários para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1,0 g de óleo ou gordura. A presença de ácidos graxos livres ou índice de acidez representa a extensão da hidrólise, química, física ou enzimática dos glicérides.
- **Índice de Peróxido:** Esta análise seguiu o método Cd 8b-90(1) (AOCS, 1997). Este índice indica o estado de oxidação dos lipídeos, sendo um fator muito importante para definir a deterioração do óleo, principalmente pela presença de compostos de baixa massa molecular provenientes da degradação como, por exemplo, aldeídos,

cetonas, álcoois e hidrocarbonetos que são responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos (Moretto e Fett, 1998).

- **Composição do óleo em ácidos graxos:**

As amostras contendo ácidos graxos foram transformadas em ésteres metílicos através do método Ce 2-66 (AOCS, 1997). Pesou-se aproximadamente 50 mg de amostra em tubo de ensaio com tampa, juntamente com 4 mL de reagente de saponificação. A mistura foi agitada e aquecida por 5 minutos em banho-maria. A solução foi resfriada e em seguida adicionou-se 5 mL de BF_3 , e o material foi agitado e aquecido. Após o resfriamento adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaCl e 5 mL de éter de petróleo e novamente a mistura foi agitada. O material foi deixado em repouso para ocorrer a separação das fases. A fase superior contendo os ésteres metílicos foi injetada no cromatógrafo gasoso.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso Capilar-CGC Agilent 6850 Series GC System, com coluna capilar DB-23 Agilent (50 % cianopropil) – methylpolisiloxano, com dimensões de 60 m e diâmetro interno de 0,25 mm, possuindo 0,25 μm de filme. Utilizou-se como gás de arraste o hélio e um volume de amostras injetado de 1,0 μL . Condições de operação: Fluxo na coluna de 1,00 ml/min; velocidade linear 24 cm/seg, temperatura do detector: 280°C, temperatura do injetor: 250°C, Temperatura do forno: 110°C por 5 minutos, 110-215°C (5°C/min), 215°C-24 minutos.

A.2. Caracterização do óleo bruto de nim

O óleo de nim utilizado nos ensaios de solubilidade do óleo foi caracterizado no Laboratório de Óleos de Gorduras-FEA/UNICAMP e suas propriedades físico-químicas estão apresentadas na **Tabela A1** em comparação as análises realizadas por Kumar e Parmar (1996).

Os valores encontrados das diferentes propriedades do óleo estão dentro das faixas encontradas por Kumar e Parmar (1996).

Tabela A.1: Caracterização físico-química do óleo bruto de nim.

Características	Óleo bruto	Kumar e Parmar (1996)
Cor Lovibond	70 Y, 4,5 R	Amarelo-oliva marrom forte e amarelo
Índice de Refração (20°C)	1,4656	1,4575-1,4675
Índice de Iodo (cg de I ₂ /g)	68,8	33,8-192
Índice de Peróxido (meq O ₂ /Kg óleo)	4,8	----
Índice de Saponificação (mg KOH/g de óleo)	193,7	130- 257,0
Índice de Acidez	11,74	2,6- 49,0
% ácido Oléico	5,89	----

Y= amarelo, R= vermelho.

A.3. Comparação das propriedades físico-químicas dos óleos obtidos por prensa, Soxhlet e FSC

Os óleos obtidos por prensa, Soxhlet e FSC, foram comparados em relação às suas principais propriedades físico-químicas.

O óleo bruto, obtido pelo processo de prensa apresentou uma coloração mais escura do que os demais, devido à presença de compostos como fosfolípidos que incorporam-se ao óleo.

O óleo proveniente da extração por Soxhlet possui uma aparência amarelada, devido à solubilização de compostos facilmente extraídos com solventes orgânicos (hexano, metanol e etanol) e que afetam a sua qualidade, gerando óleos que necessitam de etapas dispendiosas de tratamento assim como tortas residuais com difícil remoção do solvente.

Os óleos extraídos por FSC utilizando CO₂-puro apresentaram coloração levemente amarelada. Na extração com CO₂-SC + etanol ocorreu uma maior extração dos pigmentos das sementes de nim e, conseqüentemente, dos fosfolípidos que ficam mais

solúveis nesta nova mistura, resultando em amostras de coloração fortemente amareladas e com maiores concentrações de compostos indesejáveis.

As amostras de óleo bruto, de FSC e Soxhlet foram analisadas por CG, para obtenção da composição em ácidos graxos.

As **Figuras A1, A2, A3, A4 e A.5**, apresentam os cromatogramas obtidos com as diferentes amostras.

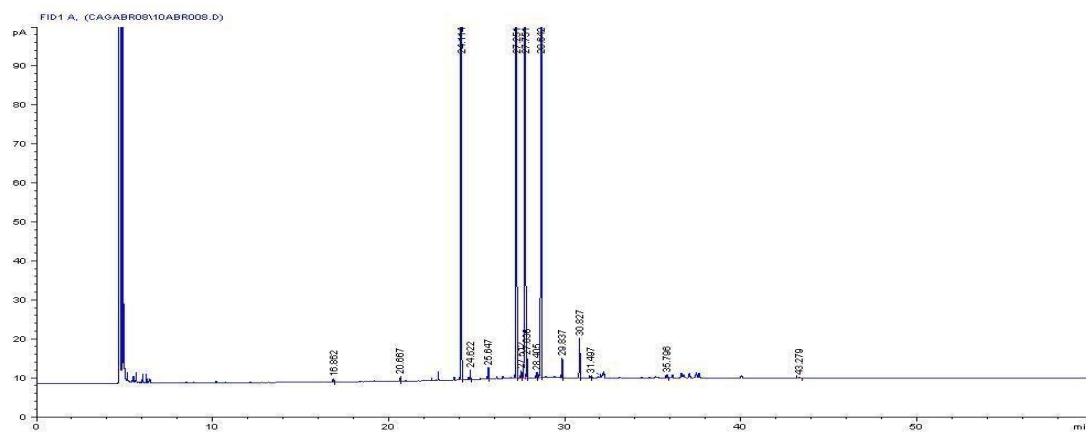


Figura A.1: Cromatograma do óleo obtido por FSC a 150 bar, 50°C, após a passagem de 200g de CO₂-puro.

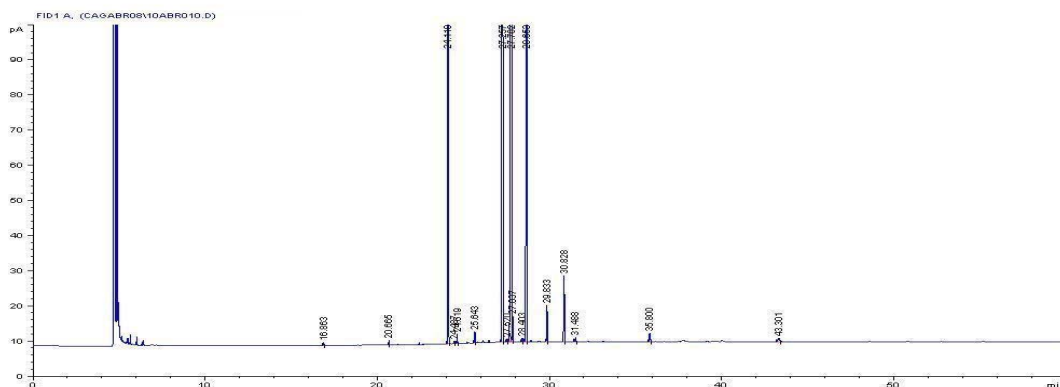


Figura A.2: Cromatograma do óleo obtido por FSC a 250 bar, 50°C, após a passagem de 200g de CO₂-puro.

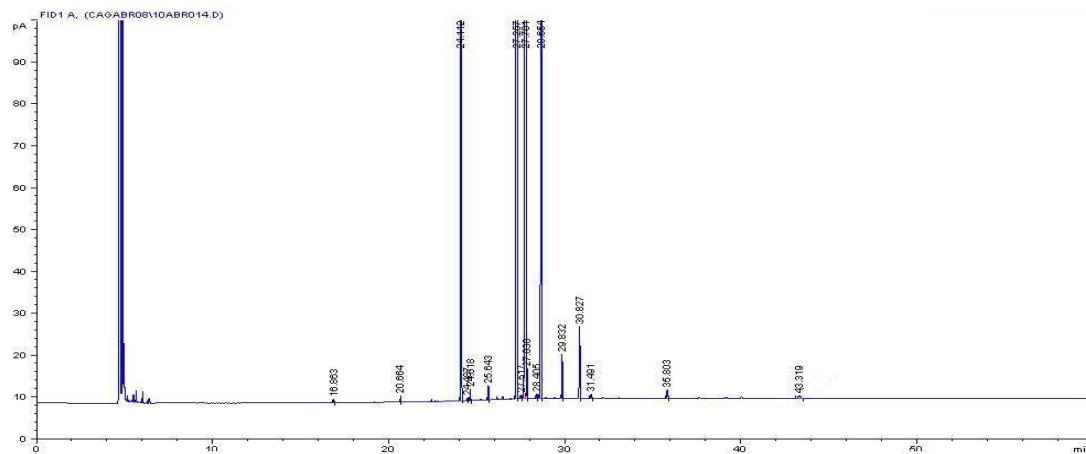


Figura A.3: Cromatograma do óleo obtido por FSC a 200 bar, 50°C, após a passagem de 200g de CO₂-puro.

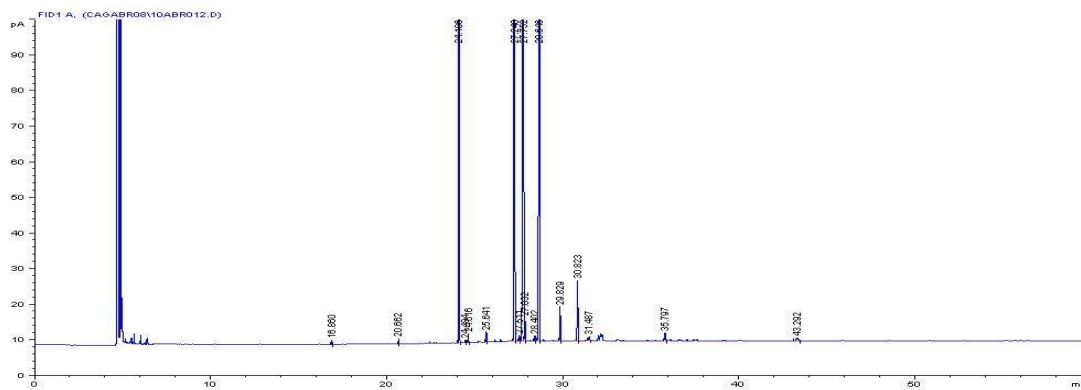


Figura A.4: Cromatograma do óleo obtido por Soxhlet com solvente hexano.

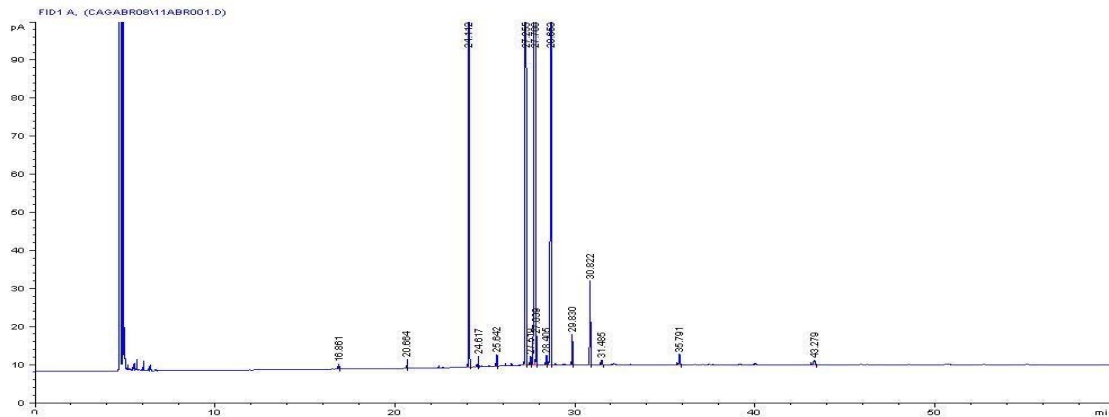


Figura A.5: Cromatograma do óleo obtido por prensa (óleo bruto).

A **Tabela A.2** apresenta a composição em ácidos graxos obtida em cada um dos óleos. Verifica-se não haver diferença significativa na quantidade de ácidos graxos presentes nos diferentes óleos. Somente nas amostras de FSC nota-se a presença de compostos trans (em pequenas quantidades), porém como este óleo não possui finalidade alimentícia, este fato não é levado em consideração.

Tabela A.2: Composição em ácidos graxos das amostras de óleo de nim obtidos por diferentes métodos (%).

Ácidos graxos	Óleo Bruto *	Soxhlet (hexano) *	150 bar, 50°C *	200 bar, 50°C *	250 bar, 50°C *
<i>Saturados</i>					
Láurico (C 12:0)	0,05	0,05	0,05	0,06	0,03
Mirístico (C 14:0)	0,09	0,06	0,08	0,07	0,05
Palmítico (C 16:0)	18,22	18,52	23,94	18,94	18,09
Margárico (C 17:0)	0,14	0,15	0,18	0,16	0,15
Estearico (C 18:0)	18,46	19,54	20,25	20,06	19,72
Araquídico (C 20:0)	1,48	1,40	0,93	1,35	1,44
Behênico (C 22:0)	0,27	0,25	0,10	0,22	0,25
Lignocérico (C 24:0)	0,18	0,16	0,05	0,14	0,16
<i>Insaturados</i>					
Palmitoleico (C 16:1)	0,12	0,14	0,15	0,16	0,15
C 18:1 trans	0,17	0,14	0,16	0,07	0,08
Oléico (C 18:1)	41,88	40,08	38,69	39,11	40,06
C 18:2 trans	---	---	0,11	0,07	0,07
Linoléico (C 18:2)	18,13	18,57	14,76	18,78	18,92
Linolênico (C 18:3)	0,49	0,66	0,42	0,66	0,66
C 20:1	0,09	0,08	0,05	0,08	0,08

* Valores médios de amostras em duplicata.

A determinação dos Índices de iodo, Índice de saponificação, Índice de peróxido e Índice de acidez foi realizada nas mesmas amostras, para efeito de comparação entre elas e estão apresentadas na **Tabela A.3**.

Tabela A.3: Índice de saponificação, índice de iodo e acidez das amostras de óleo.

Amostras	Índice de Iodo (cg de I₂/g)	Índice de Saponificação (mg KOH/g)	Índice de Peróxido (meq O₂/Kg óleo)	Índice de Acidez
150 bar, 50°C	60,2	194,9	-----	67,9
200 bar, 50°C	68,2	193,7	-----	60,9
250 bar, 50°C	69,1	193,5	-----	54,0
Soxhlet (hexano)	68,6	193,7	49,0	-----
Prensa	68,8	193,7	4,8	2,5

Através dos dados da **Tabela A.3**, pode-se observar um alto valor de índice de iodo nas amostras de óleo, independentemente do método de extração, indicando um grande número de insaturações, o que é confirmado pela presença dos ácidos graxos insaturados na **Tabela A.2**.

O alto índice de saponificação encontrado para as amostras analisadas, indica que, em princípio, (sem analisar os outros parâmetros), estes óleos poderiam ser utilizados para fins alimentares, de acordo com Moretto e Fett (1998).

O índice de peróxido para o óleo está dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA (Resolução nº 482, para óleos e gorduras, 1999), porém nenhum valor foi pré-estabelecido para o óleo de nim.

Um fator que é utilizado como parâmetro de qualidade do óleo é a presença de fosfolipídeos e glicolipídeos presentes nos óleos. Os óleos extraídos com solvente possuem uma porcentagem maior destes compostos em relação aos óleos obtidos com CO₂-SC, já que estes componentes são pouco solúveis no CO₂-SC.

De um modo geral, pode-se observar na **Tabela A.3**, que não há diferença significativa entre os óleos, comparando-se todos os parâmetros analisados.

Apêndice B

B. Quantificação da azadiractina

A quantificação do limonóide azadiractina foi realizada de acordo com as propostas apresentadas no **Item III.10**, onde a metodologia de Kaushik (2002) foi abordada. A curva de Calibração foi elaborada com as concentrações do padrão variando de 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

A **Figura B.1**, apresenta o cromatograma do padrão de azadiractina na concentração de 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As **Figuras B.2** e **B.3**, apresentam as separações de azadiractina do extrato etanólico obtido por FSC das sementes de nim, com a utilização de co-solvente etanol.

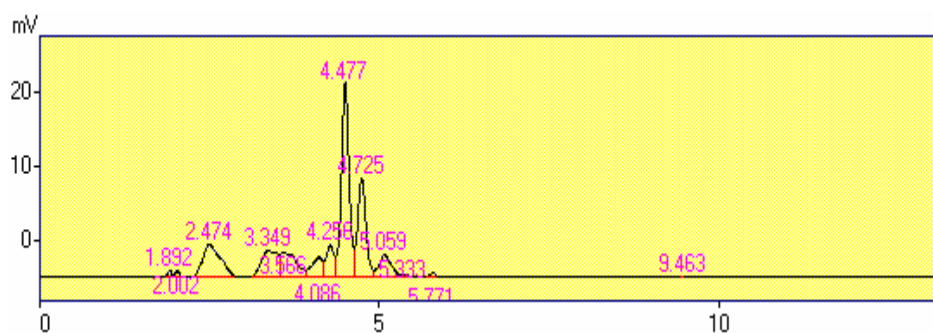


Figura B.1: Padrão de azadiractina na concentração de 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (217 nm, Fm: ACM: água (40:60)).

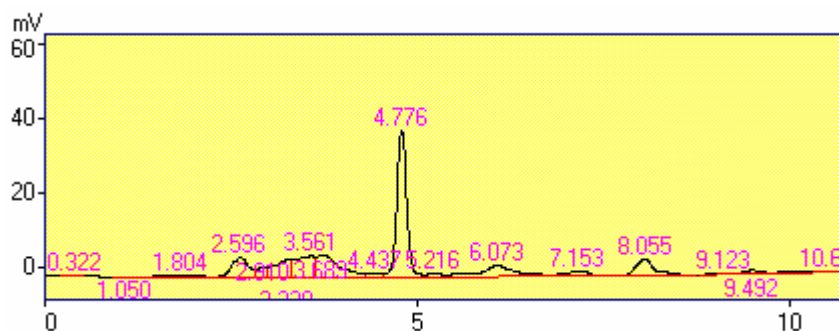


Figura B.2: Cromatograma de extração com $\text{CO}_2\text{-SC}$ + etanol da azadiractina, com a passagem de 1000 g de CO_2 (Tr: 4,776)

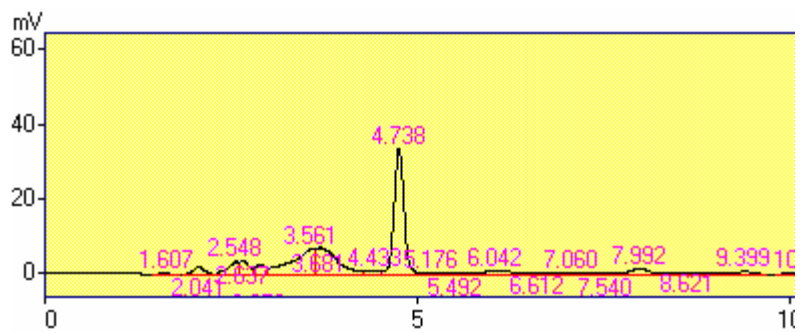


Figura B.3: 1600 g de CO₂ (Tr: 4,738).

Apêndice C

C. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas das sementes de nim antes e após as inativações dos fungos em FSC, foram realizadas no ITAL, de acordo com metodologia apresentada no **Item III.11.1.**

Neste trabalho todos os meios de culturas utilizados nas etapas de crescimento, identificação e produção de toxinas, são apresentados abaixo, juntamente com as suas constituições.

1. Dichloran 18 % Glicerol Agar (DG18)

Composição	Quantidades
Glicose	10 g
Peptona	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Glicerol, A.R.	220 g
Agar	15 g
Dichloran (0,2% v/v em etanol 1 mL)	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Água destilada	1 L

* Esterilizar em autoclave por 15 minutos, a 121°C. pH final 5,5 a 5,8.

2. Ágar Czapek extrato de levedura (CYA)

Composição	Quantidades
K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado	10 mL
Solução com traços de metais	1 mL
Extrato de leveduras concentrado	5g
Sucrose	30g
Agar	15 g
Água destilada	1 L

* Esterilizar em autoclave por 15 minutos, a 121°C. pH final 6,7.

3. Czapek concentrado

Composição	Quantidades
NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
Água destilada	100 mL

4. Meio de cultura: Ágar de extrato de malte (MEA)

Composição	Quantidades
Extrato de malta, concentrado	20 g
Peptona	1 g
Glicose	20 g
Agar	20 g
Água destilada	1 L

* Esterilizar em autoclave por 15 minutos, a 121°C. pH final 5,6.

C.1. Avaliação da produção de toxinas (CCD)

- **CCD- H plug**

Esta técnica tem como objetivo avaliar a presença de toxinas produzidas por fungos, sendo, portanto apenas de caráter qualitativo. Todos os fungos que foram isolados nas etapas anteriores foram analisados por este método.

Metodologia:

Cortou-se em cada placa de petri contendo o fungo um quadrado de 0,5 por 0,5 cm, depois foi retirado da placa e colocado em contato com algumas gotas de uma solução Clorofórmio: metanol (1:1), para a extração das toxinas presentes. Após esta etapa, este material foi depositado em placa de sílica gel 60, nas proporções 20 x 20 cm, da marca Merck (25TLC Aluminium Sheets). Esta placa contendo todas as amostras juntamente com padrões de aflatoxina (20 µL) e ocratoxina (10 µL) foi adicionada a uma cuba de vidro com a solução: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e clorofórmio (nas proporções 7: 5: 2: 5). Após a corrida ter terminado, a placa é retirada da cuba, deixada secar, para posterior comparação das amostras com os padrões de toxinas em câmara com luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm.