

Ana Augusta Salvador

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS  
DE EXTRATOS DA TORTA DE NOZ PECÃ (*Carya illinoensis*)  
OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jane Mara Block

Florianópolis  
2014

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

Salvador, Ana Augusta

Atividade Antioxidante e Perfil de Ácidos Graxos de Extratos da Torta de Noz Pecã (*carya illinoensis*) Obtidos por Extração Supercrítica / Ana Augusta Salvador, orientadora Sandra Regina Salvador Ferreira, coorientadora Jane Mare Block – Florianópolis, SC, 2014

139

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

Inclui referência

1. Engenharia de Alimentos. 2. torta de noz pecã. 3. tecnologia supercrítica. 4. atividade antioxidante. 5. ácidos graxos. I. Ferreira, Regina Salvador, II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS  
DE EXTRATOS DA TORTA DE NOZ PECÃ (*Carya illinoensis*)  
OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA**

Por

Ana Augusta Salvador

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do **Título de “Mestre” em Engenharia de Alimentos**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

---

Prof.<sup>a</sup> Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.<sup>a</sup>  
**Orientadora**

---

Prof.<sup>a</sup> Jane Mara Block, Dr.<sup>a</sup>  
**Coorientadora**

---

Prof. João Borges Laurindo, Dr.  
**Coordenador do Curso**

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Sandra R. S. Ferreira, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof. Carlos Alberto da Silva  
Riehl, Dr.  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro

---

Prof. Pedro Luís Manique  
Barreto, Dr.  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof. Haiko Hense, Dr.  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

Florianópolis, 7 de fevereiro de 2014.



Este trabalho é dedicado aos meus pais, amo vocês.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e se mostrar sempre presente.

Aos meus pais, Ilson e Dirlene, por toda paciência, incentivo e muito amor.

Aos meus irmãos Angela e Amadeo por andarem de mãos dadas comigo. À Karla e Paulo pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu noivo, Jeferson pela enorme compreensão, paciência e carinho.

À Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira pela oportunidade concedida, pelo apoio e paciência durante a realização deste projeto e incentivo durante todo o mestrado.

À Profa. Dra. Jane Mara Block por gentilmente ter aceitado ser coorientadora deste mestrado, disponibilizando seu laboratório e sua equipe de trabalho, além de suas contribuições nos trabalhos realizados durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Riehl do Instituto de Química da UFRJ pela persistência e disposição para realizar as análises cromatográficas.

Ao técnico Luciano do Laboratório de Bromatologia e André do Laboratório de Cereais da Universidade Federal de Santa Catarina que auxiliaram na realização dos testes preliminares deste projeto.

À Dra. Natália Mezzomo e ao Professor Dr. Haiko Hense pelas contribuições que enriqueceram este trabalho durante a qualificação de mestrado.

Ao Professor Dr. Marcelo Lanza por cuidar da manutenção do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica.

Aos meus colegas do LATESC: Natália por dividir conhecimento, Patrícia por cuidar de todos, Daniela pela generosidade de suas ações, Sibeles pelos conselhos sábios, Daiane pela descontração necessária na dificuldade, Josamaique pelas soluções apresentadas de boa vontade, Katia pelas alertas e dicas, Simone por apresentar sempre um lado bom das coisas e Gláucia ombro amigo.

Às colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras e da Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras Rossana, Ana Cristina, Josiane e Gisele pelas parcerias.

Aos amigos que conheci na pós-graduação e na graduação por fazerem parte desta história.

À Vital Átman e Pecanita, pelo fornecimento das amostras que possibilitaram a realização deste projeto.

À banca que se fez presente para contribuir com a avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e ao Centro de Ciências Agrárias pelo apoio financeiro no projeto e para divulgação do mesmo.



“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.”

(Albert Einstein)



## RESUMO

A torta de noz pecã é um subproduto da extração do óleo de nozes e é normalmente utilizada como ração animal. O objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade antioxidante e o perfil de ácidos graxos dos extratos de torta de noz pecã obtidos por extração supercrítica, comparando os resultados com técnicas de extração a baixa pressão. Dois tipos de torta foram testadas, a da variedade Mahan (Torta 1) e a mistura das variedades Barton e Desirable (Torta 2). As condições de extração supercrítica (ESC) aplicadas variaram de 100 bar a 300 bar e de 40 a 50 °C. Também foram realizadas extrações com adição de cossolvente etanol em ESC sequencial (ESC-S). As extrações a baixa pressão (EBP) selecionadas foram em Soxhlet e com Ultrassom, utilizando etanol, acetona e hexano como solventes. A atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos foi determinada pelas técnicas de captura do radical DPPH, descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido-linoleico e inibição do radical ABTS. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e o teor de taninos condensados pelo ensaio de vanilina. O perfil de ácidos graxos dos extratos foi determinado por cromatografia gasosa. A Torta 1 e Torta 2 apresentaram óleo residual de  $59,4 \pm 0,1\%$  e  $36 \pm 1\%$ , respectivamente. Os maiores rendimentos foram obtidos com a Torta 1 (58 e 58,4%) utilizando as seguintes condições para a ESC: 300 bar, 50°C e 40°C, respectivamente. A utilização de cossolvente na ESC-S possibilitou aumento nos rendimentos de extração nas condições estudadas. Para as EBP o maior rendimento foi obtido na extração em Soxhlet com etanol (61,5%). Os extratos das EBP com acetona e etanol apresentaram teores significativos de compostos fenólicos e taninos condensados e em alguns casos os extratos mostraram AA equivalente a antioxidantes como TBHQ e ácido gálico. Considerando os extratos supercríticos, a maior AA foi encontrada no extrato obtido a 150 bar e 50°C. Todos os extratos avaliados apresentaram o ácido oleico como ácido graxo majoritário, seguido do ácido linoleico. A ESC mostrou ser uma alternativa segura e eficiente para extração de ácidos graxos da torta de noz pecã.

**Palavras-chave:** torta de noz pecã, tecnologia supercrítica, atividade antioxidante, ácidos graxos.



## ABSTRACT

The pecan cake is a byproduct from pecan nut oil extraction that despite being rich in oil and antioxidants is so far used as animal feed. The objective of this study was to determine the antioxidant activity and the fatty acid profile of pecan cake extracts obtained by supercritical fluid extraction comparing the results with solvent extraction techniques. Two types of industrial cake were tested, one composed by the Mahan variety (Cake 1) and the other one by the mixture of varieties Barton and Desirable (Cake 2). The conditions for supercritical extraction (SFE) applied ranged from 100 bar to 300 bar and from 40 to 50 °C. Extractions with co-solvent were also performed in sequential supercritical fluid extraction (S-SFE). The extractions at low pressure (LPE) selected were in Soxhlet and with Ultrasound using ethanol, acetone and hexane as solvents. The antioxidant activity (AA) of the extracts was determined by the techniques of free radical scavenging activity (DPPH),  $\beta$ -carotene bleaching test and ABTS radical scavenging assay. The total phenolic (TF) content was determined by the Folin-Ciocalteu method and content of condensed tannins (CT) by the vanillin assay. The fatty acids profile was determined by gas chromatography. Cake 1 and Cake 2 presented  $59.4 \pm 0.1$  % and  $36 \pm 1$  % of residual oil, respectively. The highest yields were obtained with Cake 1 (58 and 58.4 %) using the following conditions for SFE: 300 bar, 50 °C and 40 °C, respectively. The use of co-solvent in S-SFE enabled increased yields of extraction. For LPE the highest yield was obtained in Soxhlet extraction with ethanol (61.5 %). The LPE with acetone and ethanol extracts showed significant levels of phenolics and condensed tannins and in some cases the extracts showed AA equivalent to antioxidants such as TBHQ and gallic acid. Considering just the supercritical extracts, the extract obtained at 150 bar and 50 °C presented the highest AA. All extracts showed oleic acid as the major fatty acid, followed by linoleic acid. The SFE has proven to be a safe and effective alternative for the extraction of fatty acids of pecan cake.

**Keywords:** pecan cake, supercritical technology, antioxidant activity, fatty acids.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do ciclo de desenvolvimento da noz pecã. ....	29
Figura 2: Fluxograma produção de óleo de noz pecã. ....	33
Figura 3: Esquema geral mecanismo de oxidação lipídica ....	37
Figura 4: Estrutura de antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos ....	38
Figura 5: Estrutura de antioxidantes naturais: ácido fenólico (esquerda) e flavonoide (direita). ....	40
Figura 6: Estrutura de proantocianidina (a) e tanino hidrolisável (b). ....	42
Figura 7: Diagrama de Fases de uma substância pura, Tc temperatura crítica e Pc pressão crítica. ....	47
Figura 8: Amostras das tortas de nozes pecã. 1) torta da variedade Mahan e 2) torta da mistura das variedades Barton e Desirable. ....	53
Figura 9: Complexação do anel fenólico com a molécula de ferro. ....	60
Figura 10: A) extração em Soxhlet seguida do B) processo de eliminação do solvente e C) a extração com ultrassom. ....	61
Figura 11: Equipamento de Extração Supercrítica com detalhe das válvulas de controle de vazão. ....	62
Figura 12: Extração supercrítica sequencial da torta de noz pecã. ....	65
Figura 13: Resultado análise detecção de taninos: a- Torta 1; b- Torta 2 ....	77
Figura 14: Cinéticas das extrações supercríticas das Tortas 1 e 2. ....	80
Figura 15: Quantidade de óleo nas tortas de noz pecã por tempo. ....	82
Figura 16: Média rendimentos das extrações a baixa pressão utilizando acetona e etanol da Torta 1 e Torta 2 ....	86
Figura 17: Isotermas das extrações supercríticas da Torta 1 ....	88
Figura 18: Gráfico de resíduos do Modelo para a extração supercrítica de torta de noz pecã (Torta 1). ....	90
Figura 19: Extratos obtidos por ESC e EBP comparados ao óleo comercial obtido na indústria. (A) óleo comercial; (B) ESC Torta 2; (C) ESC Torta 1; (D) EBP solvente polar. ....	91
Figura 20: Resíduos das extrações supercríticas a 100, 200 e 300 bar. ....	91
Figura 21: Rendimentos da extração supercrítica sequencial com cossolvente etanol 5% das tortas de noz pecã. ....	92
Figura 22: Extratos obtidos na 1ª etapa (esquerda) e 2ª etapa (direita) da ESC-S ....	93
Figura 23: Atividade Antioxidante dos extratos da Torta 1 obtidos por ESC de acordo com o método de descoloração do sistema $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico ....	102
Figura 24: Variação da Atividade Antioxidante com a densidade do CO <sub>2</sub> supercrítico nos extratos da Torta 1 obtidos por ESC. ....	105
Figura 25: Variação da atividade antioxidante $\mu\text{mol TEAC/g}$ dos extratos de torta de noz pecã com o aumento da pressão de ESC. ....	106
Figura 26: Variação na porcentagem de ácido oleico, linoleico e palmítico no óleo da Torta 1 de noz pecã com o aumento da pressão na extração. ....	116

Figura 27: Razão O/L no óleo da Torta 1 de noz pecã com o aumento da densidade do CO <sub>2</sub> na extração. ....	119
Figura 28: Curva analítica de Trolox necessária para determinar a atividade antioxidante dos extratos pelo método do radical ABTS. ....	135
Figura 29: Curva analítica de ácido gálico necessária para determinar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos. ....	137
Figura 30: Curva analítica de catequina necessária para determinar o teor de taninos condensados dos extratos. ....	139



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição nutricional e teor de taninos em diferentes variedades de nozes. Valores expressos em g/100g. ....	30
Tabela 2: Conteúdo de tocoferóis e fitoesteróis na noz pecã. ....	31
Tabela 3: Composição em ácidos graxos do óleo de noz pecã. ....	31
Tabela 4: Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados mais comuns encontrados em óleos vegetais. ....	34
Tabela 5: Resumo dos ensaios realizados com as tortas de noz pecã. ....	74
Tabela 6: Composição nutricional e diâmetro médio das partículas das tortas de noz pecã. ....	75
Tabela 7: Características físico-químicas dos óleos das duas tortas de noz pecã e dos respectivos óleos comerciais. ....	78
Tabela 8: Resultados dos testes preliminares de quantidade de amostra e rendimento das extrações supercríticas. ....	79
Tabela 9: Dados de tempo e quantidade de extrato das curvas de cinética das Tortas 1 e 2; Pressão=200; Temperatura=50°C; massa leito=5g. ....	81
Tabela 10: Rendimento das extrações à baixa pressão em base seca. ....	83
Tabela 11: Anova multifatorial dos dados de rendimento das extrações realizadas com as Tortas 1 e 2. ....	85
Tabela 12: Rendimento das extrações supercríticas em base seca. ....	87
Tabela 13: ANOVA multifatorial dos dados de rendimento das extrações supercríticas realizadas com a Torta 1. ....	89
Tabela 14: Resultados para a menor concentração necessária para atingir 50% de atividade antioxidante (CE <sub>50</sub> ) e Atividade Antioxidante (AA%) pelo método de captura do DPPH dos extratos das tortas obtidos por diferentes técnicas de extração. ....	95
Tabela 15: Resultados de Atividade Antioxidante pelo método de $\beta$ -caroteno/ácido linoleico dos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração. ....	99
Tabela 16: Resultados de Atividade Antioxidante (AA) pelo método de inibição do radical ABTS dos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração. ....	103
Tabela 17: Resultados de compostos fenólicos totais obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu dos extratos da Torta 1 e 2. ....	108
Tabela 18: Resultados de taninos condensados obtidos pelo método de vanilina dos extratos da Torta 1 e 2. ....	110
Tabela 19: Perfil de ácidos graxos dos óleos da Torta 1 obtidos por EBP em Soxhlet hexano e ESC, comparados aos óleos comerciais da noz pecã e óleo de ESC Torta 2. ....	113
Tabela 20: Perfil de ácidos graxos dos óleos de noz pecã, avelã e castanha-do-pará. ....	115
Tabela 21: Razão entre ácidos graxos insaturados e saturados, razão entre ácido oleico e ácido linoleico dos óleos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração comparados aos respectivos óleos comerciais. ....	117



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACS	American Chemical Society
AG	Ácido Graxo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	American Oil Chemists Society
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CER	Etapa de taxa constante de extração
EC	Equivalente em catequina
CE <sub>50</sub>	Concentração de extrato para 50% de AA
CG	Cromatografia gasosa
DCP	Etapa difusional
DPPH	1,1-diphenil-2-picryl hidrazil
EBP	Extração a baixa pressão
ESC	Extração supercrítica
ESC-S	Extração supercrítica sequencial com cossolvente
FER	Etapa de taxa decrescente de extração
FT	Compostos Fenólicos totais
GAE	Equivalente em ácido gálico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INC	International Nut and Dried Fruits
PG	Galato de propila
TBHQ	Tero-butil-hidro-quinona
TC	Taninos condensados



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>26</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 NOZ PECÃ: CARACTERÍSTICAS, PRODUÇÃO E BENFICIAMENTO</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 LIPÍDIOS/ÁCIDOS GRAXOS</b> .....	<b>33</b>
2.2.1 Oxidação Lipídica .....	35
<b>2.3 ANTIOXIDANTES</b> .....	<b>37</b>
2.3.1 Compostos fenólicos .....	39
<b>2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO</b> .....	<b>42</b>
2.4.1 Extração a Baixa Pressão .....	43
2.4.1.1 Em Soxhlet .....	43
2.4.1.2 Com ultrassom.....	44
2.4.2 Extração Supercrítica .....	45
2.4.2.1 Curva de extração Supercrítica.....	49
2.4.2.2 Extração supercrítica sequencial com cossolvente .....	50
<b>2.5 CONSIDERAÇÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1 MATÉRIA-PRIMA</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2 MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
3.2.1 Caracterização das tortas de noz pecã .....	54
3.2.1.1 Composição Nutricional .....	54
3.2.1.1.1 Teor de umidade e compostos voláteis .....	54
3.2.1.1.2 Teor de lipídios totais.....	54
3.2.1.1.3 Teor de nitrogênio total.....	55
3.2.1.1.4 Teor de cinzas .....	56
3.2.1.1.5 Teor de fibras alimentares.....	56
3.2.1.1.6 Teor de carboidratos .....	56
3.2.1.2 Determinação do diâmetro médio das partículas das tortas .....	56
3.2.1.3 Caracterização do óleo das tortas .....	57
3.2.1.3.1 Índice de acidez.....	57

3.2.1.3.2 Índice de peróxido .....	58
3.2.1.3.3 Índice de refração .....	59
3.2.1.3.4 Densidade relativa .....	59
3.2.1.4 Teste de presença de taninos .....	59
3.2.2 Obtenção dos extratos .....	60
3.2.2.1 Extrações a baixa pressão .....	60
3.2.2.1.1 Extração em Soxhlet .....	60
3.2.2.1.2 Extração com ultrassom .....	61
3.2.2.2 Extração Supercrítica .....	62
3.2.2.2.1 Equipamento de Extração Supercrítica .....	62
3.2.2.2.2 Testes preliminares de extração supercrítica .....	63
3.2.2.2.3 Extração Supercrítica com CO <sub>2</sub> puro .....	63
3.2.2.2.4 Extração Supercrítica Sequencial com Cossolvente .....	64
3.2.2.3 Eliminação do solvente orgânico dos extratos .....	66
3.2.3 Cálculos do rendimento de extração .....	66
3.2.4 Caracterização dos extratos obtidos .....	67
3.2.4.1 Determinação da Atividade Antioxidante dos extratos obtidos .....	67
3.2.4.1.1 Método de captura radical DPPH .....	67
3.2.4.1.2 Método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico .....	68
3.2.4.1.3 Método de inibição do radical ABTS .....	69
3.2.4.2 Teor de compostos fenólicos totais .....	70
3.2.4.3 Teor de taninos condensados .....	71
3.2.4.4 Determinação do perfil de ácidos graxos .....	72
3.2.5 Análise estatística .....	73
<b>3.3 RESUMO DOS ENSAIOS .....</b>	<b>73</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2 TESTES PRELIMINARES DE EXTRAÇÃO   SUPERCRÍTICA .....</b>	<b>79</b>
<b>4.3 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES .....</b>	<b>82</b>
4.3.1 Extrações a Baixa Pressão .....	82
4.3.2 Extração Supercrítica .....	86
<b>4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS .....</b>	<b>94</b>
4.4.1 Atividade antioxidante obtida pelo método de captura do radical DPPH .....	94
4.4.2 Atividade antioxidante obtida pelo método de descoloração do	

sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	98
4.4.3 Atividade antioxidante obtida pelo método de inibição do radical ABTS .....	103
<b>4.5 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS .....</b>	<b>108</b>
4.5.1 Fenólicos Totais por método Folin-Ciocalteu .....	108
4.5.2 Taninos condensados por ensaio de vanilina .....	110
<b>4.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DAS TORTAS DE NOZ PECÃ .....</b>	<b>111</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>121</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>123</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>125</b>
<i>APÊNDICE A – Curva analítica do método de atividade antioxidante do radical ABTS. ....</i>	<i>135</i>
<i>APÊNDICE B – Curva analítica do método de Fenólicos Totais. ...</i>	<i>137</i>
<i>APÊNDICE C – Curva analítica do método de Taninos condensados. ....</i>	<i>139</i>





# 1 INTRODUÇÃO

O IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) estimou para 2013 uma safra de 185,7 milhões de toneladas para cereais, leguminosas e oleaginosas indicando um aumento de 14,7 % em relação à safra de 2012. Este aumento na produção também é indicativo do aumento da geração de resíduos e subprodutos resultantes da produção e do beneficiamento destas matérias-primas.

Em 2011 a produção mundial de noz pecã atingiu 92.352 toneladas (INC, 2012), com produção comercial no Brasil, Estados Unidos, Austrália, África do Sul, Israel, Argentina, Canadá, França, Reino Unido e outros. (WOOD, PAYNE e GRAUKE, 1994). No Brasil a noz pecã é produzida principalmente na região sul e beneficiada por indústrias localizadas nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo.

Este tipo de noz é comercializada “in natura”, caramelizada, granulada ou em pasta. Além do beneficiamento da noz para comercialização, também pode ser realizada a extração do óleo para utilização culinária. Durante a produção do óleo a indústria gera dois subprodutos: a casca de noz pecã e a torta da extração. A casca da noz pecã tem sido utilizada popularmente no Rio Grande do Sul para o preparo de chá e vários estudos demonstram que a mesma apresenta atividade antioxidante e antibacteriana (DO PRADO, 2008; DO PRADO *et al.*, 2013; DO PRADO *et al.*, 2014). A torta de noz pecã é um resíduo da prensagem a frio das nozes para obtenção do óleo, e apresenta um percentual de óleo elevado.

Considerando a noz pecã uma importante fonte de compostos antioxidantes (YANG, 2009) e o seu óleo como fonte de ácidos graxos (ZHAO *et al.*, 2011), supõe-se que o subproduto do processamento da mesma mantenha parte desta composição. Por isso, a torta foi selecionada como matéria-prima para o presente trabalho. Os tipos de antioxidantes presentes na noz pecã são compostos capazes de combater radicais livres e prevenir alguns tipos de câncer (MEYER, HEINONEN e FRANKEL, 1998; FRANKEL, 1999). O consumo de ácidos graxos monoinsaturados está associado à diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol (FREITAS e NAVES, 2010). Estes compostos constituintes da noz pecã e, possivelmente presentes também na torta, podem ser recuperados da torta mediante a obtenção de extratos de importância nutricional e biológica valorizando este subproduto.

A extração de óleo e outros compostos a partir de matrizes vegetais geralmente é realizada com o emprego de solventes orgânicos. Entretanto, o alto custo dos solventes, as leis ambientais e as exigências

das indústrias farmacêuticas e de alimentos por produtos de alta pureza têm aumentado a necessidade de desenvolver tecnologias novas e limpas para o processamento de produtos alimentícios (MOHAMED e MANSOORI, 2002). Concomitantemente muito esforço tem sido exigido na pesquisa de fontes alternativas e baratas de antioxidantes naturais e no desenvolvimento de técnicas de extração seletivas e eficientes (DÍAZ\_REINOSO *et al.*, 2006).

Neste enfoque, a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, é considerada uma tecnologia limpa e seletiva para aplicação em produtos naturais. A extração supercrítica (ESC) proporciona vantagens sobre as técnicas de extração convencionais, dentre elas: a ausência de luz e de ar durante o processo de extração, reduzindo a incidência de reações de degradação (PALMA e TAYLOR, 1999); capacidade de lidar com material de alta viscosidade (BRUNNER, 2005); processo flexível, devido à possibilidade de modulação contínua do poder de solvatação e seletividade do solvente através da modificação de temperatura e pressão (REVERCHON e DE MARCO, 2006); ausência de solvente residual, além do fato do CO<sub>2</sub> supercrítico ser considerado seguro para utilização em alimentos por ser inerte e não tóxico (BRUNNER, 2005)

Assim, considerando o exposto acima, o presente trabalho de pesquisa envolve a extração de compostos com atividade antioxidante e de ácidos graxos da torta de noz pecã mediante o emprego da tecnologia supercrítica.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antioxidante e o perfil de ácidos graxos de torta de noz pecã obtidos por extração supercrítica comparando os resultados com técnicas de extração que empregam solventes orgânicos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar as tortas estudadas através da composição nutricional, diâmetro médio das partículas, presença de compostos fenólicos e caracterização dos óleos das tortas por parâmetro de identidade (índice de refração e densidade) e de qualidade (índice de acidez e índice de peróxido).

- b) Obter extratos da Torta 1 de noz pecã por extração supercrítica (ESC) a 100,150, 200 e 300 bar usando temperaturas de 40°C e 50°C
- c) Avaliar a influência das condições operacionais da extração supercrítica sobre os rendimentos obtidos.
- d) Obter extratos da Torta 1 de noz pecã por extrações à baixa pressão (EBP) Ultrassom e Soxhlet com etanol, acetona e hexano como solventes e comparar com os resultados obtidos por ESC em termos de rendimento.
- e) Aplicação dos ensaios de extração de melhor rendimento da Torta 1 na Torta 2.
- f) Determinar a atividade antioxidante pelas técnicas de captura do radical DPPH, descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, inibição do radical ABTS e de teor de compostos fenólicos (Compostos fenólicos totais e taninos condensados) dos extratos obtidos.
- g) Selecionar o solvente orgânico para ser aplicado como cossolvente na extração supercrítica de acordo com resultados obtidos nas análises de atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos.
- h) Realizar ensaios de ESC empregando cossolvente em extração supercrítica sequencial de acordo com os resultados de rendimento e atividade antioxidante obtidos no trabalho.
- i) Determinar o perfil de ácidos graxos dos extratos obtidos.

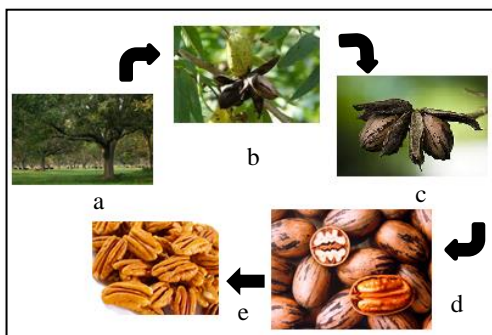


## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NOZ PECÃ: CARACTERÍSTICAS, PRODUÇÃO E BENFICIAMENTO

A noz pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch pertence à família *Juglandaceae* e é originária da América do Norte (VENKATACHALAM, 2004). Os frutos da nogueira pecã são considerados drupas, e crescem agrupados em cachos que contém normalmente de três a oito unidades, apresentam casca de coloração marrom escura com manchas negras, de espessura bastante variada (POLETTO *et al.*, 2012). A maturação ocorre nos meses de março a maio, podendo variar em função das condições genéticas das plantas (LUZ *et al.*, 2001; POLETTO *et al.*, 2012). A Figura 1 apresenta uma ilustração do pé de nogueira (a), os frutos maduros (c) e detalhes da divisão do fruto e amêndoa com a casca (d).

**Figura 1:** Ilustração do ciclo de desenvolvimento da noz pecã.



Existem cerca de 1000 variedades de nozes pecã nomeadas no mundo (SANTERRE, 1994). Os principais cultivares de nogueira pecã no Brasil são oriundas dos Estados Unidos e as mais importantes são Mahan, Frotscher, Schley, Success e Moneymaker Barton, Shawnee, Cape Fear, Chickasaw, Choktaw, Desirable, Imperial, Importada, Burkett, Chpecear, Shoshone (POLETTO *et al.*, 2012).

A composição nutricional e teor de taninos da noz pecã podem ser observados na Tabela 1 (pág. 30). É apresentada a composição nutricional das variedades de nozes que compõe as tortas do presente trabalho.

**Tabela 1:** Composição nutricional e teor de taninos em diferentes variedades de nozes. Valores expressos em g/100g.

	Mahan <sup>1</sup>	Desirable <sup>1</sup>	Barton <sup>2</sup>	Diversas <sup>1*</sup>
Teor de umidade	4,54 ± 0,03	6,23 ± 0,16	3,7 ± 0,31	2,1 – 6,4
Lipídios totais	70,67 ± 0,32	70,08 ± 0,39	69,4 ± 0,01	65,9 – 78,0
Proteínas	7,5 ± 0,18	9,54 ± 0,09	9,9 ± 0,01	6 – 11,3
Cinzas	1,41 ± 0,18	1,78 ± 0,04	1,4 ± 0,02	1,23 – 1,79
Carboidratos	4,21 ± 0,04	3,67 ± 0,06	7,8	3,3 – 5,3
Taninos	1,60 ± 0,04	0,94 ± 0,03	-	0,66 – 2,68

Fonte: <sup>1</sup>Venkatachalam (2004) \* variação da composição centesimal de 24 variedades de pecã; <sup>2</sup> Oro (2007).

As nozes fornecem proteínas, fibras, ácidos graxos essenciais e vitaminas. (TEMELLI *et al.*, 2007). Freitas e Naves (2010) estudaram a composição nutricional de nozes e sementes comestíveis e consideram que devido suas propriedades nutricionais o consumo de nozes e sementes deve ser estimulado. Estes constituintes nutricionais são benéficos à saúde. Por exemplo, as proteínas são fonte energética e de aminoácidos essenciais, as fibras insolúveis auxiliam nas funções intestinais, o mineral selênio é o centro ativo de várias enzimas que atuam como antioxidantes (FREITAS e NAVES, 2010).

A noz pecã é majoritariamente lipídica, contendo 65,9 a 78,0 % de óleo (SANTERRE, 1994). O teor de lipídios se altera dependendo da espécie, local da plantação, ano de produção, conteúdo de fertilizantes e tempo de colheita (SANTERRE, 1994). Estas diferenças na produção e espécies das nozes também produzirão alterações na composição das duas tortas industriais, alvos do presente trabalho. Até materiais da mesma espécie de planta podem apresentar diferenças de colheita a colheita, de acordo com as condições e tratamentos pós-colheita, de acordo com a idade e do tratamento pré-extração (BRUNNER, 1994).

A noz pecã é um dos alimentos com maior quantidade de compostos fenólicos entre as diferentes nozes e possui uma das maiores atividades antioxidantes (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Segundo Yang (2009) a noz pecã apresenta 1463,9 mg/100g de teor de compostos fenólicos totais enquanto que a castanha-do-pará e a macadamia possuem 169,2 mg/100g e 497,8 mg/100g, respectivamente. De acordo com VILLARREAL-LOZOYA *et al.* (2007) o ácido gálico representa 78% do teor de compostos fenólicos totais (138 µg/g da noz desengordurada).

Além do alto teor de compostos fenólicos, a noz pecã é também fonte de tocoferóis e fitoesteróis (Tabela 2). Os tocoferóis são compostos que apresentam atividade antioxidante e de vitamina E (FOURIE e BASSON, 1989). Os fitoesteróis são compostos análogos ao colesterol e a presença destes compostos na dieta reduz o colesterol sanguíneo, diminui risco para certos tipos de câncer e aumenta as funções imunológicas do organismo (YANG, 2009).

**Tabela 2:** Conteúdo de tocoferóis e fitoesteróis na noz pecã.

Composto	mg /100g <sup>1</sup>
<b>Tocoferóis</b>	
$\alpha$ -tocoferol	1,4
$\beta$ -tocoferol	0,39
$\gamma$ -tocoferol	24,4
$\delta$ -tocoferol	0,49
<b>Fitoesteróis</b>	
$\beta$ -sitosterol	117,0
Campesterol	6,0
Stigmasterol	3,0

<sup>1</sup>USDA (2001)

A composição de ácidos graxos do óleo de noz pecã pode ser observada na Tabela 3. O óleo de noz pecã é comestível, extraído da amêndoa da noz pecã. Possui uma composição similar ao azeite de oliva em termos de ácidos graxos e teor de tocoferóis, porém é mais estável contra rancidez oxidativa (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). É utilizado há séculos para eliminar radicais livres, fortalecer a atividade das células, e aumentar a função das células nervosas (ZHAO *et al.*, 2011).

**Tabela 3:** Composição em ácidos graxos do óleo de noz pecã.

Ácido Graxo	% <sup>1</sup>
Ácido oleico	49-69
Ácido linoleico	19-40
Acido linolênico	0-3
Ácido palmítico	5-11
Ácido esteárico	1-6

<sup>1</sup> Firestone (1999);

A noz pecã contém ácidos graxos com 16 ou mais carbonos. Aproximadamente 98% dos trigliceróis são compostos pelos ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico (BLOCK e BARRERA-ARELLANO, 2010). Dentre eles, os ácidos graxos linoleico ( $\omega$ -6) e linolênico ( $\omega$ -3) são compostos de importância nutricional (SAHENA *et al.*, 2009; FREITAS e NAVES, 2010). Como pode ser observado na Tabela 3 (pág. 31), o óleo de noz pecã é rico em ácidos graxos insaturados, cerca de 90% da composição (FIRESTONE, 1999; ZHAO *et al.*, 2011). Geralmente, o óleo de nozes é rico em ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico, mas contém quantidades menores de ácidos graxos poli-insaturados, predominantemente o linoleico (USDA, 2001).

O conhecimento da composição de ácidos graxos de nozes é importante por diversos motivos: qualidade nutricional por apresentar ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados que podem oferecer benefícios à saúde, especialmente em relação ao perfil lipídico do soro sanguíneo; sabor agradável atribuído a diferentes ácidos graxos que constituem as sementes de nozes; contribuição na textura e importância para manter a qualidade (VENKATACHALAM, 2004) *apud* (BLOCK e BARRERA-ARELLANO, 2010).

A noz pecã é produzida comercialmente na Austrália, África do Sul, Israel, Argentina, Chile, México e Brasil (WOOD, PAYNE e GRAUKE, 1994). No ano de 2011 foram produzidas 92.352 toneladas de nozes pecã no mundo, sendo que 58 % desta produção pertencem aos Estados Unidos (INC, 2012).

Sua produção mais significativa na América Latina está no município de Cachoeira do Sul, no Rio Grande do Sul, região sul do Brasil (RIO GRANDE DO SUL, 2008). De acordo com o Governo do Estado do Rio Grande do Sul (2011) a área cultivada de pomares de nozes pecã para fins comerciais era de 1769 hectares (BORTOLETTI, 2012). Se comparado a 2005, o aumento foi de aproximadamente 45%. Em Santa Catarina já existem plantações em Presidente Nereu, Santa Rosa de Lima, Lontras e Presidente Getúlio (SANTA CATARINA, 2012).

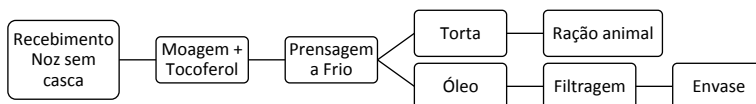
A produção das nozes inicia após 5 anos do plantio da noqueira, sendo que com 12 anos a rentabilidade do pomar pode chegar a R\$ 10 mil por hectare (SANTA CATARINA, 2012). Porém, de toda produção de noz pecã, 10 a 20% é perdida nas plantações por não apresentarem qualidade satisfatória para comercialização (BREITENBECK, GRAHAM e IQBAL, 2009).



As nozes pecã são valiosas por serem doces e crocantes e por isso são usadas em vários produtos alimentícios de padarias, confeitarias e também como saladas, sobremesas ou salgadinhos. No Brasil são beneficiadas no Rio Grande do Sul e em São Paulo, e então comercializadas in natura, caramelizada, granulada, em pasta e também após extração como óleo culinário ou óleo essencial.

Atualmente existem apenas duas empresas brasileiras produtoras de óleo de noz pecã. Um fluxograma simplificado do processo de extração do óleo de noz pecã é apresentado na Figura 2. A noz é recebida sem casca e já higienizada, em seguida procede-se a moagem da noz com adição de vitamina E. Esta Vitamina E, adicionada no momento da moagem, pode permanecer na noz mesmo após extração do óleo. A extração do óleo é realizada somente por prensagem a frio. Tradicionalmente o óleo de nozes é obtido por prensagem mecânica seguida de extração com solvente (TEMELLI *et al.*, 2007). Desta prensagem resulta o óleo e a torta. O óleo segue para a filtragem e envase, enquanto a torta torna-se um resíduo. A torta pode ser utilizada como um ingrediente de confeitaria, padaria, em barras de cereais e indústrias lácteas (ORO, 2007).

**Figura 2:** Fluxograma produção de óleo de noz pecã



## 2.2 LIPÍDIOS/ÁCIDOS GRAXOS

Lipídios são biomoléculas solúveis em solventes apolares, são óleos e gorduras insolúveis em água (BOBBIO e BOBBIO, 1989; AKOH e MIN, 2002; SAHENA *et al.*, 2009). Os lipídios podem ser saponificáveis como os acilgliceróis (triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis), fosfolipídios, ceras, esfingolipídios e glicolipídios, ou não saponificáveis como os terpenos, tocoferóis, esteróis e pigmentos (AKOH e MIN, 2002).

É com base na solubilidade que os lipídios são extraídos industrialmente de grãos oleaginosos com hexano (REVERCHON e DE

MARCO, 2006), e também são separadas as frações lipídicas de outras matrizes com clorofórmio ou metanol (OETTERER, REGITANO-D'ACE e SPOTO, 2006). O inconveniente das extrações com solvente é a necessidade de eliminação do solvente após o processo. O dióxido de carbono supercrítico também é um bom solvente para extrair compostos lipossolúveis, como óleos de sementes oleaginosas, e propicia (dependendo das condições utilizadas) altos rendimentos (BRUNNER, 1994; 2005; SAHENA *et al.*, 2009).

As unidades fundamentais dos triacilgliceróis são os ácidos graxos (AG). Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos, possuem uma cadeia hidrocarbonada e um grupo carboxila terminal (parte polar da molécula). Podem apresentar de 4 a 30 átomos de carbono, ser saturados (ligações simples) ou insaturados (duplas ligações). A Tabela 4 apresenta os ácidos graxos mais comuns encontrados em óleos vegetais. Os insaturados diferem na posição e quantidade das duplas ligações (BOBBIO e BOBBIO, 1989; AKOH e MIN, 2002; OETTERER, REGITANO-D'ACE e SPOTO, 2006; VISENTAINER e FRANCO, 2006; SAHENA *et al.*, 2009).

**Tabela 4:** Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados mais comuns encontrados em óleos vegetais.

Ácido graxo	Nº de carbonos e insaturações	Estrutura
Mirístico	C14:0	
Palmítico	C16:0	
Estearíco	C18:0	
Oleico	C18:1	
Linoleico	C18:2	
Linolênico	C18:3	
Araquídico	C20:0	
Gadoleico	C20:1	
Behênico	C22:0	

Embora os ácidos graxos ocorram em quantidades muito grandes como blocos construtivos dos lipídios naturais saponificáveis, eles ocorrem apenas em traços na forma livre (não esterificada). No entanto,

em alimentos armazenados e/ou submetidos ao processamento, o teor de ácidos graxos livres pode ser encontrado em níveis elevados (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Para obter os ácidos graxos na forma livre é necessário realizar reações de hidrólise e saponificação, seguida de uma acidificação. É desta maneira que se procede a metilação para identificação dos ácidos graxos (OETTERER, REGITANO-D'ACE e SPOTO, 2006). Os ésteres metílicos apresentam maior volatilidade e são os compostos analisados na identificação e quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Os ácidos graxos também são compostos de importância nutricional e podem ser classificados em dois grupos baseado na capacidade do ser humano sintetizá-los. Ácidos graxos essenciais não podem ser sintetizados pelo corpo humano e precisam ser supridos na alimentação e os não essenciais, como ácido oleico, podem ser sintetizados no corpo (SAHENA *et al.*, 2009). As dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados, como o  $\omega$ -9 (por exemplo, o oleico), tem efeito benéfico na proporção de lipoproteína de alta densidade (HDL), que é um indicador do risco de doença coronariana (BRASIL, 2012). Os ácidos graxos essenciais poli-insaturados como  $\omega$ -3 (por exemplo, o linolênico) e  $\omega$ -6 (por exemplo, o linoleico), são importantes para funções celulares normais, e atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônicos, eicosapentaenoico e docosaenoico, que fazem parte de numerosas funções celulares como a integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana e síntese de eicosanoides como as prostaglandinas (MANHEZI, BACHION e PEREIRA, 2008).

### 2.2.1 Oxidação Lipídica

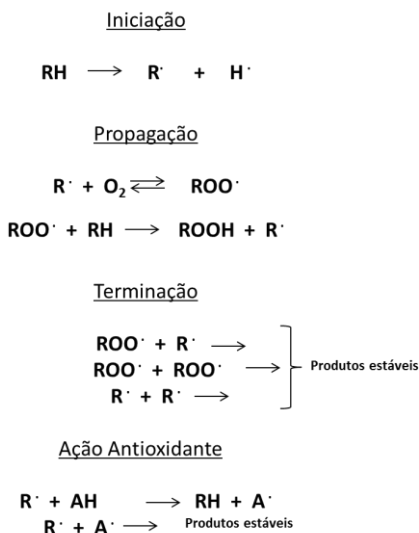
A principal causa da deterioração de óleos vegetais é a rancificação, que resulta no desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis e leva à rejeição do alimento, reduzindo seu tempo de comercialização (OETTERER, REGITANO-D'ACE e SPOTO, 2006; PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006; RAMALHO e JORGE, 2006).

A rancidez pode ocorrer por via hidrolítica (enzimática ou não enzimática) ou oxidativa (foto-oxidação e auto-oxidação). A rancidez hidrolítica enzimática ocorre devido à ação das enzimas lipases,

presentes nas sementes oleaginosas ou lipases de origem microbiana e a não enzimática se dá em altas temperaturas, ambas produzindo ácidos graxos livres (RAMALHO e JORGE, 2006).

A oxidação ou rancidez oxidativa envolve o ataque do oxigênio atmosférico, ou dissolvido no produto, à porção insaturada dos ácidos graxos presentes nos óleos e gorduras, sendo favorecida por altas temperaturas, incidência de luz, presença de metais pró-oxidantes e altas concentrações de duplas ligações (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006; RAMALHO e JORGE, 2006). Os sítios reativos das moléculas lipídicas são a ligação carboxílica e as duplas ligações. Por isso quanto maior o grau de insaturações do ácido graxo, maior a intensidade da oxidação (OETTERER, REGITANO-D'ACE e SPOTO, 2006). O mecanismo de foto-oxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores (clorofila, mioglobina) (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006).

A Figura 3 (pág. 37) apresenta um esquema da auto-oxidação em lipídios. Os lipídios poli-insaturados se oxidam formando um radical alquil ( $R\cdot$ ) (iniciação). Os radicais alquil reagem com oxigênio para formar radicais peróxido ( $ROO\cdot$ ), os quais reagem novamente com os lipídios para produzir hidroperóxidos (propagação). Estes hidroperóxidos decompõem-se facilmente na presença de metais para produzir os aldeídos. Por fim, os radicais reagem entre si (terminação). Substâncias que podem evitar a oxidação lipídica são os antioxidantes (AH). O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres  $R\cdot$  e  $ROO\cdot$  com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte ( $A\cdot$ ) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO e JORGE, 2006).

**Figura 3:** Esquema geral mecanismo de oxidação lipídica

RH : substrato orgânico; R<sup>·</sup>, ROO<sup>·</sup> : radicais livres; ROOH: hidroperóxido; AH: antioxidante; A<sup>·</sup>: radical inerte

## 2.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes podem ser compostos presentes naturalmente nos alimentos ou empregados como aditivos em produtos processados. Segundo o Codex Alimentarium (1994) antioxidante é um aditivo alimentar que prolonga a vida de prateleira do alimento contra deterioração causada por oxidação. São compostos aromáticos que contém, no mínimo, uma hidroxila, podendo ser sintéticos ou naturais e quando presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (SOUSA *et al.*, 2007).

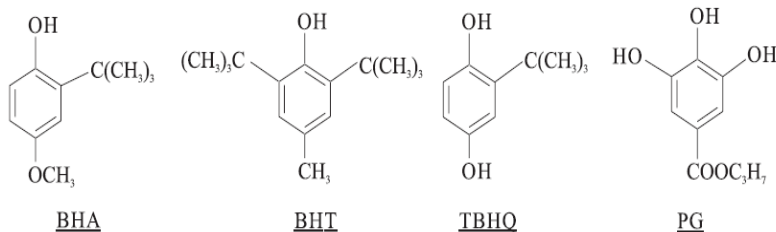
Os antioxidantes podem ser enzimas (superóxido dismutase e catalase), vitaminas (vitamina E, β-caroteno, vitamina C), minerais (selênio vinculado a enzimas) e ácidos fenólicos. São compostos capazes de capturar radicais livres, prevenir doenças do coração, doenças degenerativas, câncer e catarata (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

O mecanismo de ação dos antioxidantes define sua classificação em primários e secundários. Os primários retardam ou inibem as fases de iniciação e propagação da auto-oxidação ao doarem um hidrogênio para estabilizar os radicais livres. Os antioxidantes secundários apresentam diferentes mecanismos de ação, diminuem a taxa de oxidação, mas não convertem radicais livres a compostos estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes, repor hidrogênio de antioxidantes primários, desativar oxigênio singlete e absorver a radiação ultravioleta (AKOH e MIN, 2002).

Os antioxidantes para serem usados em alimentos devem ser baratos, atóxicos, efetivos a baixas concentrações (0,001% a 0,01%), estáveis, capazes de resistir aos processos de industrialização e não deixar sabor, odor ou cor residual (AKOH e MIN, 2002; RAMALHO e JORGE, 2006).

Os antioxidantes primários (Figura 4) mais utilizados em alimentos são compostos sintéticos como Butil-hidroxi-anisol (BHA), o Butil-hidroxi-tolueno (BHT), o Terbutil-hidroxiquinona (TBHQ) e o propil galato (PG) (AKOH e MIN, 2002; RAMALHO e JORGE, 2006; SOUSA *et al.*, 2007).

**Figura 4:** Estrutura de antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos



No entanto, algumas pesquisas têm mostrado que dosagens de 500 mg/kg/dia dos antioxidantes como BHA e BHT provocam alterações lipídicas, enzimáticas e patológicas em ratos e macacos de laboratório. Em alguns casos apresentaram até efeitos cancerígenos (BRANEN, 1975). Por isso, o uso de antioxidantes naturais é uma tendência em aplicações laboratoriais e industriais (DÍAZ\_REINOSO *et al.*, 2006).

Alguns antioxidantes naturais também agem como antioxidantes primários e são comumente utilizados nos alimentos. Os tocoferóis são os mais comuns, seguidos pelos ácidos fenólicos e os carotenoides (AKOH e MIN, 2002; RAMALHO e JORGE, 2006). No Brasil as doses

permitidas de antioxidantes em alimentos são regulamentadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) baseada no Codex Alimentarium. O tocoferol pode ser utilizado em óleos e gorduras a níveis de 0,05 g/100g segundo Codex Alimentarium (1994).

Nas últimas décadas o número de pesquisas sobre antioxidantes naturais aumentou significativamente devido o reconhecimento de seus potenciais benefícios à saúde (FRANKEL e FINLEY, 2008) e devido aos riscos à saúde de compostos sintéticos (FRANKEL, 1996).

Em espécies vegetais podem ser encontrados antioxidantes naturais como os tocoferóis, carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos. Os vegetais produzem uma diversidade de metabólitos fenólicos que rapidamente inibem a oxidação e apresentam potencial para minimizar os efeitos da auto-oxidação (AKOH e MIN, 2002).

Especificamente a noz pecã apresenta em sua composição tocoferóis, como citado anteriormente (item 2.1; pág. 29) e também compostos fenólicos (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

### **2.3.1 Compostos fenólicos**

Compostos fenólicos são encontrados em muitas frutas e vegetais em diferentes estruturas e funções. O vinho tinto e o chá verde, por exemplo, apresentam compostos fenólicos constituídos majoritariamente de flavonoides (antocianinas e flavonóis) (FRANKEL, 1999; MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). Resíduos da agricultura e da indústria são fontes renováveis, baratas e altamente disponíveis de antioxidantes fenólicos (DÍAZ\_REINOSO *et al.*, 2006).

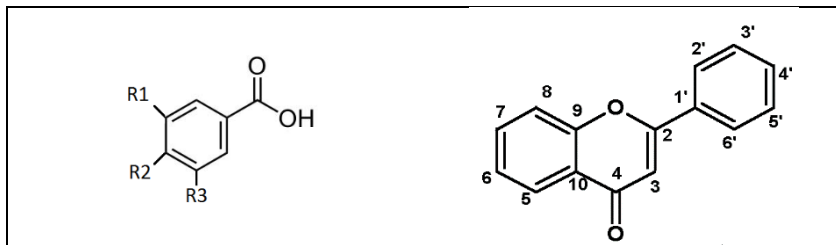
Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula.

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK e SHAHIDI, 2004).

As estruturas apresentadas na Figura 5 são formas genéricas de compostos fenólicos presentes na amêndoa de noz pecã. Por exemplo, o ácido gálico e a catequina, compostos comprovadamente presentes na

noz, apresentam os seguintes substituintes: R1, R2 e R3= OH e 3,5,7, 3' e 4'=OH, respectivamente.

**Figura 5:** Estrutura de antioxidantes naturais: ácido fenólico (esquerda) e flavonoide (direita).



Outros ácidos fenólicos presentes na noz pecã incluem gentísico, vanílico, protocatequico, *p*-hidroxibenzóico e os ácidos *p*-hidroxifenilacético e quantidades vestigiais de ácidos cumárico e siríngico (VENKATACHALAM, 2004).

Muitos compostos fenólicos têm mostrado potencial para uso como antioxidante em alimentos ou até já são usados como tal. Ácidos fenólicos tais como hidroxicinâmicos (caféico, *p*-cumárico, ferúlico, e ácidos sinápico), hidroxicumarina (escopoletina), e os ácidos hidroxibenzóico (4-hidroxibenzóico, ácido gálico, gentísico, elágico, protocatequico, salicílico, e vanílico) são compostos fenólicos cuja atividade antioxidante varia muito e depende também do sistema onde são inseridos (AKOH e MIN, 2002).

Além da aplicação na indústria de alimentos os antioxidantes fenólicos podem ser utilizados na área de cosméticos, especificamente como substitutos para conservantes sintéticos ou como ingredientes ativos para produtos para pele (PESCHEL *et al.*, 2006).

De acordo com várias pesquisas, compostos fenólicos podem inativar radicais livres e são estudados para reduzir a incidência de doenças crônicas, incluindo Alzheimer, Parkinson, alguns tipos de câncer, e outras doenças degenerativas (MEYER, HEINONEN e FRANKEL, 1998; FRANKEL, 1999; AKOH e MIN, 2002).

A extração de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada pela natureza química dos compostos, o método de extração utilizado, o tamanho de partícula da amostra, o tempo e as condições de armazenamento, assim como a presença de substâncias interferentes (NACZK e SHAHIDI, 2004). Estes compostos podem estar



complexados com proteínas e outros componentes das plantas; alguns compostos fenólicos de alto peso molecular e seus complexos podem ser bastante insolúveis. Etapas adicionais podem ser necessárias para a remoção de compostos fenólicos e substâncias indesejadas, não fenólicas, tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (NACZK e SHAHIDI, 2004). A extração de compostos fenólicos livres e esterificados com auxílio de uma etapa de hidrólise ácida ou alcalina pode ocasionar perdas significativas de derivados de ácidos hidroxicinâmicos (KRYGIER, SOSULSKI e HOGGE, 1982).

Metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e, em menor grau, o propanol, dimetilformamida, e suas combinações são frequentemente usadas para a extração de compostos fenólicos (SIMÕES *et al.*, 2003; NACZK e SHAHIDI, 2004).

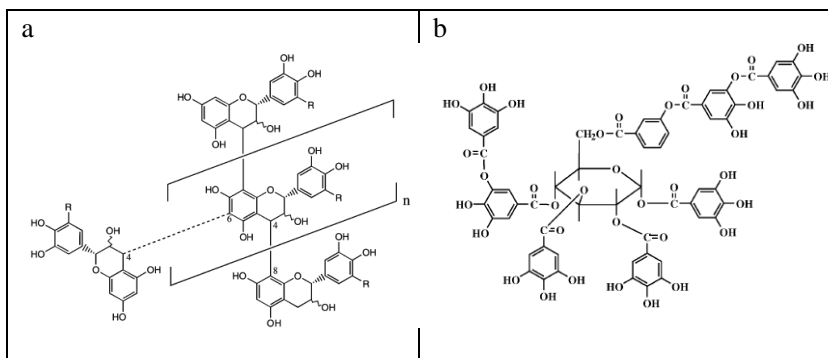
Entre os compostos fenólicos encontrados nas plantas estão os taninos. São substâncias de cores que podem variar do branco ao marrom claro e que contribuem significativamente para sensação adstringente de vinhos, sucos de frutas e chás (BOBBIO e BOBBIO, 1989; SIMÕES *et al.*, 2003).

A presença de taninos condensados (catequina, epicatequina) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico) na amêndoa de noz pecã já foi reportada na literatura (VENKATACHALAM, 2004; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

São classificados em dois grupos, apesar de ambos possuírem uma molécula de poli-hidroxi-fenóis ou seus derivados. O primeiro grupo são os taninos hidrolisáveis, polímeros derivados do ácido gálico e elágico. O outro grupo é encontrado em maior quantidade e de maior importância em alimentos, são os denominados taninos condensados, relacionados à estrutura da catequina (BOBBIO e BOBBIO, 1989).

Os taninos condensados ou proantocianidina compreendem um grupo de oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 6-a; pág. 42) (SCHOFIELD, MBUGUA e PELL, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003). Os múltiplos grupos de compostos hidroxifenólicos propiciam a formação de complexos com proteínas, íons metálicos e macromoléculas como polissacarídeos (BOBBIO e BOBBIO, 1989; SCHOFIELD, MBUGUA e PELL, 2001). Isto e a diversidade de estruturas dos taninos condensados tornam sua análise complicada.

Os taninos hidrolisáveis apresentam um polioli central ( $\beta$ -D-glicose) esterificado com ácido gálico (Figura 6-b).

**Figura 6:** Estrutura de proantocianidina (a) e tanino hidrolisável (b).

Cuidados devem ser tomados para evitar perdas destes compostos. Os métodos de secagem que empregam calor acima de 70°C diminuem consideravelmente a concentração de taninos e outras substâncias fenólicas. A secagem ao ar ou à temperatura ambiente altera os teores de taninos, mas em menor proporção (SIMÕES *et al.*, 2003).

Com relação aos solventes utilizados na extração e separação dos taninos, são recomendados água, acetona, metanol e suas misturas. A acetona bloqueia a associação tanino-proteína, o que não ocorre com o metanol. A inserção de água pode aumentar o rendimento da extração.

A formação do complexo tanino-proteína pode originar artefatos após a extração. Hawker (1968), em seu estudo, sugeriu que as enzimas invertase extraídas de uvas são insolúveis por se tratarem de artefatos de extração, gerados pela formação do complexo tanino-invertase. O autor ainda afirma que outros frutos, que apresentam taninos em sua composição, podem formar o complexo tanino-proteína.

Após a extração os taninos condensados precisam ser mantidos ao abrigo da luz e refrigerados, enquanto que os taninos hidrolisáveis podem ser mantidos na temperatura ambiente (SIMÕES *et al.*, 2003).

## 2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Para obter extratos de matrizes vegetais várias são as técnicas de extrações existentes: destilação por arraste de vapor, extração com solventes como maceração, em Soxhlet, percolação, infusão e as não

convencionais como extração supercrítica, extração com micro-ondas e extração com ultrassom (VINATORU, 2001).

Antes de executar a extração, devem-se levar em consideração as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator e a metodologia (SIMÕES *et al.*, 2003). No presente estudo serão revisadas as técnicas em Soxhlet, com ultrassom e a extração supercrítica.

### **2.4.1 Extração a Baixa Pressão**

As extrações a baixa pressão (EBP) são extrações realizadas a pressão atmosférica com solventes.

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças à seletividade que é possível extrair apenas as substâncias desejadas ou maior quantidade das mesmas. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura de solvente que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (SIMÕES *et al.*, 2003).

#### **2.4.1.1 Em Soxhlet**

É utilizada para extrair compostos de sólidos utilizando solventes voláteis e exigindo o emprego do aparelho de Soxhlet. Opera em ciclos de preenchimento do extrator Soxhlet onde se encontra a matriz vegetal. Em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim o processamento possibilita uma extração altamente eficiente (SIMÕES *et al.*, 2003; LUQUE DE CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Segundo Instituto Adolfo Lutz (2008), a determinação de lipídios em alimentos é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes, na forma mais simples extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Estes conjuntos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, as lecitinas, as ceras, os carotenoides, a clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D, óleos essenciais, etc.

A extração em Soxhlet exige muito tempo de extração (horas) e gera quantidades consideráveis de resíduos de solventes no extrato, se comparada outras metodologias de extração de sólidos, como a extração supercrítica (LUQUE DE CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010). Apesar disso, possibilita extrair mais massa de amostra do que a maioria dos métodos mais recentes como extração com micro-ondas, ultrassom ou fluido supercrítico (LUQUE DE CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998).

A amostra em contato com o solvente permanece em temperatura maior que a temperatura ambiente. A solução extrato e solvente pode atingir uma temperatura superior à temperatura de ebulição do solvente. Isto pode acarretar a perda de compostos alvos termolábeis (LUQUE DE CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Devido à alta temperatura empregada na extração pode ocorrer a formação de artefatos. Artefatos são compostos formados durante a extração pela ocorrência de reações químicas envolvendo metabólitos secundários. Entre os processos responsáveis pela formação de artefatos destacam-se, as reações térmicas e as reações de solvólise (ASFAYA *et al.*, 2001; PIZZOLATTI *et al.*, 2002).

#### 2.4.1.2 Com ultrassom

A extração com ultrassom tornou-se uma boa alternativa aos métodos de extração convencionais, devido à sua alta eficiência e baixos consumo de energia e água. Este método tem sido utilizado com sucesso para extrair substâncias bioativas a partir de plantas (RODRIGUES e PINTO, 2007).

A tecnologia de ultrassom aumenta o rendimento da extração de compostos orgânicos, devido o fenômeno de cavitação produzido no solvente. Entre os ciclos de som são produzidas bolhas de gás que cavitam, aumentando a temperatura e a pressão. O fenômeno de cavitação também pode produzir radicais livres e no caso da água radicais hidroxila reativos (PANIWNYK *et al.*, 2001).

O mecanismo da extração com ultrassom na matriz vegetal envolve dois fenômenos físicos. Considerando que o tecido vegetal é composto por células envoltas das paredes celulares, os dois fenômenos são a difusão do solvente pelas paredes das células e o arraste dos compostos para fora das células (VINATORU, 2001).

O rendimento dos compostos de interesse é alterado dependendo do tamanho das partículas em extração, da temperatura e tempo de

extração, do tipo e da razão de solvente empregado e da frequência utilizada (PANIWNYK *et al.*, 2001; VINATORU, 2001; RODRIGUES e PINTO, 2007; RODRIGUES, PINTO e FERNANDES, 2008). Quando altas frequências são utilizadas na extração com ultrassom o rendimento não cresce significativamente, no entanto a degradação dos constituintes do vegetal diminui (VINATORU, 2001).

Segundo Rodrigues e Pinto (2007) o rendimento de compostos fenólicos do pó da casca de coco aumentou significativamente na extração de 60 minutos comparada à extração de 20 minutos. De 5 a 60 minutos quanto maior o tempo de extração, mais compostos fenólicos são extraídos (RODRIGUES e PINTO, 2007; RODRIGUES, PINTO e FERNANDES, 2008).

Assim como a extração em Soxhlet, a extração com ultrassom gera resíduos de solvente que precisam ser recuperados e despejados da forma correta para não causar problemas ao meio ambiente. Resíduos de solvente podem permanecer no extrato, assim, cuidados adicionais devem ser tomados para posterior uso do extrato na indústria farmacêutica ou alimentícia. No caso do ultrassom, ainda existe o inconveniente da filtragem da amostra no final do processo.

Tanto o método em Soxhlet e com ultrassom são baratos e por isso são constantemente utilizados na indústria e em laboratórios (LUQUE DE CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998).

## **2.4.2 Extração Supercrítica**

A extração supercrítica (ESC) surge como alternativa à extração com solventes, que são largamente usados hoje pelas indústrias farmacêutica, química e de alimentos (PEREDA, BOTTINI e BRIGNOLE, 2007). A extração com solventes orgânicos deixa resíduos indesejáveis no produto final (LI, BELLMER e BRUSEWITZ, 1999) e, a tecnologia supercrítica é uma opção para obter os compostos de interesse com um processo com baixos impactos ambientais.

A extração com fluido supercrítico proporciona grandes vantagens sobre as técnicas de extração convencionais. Dentre elas: a ausência de luz e do ar durante o processo de extração reduz a incidência de reações de degradação que podem mais facilmente ocorrer quando se utiliza outras técnicas de extração (PALMA e TAYLOR, 1999). É um processo flexível, devido à possibilidade de modulação contínua do poder de solvatação e seletividade do solvente e também permite a eliminação de solventes orgânicos (REVERCHON e DE

MARCO, 2006). E, além disso, é um processo amigável para o meio ambiente em comparação a outros métodos de extração com solventes ou enzimas para recuperar óleo natural (BRUNNER, 2005).

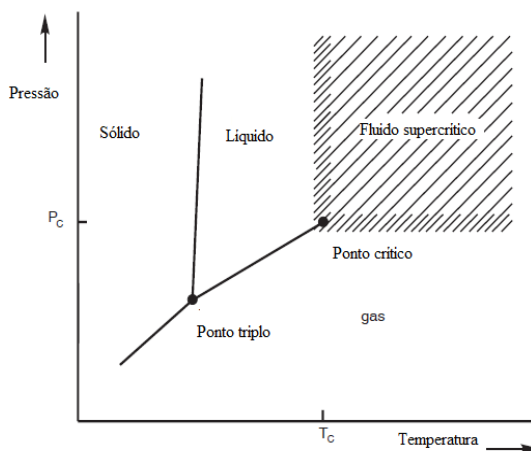
A única grande desvantagem da ESC é o aumento dos custos de investimento, se comparada às técnicas tradicionais de extração à pressão atmosférica (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Apesar disso, é um dos poucos processos que apresentam capacidade de produzir produtos isentos de solventes e de lidar com material de alta viscosidade (BRUNNER, 2005).

O método de ESC permite recuperar os aromas naturais de vários tipos de modo bastante eficiente e, atualmente, é o método de escolha para extração industrial de óleos voláteis (SIMÕES *et al.*, 2003). ESC também é usada para extrair produtos naturais com potencial antitumoral, anti-inflamatório e antibacteriano (PALMA *et al.*, 1999; BISCAIA e FERREIRA, 2009; MICHIELIN *et al.*, 2009; SAHENA *et al.*, 2009; PARISOTTO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Processos de extração supercrítica são realizados em grande escala na indústria de alimentos. São exemplos a descafeinização dos grãos de café e de folhas de chá preto, produção de extrato de lúpulo e também para extração de compostos aromáticos e de especiarias (BRUNNER, 1994; 2005).

Trata-se de uma tecnologia de separação que utiliza um solvente no estado supercrítico. Uma substância pura se encontra no estado supercrítico quando sua temperatura e pressão estão acima dos valores críticos, acima do ponto crítico (BRUNNER, 1994). A Figura 7 (pág. 47) apresenta um diagrama de fases de uma substância pura adaptado de BRUNNER (1994).

**Figura 7:** Diagrama de Fases de uma substância pura,  $T_c$  temperatura crítica e  $P_c$  pressão crítica.



\*Adaptado de BRUNNER (1994).

No caso de uma mistura, a mesma se encontra no estado supercrítico se a pressão, a temperatura e a composição garantem seu estado além do ponto crítico. No ponto crítico as fases gasosa e líquida de um componente se tornam idênticas, as fases coexistem (BRUNNER, 1994).

Para atingir o ponto crítico, ou manter a mistura acima do ponto crítico, um solvente de extração precisa ser pressurizado para proceder a ESC. Dióxido de carbono é o solvente mais comum utilizado em ESC para aplicações em alimentos. Não é apenas barato e acessível em alta pureza, mas também seguro para manuseio e fisiologicamente, pois se apresenta em baixos níveis no alimento (porque é facilmente removido por uma simples expansão para a pressão atmosférica do meio, solvente de baixa temperatura crítica). Conseqüentemente, é aprovado para processamento de alimentos sem necessidade de declaração (SIMÕES *et al.*, 2003; BRUNNER, 2005; REVERCHON e DE MARCO, 2006; SAHENA *et al.*, 2009). A pressão e temperatura críticas do  $\text{CO}_2$  são 7,38 MPa (73,8 bar) e 304,15K (31,97°C), respectivamente (REID, PRAUSNITZ e POLING, 1989; BRUNNER, 1994).

Selecionado o solvente procede-se a extração em condições pré-estabelecidas. As variações de parâmetros de extração como pressão, temperatura, tempo e vazão do solvente determinam a composição dos

extratos e também o rendimento global da extração. Assim, após estudo dos parâmetros de extração e sua influência no rendimento e composição dos extratos pode-se determinar condições de extração onde se obtém maior rendimento, aliado ou não, a maior quantidade dos compostos de interesse. Para extração de compostos como fenólicos e terpenos, por exemplo, geralmente são utilizadas pressões entre 150 e 400 bar e temperaturas de 40 a 60 °C (MEIRELES, 2009).

Outros trabalhos sobre extração supercrítica de noz pecã já foram publicados. Nestes estudos os autores buscavam: aperfeiçoar a extração do óleo e propor um modelo para quantificar o teor inicial de óleo nas nozes e o coeficiente de difusividade da extração (ALEXANDER, BRUSEWITZ e MANESS, 1997); desengordurar a noz pecã para aumentar sua vida de prateleira (ZHANG *et al.*, 1995); executar uma extração que reduza a quebra das nozes efetuando diferentes pré-tratamentos (LI, BELLMER e BRUSEWITZ, 1999); obter e analisar ácidos graxos das nozes com extração supercrítica e com análise por cromatografia (MANESS *et al.*, 1995).

As propriedades como viscosidade, densidade, condutividade térmica do fluido supercrítico variam de forma diferente de um líquido, gás ou sólido. Pode-se afirmar que as propriedades do fluido supercrítico são similar a de gases e líquidos. Apresentará alta densidade (líquido), a qual contribui para a melhor solubilização dos compostos, baixa viscosidade (gases), que viabiliza a penetração na matriz de extração sem grandes desgastes (SAHENA *et al.*, 2009).

Durante a transferência de massa no leito de extração formam-se perfis de concentração de extrato no sólido e no solvente. O fluido supercrítico passa através do leito e extrai os componentes até a matriz ser esgotada. A concentração do extrato aumenta na direção deste fluxo (BRUNNER, 1994; 2005). A transferência de massa de componentes solúveis de um sólido ocorre em diferentes passos (BRUNNER, 1994):

- 1) A matriz absorve o solvente supercrítico e outros fluidos (se adicionados à extração). Isto ocasiona o inchaço das membranas e do interior das células do material, diminuindo a resistência ao transporte de massa.
- 2) Em paralelo, os extratos são dissolvidos pelo solvente, sendo que, uma reação química pode ocorrer antes disso.
- 3) Os compostos dissolvidos são transportados para a superfície externa do sólido, sendo a difusão o mecanismo predominante neste caso, e uma mudança de fase pode ocorrer.



- 4) Os componentes são transportados da camada da superfície do sólido para a massa de fluido supercrítico. Ocorre subsequentemente a remoção dos compostos dessa massa de solvente supercrítico.

Analisando os fenômenos acima, nota-se que a solubilidade dos compostos no solvente supercrítico exerce papel fundamental no fenômeno de transferência de massa.

A solubilidade dos compostos no solvente supercrítico depende da pressão de vapor dos compostos e da densidade do solvente supercrítico (BRUNNER, 1994; 2005). A pressão de vapor dos compostos aumenta exponencialmente com a temperatura à pressão constante (BRUNNER, 1994). A densidade do solvente supercrítico pode ser determinada de acordo com a pressão, temperatura e composição do sistema (BRUNNER, 1994; PEREDA, BOTTINI e BRIGNOLE, 2007).

À pressão constante e com aumento da temperatura a pressão de vapor dos componentes aumenta e a densidade do solvente diminui. Enquanto que a temperatura constante e com o aumento da pressão a densidade do solvente aumenta. A maior influência de um destes efeitos caracterizam o fenômeno de retrogradação, que pode ser visualizado pela inversão das isotermas de extração (TEPELLI *et al.*, 2007; MICHIELIN *et al.*, 2009; MEZZOMO *et al.*, 2010).

#### 2.4.2.1 Curva de extração Supercrítica

Durante a extração supercrítica os componentes extraídos são arrastados por um fluxo contínuo de solvente supercrítico. Tanto para o sólido quanto para o solvente essa transferência de massa não é constante e pode ser analisadas por curvas de extração.

As curvas de extração podem ser plotadas em quantidade de extrato *versus* tempo de extração, taxa de extrato *versus* tempo de extração, porcentagem extraída *versus* tempo de extração e também quantidade remanescente de extrato *versus* tempo de extração (BRUNNER, 1994).

Através das curvas de extração (massa de extrato) em função do tempo é determinada a duração da extração até o esgotamento da quantidade de amostra selecionada. Esta curva cinética de extração supercrítica é dividida em 3 períodos conforme descrito por Sovová (1994) e empregado por Ferreira e Meireles (2002), De Campos *et al.*, (2008), Mezzomo, Martinez e Ferreira (2009), Benelli *et al.*, (2010).

- 1) CER-(Constant Extraction Rate) é caracterizado pela transferência de massa constante. Ocorre transição da fase sólida para fluida por convecção. O gradiente desta primeira etapa da curva é a solubilidade de equilíbrio, que limita a taxa de extração (TEMELLI *et al.*, 2007). Resistência externa a transferência de massa: convecção.
- 2) FER-(Falling Extraction Rate) ocorre um decaimento da taxa de extração. O extrato mais acessível (na barreira sólido/fluido) já está esgotando e as resistências à transferência de massa aumentam. Resistência externa (convecção) e interna (difusão).
- 3) DCP-(Diffusion Controlled Period) a difusão (resistência interna) domina a transferência de massa no sólido.

A curva cinética de extração depende dos parâmetros de processo e de todos os fenômenos (distribuição radial do solvente na entrada; distribuição dos sólidos, difusão do solvente) que ocorrem durante a extração (BRUNNER, 1994).

As informações obtidas com as curvas cinéticas possibilitam a comparação de experimentos da mesma matéria-prima e no mesmo equipamento.

#### 2.4.2.2 Extração supercrítica sequencial com cossolvente

Continuando o estudo da extração supercrítica e suas particularidades será parte integrante deste trabalho também a extração sequencial (ESC-S) com cossolvente. Tais processos buscam aperfeiçoar a extração dos compostos desejados e aumentar o rendimento de extração. As operações sequenciais são obtidas variando pressão e/ou temperatura em cada etapa do processo (REVERCHON e DE MARCO, 2006; BISCAIA e FERREIRA, 2009). Sabe-se que com a alteração dos parâmetros de extração altera-se a seletividade do CO<sub>2</sub> para diferentes compostos. Assim, etapas com pressões e temperaturas diferentes visam obter frações diferentes da mesma amostra.

Para um extrato com muitos componentes, uma extração em vários estágios pode gerar diferentes produtos (BRUNNER, 1994), se os componentes apresentarem diferentes polaridades, massa e pressão de vapor (PEREDA, BOTTINI e BRIGNOLE, 2007). Na extração sequencial é possível realizar uma primeira extração operando à baixa densidade de CO<sub>2</sub> (baixa pressão) seguida por uma segunda etapa de

extração com alta densidade de CO<sub>2</sub> (alta pressão) (BISCAIA e FERREIRA, 2009). Cada estágio de extração pode ser delineado com outras condições de processos, até mesmo com solventes diferentes (BRUNNER, 1994).

Palma *et al.* (1999) realizaram extração supercrítica sequencial de sementes de uvas brancas, na condição de 450 bar e 35°C. Na extração duas frações, coletadas separadamente, foram obtidas da mesma massa de amostra. Na extração da primeira fração foi utilizado CO<sub>2</sub> modificado com hexano. Esta fração continha principalmente ácidos graxos, aldeídos alifáticos e esteróis. A segunda fração foi obtida com CO<sub>2</sub> modificado com metanol, e, possuía compostos fenólicos, principalmente catequina, epicatequina e ácido gálico.

A utilização de pequenas quantidades de solvente orgânico pode extrair fenóis das sementes de uva (PALMA e TAYLOR, 1999). A utilização de 10% de etanol como cossolvente aumentou a solubilidade do ácido gálico cerca de 2500 vezes e possibilitou a extração de catequina e epicatequina de sementes de uva (MURGA, BELTRÁN e CABEZAS, 1998).

Além da adição de cossolvente e diferentes etapas de extração também pode ser utilizado o processo de despressurização. A despressurização participa da ESC com o intuito de aumentar a eficiência da extração. A rápida expansão do gás provoca a modificação da membrana celular, aumentando a disponibilidade de substâncias extraíveis pelo solvente (ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2012). É observado que o trajeto percorrido pelos compostos é menor e a transferência de massa aumenta se o material, matriz, é triturado, e suas células destruídas. Isso porque a resistência do transporte pelas membranas diminui ou torna-se irrisório (BRUNNER, 1994).

## 2.5 CONSIDERAÇÕES

Finalizando esta revisão é possível afirmar que a noz pecã é fonte de nutrientes, em maior proporção lipídios e compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são importantes para prevenção da oxidação e na inativação de radicais livres, enquanto que os ácidos graxos são compostos essenciais ao organismo e podem prevenir certas doenças e regular funções metabólicas.

Pesquisas descrevem diferentes técnicas de extração para obter estes compostos da noz. No caso dos lipídios a extração supercrítica e

extração com solventes e no caso dos antioxidantes extrações e fracionamentos com solventes.

A produção de noz pecã e do óleo da mesma vem crescendo no Brasil e com isso os resíduos gerados por essa indústria.

A extração supercrítica é uma tecnologia eficiente para extração de compostos lipofílicos e pode ser eficaz também para extração de compostos antioxidantes dependendo dos parâmetros e coadjuvantes aplicados.

Diante do exposto anteriormente existe um grande interesse em caracterizar a torta de noz pecã e verificar a eficácia das extrações para obtenção dos compostos de alto valor agregado visando valorização deste resíduo agroindustrial.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

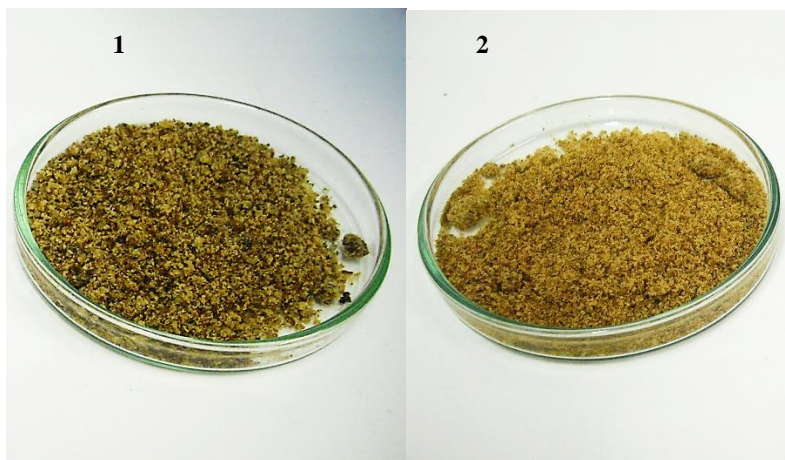
#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram estudadas tortas provenientes da prensagem a frio da noz pecã como segue:

- Torta 1: variedade Mahan, colheita realizada em junho de 2012 e,
- Torta 2: mistura das variedades Barton e Desirable, de colheita realizada no primeiro semestre 2012.

As amostras (Figura 8) foram fornecidas pelas empresas Pecanita do Rio Grande do Sul e Vital Âtman de São Paulo. As empresas enviaram as tortas embaladas a vácuo e protegidas da luz para evitar a oxidação das mesmas durante o transporte.

**Figura 8:** Amostras das tortas de nozes pecã. 1) torta da variedade Mahan e 2) torta da mistura das variedades Barton e Desirable.



Imediatamente após o recebimento, as matérias-primas foram armazenadas protegidas da luz e de oxigênio em freezer doméstico (Cônsul, cvu 300, Brasil) a  $-18^{\circ}\text{C}$ , no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da UFSC.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Caracterização das tortas de noz pecã

As tortas de noz pecã foram caracterizadas através da análise da composição nutricional, presença de taninos, determinação do diâmetro médio das partículas e pelo índice de peróxido, índice de acidez, índice de refração e densidade do óleo das tortas.

#### 3.2.1.1 Composição Nutricional

Os teores de água, de lipídios, de proteína e de cinzas foram determinados no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

##### 3.2.1.1.1 Teor de umidade e compostos voláteis

O teor de umidade e compostos voláteis das amostras foi determinado por método gravimétrico segundo metodologia 950.26 da AOAC (2005). Nesta metodologia foram utilizadas 3 gramas de amostra, balança analítica (Hangping, FA2004), cápsulas de metal, dessecador e estufa (De Leo, Digital 100, Brasil). Primeiramente as cápsulas de metal foram aquecidas a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  por 1h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e suas massas mensuradas. Em seguida pesou-se 3 gramas de amostra em cada cápsula que sofreram aquecimento a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  até que as mesmas não apresentassem variação de massa. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis a Equação (1) foi utilizada.

$$\text{Teor de umidade e substâncias voláteis (\%)} = \frac{100 \cdot mf}{mi} \quad (1)$$

Onde  $mi$  e  $mf$  são massa inicial e massa final da amostra em gramas, respectivamente. Como o experimento foi realizado em triplicada os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

##### 3.2.1.1.2 Teor de lipídios totais

O teor de lipídios foi determinado por extração Soxhlet segundo metodologia 933.05 da AOAC (2005). Primeiramente os balões do equipamento e os cartuchos foram tarados, e em seguida incorporaram-

se as amostras da análise de umidade aos cartuchos. O cartucho com a amostra e o balão com éter etílico foram acoplados ao extrator (Tecnal, TE-044, Brasil) onde se procedeu a extração por 6 horas. A primeira etapa da extração ocorreu a 45°C por 2h e a segunda etapa a 65°C por 4h. Os balões, já sem solvente foram novamente pesados e foi calculado o teor de lipídios pela Equação 2.

$$\text{Teor de Lipídios (\%)} = \frac{100 \cdot m_f}{m_i} \quad (2)$$

Onde  $m_i$  e  $m_f$  são massa inicial de amostra e massa final de lipídios em gramas, respectivamente. Como o experimento foi realizado em triplicada os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.1.1.3 Teor de nitrogênio total

A fração nitrogenada, proteína bruta foi determinada pelo método de KJELDAHL (920.152 da AOAC (2005)). Na primeira etapa 1,3 gramas de amostra e 5g de catalisador ( $\text{CuSO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) sofreram digestão, para degradação dos compostos nitrogenados, durante 4 h a 350°C. Certificou-se que a digestão foi completa pela descoloração da solução escura. Em seguida adicionou-se 50 mL de água destilada e conectou-se o frasco nos sistema de destilação (Tecnal, TE-036/1, Brasil). Procedeu-se com a titulação do meio com uma solução de hidróxido de sódio 50% até obter uma mistura alcalina. Em seguida destilou-se o nitrogênio da mistura que foi coletado em ácido bórico 4% com indicador. Por fim, efetuou-se a titulação com ácido clorídrico 0,1 N para averiguar o teor de nitrogênio.

O Fator de conversão de nitrogênio total em proteína bruta para a noz pecã é 5,3 (USDA, 2001).

Os valores de teor de nitrogênio e teor de proteína foram calculados de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{Teor de nitrogênio (\%)} = \frac{V \cdot f \cdot 0,1 \cdot 14 \cdot 100}{m \cdot 1000} \quad (3)$$

Sendo que  $f$  é o fator de correção para a solução de HCl,  $V$  volume de HCl gasto na titulação e  $m$  massa de amostra.

$$\text{Teor de proteína bruta (\%)} = \text{Teor de nitrogênio} \times 5,3 \quad (4)$$

#### 3.2.1.1.4 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado com mufla (Quimis, Q318.24, Brasil) a 550°C segundo método 940.26 da AOAC (2005). No procedimento as cápsulas de porcelana foram previamente taradas. Em seguida 3g de amostra foram incineradas e então aquecidas em mufla a 550°C até aparecimento das cinzas. Resfriadas em dessecador suas massas foram mensuradas. Para o cálculo das cinzas utilizou-se a Equação 5.

$$\text{Teor de Cinzas (\%)} = \frac{100 \cdot m_f}{m_i} \quad (5)$$

Onde  $m_i$  e  $m_f$  são massa inicial e massa final da amostra em gramas, respectivamente. A determinação foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 3.2.1.1.5 Teor de fibras alimentares

O teor de fibras alimentares (solúveis e insolúveis) foi realizado no Laboratório de Cereais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina segundo método 991.43 da AOAC (2005).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão determinando a composição nutricional das duas variedades de torta.

#### 3.2.1.1.6 Teor de carboidratos

A porcentagem de carboidratos foi calculada pela subtração de todos os teores acima citados, conforme Equação (6).

$$\text{Carboidratos(\%)} = 100 - (\text{águae voláteis} + \text{lipídeos} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{fibras}) \quad (6)$$

#### 3.2.1.2 Determinação do diâmetro médio das partículas das tortas

O diâmetro médio das partículas foi determinado por ensaio em agitador de peneiras (Bertel Metalurgic Ind. Ltda., Caieiras/SP, Brasil) durante 60 minutos com peneiras de 6, 16, 20, 25 e 32 mesh (série Tyler, W.S. Tyler, Wheeling, EUA), em duplicata. As frações retidas em cada



peneira foram pesadas e o diâmetro médio de partículas foi calculado de acordo com as Equações 7 e 8, apresentadas por Gomide (1983).

$$D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}}}{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}^3}}} \quad (7)$$

$$x_i = \frac{M_i}{M} \quad (8)$$

Onde:

$x_i$  = percentagem retida de amostra na fração  $i$ ,

$D_p$  = diâmetro médio superficial das partículas;

$D_{pi}$  = diâmetro da peneira  $i$ ;

$M_i$  = massa de amostras retidas na peneira  $i$ ;

$M$  = massa total nas peneiras;

$n$  = número total de frações.

O diâmetro médio de cada torta foi então expresso pela média  $\pm$  desvio padrão, em milímetro (mm).

### 3.2.1.3 Caracterização do óleo das tortas

O óleo caracterizado foi obtido das tortas por maceração de 7 dias, utilizando solvente hexano na razão 1:5. A caracterização dos óleos das Tortas 1 e 2 e dos óleos Comerciais fornecidos pelas indústrias foi realizada no laboratório de óleos e Gorduras do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 3.2.1.3.1 Índice de acidez

O índice de acidez foi determinado em triplicata de acordo com o método Cd 3d-63 da AOCS (2003), com modificações, e os dados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, em g oleico/100g de amostra.

Na determinação de acidez foram pesadas 7 gramas da amostra homogeneizada, em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Após adição de 3 gotas de solução de fenolftaleína 1%, o óleo pesado foi dissolvido em 125 mL de etanol neutralizado 95%. Por fim, foi realizada a titulação

com solução de hidróxido de sódio 0,01 M, até o aparecimento da coloração rósea, a qual persistiu por 30 segundos.

A Equação 9 é utilizada para realizar o cálculo do índice de acidez .

$$\text{Índice de acidez (g oleico/100 g)} = \frac{(A-B) \times f \times 0,01 \times 56,1}{P \times 2,81} \quad (9)$$

Onde: A = nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra; B = nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação do branco; f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio; P = nº de g da amostra.

### 3.2.1.3.2 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado conforme método Cd 8b-90 da AOCS (2003) e os dados em triplicata foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, em mEq/ kg de amostra.

Foram colocados 5 g da amostra em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com 0,5 mL de solução KI e 50 mL de solução de ácido acético glacial com isoctano 3:2. A solução foi agitada até a dissolução da amostra. Depois de 1 minuto adicionou-se 30 mL de água, 0,5 mL de solução de lauril sulfato de sódio e 0,5 ml de solução de amido. Por fim, titulou-se a mistura com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N (1gota por segundo), agitando constantemente. A titulação cessa quando a solução torna-se branca. A prova em branco sofre os mesmos procedimentos.

A Equação 10 é utilizada para o cálculo do índice de peróxido em mEq por 1000 g de amostra

$$\text{Índice de Peróxido (mEq/kg)} = \frac{(A - B) \times 0,01 \times f \times 1000}{P} \quad (10)$$

Onde: A = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra; B = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco; f = fator de correção da solução de tiosulfato de sódio; P = nº de g da amostra.

### 3.2.1.3.3 Índice de refração

O índice de refração foi determinado em refratômetro segundo método Cc 7-25 da AOCS (1993). Com uma gota de óleo no refratômetro procede-se a leitura do índice de refração pelo nivelamento da linha pontilhada com o limite da zona escura visualizada.

### 3.2.1.3.4 Densidade relativa

A densidade relativa do óleo foi determinada com o auxílio de um picnômetro seguindo a metodologia Cc 10a-25 da AOCS (1995). Na metodologia determina-se a massa do picnômetro vazio, cheio de água e cheio de óleo e então se calcula a densidade relativa do óleo segundo Equação 11.

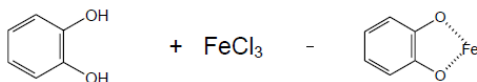
$$\text{Densidade relativa} = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{água}}} \quad (11)$$

Onde  $m_{\text{água}}$  é a massa de água no picnômetro e  $m_{\text{óleo}}$  é a massa de óleo no picnômetro.

### 3.2.1.4 Teste de presença de taninos

As duas amostras deste trabalho também foram submetidas à avaliação da presença de taninos através de ensaio com reagente cloreto férrico descrito por Simões et al. (2007). A presença de taninos condensados e hidrolisados pode ser observada pela adição de solução de cloreto férrico (1% metanol) ao extrato aquoso da amostra em teste. O aparecimento de um halo azul é indicativo de existência de taninos hidrolisáveis, enquanto o aparecimento de um halo verde é indicativo de taninos condensados. Estas cores se desenvolvem devido à complexação das hidroxilas dos compostos fenólicos com a molécula de ferro, conforme Figura 9 (pág. 60). A coloração azul ou esverdeada aparece de acordo com a estrutura da molécula (BOBBIO e BOBBIO, 1989; GRUSZYNSKI, 2002).

**Figura 9:** Complexação do anel fenólico com a molécula de ferro.



Esse ensaio é apenas qualitativo, servindo somente para confirmar a presença das classes de compostos antioxidantes na amostra.

### 3.2.2 Obtenção dos extratos

#### 3.2.2.1 Extrações a baixa pressão

Os métodos utilizados nas extrações a baixa pressão (EBP) foram em Soxhlet e com ultrassom, empregando-se separadamente três solventes de índice de polaridade distintos.

Os solventes selecionados foram os hexano (Synth, 98,5%), o etanol (Synth, 99,5%) e a acetona (Synth, 99,5%), todos P.A. O hexano foi escolhido por ser muito utilizado nas extrações de lipídios, até mesmo nas indústrias (OETTERER, REGITANO-D'ACE e SPOTO, 2006). O etanol e a acetona, além de serem polares, apresentam bons resultados, reportados na literatura, para a obtenção de extratos com atividade antioxidante da noz pecã (SIMÕES *et al.*, 2003; NACZK e SHAHIDI, 2004). Além disso, o etanol é um solvente considerado “verde” para saúde humana (ACS, 2011).

##### 3.2.2.1.1 Extração em Soxhlet

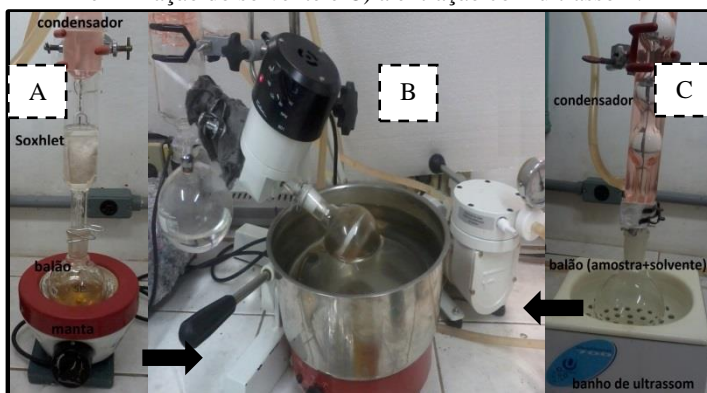
A extração em Soxhlet foi realizada em duplicata com 5 g de torta de noz pecã e 150 mL do solvente orgânico, num aparelho Soxhlet durante 6 horas, tal como descrito pelo método 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Cada extração foi realizada com apenas um dos três solventes.

A estrutura é composta de manta de aquecimento, balão de fundo redondo com solvente, aparelho Soxhlet, cartucho de papel filtro (poro 14  $\mu\text{m}$ ) com amostra, condensador e banho termostático (Micro Química, MQBMP-01, Brasil), como pode ser observado na Figura 10 (pág. 62).

A temperatura do solvente foi mantida próxima da temperatura de ebulição do mesmo, garantindo gotejamento do solvente na amostra com velocidade de 4 a 5 gotas por segundo.

Na Figura 10 são apresentados os aparatos das extrações em Soxhlet (A) e com ultrassom (C) além do esquema de rota-*evaporação* a vácuo (B).

**Figura 10:** A) extração em Soxhlet seguida do B) processo de eliminação do solvente e C) a extração com ultrassom.



### 3.2.2.1.2 Extração com ultrassom

A técnica aplicada foi adaptada de Vinatoru (2001), onde 5 g de torta de noz pecã permaneceram em contato com 150 mL de solvente (hexano, ou etanol, ou acetona) durante 1 hora em banho de ultrassom. A razão entre a massa de amostra e o volume de solvente utilizada na extração com ultrassom foi a mesma utilizada na extração em Soxhlet (1:30).

Como apresentado na Figura 10, a extração foi realizada com solvente e amostra dentro de um balão de fundo chato, inserido em um banho de ultrassom (Unique, Ultra Cleaner 700, Brasil), dimensões internas 10x10x5 cm, com frequência de 55 kHz e um condensador acoplado a banho termostático (Micro Química, MQBMP-01, Brasil). A temperatura atingida pela água do banho após 1 hora de extração foi de 40 °C.

Após a extração, a mistura solvente-amostra foi filtrada em papel filtro (poro 14 µm) para separação da amostra sólida da solução com extrato.

Assim como na extração Soxhlet, os ensaios foram realizados em duplicata.

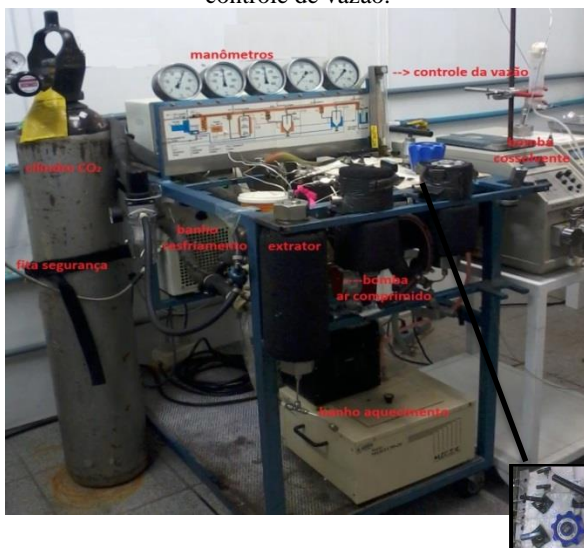
### 3.2.2.2 Extração Supercrítica

#### 3.2.2.2.1 Equipamento de Extração Supercrítica

As extrações supercríticas foram realizadas em uma unidade de extração desenvolvida na Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), na Alemanha, hoje propriedade do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica. O equipamento pode ser visualizado na Figura 11.

O equipamento, já descrito por Zetzl, Lozano e Brunner (2007), consiste em uma coluna de extração, 3 banhos termostáticos (DC30-B30, Thermo Haake, Alemanha; C10 - K10, Thermo Haake, Alemanha; MQBTZ99-20, Microquímica, Brasil), um cilindro com tubo pescador de CO<sub>2</sub> 99,9 % (White Martins, Brasil) pressurizado a 60 bar, tubulação de aço inox de 1/8" e 1/4", manômetros, um multiplicador de pressão hidropneumático (Maximator M111, Alemanha), uma válvula de entrada tipo agulha e duas de controle e descompressão na saída: de ajuste micrométrico (HIP ,10-11NFA-V, Estado Unidos) e macrométrico (HIP, 10-11NFA, Estados Unidos).

**Figura 11:** Equipamento de Extração Supercrítica com detalhe das válvulas de controle de vazão.



Resumidamente segundo Michielin *et al.*,(2005) : o solvente (CO<sub>2</sub>) com a temperatura entre -10°C a 0 °C, para garantir que esteja no estado líquido, é comprimido pela bomba e encaminhado à linha de extração. No início do processo de extração a válvula de entrada no extrator é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO<sub>2</sub> supercrítico para o extrator, onde se encontra a matéria-prima sólida. A tubulação que liga a bomba ao extrator, bem como a tubulação após o extrator e as válvulas são imersas em banho com água a 65°C visando evitar o congelamento da linha e das válvulas de saída durante a despressurização da mistura soluto/solvente. Com o sistema todo despressurizado são abertas as válvulas de saída que permitem a saída do CO<sub>2</sub> do equipamento e também a precipitação do extrato no frasco âmbar.

#### 3.2.2.2.2 Testes preliminares de extração supercrítica

Os testes preliminares de extração visaram determinar o tempo, a vazão de solvente e a massa de sólidos (torta) que seriam utilizadas nas extrações. Assim, para determinar a massa de amostra que seria utilizada foram realizados experimentos com 5g e 10g de amostra em extrações a 200 bar e 40°C com a vazão de  $8 \pm 2$  g/min. A duração das extrações foi de 2h.

Após estipular a vazão de solvente e a massa de amostra foram efetuados testes cinéticos para obter as curvas de extração. Os testes foram realizados a 200 bar e a 50°C com 5g de amostra durante 6h. As curvas cinéticas de extração foram construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração.

#### 3.2.2.2.3 Extração Supercrítica com CO<sub>2</sub> puro

Os experimentos de extração supercrítica com CO<sub>2</sub> puro (ESC) foram realizados no equipamento descrito no item 3.2.2.2.1 (pág. 62) com 5 g de torta de noz pecã, com passagem constante de solvente (CO<sub>2</sub>) pela amostra.

Como já citados nos objetivos os compostos de interesse do presente estudo são os compostos antioxidantes da torta de noz pecã e os ácidos graxos. A literatura afirma que grande parte do teor de óleo presente nas nozes é extraída com temperaturas entre 35°C e 100°C e pressões de 90 a 700 bar (TEMELLI *et al.*, 2007) e também que para a extração de compostos como fenólicos geralmente são utilizadas

pressões entre 150 e 400 bar e temperaturas de 40 a 60 °C (MEIRELES, 2009). Além disso, os triglicerídios que formam a maior parte do óleo de sementes oleaginosas são solúveis no CO<sub>2</sub> supercrítico a temperaturas de 40°C e a pressões maiores de 280 bar (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Com base nestas informações e as fornecidas anteriormente [itens 2.2 (pág.33), 2.3 (pág. 37) e 2.4.2 (pág. 45)] foram selecionadas as temperaturas e pressões de trabalho.

As temperaturas utilizadas foram de 40°C e 50 °C e as pressões de trabalho foram de 100, 150, 200 e 300 bar. Esta série de ensaios foi realizada para a Torta 1 e somente o ensaio que apresentou maior rendimento foi aplicado à Torta 2. Por serem duas amostras de torta de noz pecã acreditou-se não haver necessidade de aplicar todos os ensaios para ambas as tortas.

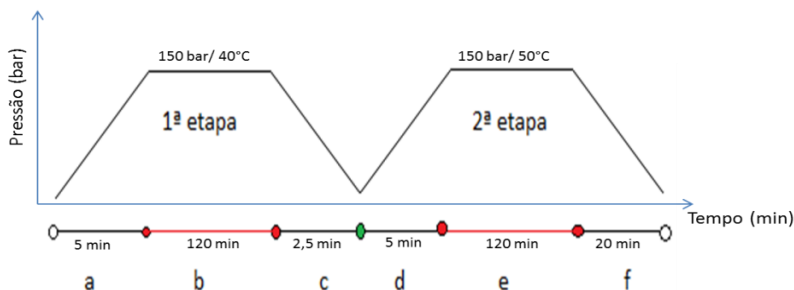
A vazão foi a mesma para todos os ensaios de extração supercrítica, de  $8 \pm 2$  g/min, com um tempo de extração de 4 horas, fixados de acordo com os ensaios cinéticos [item 3.2.2.2.2 (pág. 63)]. O frasco âmbar coletor de extrato foi mantido a 0 °C e abaixo da saída do CO<sub>2</sub> para evitar perdas de óleo.

#### *3.2.2.2.4 Extração Supercrítica Sequencial com Cossolvente*

Na extração supercrítica sequencial com cossolvente (ESC-S) a torta foi extraída em duas condições diferentes de operação. Conforme esquematizado na Figura 12 (pág. 65), primeiramente ocorreu a pressurização do sistema (a), então foi realizada a primeira extração (b). Em seguida para acoplar a bomba de cossolvente no equipamento uma etapa de despressurização (c) foi adicionada. Após uma nova pressurização do sistema (d) foi executada uma segunda extração (e) e por fim uma despressurização final (f).



**Figura 12:** Extração supercrítica sequencial da torta de noz pecã.



(a): pressurização (5 min); (b): extração (2h); (c): despressurização (60 bar/min); (d): pressurização 2ª etapa (5min); (e): extração (2h); (f): despressurização final.

A etapa (b) da ESC-S visou a extração preferencial dos ácidos graxos presente na torta. Considerou-se esta uma etapa para desengordurar a amostra. De acordo com os resultados de rendimento [item 4.3.2 (pág. 86)] e composição de ácidos graxos [item 4.6 (pág. 111)] a condição selecionada para esta etapa foi de 150 bar e 40°C durante 2h.

Antes de prosseguir com a próxima etapa de extração o sistema foi despressurizado. A despressurização (c), após desengordurar a torta, teve a função também de romper as células vegetais facilitando o acesso do solvente. Na despressurização a quebra ou ruptura das células ocorre devido a mudança de fase do CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> na fase líquida preso na matriz sólida expande (efeito Joule-Thomson) causando a ruptura das células (TEMELLI *et al.*, 2007). A taxa de despressurização, 60 bar/min (c), foi definida baseado no estudo de Li, Bellmer e Brusewitz (1999). Esses autores observaram uma maior ruptura das nozes pecãs na extração supercrítica quando despressurizaram o leito de extração de 62 MPa para 2 MPa em 10 minutos do que quando realizaram a mesma despressurização em 20 minutos.

A etapa (e) buscou a obtenção de compostos com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos, e, além disso, extrair o restante do óleo da amostra aumentando o rendimento da extração. Nesta etapa foram utilizadas as condições de 150 bar a 50°C por 2h, onde também foi adicionado um cossolvente. Essa condição de ESC foi selecionada, pois apresentou a maior atividade antioxidante entre os extratos de ESC.

O cossolvente foi inserido no extrator com auxílio de uma bomba de cossolvente (SP Thermo Separation Products, Constametric 3200, Estados Unidos) acoplada ao equipamento ESC descrito no item 3.2.2.2.1 (pág. 62). Após a bomba de cossolvente há uma válvula de retenção que evita o retorno do solvente orgânico, caso ocorra um aumento na pressão da bomba de CO<sub>2</sub> durante o experimento. O cossolvente utilizado foi o etanol a 5 % (m/m) em relação à massa de CO<sub>2</sub> utilizada para a extração de torta de noz pecã. Este solvente foi selecionado com base nos resultados de atividade antioxidante das extrações em Soxhlet e com ultrassom [item 4.4 (pág. 94)] e também por se tratar de um solvente verde.

### 3.2.2.3 Eliminação do solvente orgânico dos extratos

Após os procedimentos de extração em Soxhlet, com ultrassom e ESC-S, as misturas resultantes de cada técnica foram separadas usando um rota-evaporador (Fisatom, 802, Brasil), com resfriamento e controle de vácuo, obtendo-se o extrato.

Para garantir a eliminação de todo o solvente os extratos foram pesados até obtenção de massa constante e também foram inertizados com nitrogênio durante 5 min após a rota-evaporação à vácuo. Na inertização, todo volume do frasco âmbar é preenchido por gás inerte nitrogênio garantindo que o extrato não reaja com compostos como oxigênio e também auxilia na evaporação do restante do solvente, devido aumento do fluxo convectivo de massa no interior do frasco.

Todos os extratos foram armazenados em frascos âmbar a -18°C.

### 3.2.3 Cálculos do rendimento de extração

Todos os experimentos de extração dos sistemas ESC e a baixa pressão foram realizados em duplicata e os rendimentos determinados pela razão entre a massa do extrato obtido e a massa de matéria-prima utilizada (base seca), e apresentados por média ± desvio padrão. As medidas de massas das amostras, dos balões e dos frascos âmbar realizaram-se em balança analítica (Shimadzu, AY220, Brasil).

### 3.2.4 Caracterização dos extratos obtidos

#### 3.2.4.1 Determinação da Atividade Antioxidante dos extratos obtidos

Uma grande variedade de protocolos tem sido usada para avaliar a atividade de antioxidantes (AA) naturais através do uso de sistemas de geração de radicais livres, métodos de oxidação induzida e pela avaliação de pontos finais de oxidação (FRANKEL e FINLEY, 2008).

Neste trabalho foram selecionados três métodos de atividade antioxidantes. Assim, a atividade antioxidante dos extratos obtidos pelas extrações supercríticas e pelos ensaios a baixa pressão foi determinada pelos métodos que utilizam o radical DPPH, o radical ABTS e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Em todos os testes os solventes de diluição possuíam pureza analítica (99,5 %) e os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich.

As atividades antioxidantes dos extratos das tortas foram comparadas com valores da atividade antioxidante do ácido gálico e antioxidante sintético TBHQ. O ácido gálico é um composto fenólico de alto poder antioxidante e o TBHQ um antioxidante sintético utilizado em alimentos como óleos e gorduras.

##### 3.2.4.1.1 Método de captura radical DPPH

O teste foi realizado de acordo com MENSOR *et al.* (2001). O método consiste de uma reação de 30 minutos do radical livre DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hydrazil) com o extrato em solução etanólica.

Inicialmente 0,01 g de extrato de noz pecã foram diluídos em 10 mL de etanol. A solução do extrato foi dividida em tubos de ensaio em concentrações pré-determinadas entre 10 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução DPPH (0,003 g/ 25 mL). Após 30 min de reação a absorvância foi medida a 518 nm em espectrofotômetro (Femto, 800XI, Brasil).

Por ação de um antioxidante o DPPH foi reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção que foi monitorada pelo decréscimo da absorvância (SOUSA *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com a Equação 12 (pág. 69).

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (12)$$

Onde:  $Abs_{amostra}$  é a absorvância lida para a amostra,  $Abs_{branco}$  a absorvância do branco da amostra e  $Abs_{controle}$  é a absorvância do controle.

Os resultados foram expressos como a atividade antioxidante, correspondente a concentração de 500 µg/mL. Como as medidas foram realizadas em triplicata os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Com os dados obtidos foi possível construir uma curva da atividade antioxidante em função da concentração de extrato, e por análise de regressão linear foi calculada a concentração necessária para obter 50 % de atividade antioxidante ( $CE_{50}$ ).

#### 3.2.4.1.2 Método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante a partir do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com o método descrito por Matthäus (MATTHÄUS, 2002).

Resumidamente, 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 20, foram transferidos para um frasco com 1 mL de uma solução de β-caroteno-clorofórmio (3,34 mg /mL). O clorofórmio foi removido por evaporação a 40 °C. Em seguida, 100 mL de água destilada foi adicionada lentamente e agitada vigorosamente para formar uma emulsão estável de β-caroteno. Uma segunda emulsão foi elaborada com os mesmos reagentes da primeira, mas sem o β-caroteno, formando a emulsão de Branco.

Uma alíquota de 5 ml da emulsão de β-caroteno foi adicionada a 0,2 ml de solução de extrato etanólico (1,667 mg / mL) em tubos de ensaio, em triplicata, e a absorvância foi medida imediatamente a 470 nm em espectrofotômetro (Femto, 800XI, Brasil). Procedeu-se da mesma maneira para a leitura da emulsão de branco.

Os tubos foram colocados num banho de água a 50 °C e a absorvância foi medida novamente após 120 minutos. Os valores de absorvância foram convertidos em percentagem de atividade antioxidante calculada pela Equação 13 (pág. 70).

$$AA\% = 100 - \frac{\{[(Abs_{t=0} amostra - Abs_{t=0} branco) - (Abs_{t=120} amostra - Abs_{t=120} branco)]\}}{(Abs_{t=0} controle - Abs_{t=120} controle)} * 100 \quad (13)$$

Onde: Abs (t=0) absorvância da amostra, controle ou branco no tempo zero e Abs (t=120) absorvância da amostra, controle ou branco após 2h.

Como as medidas foram realizadas em triplicata os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante, como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.4.1.3 Método de inibição do radical ABTS

A atividade antioxidante determinada pelo método de inibição do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por RE *et al.* (1999). Trolox foi utilizado como antioxidante referência para construir a curva analítica do método. Trolox, 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, um composto sintético derivado do  $\alpha$ -tocoferol, foi preparado em etanol e estocado como solução padrão (RE *et al.*, 1999; PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

O radical ABTS foi dissolvido em água até a concentração de 7,0 mmol/L, e submetido à reação com 2,45 mmol/L de persulfato de potássio para a formação do radical. A mistura ficou armazenada em refrigerador, protegida da luz, 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS foi diluída em etanol até uma absorvância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm.

Prepararam-se soluções de 20  $\mu$ L de extrato nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000  $\mu$ g/mL em tubos de ensaio em triplicata. Adicionou-se 980  $\mu$ L de solução de ABTS nos tubos de ensaio e após 6 minutos as absorvâncias foram lidas. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Femto, 800XI, Brasil), e a partir delas calculou-se a porcentagem de inibição do radical, conforme Equação 14:

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \left[ \frac{Absf}{Abs0} \right] \cdot 100 \quad (14)$$

Onde: Absf é a absorvância após a adição da solução do radical ABTS na solução de extrato para o tempo de 6 minutos e Abs0 é a absorvância do radical.

Os resultados deste método são expressos como TEAC (capacidade antioxidante equivalente em Trolox do inglês Trolox equivalent antioxidant activity). Para tal, uma curva analítica foi plotada em função da percentagem de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox ( $\mu\text{mol/mL}$ ). Após a obtenção do percentual de inibição do respectivo extrato a atividade antioxidante foi calculada através da Equação 15 com base na curva analítica de Trolox. A curva analítica de Trolox é apresentada no Apêndice A (pág.135).

$$AA(\%) = \frac{Ca}{Ce} \quad (15)$$

Onde: Ca é a concentração ( $\mu\text{mol/L}$ ) referente ao percentual de inibição obtido através das leituras espectrofotométricas do extrato e Ce é a concentração do extrato utilizada na técnica.

A concentração de extrato tomada foi a de  $500 \mu\text{g/mL}$ , para permitir a comparação com a técnica do radical DPPH.

Desta forma, como a análise foi realizada em triplicata, os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol TEAC/g}$ , como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.4.2 Teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais (FT) presente nos extratos de torta de noz pecã foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965; PESCHEL *et al.*, 2006).

Este método foi selecionado por ser bem difundido como método de quantificação de compostos fenólicos (NACZK e SHAHIDI, 2004; SOUSA *et al.*, 2007) aprimorado do método de Folin-Denis e por ser o método mais utilizado para quantificação de compostos fenólicos da noz pecã em outros trabalhos (DO PRADO, 2008; MIRALIAKBARI e SHAHIDI, 2008), possibilitando assim comparações mais fiéis.

Cada um dos extratos testados foi diluído em etanol P.A. na concentração final de  $1,667 \text{ mg/L}$ . A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de  $10,00 \text{ mL}$ , sendo transferido para estes  $10 \mu\text{L}$  de amostra, aos quais foram adicionados  $2 \text{ mL}$  de água destilada e  $0,5 \text{ mL}$  do reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA). Após  $30$  segundos e antes de  $8$  minutos após a adição do reativo, foi adicionado

1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Nuclear, CAQ Ind. e Com. Ltda., Brasil) a 20 % (m/v). Os balões foram aferidos com água destilada até a marca de 10,00 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 2 horas para que a reação ocorresse. A absorvância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (Femto, 800XI, Brasil). O branco realizado com todos os reagentes, substituindo-se a amostra por água destilada também foi lido.

Os valores de absorvância obtidos para cada um dos extratos são correlacionados com uma curva analítica de ácido gálico e o teor de compostos fenólicos total foi determinado através da Equação 16. A curva analítica de ácido gálico é apresentada através do gráfico de absorvância versus concentração de ácido gálico, no Apêndice B (pág. 137).

$$\text{Teor de compostos fenólicos (mg GAE/gext)} = \left\{ \frac{[GAE]}{D_{ext}} \right\} \quad (16)$$

Onde GAE é o equivalente em ácido gálico obtido da curva (mg GAE/L), D: diluição das amostras (gext/L).

A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em mg GAE/g de extrato, como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.4.3 Teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados (TC) foi determinado de acordo com ensaio de vanilina descrito por Villarreal-Lozoya, Lombardini E Cisneros-Zevallos (2007) e adaptado por Do Prado (2008).

O ensaio de vanilina é baseado na condensação do reagente de vanilina com proantocianidinas em soluções acidificadas. A vanilina protonada, um radical eletrofílico fraco, reage com o anel flavonoide na posição 6 ou 8. O produto intermediário desta reação torna-se levemente rosa passando para um tom vermelho formando o produto final da reação (DO PRADO, 2008).

Retiraram-se alíquotas de 1mL do extrato metanólico (1,667 mg / mL) que foram colocados em tubos de ensaio em triplicata. Em seguida adicionou-se 5mL de solução de vanilina (0,5g de reagente e 200 mL de 4% HCl em metanol) às soluções de extrato. Após 20 minutos de reação

fez-se a leitura em espectrofotômetro (Femto, 800XI, Brasil) a um comprimento de onda de 500 nm. O branco do método substitui na solução do extrato a solução 4% HCl em metanol.

Os valores das absorvâncias foram correlacionados a curva analítica de catequina. A curva analítica está no Apêndice C (pág. 139).

Os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina/g de extrato (mg EC/g), como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 3.2.4.4 Determinação do perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa (CG) no Laboratório de Óleos e Gorduras no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os extratos foram metilados em duplicata de acordo com modificações do método descrito por O'FALLON *et al.* (2010). Na metilação em 100  $\mu$ L de óleo foi adicionado 0,7 mL de solução KOH 10 mol/L e 5,3 mL de metanol. Após agitação por 5 minutos em vortex os tubos de ensaios foram incubados em banho-maria a 55°C por 1h30min. Então, adicionou-se 580  $\mu$ L de solução ácido sulfúrico 12 mol/L e os tubos foram novamente incubados em banho-maria a 55°C por 1h30min. Por fim adicionou-se 3mL de hexano e centrifugou-se a mistura para retirar o sobrenadante.

O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo a gás (Shimadzu, 2010, Brasil) equipado com injetor split (razão do Split 1:40), segundo metodologia AOCS (2003) de composição em ácidos graxos, (Ce 1-62). Condições de análise: Cromatógrafo Gasoso Capilar – GC 2010 - Shimadzu. Coluna capilar: HP 88 (88% cianopropil Metilpolisiloxano) de sílica fundida, dimensões 100 m,  $\varnothing$  int: 0.25 mm, 0.20  $\mu$ m filme. Condições de operação do cromatógrafo: split = 1:150; fluxo da coluna = 0,92 mL/min.; temperatura do detector: 260°C; temperatura do injetor: 150°C; temperatura do forno: 140°C – 6 min, 140°C – 240°C (4°C/min), 240°C – 6 min; gás auxiliar (make up gás): nitrogênio; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1.0  $\mu$ L. Cada sobrenadante foi injetado duas vezes no cromatógrafo.

Utilizaram-se os padrões Supelco 15 e 20 totalizando 8 ésteres metílicos. O padrão que melhor coincidiu com os tempos de retenção das amostras foi o padrão Supelco 15.

Os ácidos graxos foram identificados de acordo com o tempo de retenção e a quantidade de acordo com a área do pico integrada no software CG Solution. Através do método de normalização obteve-se a



percentagem relativa de ácido em relação à área total dos ácidos graxos (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Analisaram-se os extratos da ESC e Soxhlet com hexano. Os extratos de ESC foram selecionados de acordo com a densidade do fluido supercrítico.

Os resultados foram expressos em percentagem do ácido graxo, como média  $\pm$  desvio padrão.

### **3.2.5 Análise estatística**

Os testes estatísticos foram realizados no software RGui versão 3.0.1 da *The R Foundation for Statistical Computing* (2013).

A análise estatística, diferença entre médias, nos resultados de caracterização das amostras, foi determinada por Teste t bicaudal.

O rendimento das extrações e a atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de comparação múltipla de Tukey, ambos com nível de confiança de 95%.

Através da ANOVA é possível verificar a presença de diferença significativa entre as médias dos resultados obtidos e pelo Teste de Tukey comparar a média das amostras par a par.

## **3.3 RESUMO DOS ENSAIOS**

A Tabela 5 (pág. 74) apresenta o resumo dos experimentos realizados para o estudo dos diferentes extratos obtidos das tortas de noz pecã. Os ensaios incluem as diversas técnicas de obtenção dos extratos, as análises realizadas para cada extrato, bem como o local de sua realização.

**Tabela 5:** Resumo dos ensaios realizados com as tortas de noz pecã

Experimentos		Análises	Atividade Antioxidante						Teor de Fenólicos				CG	Tratamento		
		Local	LATESC						LATESC				LOG	Estatística		
		Método	DPPH		ABTS		β-caroteno		Fenólicos Totais		Vanilina			Anova		
Extrações		Torta	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2				
Local	Método	Parâmetro														
LATESC	Soxhlet	etanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			X	
		acetona	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			X	
		hexano	x		x		x		x		x		x		X	
LATESC	Ultrassom	etanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			X	
		acetona	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			X	
		hexano	x		x		x		x		x				X	
LATESC	ESC (CO <sub>2</sub> puro) [P(bar)/T(°C)]	100/40	x		x		x		x		x				X	
		100/50	x		x		x		x		x		x		X	
		150/40	x		x		x		x		x		x		X	
		150/50	x		x		x		x		x		x		X	
		200/40	x		x		x		x		x				X	
		200/50	x		x		x		x		x				X	
		300/40	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
		300/50	x		x		x		x		x					X
LATESC	ESC-Sequencial [etapa,P(bar)/T(°C)/modificador]	1 <sup>o</sup> /150/40													X	
		Des-pressurização														X
		2 <sup>o</sup> /150/50/5% etanol	x	x	x	x	x	x	x	x						X

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Os resultados da composição nutricional e de diâmetro médio das partículas das tortas de noz pecã estudadas podem ser observados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Composição nutricional e diâmetro médio das partículas das tortas de noz pecã.

<b>Parâmetro</b>	<b>Torta 1</b>	<b>Torta 2</b>	
Umidade e voláteis (%)	5,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	
Cinzas (%)	1,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,55 ± 0,05 <sup>b</sup>	
Proteína (%)	10,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>b</sup>	
Lipídios (%)	59,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	36 ± 1 <sup>b</sup>	
Fibras	Solúvel (%)	2 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
	Insolúvel (%)	7,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,1 <sup>b</sup>
Carboidratos <sup>1</sup> (%)	13,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	22 ± 2 <sup>b</sup>	
Diâmetro médio das partículas (mm)	0,463 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,505 ± 0,007 <sup>b</sup>	

<sup>1</sup> Obtidos por diferença; Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

De acordo com a análise estatística dos resultados da Tabela 6, realizado segundo procedimento descrito no item 3.2.5 (pág. 73), todos os teores analisados para a caracterização das tortas e também o diâmetro médio das partículas apresentam diferença significativa em nível de 5%.

De acordo com os resultados para o teor de lipídios as tortas apresentaram um elevado teor de óleo remanescente (59,4 e 36% para as Tortas 1 e 2, respectivamente), indicando que os processos de prensagem utilizados nas indústrias apresentaram diferentes rendimentos e não extraíram totalmente o óleo das nozes. Tendo em vista que o teor de óleo da noz pecã é de aproximadamente 70% (VENKATACHALAM, 2004) o rendimento obtido para a extração por prensagem da Torta 1 foi de apenas 11,3%. Oro (2009) relatou um teor de lipídios para a variedade de torta Barton, obtida em prensa hidráulica

em laboratório, de 36,2%, valor semelhante ao obtido para o teor de lipídios obtido para a Torta 2 (36%).

A eficiência da extração por prensagem é bem inferior àquela obtida pelo tradicional método de extração por solvente, sendo afetada diretamente pelas condições iniciais dos grãos, como o teor de umidade e temperatura, e por aspectos construtivos da prensa, como dimensionamento do seu eixo e da gaiola (PIGHINELLI *et al.*, 2008). Baixo rendimento de extração também foi obtido por D'Avila *et al.* (2011), que reportou para prensagem a frio da castanha do Brasil (que originalmente apresentava 64,5% em teor de lipídios) um rendimento de 18,3 %. Em contrapartida a extração por solvente apresentou rendimento de 66,2 %.

O teor de umidade e compostos voláteis determinado para as Tortas 1 e 2 foi de 5,2% e 5,9%, respectivamente. A diferença nos teores de umidade e compostos voláteis pode estar relacionada às diferenças de colheita a colheita, de acordo com as condições e tratamentos pós-colheita (higienização, descascamento), de acordo com a idade e do tratamento pré-extração (condições de armazenamento) (BRUNNER, 1994). Também podem ser identificadas diferenças nos valores de umidade e compostos voláteis para diferentes variedades de nozes que compõe as tortas, como também observado por Venkatachalam (2004), que reportou teor de umidade e compostos voláteis para a variedade de noz pecã Mahan de 4,54% e, para a variedade Desirable de 6,23%.

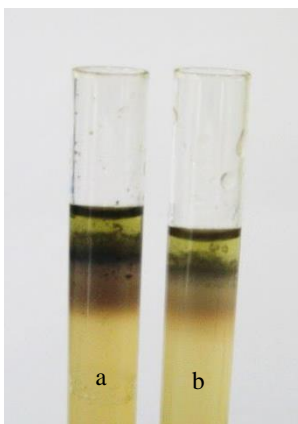
O teor de umidade presente nas amostras de torta pode influenciar a eficiência das extrações. Na ESC, conteúdo alto de umidade age como uma barreira para a difusão do CO<sub>2</sub> supercrítico na amostra, como também para a difusão do óleo para fora da amostra (DUNFORD e TEMELLI, 1997). Por outro lado, a água pode provocar o inchaço das células do material facilitando a transferência de massa. Estudos indicam que a influência do teor de água entre 3 e 10% não tem impacto significativo na transferência de massa de óleos comestíveis de sementes (PEREDA, BOTTINI e BRIGNOLE, 2007). Em estudo da extração supercrítica de nozes pecãs realizado por LI, BELLMER e BRUSEWITZ (1999) os teores de umidade entre 3,5 e 11% não interferiram na quantidade de óleo extraído. Os valores de umidade determinados para as Tortas 1 e 2 (5,2 % e 5,9 %, respectivamente) estão dentro desta faixa, o que descarta a necessidade de secagem do material.

Para os teores determinados de cinzas, proteínas, fibras solúveis e carboidratos a Torta 2 obteve teores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que a Torta 1.

A Torta 1 e Torta 2 já estavam moídas e apresentaram diâmetros de  $0,463 \pm 0,003$  mm e de  $0,505 \pm 0,007$  mm, respectivamente, valores que indicaram diferença significativa ao nível de 5%. Tamanhos de partícula menores aumentam a área superficial de contato do solvente com a amostra e também expõe mais células vegetais ao solvente, facilitando a transferência de massa na extração (BRUNNER, 1994; VINATORU, 2001; TEMELLI *et al.*, 2007). Por outro lado, partículas muito pequenas podem impedir o fluxo do solvente na extração supercrítica por formarem uma barreira densa no leito, e ou, até formarem caminhos preferenciais, dependendo da geometria das partículas (BRUNNER, 1994). Não é o caso de sementes oleaginosas, quando a diminuição do tamanho da semente ou pré-tratamentos (cocção, secagem, aplicação de ultrassom) aumentam a taxa de extração (BRUNNER, 1994). Como as amostras de torta já estavam moídas, as tortas foram utilizadas com os mesmos parâmetros que chegaram ao laboratório.

O resultado positivo no teste de presença de taninos dos extratos aquosos das tortas é um indicativo da qualidade da amostra e da possibilidade de obter compostos antioxidantes nas extrações. Na Figura 13, é possível observar que as duas tortas apresentam taninos hidrolisáveis (halo azul) e taninos condensados (halo verde).

**Figura 13:** Resultado análise detecção de taninos: a- Torta 1; b- Torta 2



Os resultados de caracterização dos óleos das tortas são apresentados na Tabela 7. Os dados foram comparados com os referenciados para o azeite de oliva extravirgem, segundo legislação

vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012), já que o óleo de noz pecã não possui legislação específica, mas apresenta composição em ácidos graxos similar ao azeite de oliva.

**Tabela 7:** Características físico-químicas dos óleos das duas tortas de noz pecã e dos respectivos óleos comerciais.

<b>Propriedade</b>	<b>Torta 1</b>	<b>OC 1*</b>	<b>Torta 2</b>	<b>OC 2*</b>
Acidez (g oleico/100g)	0,78±0,02 <sup>d</sup>	0,68±0,02 <sup>c</sup>	0,33±0,01 <sup>a</sup>	0,58±0,04 <sup>b</sup>
Índice de Peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg)	4,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,5±0,1 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	6,1±0,1 <sup>c</sup>
Densidade relativa (g/cm <sup>3</sup> )	0,9121	0,9153	0,9149	0,9156
Índice de Refração (n <sup>20</sup> <sub>D</sub> )	1,472	1,472	1,474	1,473

\*OC 1 e OC 2 – Óleo Comercial de noz pecã das indústrias fornecedoras das Tortas 1 e 2, respectivamente. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

Conforme dados apresentados na Tabela 7, o índice de acidez obtido para os dois óleos da torta de noz pecã e dos respectivos óleos comerciais está dentro da legislação brasileira para azeite de oliva extravirgem. Segundo legislação a acidez do azeite de oliva extravirgem pode ser menor ou igual a 0,8 g/100g oleico (BRASIL, 2012). Os valores de acidez de todos os óleos analisados estão dentro da legislação internacional Codex Alimentarium (1999) para óleos vegetais virgens e prensados a frio,  $\leq 4$  mg KOH/g ( $2,01 \leq$  g oleico/100g).

Todos os resultados de índice de acidez foram significativamente diferentes conforme análise estatística realizada. O maior índice de acidez foi detectado na Torta 1 de  $0,78 \pm 0,02$  g oleico/100g, enquanto a Torta 2 apresentou valor de  $0,33 \pm 0,01$  g oleico/100g. A diferença nos índices de acidez das duas tortas está relacionada com as condições (exposição ar, a luz e a temperatura ambiente) em que as tortas foram mantidas no manuseio na indústria e durante o transporte até o momento da análise. A estabilidade das amêndoas e dos óleos das nozes dependem diretamente das condições de manuseio na colheita, processamento e armazenamento (BLOCK e BARRERA-ARELLANO, 2010).

Os índices de peróxido determinados foram 4,0 e 4,8 mEq/kg para as Tortas 1 e 2, respectivamente, estão dentro do limite máximo

estabelecido para azeite de oliva extravirgem, 20 mEq/kg (BRASIL,2012) e óleos vegetais virgem e prensados a frio, 15 mEq/kg segundo Codex Alimentarium.

Os resultados de densidade e índice de refração serviram para identificação dos óleos das tortas e estão condizentes com a literatura (AOCS, 1999; BLOCK e BARRERA-ARELLANO, 2010).

#### 4.2 TESTES PRELIMINARES DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Os resultados dos testes preliminares de extração supercrítica (ESC) para avaliar o rendimento de extração empregando diferentes quantidades de amostra são apresentados na Tabela 8.

Conforme explicado no item 3.2.2.2.2 (pág.63), estes são testes preliminares para determinar qual seria a quantidade de amostra utilizada no leito em todas as extrações.

**Tabela 8:** Resultados dos testes preliminares de quantidade de amostra e rendimento das extrações supercríticas.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa de amostra (g)	Tempo (h)	Razão Solvente /amostra m/m	Massa de extrato (g)	Rendimento (%) b.s.
200	40	5	2	199,2	1,97	40,57
200	40	10	2	99,6	2,47	25,04

b.s. – base seca

De acordo com os testes da Tabela 8, nas mesmas condições de extração, utilizando 5 g de amostra obteve-se 40,57% de rendimento, enquanto que com 10g, 25,04%. Esta diferença de rendimento ocorreu, pois a razão entre solvente (CO<sub>2</sub>) e amostra foi maior quando se utilizou 5g de amostra. Com maior razão entre amostra e solvente há maior quantidade de solvente em contato com a amostra, propiciando maior rendimento de extração. Assim, para obter um rendimento de extração maior com 10g de amostra no extrator seria necessária uma vazão de solvente maior, o que acarretaria mais gasto de CO<sub>2</sub>.

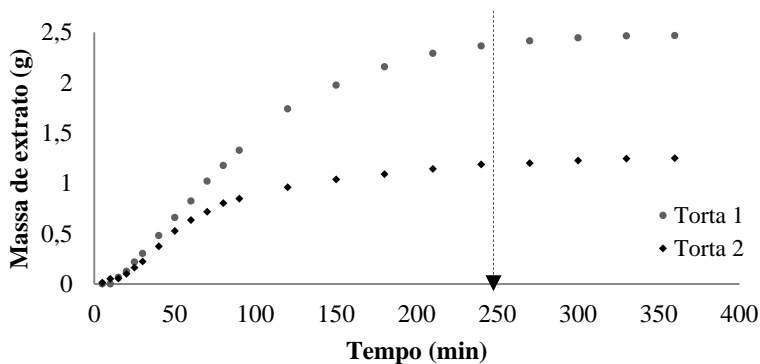
Após os testes, selecionou-se 5 g de amostra (torta) pra realizar as extrações subsequentes, pois com 2 h de extração, obteve-se suficiente massa de extrato para a realização das análises de qualidade dos extratos (análises de atividade antioxidante e cromatográficas). Outro fator considerado foi o tempo de extração, o tempo necessário para exaurir o

soluto da fase sólida é menor com o emprego de 5 g de amostra (comparado com 10 g de amostra) para uma mesma vazão de solvente.

A vazão de solvente foi fixada em 8,3 g/min (4,2 L/min), pois foi possível mantê-la constante durante todo o processo de extração sem provocar acúmulos de material na linha. Além disso, o aumento da vazão de solvente, apesar de possibilitar um acréscimo na taxa de extração, com conseqüente redução do tempo de processo, também ocasiona aumento do custo de operação (BRUNNER, 1994). Na extração com 5 g de torta e vazão de 8,3 g CO<sub>2</sub>/min são gastos 0,996 kg (504L) de CO<sub>2</sub>, assim a razão massa de amostra por massa de solvente é 1:199.

Além destes testes preliminares, também foram realizados os ensaios cinéticos de ESC para ambas as tortas de noz pecã, com a finalidade de determinar o tempo de extração para a seqüência do estudo. A Figura 14 mostra as curvas cinéticas obtidas neste estudo, expressas em massa acumulada de extrato por tempo de extração, em experimento a 200 bar, 50°C, com 5g de amostra e vazão de 8,3g/min.

**Figura 14:** Cinéticas das extrações supercríticas das Tortas 1 e 2.



Cada torta apresenta sua curva cinética, composta pelas etapas de taxa de extração constante (CER), taxa de extração decrescente (FER) e difusional. Como explicado no item 2.4.2.1 (pág. 49) na etapa CER ocorre a convecção do soluto que recobre a matriz (óleo de fácil acesso) da amostra para a fase solvente (CO<sub>2</sub> supercrítico). Na etapa FER além do fenômeno de convecção do soluto restante que recobre a matriz existe também a difusão do soluto para fora da matriz (óleo do interior das partículas, de difícil acesso). Nestas duas etapas iniciais a maior



parte do soluto é extraída. E na etapa difusional ocorre majoritariamente a difusão do soluto de dentro para fora das partículas da torta. O início e o fim de cada etapa da curva cinética ( $t_{CER}$ ,  $t_{FER}$ ,  $t_{DIF}$ ) para as Tortas 1 e 2 pode ser observado na Tabela 9. Tais dados foram averiguados graficamente e também por uma rotina no software SAS 9.0 for Windows.

**Tabela 9:** Dados de tempo e quantidade de extrato das curvas de cinética das Tortas 1 e 2; Pressão=200; Temperatura=50°C; massa leito=5g.

Torta	CER		FER		Difusional	
	t (min)	$m_{ext}(g)$	t (min)	$m_{ext}(g)$	t (min)	$m_{ext}(g)$
1	5-120	1,7404	120-270	2,4151	270-360	2,4674
2	5-90	0,8481	90-240	1,1876	240-360	1,2504

As curvas cinéticas da ESC das Tortas 1 e 2 apresentaram tempos diferentes para a etapa CER e FER, porém são similares. Apesar das etapas terem tempos diferentes, elas se apresentam nas curvas de cinética da Torta 1 e Torta 2 com gradientes de mesma grandeza.

Esta diferença de duração das etapas das curvas de cinética entre a Torta 1 e Torta 2 já era esperada por se tratarem de duas amostras com composição em óleo muito diferente. A Torta 1 possui mais óleo (59,4%) que a Torta 2 (36%) e provavelmente por isso sua curva cinética apresenta tempos maiores para passar de uma fase a outra, é necessário mais tempo de extração para retirar o soluto que recobre a matriz. A curva da Torta 2 atinge a etapa decrescente de extração (FER) em menos tempo, já que de acordo com a caracterização ela apresenta menos óleo disponível.

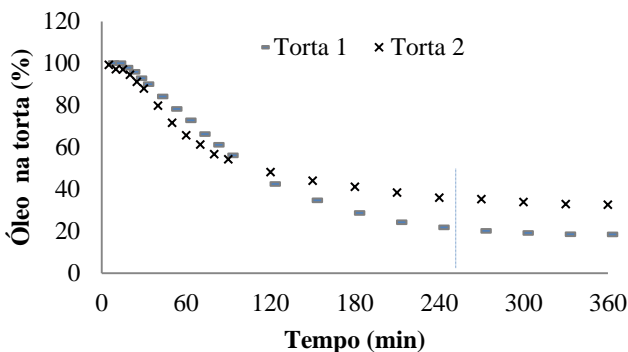
Segundo Meireles (2009), o tempo mais favorável do processo de extração, do ponto de vista econômico está localizado entre a etapa  $t_{CER}$  e a etapa  $t_{FER}$ . Por esse motivo e também para garantir maior rendimento de extração foi selecionado como parâmetro de operação (para os experimentos subsequentes) um tempo de extração no final da etapa FER. O tempo de 240 minutos está no final da etapa FER da Torta 1 e Torta 2. Nas extrações com duração de 4h (8,3 g CO<sub>2</sub>/min) a quantidade de CO<sub>2</sub> utilizada na extração é de 1,992 kg e a razão massa de amostra por massa de solvente é de 1:398.

A massa acumulada de extrato obtida para a Torta 1 no fim de 6 horas de cinética foi de 2,46 g (51,16% de rendimento, em base seca) e para a Torta 2 foi de 1,25 g (25,7% de rendimento, em base seca),

valores compatíveis com o teor inicial de óleo de cada tipo de torta (Torta 1 de 59,4 % e Torta 2 de 36%).

Avaliando-se a quantidade de óleo que permanece na amostra ao longo da extração, como mostrado na Figura 15, verifica-se que a Torta 2, embora tenha menor quantidade de óleo inicial, também retém maior quantidade de óleo após a extração, indicando uma maior resistência a transferência de massa. Isto pode ter acontecido, pela diferença no diâmetro das partículas das tortas. A Torta 1 apresenta diâmetro de partícula menor, facilitando uma maior extração do óleo que a Torta 2. Na Figura 15 também se observa que após as 4 horas de ESC a quantidade de óleo nas tortas não sofre grandes alterações.

**Figura 15:** Quantidade de óleo nas tortas de noz pecã por tempo.



## 4.3 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

### 4.3.1 Extrações a Baixa Pressão

Os valores de rendimento das extrações a baixa pressão (EBP) obtidos pelos diferentes métodos para as Tortas 1 e 2 são apresentados na Tabela 10 (pág. 83).

Os maiores rendimentos foram obtidos pelo método de extração em Soxhlet com etanol ( $69,6 \pm 0,3$  %) e em Soxhlet com acetona ( $64 \pm 3$ %) da Torta 1, e os menores pelo método com ultrassom com etanol ( $36 \pm 3$  %), com acetona  $37 \pm 2$  % e em Soxhlet com acetona ( $41,3 \pm 0,8$ %) da Torta 2.

**Tabela 10:** Rendimento das extrações à baixa pressão em base seca.

Extração	Solvente	IP <sup>1</sup>	Rendimento (%) <sup>2</sup>	
			Torta 1	Torta 2
Soxhlet	Etanol	5,2	69,6 ± 0,3 <sup>e</sup>	56,5 ± 0,5 <sup>bd</sup>
Soxhlet	Hexano	0	61,5 ± 0,4 <sup>cd</sup>	-
Soxhlet	Acetona	5,1	64 ± 3 <sup>de</sup>	41,3 ± 0,8 <sup>a</sup>
Ultrassom	Etanol	5,2	51 ± 3 <sup>b</sup>	36 ± 3 <sup>a</sup>
Ultrassom	Hexano	0	55 ± 2 <sup>bc</sup>	-
Ultrassom	Acetona	5,1	60 ± 2 <sup>cd</sup>	37 ± 2 <sup>a</sup>

1 Índice Polaridade dos solventes (MARKOM *et al.*, 2007).

2 Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

- Não avaliada

Para as extrações da Torta 2 só foram utilizados os solventes acetona e etanol, pois apresentaram bons rendimentos para a Torta 1 e são bons solventes para extração de compostos fenólicos, conforme literatura [item 2.3.1 (pág. 39)]. Os solventes de maior polaridade (etanol e acetona) além de extrair grande parte do óleo da torta também extraíram os compostos polares da torta de noz pecã. O solvente apolar hexano, no entanto, extraiu o óleo da noz e não a fração polar. Por isso, nas extrações em Soxhlet o hexano apresenta menor rendimento.

De acordo com análise estatística, os rendimentos das EBP da Torta 1 com acetona e hexano não diferem significativamente. Nas extrações com ultrassom da Torta 1, por exemplo, o maior rendimento foi obtido com o uso do solvente acetona (60 ± 2 %) que não apresenta diferença significativa em relação ao rendimento obtido para o hexano (55 ± 2 %). Na extração por ultrassom o rendimento obtido com o solvente hexano e etanol também não apresentaram diferença significativa.

Os rendimentos de extração obtidos com a Torta 1 foram maiores que os da Torta 2, justamente por esta última apresentar menos óleo, como já avaliado na caracterização.

Os rendimentos obtidos pelas extrações com a Torta 2 em Soxhlet e com ultrassom com acetona e com ultrassom com etanol não apresentaram diferença significativa, sendo que o maior rendimento foi obtido na extração em Soxhlet etanol, 56,5 ± 0,5 %. O maior rendimento com solvente etanol também foi verificado por Do Prado (2008) na extração da torta de noz pecã variedade Barton desengordurada. No trabalho de Do Prado (2008) a extração com etanol obteve rendimento (5,7%) superior a acetona (3,5%), porém menores que a água (20,2%).

O etanol apresenta a maior polaridade dos solventes utilizados, isto e a alta temperatura utilizada na extração em Soxhlet propiciaram maiores rendimentos na extração em Soxhlet com etanol da Torta 2.

A extração de pecãs com hexano, realizada por Miraliakbari e Shahidi (2008), resultou em  $71,5 \pm 0,4$  % de rendimento e para a utilização de solventes polares, como o clorofórmio-metanol, obteve  $73,4 \pm 0,3$  %. Para estes autores, os rendimentos foram mais elevados do que os obtidos neste trabalho, porque as amostras foram nozes pecãs e, assim, o material ainda não havia sofrido nenhum processo de extração.

Nas EBP o método em Soxhlet apresentou os resultados mais elevados de rendimento em comparação com o processo de Ultrassom para o mesmo solvente orgânico. Isto ocorre porque a extração em Soxhlet opera em ciclos de extração onde o solvente sempre atinge a amostra renovado e limpo e, assim, apresenta maior rendimento que outras extrações, como ultrassom, micro-ondas (LUQUE DE CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998).

A utilização de diferentes solventes na técnica de ultrassom não ocasionou grandes diferenças de rendimento. A técnica utilizou temperaturas mais baixas que a metodologia em Soxhlet, mas a mesma razão amostra/solvente. Na técnica de extração por ultrassom Vinatoru (2001) explica que a frequência das ondas ultrassônicas provoca aumento do rendimento da extração, se comparadas a técnicas sem este tipo de onda. Porém, isso não foi observado neste trabalho. Outros autores observaram esse aumento de rendimento pela utilização de ultrassom, como é o caso de Zhang et al. (2008) no uso de ultrassom na maceração de sementes de linho com hexano. Na extração da torta de noz pecã do presente trabalho a recirculação do solvente apresentou um efeito maior no rendimento de extração que as ondas ultrassônicas.

Sendo assim, a diferença nos resultados da EBP apresentados na Tabela 10 (pág. 83) indica que a recirculação de solvente teve influencia no rendimento do processo. Apesar dos maiores rendimentos obtidos na extração em Soxhlet, existe a desvantagem das altas temperaturas (no balão onde estão o extrato e o solvente) que podem destruir compostos termolábeis, e, além disso, o tempo de extração foi de 6 horas enquanto que o processo com ultrassom foi realizado em apenas 1 hora.

A avaliação da diferença estatística entre os rendimentos obtidos com extrações das Tortas 1 e 2 também foi realizada pelo teste de Anova multifatorial em nível de significância de 5%. Considerando somente as extrações realizadas com ambas as tortas, no caso em Soxhlet e com ultrassom com Acetona e Etanol.

O resultado da análise é apresentado na Tabela 11, com os efeitos do tipo de extração (em Soxhlet ou com ultrassom), tipo de solvente (etanol ou acetona) e variedade de torta (Torta 1 e Torta 2) sobre o rendimento da extração. Também são apresentadas as interações entre os efeitos. Na Tabela 11 são expostos a soma dos quadrados, os graus de liberdade de cada fator (que possuem dois níveis) o valor de F e o p valor.

**Tabela 11:** Anova multifatorial dos dados de rendimento das extrações realizadas com as Tortas 1 e 2.

	SQ	GL	Valor F	p valor
a Tipo de extração	544,01	1	124,27	$3,75 \cdot 10^{-6}$
b Tipo de solvente	36,91	1	8,43	0,019
c Tipo de torta	1345,74	1	307,41	$1,14 \cdot 10^{-7}$
Interação a e b	226,09	1	51,64	$9,37 \cdot 10^{-5}$
Interação a e c	1,48	1	0,337	0,57
Interação c e b	76,95	1	15,58	0,00302
Interação a, b e c	0,36	1	0,0832	0,780
Resíduo	35,02	8		

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade.

De acordo com a análise estatística os fatores com valores de  $p < 0,05$  apresentam efeito significativo. Sendo assim, foi observada diferença significativa nos dados de rendimento devido efeito do tipo de extração, tipo de torta e tipo de solvente. Ou seja, estes fatores interferem no rendimento da extração. Portanto, quando uma extração da torta de noz pecã for realizada, o tipo de extração, tipo de solvente e a procedência (tipo) da torta selecionada terão influência no rendimento final da extração.

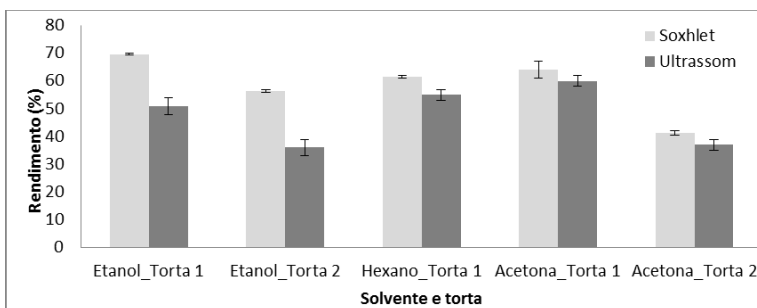
A mesma conclusão pode ser obtida quando são consideradas as interações entre o tipo de extração e tipo de solvente e também a interação entre tipo de solvente e tipo de torta. Com esses resultados é possível concluir que o rendimento obtido em um determinado tipo de extração também depende do tipo de solvente e vice versa. E que, o rendimento obtido por um tipo de solvente também depende do tipo de torta empregada.

É importante observar que o efeito do tipo de solvente foi menos significativo, fato já observado na discussão dos resultados de rendimento anterior, quando a utilização de hexano e acetona na ultrassom não ocasionou diferença significativa nos rendimentos.

A interação entre os três fatores não foi significativa ( $p$  valor = 0,78), pois a interação entre a variedade de torta e tipo de extração também não foi significativa.

Os efeitos dos diferentes fatores expostos também podem ser observados na Figura 16, onde são apresentados os gráficos das médias com desvio padrão das extrações a baixa pressão das Tortas 1 e 2.

**Figura 16:** Média rendimentos das extrações a baixa pressão utilizando acetona e etanol da Torta 1 e Torta 2 .



É possível observar na Figura 16 que as extrações com ultrassom apresentam menor rendimento que a extração em Soxhlet. Porém, no caso da utilização da acetona os rendimentos entre as extrações com ultrassom e em Soxhlet estão bem próximos e não apresentam diferença significativa [Tabela 10 (pág. 83)]. A maior diferença nos rendimentos ocorre na utilização do etanol nas extrações com ultrassom e em Soxhlet.

#### 4.3.2 Extração Supercrítica

Os resultados de rendimento de extração supercrítica (ESC) obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão são apresentados na Tabela 12, assim como a variação da densidade do  $\text{CO}_2$  de acordo com Mukhopahyay (2000).

Os rendimentos mais altos foram obtidos com a pressão de 300 bar a  $40^\circ\text{C}$  ( $58,4 \pm 0,2$  %) e a  $50^\circ\text{C}$  ( $58 \pm 1$  %). Os menores rendimentos foram obtidos a 100 bar a  $40^\circ\text{C}$  ( $3,3 \pm 0,8$  %) e a  $50^\circ\text{C}$  ( $0,123 \pm 0,003$  %). Todos estes rendimentos foram obtidos somente com a Torta 1, conforme descrito no item 3.2.2.2.3 (pág. 63).

**Tabela 12:** Rendimento das extrações supercríticas em base seca.

Pressão (Bar)	Temperatura (°C)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>1</sup>	Rendimento b. s. (%) <sup>2</sup>	
			Torta 1	Torta 2
100	40	0,630	3,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	-
150	40	0,747	33 ± 2 <sup>c</sup>	-
200	40	0,829	50 ± 1 <sup>e</sup>	-
300	40	0,928	58,4 ± 0,2 <sup>f</sup>	32 ± 1 <sup>c</sup>
100	50	0,386	0,130 ± 0,003 <sup>a</sup>	-
150	50	0,655	18 ± 1 <sup>b</sup>	-
200	50	0,762	45 ± 2 <sup>d</sup>	-
300	50	0,879	58 ± 1 <sup>f</sup>	-

<sup>1</sup> Densidade do CO<sub>2</sub> Mukhopahyay (2000).

<sup>2</sup> Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os rendimentos em nível de significância a 5%.

- Não avaliada

Estes resultados obtidos indicam que o aumento do rendimento ocorreu com aumento de pressão e decréscimo da temperatura. Isto foi provocado pelo aumento da densidade do CO<sub>2</sub>, para maiores densidades do solvente maiores os rendimentos. Tal resultado é explicado pelo poder de solvatação do CO<sub>2</sub> que é dependente da densidade do solvente, aumenta com a pressão a uma temperatura constante e diminui com o aumento da temperatura a uma pressão constante (BRUNNER, 1994).

A extração de outras tortas industriais, como a torta de palmiste, também aumentam com a pressão (RAHMAN *et al.*, 2012).

Em estudos desenvolvidos com ESC de noz pecã (ZHANG *et al.*, 1995; ALEXANDER, BRUSEWITZ e MANESS, 1997) o aumento do rendimento também foi observado com o aumento da pressão, entre 413 bar e 668 bar, a uma temperatura constante. No estudo destes autores os rendimentos para as temperaturas de 45 °C a 75 °C foram, respectivamente, de 14,34 % e 17,48 % para 413 bar e 21,26 % e 31,53 % para 668 bar (ALEXANDER, BRUSEWITZ e MANESS, 1997).

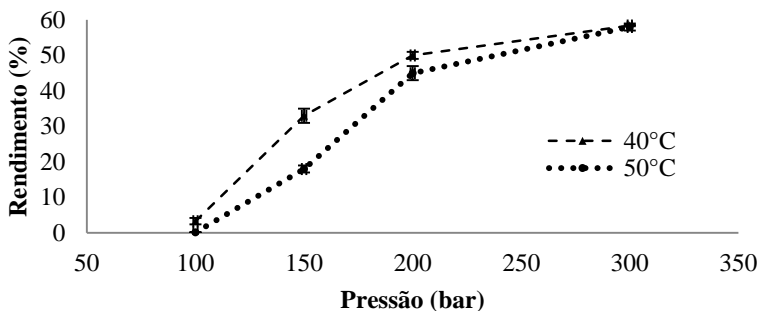
Como já tratado anteriormente somente as extrações que apresentassem maior rendimento com a Torta 1 foram aplicadas à Torta 2. E, justamente pela maior densidade e maior rendimento, a extração de 300 bar e 40 °C foi selecionada para aplicação na Torta 2. O rendimento da Torta 2 (32 %) foi menor que a Torta 1 (58,4 %) nas mesmas condições de ESC. É importante salientar que nesta condição quase todo

óleo das Tortas 1 (percentual de óleo = 59,4 %) e Torta 2 (percentual de óleo = 36%) foi extraído.

Segundo Temelli *et al* (2007) a solubilidade de óleos em CO<sub>2</sub> supercrítico é determinada pela densidade do solvente e a volatilidade dos componentes do óleo. À pressão constante e com aumento da temperatura a volatilidade dos componentes aumenta e a densidade do solvente diminui. Enquanto que a temperatura constante e com o aumento da pressão a densidade do solvente aumenta. A influência predominante de um destes efeitos caracteriza o fenômeno de retrogradação que pode ser visualizado nas isotermas de ESC. As isotermas das extrações da Torta 1 de noz pecã são apresentadas na Figura 17 (pág. 88), plotadas como rendimento da extração *versus* pressão de operação. Com a faixa de valores de temperatura e pressão avaliados não foi possível observar o fenômeno de retrogradação, entretanto, pelo comportamento das curvas pode-se sugerir que o mesmo ocorra em pressões acima de 300 bar.

O fenômeno de retrogradação foi observado entre as pressões de 150 bar e 350 bar e temperaturas entre 40°C e 60°C, por vários autores com matrizes oleaginosas como amêndoa de pêssego (MEZZOMO *et al.*, 2010) e avelã (ÖZKAL, SALGIN e YENER, 2005).

**Figura 17:** Isotermas das extrações supercríticas da Torta 1



A avaliação do efeito da pressão e temperatura nos rendimentos obtidos com extrações supercríticas da Torta 1 também foi realizada pelo teste de ANOVA multifatorial em nível de significância de 5%. O resultado da análise é apresentado na Tabela 13, onde aparecem os efeitos da Temperatura, da Pressão e da Interação entre eles. A temperatura apresentava apenas dois níveis (40°C e 50°C) e a pressão quatro (100, 150, 200 e 300 bar). Na Tabela 13 também estão discriminados os valores de p e de F.



**Tabela 13:** ANOVA multifatorial dos dados de rendimento das extrações supercríticas realizadas com a Torta 1.

	SQ	GL	Valor F	p valor
a Pressão	7532,8	3	2003,283	$7,682 \cdot 10^{-12}$
b Temperatura	152,7	1	121,832	$4,043 \cdot 10^{-6}$
Interação a e b	133,8	3	35,578	$5,652 \cdot 10^{-5}$
Resíduo	10	8		

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade.

Segundo análise os efeitos da temperatura, pressão e interação entre os dois são significativos ( $p < 0,05$ ) para determinar os rendimentos na ESC. Ou seja, os valores de rendimento de ESC dependem da temperatura e da pressão selecionada, e a pressão e temperatura dependem uma da outra também. Através da Figura 17 tem-se a comprovação da existência destes efeitos. As linhas de temperatura não são paralelas, o rendimento obtido em cada pressão não se sobrepõe e as linhas apresentam uma tendência de intersecção, o que explica a interação.

O conhecimento dos efeitos de cada fator e da interação dos mesmos no rendimento da extração possibilita a criação de um modelo linear generalizado.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \epsilon$$

Onde  $y$  é a variável dependente, rendimento, e  $x_1$  e  $x_2$  representam a Pressão e a Temperatura, respectivamente. Considera-se o termo de interação entre a temperatura e pressão e um termo quadrático para a pressão. Como a temperatura apresenta somente dois níveis, não foi considerado um termo quadrático para temperatura.

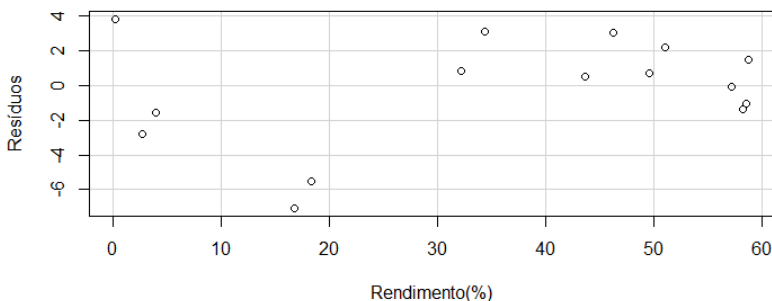
Trata-se de um modelo que pode expressar os dados obtidos neste trabalho. Com o modelo é possível prever rendimentos a serem obtidos dependendo da pressão e da temperatura aplicados ao sistema. O modelo só é válido entre as temperaturas e pressões utilizadas neste trabalho, e é apresentado a seguir.

$$Y = -20,08 + 0,7871 P - 1,263 T - 0,001636 P^2 + 0,00344 PT$$

O valor do  $R^2$  ajustado para o modelo é de 0,9739. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de  $R^2$  maior o ajuste do modelo aos dados.

Esta hipótese de ajuste do modelo pode ser confirmada através da observação do gráfico de resíduos do modelo por valores preditos de rendimento, Figura 18.

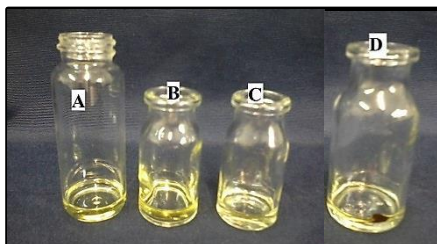
**Figura 18:** Gráfico de resíduos do Modelo para a extração supercrítica de torta de noz pecã (Torta 1).



Na figura 18 (pág. 90), é possível observar que para rendimentos mais altos (acima de 30%), os resíduos apresentam uma dispersão menor (os valores dos resíduos estão mais próximos do eixo 0 e não estão tão dispersos), o que indica melhor ajuste do modelo.

Além da análise do efeito dos parâmetros de extração (pressão e temperatura) sobre os rendimentos de extração também foram avaliadas as características visuais dos resíduos e dos extratos resultantes das extrações. Nos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração das duas tortas puderam ser observadas colorações diferenciadas. Os extratos obtidos da Torta 1 eram mais claros que os obtidos a partir da Torta 2. Nos extratos lipídicos (obtidos por ESC) das Tortas 1 e 2 foi observada uma coloração similar ao óleo comercial de noz pecã. Já nos extratos obtidos com solventes polares (acetona e etanol) nas EBP além da fase oleosa havia uma fase mais resinosa e avermelhada, como pode ser observado na Figura 19.

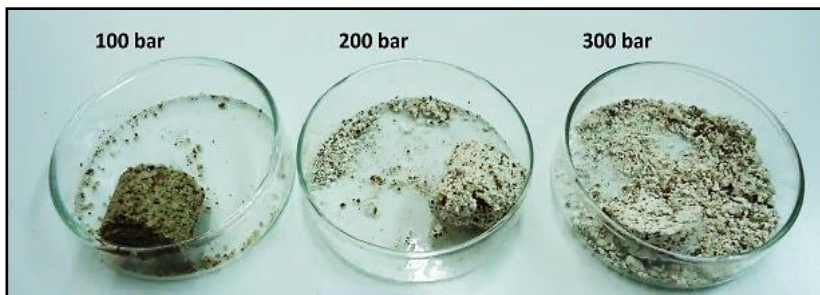
**Figura 19:** Extratos obtidos por ESC e EBP comparados ao óleo comercial obtido na indústria. (A) óleo comercial; (B) ESC Torta 2; (C) ESC Torta 1; (D) EBP solvente polar.



A coloração e a textura dos extratos indicam os tipos de compostos que podem estar presentes neles. Por exemplo, a fase oleosa fluida pode indicar presença de ácidos graxos insaturados e compostos lipofílicos como o tocoferol.

Na Figura 20 (pág. 91) são apresentadas fotos dos resíduos obtidos após a extração supercrítica da Torta 1, realizada em diferentes pressões (100, 200 e 300 bar). É possível observar que com o aumento da pressão ocorre maior descoloração da torta, indicando maior extração dos compostos de cor mais intensa. Zhang *et al.* (1995) realizaram extração supercrítica (utilizando temperaturas de 40 a 100°C e faixas de pressão de 35 a 70 bar e 413,4 a 689 bar) com o objetivo de desengordurar a noz pecã para aumentar a sua vida de prateleira e também observaram uma descoloração da noz residual após a etapa de extração.

**Figura 20:** Resíduos das extrações supercríticas a 100, 200 e 300 bar.

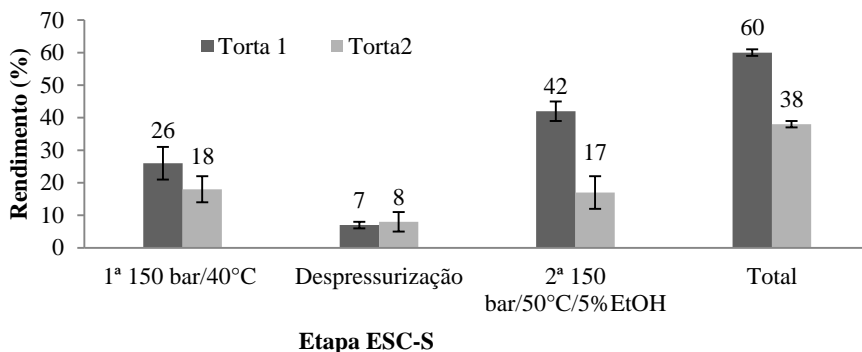


Se avaliarmos os rendimentos das extrações a baixa pressão e os obtidos por extração supercrítica é possível observar que em alguns casos a extração supercrítica obteve rendimentos maiores. A ESC realizada a 300 bar a 40°C da Torta 1 produziu rendimento maior que as EBP com ultrassom utilizando etanol e hexano para a mesma torta. Isto mostra a real possibilidade de utilizar a extração supercrítica como substituta da extração por solventes.

Os resultados de rendimento da extração supercrítica sequencial com cossolvente (ESC-S) são apresentados na Figura 21 (pág. 92). Os rendimentos de cada etapa de extração, como descrito no item 3.2.2.2.4 (pág. 64), e o rendimento total foram detalhados.

Para facilitar a comparação dos resultados foi realizada uma análise variância seguida de teste de Tukey para as ESC-S e outra para comparar com as ESC com CO<sub>2</sub> puro.

**Figura 21:** Rendimentos da extração supercrítica sequencial com cossolvente etanol 5% das tortas de noz pecã.



Na Figura 21 é possível observar que a primeira etapa de extração ( $26 \pm 5\%$ <sup>b</sup>) da Torta 1 apresentou rendimento menor que a segunda etapa ( $42 \pm 3\%$ <sup>c</sup>). O aumento de rendimento ocorre devido a adição de etanol na segunda etapa. A utilização de cossolvente aumenta o rendimento da ESC, como observado por outros autores (BISCAIA e FERREIRA, 2009; BENELLI *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2012).

Os rendimentos obtidos com a Torta 2 não apresentaram diferença significativa nas diferentes etapas de extração  $18 \pm 4\%$ <sup>b</sup> e  $17 \pm 5\%$ <sup>ab</sup>. Esta diferença de comportamento das duas Tortas pode ser explicado pela quantidade de óleo presente na Torta 1 (59,4%) e na Torta 2 (36%). Ao término da 1ª etapa de extração a quantidade de óleo

na Torta 1 no extrator era de  $34\pm 5\%$  e na Torta 2,  $18\pm 4\%$ . Assim é esperado que o rendimento da 2ª etapa da Torta 1 seja maior que da Torta 2, pois havia mais óleo de fácil acesso para ser extraído.

Considerando o rendimento total da ESC-S da Torta 1,  $60\pm 1\%<sup>d</sup>$ , e Torta 2,  $38\pm 1\%<sup>c</sup>$ , é possível observar que a técnica ESC-S proposta apresentou rendimento equivalente a ESC a 300 bar e  $40^\circ\text{C}$  para Torta 1 ( $58,4\pm 2\%<sup>d</sup>$ ) e para Torta 2 ( $32\pm 1\%<sup>bc</sup>$ ), respectivamente, indicando que a utilização do etanol e da despressurização no processo provocaram um rendimento equivalente a uma extração com pressões duas vezes maior.

O rendimento total da ESC-S da Torta 1 foi maior que o obtido na condição 150 bar a  $50^\circ\text{C}$  ( $18\pm 1\%<sup>a</sup>$ ) e a  $40^\circ\text{C}$  ( $33\pm 2\%<sup>bc</sup>$ ) com  $\text{CO}_2$  puro, confirmando o efeito do cossolvente e da despressurização no rendimento. O efeito do etanol é explicado, pois ocorre um aumento de compostos solúveis na mistura etanol/ $\text{CO}_2$ , se comparado a extração com  $\text{CO}_2$  puro. A despressurização causou a expansão do gás do interior das células facilitando a retirada dos compostos da torta. O aumento do rendimento de extração pode ser observado quando são utilizados ciclos de despressurização durante uma ESC (SMITH JR *et al.*, 2003; ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2012) e também após a repressurização como avaliado por Smith Jr *et al* (2003) na separação de casca de castanha-de-caju líquida.

A despressurização na taxa de 60 bar/min apresentou rendimento sem diferença significativa para as duas tortas (Torta 1:  $7\pm 1<sup>a</sup>$ , Torta 2:  $8\pm 3<sup>a</sup>$ ) indicando que o fenômeno de expansão do gás provocou o mesmo efeito nas duas tortas. A despressurização tinha o intuito de causar uma rápida expansão do gás  $\text{CO}_2$ , provocando ruptura das tortas e assim facilitando a retirada de mais óleo.

O aspecto visual dos extratos de ESC-S foi diferente para cada etapa, como pode ser observado na Figura 22.

**Figura 22:** Extratos obtidos na 1ª etapa (esquerda) e 2ª etapa (direita) da ESC-S



O extrato da 1ª etapa tem coloração mais clara que o extrato da 2ª etapa. Esse resultado é indicativo da presença de compostos diferentes em cada fração obtida. Esta diferença na coloração das frações obtidas por ESC-S também foi observada por Palma *et al.* (1999), no fracionamento com de sementes de uva utilizando na ESC-S hexano e metanol como modificadores e por Biscaia e Ferreira (2009) na ESC-S de própolis utilizando diferentes pressões em cada etapa.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

Os resultados de atividade antioxidante (AA) dos extratos da Torta 1 e da Torta 2 obtidos por ESC e EBP são apresentados a seguir para os métodos de captura do radical DPPH, de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e, de inibição do radical ABTS.

##### **4.4.1 Atividade antioxidante obtida pelo método de captura do radical DPPH**

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos das tortas de noz pecã obtidos pelo método de captura do DPPH são apresentados na Tabela 14 (pág.95).

A análise estatística dos dados foi realizada separadamente para extrações EBP e para ESC, tanto para Atividade Antioxidante (AA%) como para  $CE_{50}$ . A Anova e post-hoc Tukey separados facilitaram a identificação da diferença de atividade antioxidante dos extratos.

**Tabela 14:** Resultados para a menor concentração necessária para atingir 50% de atividade antioxidante ( $CE_{50}$ ) e Atividade Antioxidante (AA%) pelo método de captura do DPPH dos extratos das tortas obtidos por diferentes técnicas de extração.

Extração	$CE_{50}$ $\mu\text{g/mL}$		AA % [500 $\mu\text{g/mL}$ ]	
	Torta 1	Torta 2	Torta 1	Torta 2
Soxhlet etanol	414 $\pm$ 12 <sup>g</sup>	238 $\pm$ 2 <sup>e</sup>	58 $\pm$ 1 <sup>γ</sup>	93,5 $\pm$ 0,3 <sup>e</sup>
Soxhlet hexano	>500	-	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>α</sup>	-
Soxhlet acetona	211 $\pm$ 3 <sup>d</sup>	97 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	93,9 $\pm$ 0,2 <sup>e</sup>	93,4 $\pm$ 0,5 <sup>e</sup>
Ultrassom etanol	132,5 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	255 $\pm$ 1 <sup>f</sup>	93,9 $\pm$ 0,3 <sup>e</sup>	91,4 $\pm$ 0,2 <sup>δ</sup>
Ultrassom hexano	>500	-	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>df</sup>	-
Ultrassom acetona	193 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	246 $\pm$ 3 <sup>ef</sup>	93,1 $\pm$ 0,2 <sup>e</sup>	92,6 $\pm$ 0,8 <sup>δc</sup>
ESC 40°C/150bar	>500	-	5 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	-
ESC 40°C/200bar	>500	-	2,2 $\pm$ 0,3 <sup>AB</sup>	-
ESC 40°C/300bar	>500	>500	1,6 $\pm$ 0,4 <sup>AB</sup>	1,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>
ESC 50°C/150bar	>500	-	4,8 $\pm$ 0,1 <sup>C</sup>	-
ESC 50°C/200bar	>500	-	2,9 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>	-
ESC 50°C/300bar	>500	-	1,4 $\pm$ 0,3 <sup>AB</sup>	-
ESC-S 1ª 40°C/150bar	-	-	-	-
ESC-S 2ª 50°C/150bar	>500	>500	1,8 $\pm$ 0,6 <sup>AB</sup>	3,5 $\pm$ 0,9 <sup>BC</sup>
5% Etanol				
Ácido gálico		<10		95,8 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
TBHQ		<10		91,2 $\pm$ 0,8 <sup>δ</sup>

- Não testada; Letras iguais indicam que não há diferença estatística na AA dos extratos obtidos por EBP (αβγδεζ) ou ESC (ABCDE) e no  $CE_{50}$  para extratos das EBP (abcdef) em nível de significância de 5%.

Para as Tortas 1 e 2 a maior atividade antioxidante foi determinada nos extratos obtidos por extrações em Soxhlet com acetona ( $93,9 \pm 0,2\%$  e  $93,4 \pm 0,5\%$ ) e, com ultrassom com acetona ( $93,1 \pm 0,2\%$  e  $92,6 \pm 0,8\%$ ). Estes resultados não apresentaram diferença significativa para atividade antioxidante apresentada pelos extratos da Torta 1 obtidos com ultrassom com etanol ( $93,9 \pm 0,3\%$ ) e da Torta 2 obtidos em Soxhlet etanol ( $93,5 \pm 0,3\%$ ). A menor atividade antioxidante foi observada nos extratos obtidos em Soxhlet e com ultrassom utilizando hexano, de  $1,8 \pm 0,2\%$  e de  $3,2 \pm 0,1\%$ , respectivamente. Os solventes acetona e etanol são considerados bons solventes para extração de compostos fenólicos, que são os compostos antioxidantes majoritários da noz pecã, portanto era esperado que os extratos das Tortas 1 e 2 apresentassem maior atividade antioxidante para estes solventes do que para o hexano.

O fato dos solventes polares (acetona com índice de polaridade de 5,1 e etanol com índice de polaridade de 5,2) propiciarem resultados de atividade antioxidante maiores que o solvente apolar (hexano com índice de polaridade de 0) sugere que a maior parte dos antioxidantes (considerando somente a técnica de DPPH) estão na fração polar da torta de noz.

O extrato da Torta 1 obtido por extração em Soxhlet com etanol ( $58 \pm 1\%$ ) apresentou atividade antioxidante mais baixa entre as extrações com solventes polares. Sabe-se que o ponto de ebulição do etanol é  $78,37^\circ\text{C}$  e da acetona  $56^\circ\text{C}$ . Na extração em Soxhlet o solvente precisa atingir a temperatura de ebulição para garantir os refluxos descritos na metodologia, item 3.2.2.1.1 (pág. 60). No caso do extrato da extração em Soxhlet com etanol da Torta 1, provavelmente os compostos antioxidantes não suportaram a alta temperatura no balão com solvente e acabaram degradados durante a extração. Os taninos são um exemplo de compostos que podem ter sofrido essa degradação, pois como descrito no item 2.3.1 (pág. 39) não resistem a processos acima de  $70^\circ\text{C}$ .

A atividade antioxidante dos extratos obtidos por ESC foram muito menores que dos extratos obtidos por EBP com etanol e com acetona. Esta baixa atividade pode ser explicada pela característica lipídica dos extratos da ESC. Como já discutido anteriormente, esses resultados indicam que a maioria dos compostos antioxidantes das tortas estava presente na fração polar extraída com os solventes polares. Isto não anula o fato da fração apolar apresentar compostos antioxidantes. Os extratos obtidos por ESC e por EBP com hexano, possuíam aspecto lipídico e podem conter compostos antioxidantes lipofílicos, como os tocoferóis.



Os maiores valores de atividade antioxidante determinados para extratos obtidos por ESC foram nas condições de 150 bar e 50°C ( $4,8 \pm 0,1$ ) e para 40°C ( $5 \pm 1$ ). Essas foram justamente as condições em que a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico era menor. Isto também foi observado por Gelmez, Kincal e Yener (2009) em estudo da atividade antioxidante de extratos obtidos por extração supercrítica de germen de trigo tostado. No trabalho destes autores, a atividade antioxidante, pelo método DPPH, mostrou ser maior em extratos obtidos a baixas pressões (148-165 bar) e baixas temperaturas (40-60 °C), quando o rendimento é menor.

A maior atividade antioxidante para os extratos da ESC-S foi obtida pelo extrato proveniente da 2ª etapa de extração da Torta 2 ( $3,5 \pm 0,9\%$ ). Este resultado pode ser explicado pela menor quantidade de óleo presente na Torta 2 em relação a Torta 1, o que facilitou a extração de compostos antioxidantes da Torta 2 no sistema CO<sub>2</sub>+solvente+óleo.

No entanto, era esperada que a fração obtida com etanol na ESC-S da Torta 1 apresentasse maior atividade antioxidante que as frações obtidas com CO<sub>2</sub> puro, por facilitar a solubilidade de compostos polares como fenólicos. Estes resultados sugerem que a porcentagem de etanol adicionada na 2ª etapa de extração não foi suficiente para aumentar a solubilidade de compostos antioxidantes polares. Ao utilizar mais etanol, por exemplo, 10% de etanol, seriam gastos em torno de 150 mL de etanol por ESC-S, a mesma quantidade utilizada nas EBP, contrariando o objetivo de diminuir o resíduo de solvente utilizando uma tecnologia limpa.

Os resultados de CE<sub>50</sub>, que é a menor concentração necessária para atingir a 50% de atividade antioxidante, ou seja, quanto menor este valor maior o potencial antioxidante do extrato, também são apresentados na Tabela 14 (pág. 95). Os melhores resultado de CE<sub>50</sub> para Torta 1 foram para os extratos obtidos com ultrassom com etanol ( $133,0 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e para a Torta 2 dos extratos obtidos em Soxhlet acetona ( $97 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). De acordo com de Campos (2008) valores de CE<sub>50</sub> menores que 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  são indicativos de boa atividade antioxidantes.

Os extratos de ESC e EBP com hexano apresentaram valores elevados de CE<sub>50</sub> e não foram detalhados na Tabela 14 (pág. 95).

Estudos determinando a atividade antioxidante de nozes pecã (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; MIRALIKBARI e SHAHIDI, 2008) e da torta de noz pecã (DO PRADO, 2008) foram realizados por outros autores, porém utilizando técnicas do ensaio de DPPH diferentes, tornando a comparação dos resultados menos fidedigna. Apesar disso, foi possível

analisar, nos trabalhos de do Prado (2008), Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007) e Miraliakbari e Shahidi (2008), que os extratos obtidos com solventes de maior polaridade apresentaram maior atividade antioxidante. Dado que coincide com os resultados encontrados neste trabalho.

Os extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por extrações em Soxhlet e com ultrassom utilizando acetona apresentaram atividade antioxidante, no método de DPPH, maior que o antioxidante sintético TBHQ. Porém, apresentaram eficiência de 2 a 3% menor que o ácido gálico. O TBHQ possui 2 hidroxilas em sua molécula e é moderadamente solúvel em óleos enquanto o ácido gálico, que é um antioxidante natural presente em muitas famílias de plantas, possui 4 hidroxilas na molécula (FRANKEL, 1999). Os resultados comparativos acima sugerem que os antioxidantes presentes na torta de noz pecã apresentaram maior solubilidade em sistemas polares e provavelmente possuem mais de 2 hidroxilas em suas moléculas. A literatura indica que a atividade antioxidante avaliada pelo método de captura DPPH depende da estrutura da molécula dos compostos antioxidantes e é relacionada com o número de hidroxilas disponíveis na molécula (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995 apud (MENSOR *et al.*, 2001).

De acordo com Mensor *et al.* (2001) a polaridade dos extratos influencia a atividade antioxidante no ensaio de DPPH. É possível dizer que a boa atividade antioxidante dos extratos polares ocorre devido à presença dos grupos hidroxilas de compostos antioxidantes. Como já foi comentado, a noz pecã apresenta flavonoides e taninos [item 2.3 (pág. 37)] como antioxidantes, portanto é justificável que os extratos polares das Tortas 1 e 2 apresentem alta atividade antioxidante. Porém, é importante utilizar modelos de análise de atividade antioxidante que envolvam a peroxidação lipídica e também conhecer a composição química dos extratos para caracterizá-los como antioxidantes biológicos, que podem remover compostos reativos de um sistema alimentício (MENSOR *et al.*, 2001). Por isso, foram realizados outros métodos de avaliação da atividade antioxidantes dos extratos.

#### **4.4.2 Atividade antioxidante obtida pelo método de descoloração do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico**

Os resultados de atividade antioxidante (AA) dos extratos das Torta 1 e 2 obtidos pelo método de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico são apresentados na Tabela 15 (pág. 99). O ácido gálico e o antioxidante

sintético TBHQ, também foram utilizados como comparativos no método de descoloração  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

**Tabela 15:** Resultados de Atividade Antioxidante pelo método de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico dos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração.

Extrações	AA (%) [1667 $\mu$ g/mL]	
	Torta 1	Torta 2
Soxhlet etanol	50 $\pm$ 4 <sup>ef</sup>	16 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
Soxhlet hexano	30 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	-
Soxhlet acetona	70 $\pm$ 4 <sup>g</sup>	16,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
Ultrassom etanol	79 $\pm$ 4 <sup>g</sup>	45 $\pm$ 3 <sup>de</sup>
Ultrassom hexano	6,4 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	-
Ultrassom acetona	57 $\pm$ 4 <sup>f</sup>	32 $\pm$ 3 <sup>de</sup>
ESC 40°C/150bar	23,2 $\pm$ 0,5 <sup>D</sup>	-
ESC 40°C /200bar	7,9 $\pm$ 0,2 <sup>BC</sup>	-
ESC 40°C /300bar	24,2 $\pm$ 0,7 <sup>D</sup>	9 $\pm$ 2 <sup>C</sup>
ESC 50°C/150bar	30,3 $\pm$ 0,4 <sup>E</sup>	-
ESC 50°C /200bar	8,2 $\pm$ 0,4 <sup>C</sup>	-
ESC 50°C /300bar	6,5 $\pm$ 0,4 <sup>BC</sup>	-
ESC-S 1ª 40°C/150bar	-	-
ESC-S 2ª 50°C/150bar 5%	0,56 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	5,4 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>
Etanol		
Ácido Gálico		37 $\pm$ 2 <sup>cd</sup>
TBHQ		76 $\pm$ 2 <sup>g</sup>

- Não avaliada; Letras iguais indicam que não há diferença estatística na AA dos extratos obtidos por EBP (abcdefg) ou ESC (ABCDE) em nível de significância de 5%.

A análise estatística dos dados foi realizada separadamente para extrações a baixa pressão e para a extração supercrítica. A Anova um fator e post-hoc Tukey separados facilitaram a identificação da diferença de atividade antioxidante dos extratos.

Os resultados obtidos pelo método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico indicaram que os extratos da Torta 1 obtidos com ultrassom com etanol (79  $\pm$  4%) e em Soxhlet com acetona (70  $\pm$  4%) apresentaram a atividade antioxidante mais elevada dentre os extratos avaliados. A atividade antioxidante destes extratos da Torta 1 e do antioxidante sintético TBHQ (76 $\pm$  2) não apresentaram diferença significativa no método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido

linoleico. Estes resultados indicam que a atividade antioxidante dos extratos da torta de noz pecã é similar a de um antioxidante sintético usualmente utilizado em óleos comerciais (considerando somente a análise de  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico).

O extrato de maior atividade antioxidante da Torta 2 também foi obtido com ultrassom com etanol ( $45 \pm 3\%$ ).

Os extratos da torta de noz pecã de maior atividade antioxidante, segundo o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, são provenientes de extrações com solventes polares, gerando extratos com predominância de compostos solúveis em soluções polares e assim, mais hidrofílicos. Conclusões análogas foram obtidas por Miraliakbari e Shahidi (2008), com valores de  $35,6 \pm 0,8\%$  para a atividade antioxidante de extratos de noz pecã obtidos por EBP-hexano e  $79,2 \pm 1,2\%$  para amostras extraídas com clorofórmio-metanol. Apesar disso, também é apresentado pela literatura a presença de alguns antioxidantes lipofílicos na noz pecã em menor quantidade, como os tocoferóis (FREITAS e NAVES, 2010).

O método de descoloração  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico permite melhor avaliação da presença de antioxidantes lipofílicos. Nesse método os antioxidantes lipofílicos possuem maior atividade que os antioxidantes hidrofílicos, pois conseguem uma ação maior na fase lipídica da solução de reação e na interface água-lipídio combatendo o radical lipídico e evitando a descoloração do  $\beta$ -caroteno (FRANKEL e MEYER, 2000) *apud* (MIRALIAKBARI e SHAHIDI, 2008). Isto pode ser comprovado pelos resultados de atividade antioxidantes dos compostos: ácido gálico (hidrofílico) e o TBHQ (~lipofílico). O ácido gálico ( $37 \pm 2$ ) obteve menor resultado de atividade antioxidante que o TBHQ ( $72 \pm 2$ ).

Os extratos obtidos com os solventes acetona e etanol da Torta 1 e o extrato obtido com ultrassom com etanol da Torta 2 apresentaram atividade antioxidante maior que do ácido gálico. Os extratos de ultrassom com etanol, por exemplo, apresentaram atividade antioxidante 2,3 (Torta 1) e 1,2 (Torta 2) vezes maior que a atividade antioxidante do ácido gálico. Estes resultados indicam que além do ácido gálico existem outros compostos antioxidantes disponíveis na torta de noz pecã que estão agindo neste método, ou que a concentração de ácido gálico nos extratos é maior que a estipulada no método. A atividade antioxidante determinada pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do extrato de ultrassom com etanol da Torta 1 determinada no presente trabalho foi maior que a reportada por Miraliakbari e Shahidi (2008) para nozes

( $70 \pm 1,4\%$ ), castanha-do-pará ( $62,5 \pm 1,1\%$ ), avelã ( $45,2 \pm 1,3\%$ ) e pistache ( $48,5 \pm 1,3\%$ ).

As atividades antioxidantes pelo método de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico dos extratos da Torta 1 foram maiores que as atividades antioxidantes dos extratos da Torta 2. A Torta 1 apresenta uma concentração maior de óleo residual que a Torta 2, como já descrito no item 4.1 (pág. 75). Sabe-se que no método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico os compostos lipofílicos apresentam atividade maior que os compostos hidrofílicos. Sem desconsiderar a importância dos compostos hidrofílicos na atividade antioxidante das tortas, a Torta 1 apresenta mais óleo residual e provavelmente mais compostos lipofílicos antioxidantes remanescentes, por isso sua atividade antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é maior se comparada a Torta 2. Outra explicação para este fato é a presença de quantidades diferentes de compostos antioxidantes em cada torta, por se tratarem de tortas de procedência distintas. Cada torta apresentou processamentos diferentes na indústria. Para o caso da Torta 1, antes da prensagem das nozes foi adicionado tocoferol na moagem, compostos que podem estar presente na Torta 1 em maior quantidade que na Torta 2. Também como descrito na Tabela 1 (pág. 30), a variedade de noz Mahan (Torta 1), por exemplo, apresenta teor maior de taninos que a variedade Desirable (Torta 2).

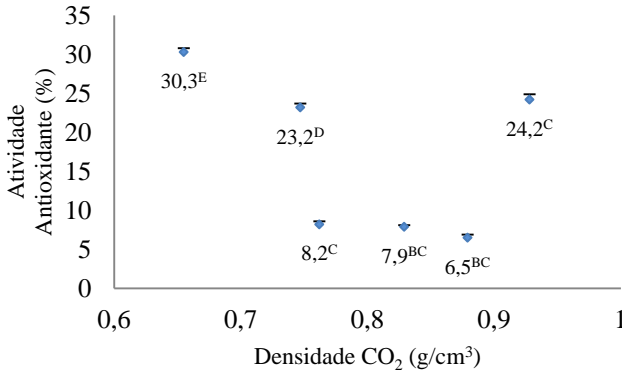
Os extratos da extração em Soxhlet etanol de ambas as tortas apresentaram atividade antioxidante mais baixa se comparadas às outras EBP com solventes polares. Novamente, este é o caso em que os compostos antioxidantes provavelmente degradaram durante a extração em Soxhlet com etanol que apresenta temperaturas acima de  $70^{\circ}\text{C}$ .

Considerando somente os extratos obtidos por ESC a maior atividade antioxidante foi obtida na condição de 150 bar e  $50^{\circ}\text{C}$  ( $30,3 \pm 0,4\%$ ), com atividade antioxidante 18% menor que o ácido gálico e 60% menor que o TBHQ. Em seguida foram as condições de 150 bar e  $40^{\circ}\text{C}$  ( $23,2 \pm 0,5\%$ ) e 300 bar e  $40^{\circ}\text{C}$  ( $24,2 \pm 0,7\%$ ). Na pressão de 200 bar, não houve diferença significativa na atividade antioxidante dos extratos obtidos a  $40^{\circ}\text{C}$  ( $7,9 \pm 0,2\%$ ) e a  $50^{\circ}\text{C}$  ( $8,2 \pm 0,4\%$ ). Nas ESC a  $50^{\circ}\text{C}$  com o aumento da pressão ocorreu uma diminuição da atividade antioxidante dos extratos obtidos, o mesmo não foi observado na temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 23 (pág. 102) mostra a variação da atividade antioxidante, de acordo com o método de descoloração  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, com a densidade do solvente supercrítico. Desconsiderado a

condição de 300 bar e 40°C, o decréscimo da densidade do solvente supercrítico garante maior atividade antioxidante.

**Figura 23:** Atividade Antioxidante dos extratos da Torta 1 obtidos por ESC de acordo com o método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico



Os extratos obtidos por ESC apresentam atividade antioxidante menor que a dos extratos obtidos por EBP. Através da ESC foram obtidos extratos de características lipofílicas e, portanto compostos lipofílicos. Nas EBP além dos antioxidantes lipofílicos são extraídos também os hidrofílicos (no caso dos solventes polares). A classe de antioxidantes hidrofílicos, como observado, apresentou efeito mais significativo no presente método.

Assim como determinado na metodologia do radical DPPH, a atividade antioxidante dos extratos obtidos por ESC-S foi menor do que a obtida por ESC com CO<sub>2</sub> puro. Além disso, a atividade antioxidante do extrato obtido da extração da Torta 2 foi maior que do extrato da Torta 1. Novamente, este resultado é indicativo da necessidade de aumentar a porcentagem de etanol ou utilizar outra condição de extração nesta 2ª etapa do processo.

Ao realizar uma terceira análise estatística (Anova e Tukey) considerando os métodos EBP e ESC juntos foi possível analisar algumas semelhanças entre EBP e ESC. O resultado de atividade antioxidante dos extratos da Torta 1 obtidos na condição a 150 bar e 50°C ( $30,3 \pm 0,4\%$ ) é equivalente ao extrato obtido em Soxhlet-hexano ( $30 \pm 4\%$ ) e ao ácido gálico ( $37 \pm 2\%$ ). Apesar destes resultados apresentarem uma atividade antioxidante mais baixa que os outros extratos (como Ultrassom etanol e o próprio TBHQ), eles sugerem a

possibilidade de substituir a extração com solventes por uma extração considerada limpa.

#### 4.4.3 Atividade antioxidante obtida pelo método de inibição do radical ABTS

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos pelo método de inibição do radical ABTS são apresentados na Tabela 16 em  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ,  $\mu\text{mol}$  atividade antioxidante em equivalente Trolox por grama de extrato. Além dos resultados dos extratos também foram utilizados para comparação o TBHQ e o ácido gálico.

O método de inibição do radical ABTS utiliza uma curva analítica de Trolox, como citado anteriormente. Trolox é um composto derivado da vitamina E e é hidrossolúvel (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

**Tabela 16:** Resultados de Atividade Antioxidante (AA) pelo método de inibição do radical ABTS dos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração.

Extrações	AA ( $\mu\text{mol TEAC/g}^*$ )	
	Torta 1	Torta 2
Soxhlet etanol	$143 \pm 4^d$	$91 \pm 5^c$
Soxhlet hexano	$39 \pm 1^{ab}$	-
Soxhlet acetona	$261 \pm 21^f$	$201 \pm 14^e$
Ultrassom etanol	$34 \pm 1^{ab}$	$86 \pm 1^c$
Ultrassom hexano	$7 \pm 1^a$	-
Ultrassom acetona	$194 \pm 10^e$	$81 \pm 4^c$
ESC 40°C/150bar	$11 \pm 1^{AB}$	-
ESC 40°C /200bar	$34 \pm 1^{DE}$	-
ESC 40°C /300bar	$20 \pm 1^{BC}$	$27 \pm 2^{CD}$
ESC 50°C/150bar	$110 \pm 4^F$	-
ESC 50°C /200bar	$21 \pm 1^C$	-
ESC 50°C /300bar	$4 \pm 1^A$	-
ESC-S 1ª 40°C/150bar	-	-
ESC-S 2ª 50°C/150bar 5%	$35 \pm 7^{DE}$	$41 \pm 1^E$
Etanol	-	-
Ácido Gálico	$43 \pm 7^b$	-
TBHQ	$1355 \pm 2^g$	-

- Não avaliada; Letras iguais indicam que não há diferença estatística na AA dos extratos obtidos por EBP (abcdefg) ou ESC (ABCDE) em nível de significância de 5%; \* $\mu\text{mol TEAC/g}$  ( $\mu\text{mol}$  atividade antioxidante em equivalente Trolox por grama de extrato)

Nas EBP, de acordo com o método de inibição do radical ABTS, o extrato da Torta 1 obtido em Soxhlet com acetona apresentou a maior atividade antioxidante,  $261 \pm 21 \mu\text{mol TEAC/g}$ , seguido do extrato obtido com ultrassom com acetona ( $194 \pm 10 \mu\text{mol TEAC/g}$ ) da mesma Torta e o extrato obtido em Soxhlet com acetona da Torta 2 ( $201 \pm 14 \mu\text{mol TEAC/g}$ ). As extrações utilizando acetona apresentaram maior atividade antioxidante, descrita pelo método de inibição do radical ABTS, do que as extrações com etanol. Isto foi verificado também por do Prado (2008) no estudo da atividade antioxidante de extratos da torta de noz pecã obtidos por separação com acetona e etanol. A autora encontrou valores de  $235 \pm 51 \mu\text{mol TEAC/g}$  para o extrato obtido com a acetona e  $29 \pm 9 \mu\text{mol TEAC/g}$  para o extrato obtido com etanol, também no mesmo método de ABTS. Tais resultados podem ser explicados pela seletividade do solvente. O etanol e a acetona são bons solventes para extração de compostos fenólicos, porém cada solvente pode ter extraído compostos fenólicos diferentes que apresentam atividade diferente no método de ABTS. A noz pecã apresenta taninos e outros compostos com atividade antioxidante como ácidos hidroxicinâmicos, em menor quantidade (VENKATACHALAM, 2004). Cada solvente extrai tipos e quantidades de compostos diferentes. No método de inibição do radical ABTS, o polifenol epicatequina, por exemplo, apresenta atividade antioxidante maior que o ácido cumárico (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

A discussão sobre a diferença de atividade antioxidante para compostos diferentes é evidenciada pela atividade antioxidante distinta do ácido gálico e do TBHQ, no método de inibição do radical ABTS. Estes dois antioxidantes apresentam estruturas químicas e funcionalidades em soluções aquosas diferentes. O potencial dos compostos fenólicos como antioxidantes no método de inibição do radical ABTS depende do número de hidroxilas na molécula, da posição das hidroxilas e do número de anéis aromáticos (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

Considerando a maioria dos resultados das EBP as atividades antioxidantes dos extratos da Torta 1 foram maiores do que aquelas apresentadas pelos extratos da Torta 2. Neste caso a procedência diferente das tortas explica as diferenças de resultados. Porque cada torta de noz pecã apresenta compostos antioxidantes em quantidades diferentes (VENKATACHALAM, 2004; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).



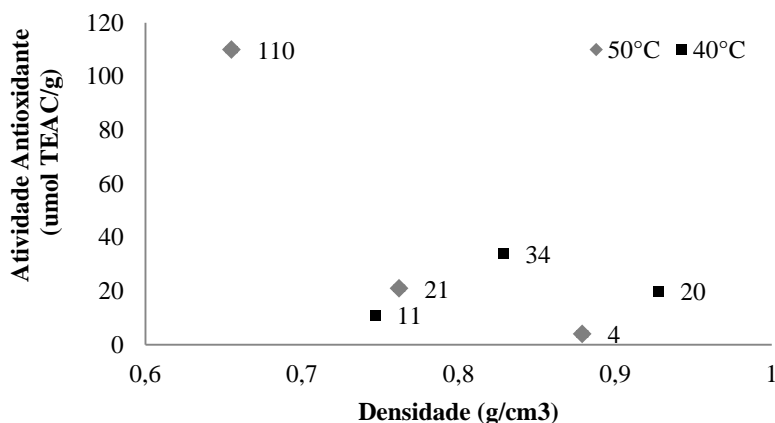
O extrato obtido em Soxhlet acetona (maior atividade antioxidante) apresentou atividade antioxidante 6 vezes maior que o ácido gálico e 5 vezes menor que o TBHQ.

A atividade antioxidante de outras oleaginosas, como castanha-do-pará (14,19  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ), da noz (135,41  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ), do pistache (79,83  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) e da avelã (96,45  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) também expressas por padrão Trolox (WU *et al.*, 2004), são menores que a atividade antioxidante do extrato em Soxhlet acetona ( $261 \pm 21$   $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) deste trabalho. Isto concorda com a literatura que afirma a noz pecã ser um dos alimentos de maior atividade antioxidante (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

Dos extratos obtidos por ESC aquele que apresentou maior atividade antioxidante foi o obtido da Torta 1 na condição de 150 bar e 50°C ( $110 \pm 4$   $\mu\text{mol TEAC/g}$ ), 2,5 vezes maior que a atividade antioxidante do ácido gálico e 12 vezes menor que o TBHQ.

Avaliando a Figura 24, é possível observar que para a condição de 50°C quanto menor a densidade (função da pressão e temperatura de extração) maior a atividade antioxidante. A mesma regra não se aplica aos extratos obtidos na condição de 40°C.

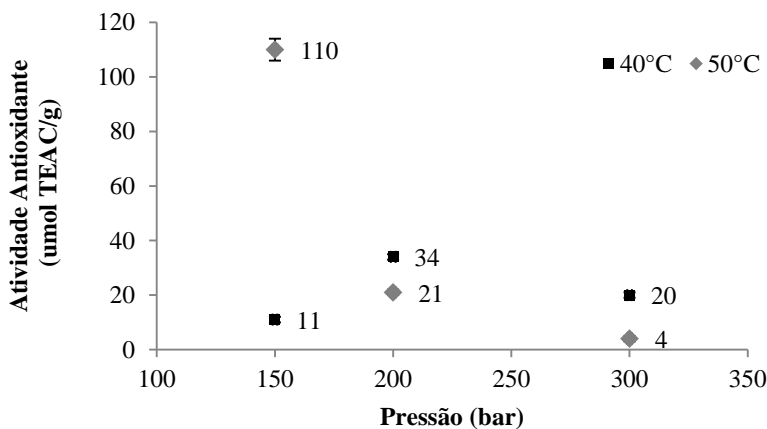
**Figura 24:** Variação da Atividade Antioxidante com a densidade do  $\text{CO}_2$  supercrítico nos extratos da Torta 1 obtidos por ESC.



Realizando uma análise nas ESC nas pressões de 200 e 300 bar, quanto maior a temperatura, menor a atividade antioxidante. E na mesma temperatura quanto maior a pressão, menor a atividade

antioxidante. Isto pode ser mais facilmente observado na Figura 25. Na figura é apresentada a variação da atividade antioxidante com a pressão de ESC. O decréscimo da atividade antioxidante com o aumento da pressão também foi observado na extração supercrítica de óleo de semente de romã (LIU *et al.*, 2012). Segundo os autores entre as pressões de 150 bar e 450 bar e temperaturas entre 35°C e 65°C a condição de maior atividade antioxidante foi 150 bar a 50°C (~4,5 mg TEAC/g) em uma ESC de 2h.

**Figura 25:** Variação da atividade antioxidante  $\mu\text{mol TEAC/g}$  dos extratos de torta de noz pecã com o aumento da pressão de ESC.



A atividade antioxidante dos extratos obtidos por ESC-S não apresentaram diferença significativa entre as Tortas 1 e 2 e não foram maiores que as atividades antioxidantes dos extratos obtidos na mesma condição (150 bar e 50°C) com  $\text{CO}_2$  puro.

A terceira análise estatística (Anova) realizada nos dados apresentados na Tabela 16 (pág. 103) possibilitou a comparação entre os extratos obtidos com ESC com aqueles obtidos por EBP. Após o teste de comparação múltipla, os resultados apresentaram equivalência estatística na atividade antioxidante de extratos obtidos por ESC e extratos obtidos por EBP. Os extratos da Torta 1 obtidos com hexano em Soxhlet ( $39 \pm 1 \mu\text{mol TEAC/g}$ ) e com ultrassom ( $7 \pm 1 \mu\text{mol TEAC/g}$ ) apresentam equivalência na atividade antioxidante a extratos

obtidos por ESC a 200 bar e 40°C ( $34 \pm 1$   $\mu\text{mol TEAC/g}$ ), 300 bar e 40°C ( $20 \pm 1$   $\mu\text{mol TEAC/g}$ ), e 200 bar e 50°C ( $21 \pm 1$   $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) da Torta 1. Embora estes resultados apresentem uma atividade antioxidante mais baixa que os outros extratos obtidos eles sugerem a possibilidade de substituir a extração com solventes por uma extração sem resíduos de solventes.

O método de inibição do radical ABTS é aplicável para antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (RE *et al.*, 1999), e por isso observa-se boa atividade antioxidante para os extratos obtidos por ESC (lipofílicos) e também obtidos por EBP com acetona e etanol (hidrofílicos).

As diferenças apresentadas nos resultados de cada método da AA podem ser explicadas pela variedade de compostos antioxidantes presentes nos extratos, que diferem quanto a classe química, quanto a polaridade, quanto a solubilidade e quanto a matriz alimentar (DE LIMA, 2008). Cada método ativou compostos que melhor reagem com radicais DPPH e ABTS, e com o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

Considerando os extratos obtidos por extrações a baixa pressão, os três métodos de avaliação de atividade antioxidante indicaram o extrato obtido por Soxhlet com acetona como de alta atividade antioxidante. Também obtiveram boas atividades antioxidantes os extratos obtidos por ultrassom com etanol e ultrassom com acetona.

Avaliando os extratos obtidos por ESC os três métodos de atividade antioxidante indicaram o extrato obtido na condição de 150 bar e 50°C como o de maior atividade. O extrato obtido na condição de 150 bar e 40°C também apresentou bons resultados para atividade antioxidante nos métodos de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e de captura do radical DPPH, mas não para o método de inibição do radical ABTS.

Os extratos da Torta 1 apresentaram melhor atividade antioxidante de acordo com os métodos de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e o método de inibição do radical ABTS, mas foram significativamente equivalentes no método de captura do radical DPPH.

A distinção entre resultados dos métodos de avaliação de atividade antioxidante também foi observado por Lima (2008) nos extratos de amêndoa de pequi. O extrato aquoso de pequi mostrou melhores resultados de acordo com os métodos de radical ABTS e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico enquanto que no método de DPPH o extrato de melhor atividade antioxidante foi o alcoólico.

## 4.5 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS

O teor de compostos fenólicos e o teor de taninos condensáveis presente nos extratos são apresentados a seguir segundo resultados obtidos pelos métodos de Folin-Ciocalteu e de vanilina, respectivamente.

### 4.5.1 Fenólicos Totais por método Folin-Ciocalteu

Os resultados de compostos fenólicos totais (FT) presentes nos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração são apresentados na Tabela 17. Lembrando que neste método os resultados são expressos em equivalente de ácido gálico, composto presente na noz pecã e um dos responsáveis por sua atividade antioxidante (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

**Tabela 17:** Resultados de compostos fenólicos totais obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu dos extratos da Torta 1 e 2.

Extrações	FT (mg GAE/g*)	
	Torta 1	Torta 2
Soxhlet etanol	22 ± 1 <sup>bc</sup>	26 ± 3 <sup>c</sup>
Soxhlet acetona	71 ± 2 <sup>e</sup>	17,6±0,9 <sup>ab</sup>
Ultrassom etanol	10 ± 1 <sup>a</sup>	35 ± 2 <sup>d</sup>
Ultrassom acetona	21 ± 1 <sup>bc</sup>	100±5 <sup>f</sup>

Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ); \*mg GAE/g (mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato)

O maior teor de compostos fenólicos foi identificado no extrato da Torta 2 obtido com ultrassom com acetona (100±5 mg GAE/g) seguido do extrato da Torta 1 obtido em Soxhlet com acetona (71 ± 2 mg GAE/g). Os resultados indicam que a acetona é o melhor solvente pra extrair compostos fenólicos da torta de noz pecã. Esta mesma conclusão foi obtida por outros autores quando obtiveram extratos de noz pecã com acetona (DO PRADO, 2008; MIRALIAKBARI e SHAHIDI, 2008; YANG, 2009; RAHMAN *et al.*, 2012). Do Prado (2008) em seu trabalho realizou o fracionamento da torta de noz pecã e obteve 16,4±4,2 mg GAE/g para a fração de acetona e 2,3 ± 1,3 mg

GAE/g para a fração de etanol. Wu et al. (2004) apresentaram valores de  $20,16 \pm 1,03$  mg GAE/g para a fração acetona/água/ác. acético (70:29,5:0,5).

A diferença no teor de compostos fenólicos determinado em cada torta é explicada pela diferença da procedência (local de origem, indústria) e da variedade das nozes que compõem as tortas (SANTERRE, 1994; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Isto também foi observado por Villarreal-Lozoya, Lombardi e Cisneros-Zevallos (2007), na determinação de teor de compostos fenólicos de diferentes variedades de nozes pecã. De acordo com os autores até a mesma variedade Desirable proveniente de diferentes regiões do Texas (EUA) possui teor de compostos fenólicos totais diferente,  $70 \pm 2$  (Caldwell) e  $62 \pm 2,3$  (Brownwood) mg GAE/g de noz desengordurada. No caso da Torta 1 o maior teor de compostos fenólicos totais foram determinados para os extratos obtidos em Soxhlet, exatamente o oposto do comportamento dos extratos da Torta 2. Esse resultado pode indicar que a Torta 2 possuía compostos fenólicos mais sensíveis à ação da temperatura (menor teor de compostos fenólicos em Soxhlet, que utiliza altas temperaturas, comparado com ultrassom), se comparada com os resultados da Torta 1.

Os extratos obtidos com o solvente hexano e por extração supercrítica não são apresentados, pois através do método empregado não foi possível detectar a presença de compostos fenólicos nestes extratos. Isto pode ter acontecido por não existirem compostos fenólicos nestes extratos ou porque a quantidade presente nos extratos era reduzida e não detectável pelo método. De acordo com as análises de atividade antioxidantes (Método de captura do radical DPPH, método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de inibição do radical ABTS), os extratos obtidos com hexano e com  $\text{CO}_2$  supercrítico apresentavam atividade antioxidante mais baixa do que aquelas apresentadas pelos extratos obtidos com solventes polares. Os teores mais baixos de compostos fenólicos em frações lipídicas da noz pecã também foram observados por Miraliakbari e Shahidi (2008). De acordo com os autores, na extração da noz pecã com clorofórmio e metanol o teor de compostos fenólicos totais no extrato é de  $783 \pm 18$  mg GAE/kg de extrato e  $196 \pm 15$  mg GAE/kg de extrato para o extrato obtido com hexano.

O maior teor de compostos fenólicos identificado no extrato da Torta 2 obtido com ultrassom com acetona ( $100 \pm 5$  mg GAE/g) pode ser comparado ao teor de compostos fenólicos de outras oleaginosas.

Segundo determinado por Wu et al. (2004) o teor de compostos fenólicos para a castanha-do-pará, a avelã e pistache foi de  $3,10 \pm 0,96$  mg GAE/g,  $8,35 \pm 2,46$  mg GAE/g e  $16,57 \pm 1,21$  mg GAE/g, respectivamente, menores que o extrato de ultrassom com acetona deste trabalho.

A partir dos resultados de compostos fenólicos totais, do rendimento de extração do mesmo extrato (ultrassom com acetona da Torta 2) e a quantidade de óleo na Torta 2 é possível determinar também o teor de compostos fenólicos totais por grama de amostra. Se cada grama de extrato apresenta 100 mg GAE então cada grama de torta de noz pecã desengordurada apresentará 57,8 mg GAE. Este valor está acima do determinado por Yang (2009), 14,639 mg GAE/g de noz pecã desengordurada, mas abaixo do determinado por Villarreal-Lozoya, Lombardi e Cisneros-Zevallos (2007),  $70 \pm 2$  mg GAE/g de noz pecã desengordurada.

#### 4.5.2 Taninos condensados por ensaio de vanilina

Os resultados de taninos condensados (TC) presentes nos extratos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração são apresentados na Tabela 18 (pág. 110). Os resultados são expressos em equivalente de catequina, composto presente na noz pecã (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

**Tabela 18:** Resultados de taninos condensados obtidos pelo método de vanilina dos extratos da Torta 1 e 2.

Extrações	(TC) (mg EC/g*)	
	Torta 1	Torta 2
Soxhlet etanol	$15 \pm 0^a$	$11 \pm 2^a$
Soxhlet acetona	$34 \pm 2^b$	$315 \pm 5^e$
Ultrassom etanol	$53 \pm 1^c$	$35 \pm 6^b$
Ultrassom acetona	$22 \pm 2^a$	$255 \pm 10^d$

Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ); \*mg EC/g (mg equivalente de catequina por grama de extrato)

O maior teor de taninos condensados foi determinado no extrato obtido por extração em Soxhlet com acetona ( $315 \pm 5$  mg EC/g) da Torta 2, seguido do extrato da mesma torta obtido com ultrassom com acetona ( $255 \pm 10$  mg EC/g). Este resultado indica que a Torta 2

apresenta maior quantidade de taninos condensáveis que a Torta 1. Isto pode ocorrer devido a diferença nas variedades de nozes pecã que compõem as Torta 1 e 2, e , devido a procedência das mesmas. Esta diferença no teor de taninos condensados em diferentes variedades de noz pecã no método de vanilina foi observada por Villarreal-Lozoya, Lombardi e Cisneros-Zevallos (2007). No estudo, os autores identificaram diferença significativa no teor de taninos nas variedades Kanza ( $47 \pm 1,9$  mg EC/g de noz desengordurada), Kiowa ( $36 \pm 3,9$  mg EC/g de noz desengordurada) e Desirable CW ( $28 \pm 1,4$  mg EC/g de noz desengordurada). O maior resultado obtido da Torta 1 foi com o extrato obtido com ultrassom com etanol ( $53 \pm 1$  mg EC/g).

Da mesma forma que não foi possível detectar compostos fenólicos nos extratos obtidos por ESC, ESC-S e EBP com hexano, o ensaio de vanilina também não identificou taninos condensados nestes extratos.

O método de Folin-Ciocalteu e o ensaio de vanilina apontaram o extrato da Torta 2 obtido por ultrassom com acetona com alto teor de compostos fenólicos e taninos condensados. Apesar disso alguns extratos com baixo teor de compostos fenólicos totais como o obtido com ultrassom com etanol da Torta 1, no ensaio de vanilina apresentaram teores de taninos condensados mais altos. Esta diferença na correlação entre os métodos de compostos fenólicos totais e taninos condensados pode ser observada no trabalho de outros autores na extração de noz pecã (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007), torta de noz pecã (DO PRADO, 2008) e torta de canola (KHATTAB *et al.*, 2010).

#### 4.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DAS TORTAS DE NOZ PECÃ

O perfil de ácidos graxos (AG) obtidos por CG [item 3.2.4.4 (pág. 72)] para os extratos das Torta 1 e 2 são apresentados na Tabela 19 (pág. 113) . Para essa análise foram selecionados os óleos obtidos nas extrações em Soxhlet, por representar a técnica convencional de extração de lipídios, além de extratos obtidos na ESC. Somente alguns extratos de ESC foram selecionados, levando em consideração a densidade do solvente supercrítico no momento da extração. Assim, os extratos obtidos na condição de 100 bar a 40°C, 300 bar a 40°C, 150 bar a 40°C e 50°C foram selecionados. Para comparação selecionou-se também o extrato da ESC da Torta 2 e os óleos comerciais das empresas fornecedoras da matéria-prima.

Os AG presentes nos extratos de torta de noz pecã foram os ácidos graxos saturados palmítico, esteárico e araquídico e, os insaturados oleico e linoleico. Estes ácidos graxos da noz pecã também foram identificados por outros autores (FIRESTONE, 1999; VENKATACHALAM, 2004; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; YANG, 2009).

Os AG majoritários identificados no perfil de todos os extratos analisados foram o ácido oleico, monoinsaturado, seguido do ácido linoleico, poli-insaturado, um resultado que está de acordo com a literatura para óleo de noz pecã (FIRESTONE, 1999; USDA, 2001).

As porcentagens de ácidos graxos identificados para os óleos de noz pecã também foram similares das apresentadas pela legislação (BRASIL, 2012) para composição em ácidos graxos de azeite de oliva virgem. Sabe-se que o óleo de noz pecã apresenta composição em ácidos graxos similar ao azeite de oliva (VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).



Tabela 19: Perfil de ácidos graxos dos óleos da Torta 1 obtidos por EBP em Soxhlet hexano e ESC, comparados aos óleos comerciais da noz pecã e óleo de ESC Torta 2.

Torta	Extração P(bar)/T(°C)	Ácidos graxos (%)						
		(C16:0)	(C18:0)	(C18:1)	(C18:2)	C(18:3)	(C20:0)	(C20:1)
		Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico	Araquídico	Gadoleico
1	100/40	9,6 ± 0,8 <sup>d</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	62,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	25 ± 2 <sup>b</sup>	nd	0,7 ± 0,2 <sup>ab</sup>	nd
	150/50	7,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>	72,5 ± 0,7 <sup>cd</sup>	17,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	nd	0,43 ± 0,01 <sup>ab</sup>	nd
	150/40	7,5 ± 0,3 <sup>bc</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	66 ± 1 <sup>c</sup>	23 ± 1 <sup>b</sup>	nd	0,9 ± 0,6 <sup>ab</sup>	nd
	300/40	6,47 ± 0,02 <sup>ac</sup>	2,08 ± 0,00 <sup>ab</sup>	71,9 ± 0,6 <sup>de</sup>	19,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	nd	0,55 ± 0,04 <sup>ab</sup>	nd
	Soxhlet Hexano	6,30 ± 0,05 <sup>ac</sup>	2,31 ± 0,04 <sup>ab</sup>	70,7 ± 0,2 <sup>d</sup>	20,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	nd	0,59 ± 0,02 <sup>ab</sup>	nd
	Óleo Comercial	5,46 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,02 <sup>a</sup>	73,89 ± 0,12 <sup>e</sup>	18,06 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,51 ± 0	0,12 ± 0 <sup>a</sup>	nd
2	300/40	7,1 ± 0,6 <sup>bc</sup>	2,03 ± 0,03 <sup>ab</sup>	56,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	33,4 ± 0,2 <sup>c</sup>	nd	1,22 ± 0,06 <sup>b</sup>	nd
	Óleo Comercial	6,12 ± 0,07 <sup>ab</sup>	1,95 ± 0,10 <sup>a</sup>	60,12 ± 0,08 <sup>b</sup>	30,28 ± 0,24 <sup>c</sup>	1,34 ± 0,01	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	nd
	Noz pecã Firestone (1999)	5 a 11	1 a 6	49 a 69	19 a 40	0 a 3	0,1 a 0,2	0,2 a 0,3
	Azeite de oliva (BRASIL, 2012)	7,5 a 20	0,5 a 5,0	55,0 a 83,0	3,5 a 21,0	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as porcentagem de ácidos graxos em nível de significância de 5%; nd: não detectado.

Os extratos de torta obtidos por diferentes técnicas de extração apresentaram diferença significativa na quantidade de ácido palmítico, mas não apresentaram diferença significativa na quantidade de ácido esteárico e araquídico. O extrato que apresentou o maior percentual de ácido palmítico foi aquele obtido por ESC a 100 bar e 40°C ( $9,6 \pm 0,8\%$ ), o que indica uma condição mais seletiva para extração de ácidos graxos saturados. Alexander, Brusewitz e Maness (1997) também observaram que na pressão mais baixa utilizada (413 bar a 45°C) a porcentagem de ácido palmítico, 10,1%, foi maior que em outras condições de ESC (551 e 668 bar). O teor de ácido palmítico dos extratos das Tortas 1 e 2 foi maior do que aquele apresentado pelos respectivos óleos comerciais.

Os maiores níveis de ácido oleico foram observados nos óleos da Torta 1 obtidos por ESC 150 bar e 50°C, ESC 300 bar e 40°C e em Soxhlet com hexano, significativamente iguais ao óleo comercial desta mesma Torta. Isto indica que a extração supercrítica nas condições citadas e a extração convencional por solvente (em Soxhlet com hexano) forneceram um óleo com a mesma proporção de ácido oleico, assim não houve efeito das diferentes técnicas de extração aplicadas. Portanto, é possível utilizar outra técnica de extração, como a ESC, que é considerada uma tecnologia limpa e apresentou alto rendimento (58%), para extrair óleo de torta de noz pecã com os mesmos teores de ácido oleico.

Os maiores níveis de ácido linoleico foram detectados para os óleos obtidos por ESC 300 bar e 40°C ( $33,4 \pm 0,2\%$ ) e o óleo comercial ( $30,4 \pm 0,2\%$ ) da Torta 2. Esses resultados indicam que o óleo extraído por ESC da torta de noz pecã apresenta o mesmo teor de  $\omega$ -6 que o óleo prensado a frio na indústria. Também não houve diferença significativa nas porcentagens de ácido linoleico dos extratos obtidos por ESC (300 bar e 40°C) do óleo comercial da Torta 1.

Os extratos das Tortas 1 e 2, obtidos a 300 bar e 40°C apresentaram diferença significativa na quantidade de ácido oleico e linoleico. Isto porque são tortas compostas por diferentes variedades de nozes. Este resultado também foi observado em óleos obtidos da extração supercrítica de duas variedades de nozes pecã realizada por Alexander, Brusewitz e Maness (1997) e na determinação do perfil de AG de óleos de diferentes variedades da mesma noz no estudo de Villarreal-Lozoya, Lombardi e Cisneros-Zevallos (2007).

O ácido linolênico, além do linoleico, do oleico e do palmítico, são os ácidos graxos geralmente presentes em óleos extraídos de nozes (TEMELLI *et al.*, 2007). As quantidades relativas de cada ácido

graxo presente na mistura dependem do tipo de noz (TEMELLI *et al.*, 2007). A Tabela 20 apresenta o perfil de AG do óleo de noz pecã determinado por diferentes autores e o perfil de AG de diferentes oleaginosas para comparação.

**Tabela 20:** Perfil de ácidos graxos dos óleos de noz pecã, avelã e castanha-do-pará.

Material/Fonte	(C16:0)	(C18:0)	(C18:1)	(C18:2)	C(18:3)	(C20:1)
	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolenico	Gadoleico
<b>Noz pecã (prensagem) Oro (2008)</b>	5,6	2,84	62,55	27,49	1,23	0,24
<b>Noz pecã (Barton) Prado (2008)</b>	5,03±0,06	2,36±0,06	75,83±0,25	16,83±0,32	nd	nd
<b>Noz Pecã (Desirable) Villarreal-Lozoya, Lombardi e Cisneros-Zevallos (2007)</b>	5	2	71	20	1	nd
<b>Noz pecã (ESC) Maness et al (1995)</b>	5,1	2,2	66	25,6	1,1	nd
<b>Avelã (ESC) Özkal et al (2005)</b>	5,99	2,17	79,34	11,45	nd	nd
<b>Castanha-do-pará Naves e Freitas (2010)</b>	14,31	10,64	28,92	44,12	0,19	0,11

De acordo com a Tabela 20 outros ácidos graxos foram identificados no óleo de noz pecã por outros autores, como o ácido gadoleico (ORO, 2008) e ácido linolênico (MANESS *et al.*, 1995; VILLARREAL-LOZOYA, LOMBARDINI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; FREITAS e NAVES, 2010). O ácido linolênico não foi identificado nos extratos deste trabalho, fato que também ocorreu na análise do óleo da prensagem de nozes Barton da autora Do Prado (2008).

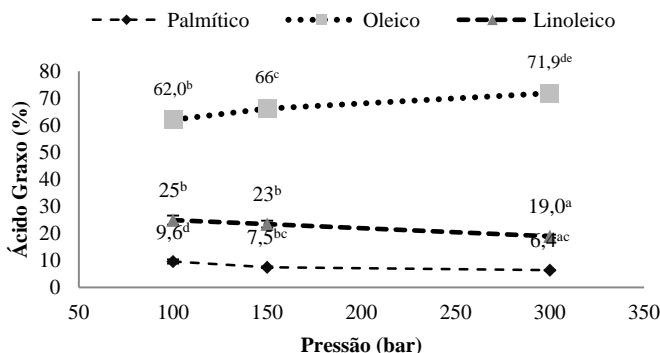
Os extratos do presente trabalho apresentam teores de ácido oleico maiores que o estipulado pela literatura (FIRESTONE, 1999). Porém ao observar os resultados de Do Prado (2008) que realizou a análise do óleo de noz pecã da variedade Barton e o de Villarreal-Lozoya, Lombardi e Cisneros-Zevallos (2007) que realizaram análise do óleo de noz pecã da variedade Desirable é possível notar a porcentagem de ácido oleico também é mais alta. Isto se deve a variedade das nozes em estudo. Neste trabalho as tortas de noz pecã são compostas pelas variedades Mahan (Torta 1) e Barton e Desirable (Torta 2), variedades que segundo o descrito acima apresentam teores maiores de ácido oleico.

A quantidade de ácido oleico identificado nos extratos de torta de noz pecã foi maior que outras nozes e sementes comestíveis como a castanha-do-pará (28,92%), noz (16,14%), amendoim (42,48) (FREITAS e NAVES, 2010), mas menor que o da avelã (79,34) obtido por ESC (ÖZKAL, SALGIN e YENER, 2005).

A quantidade de ácido linoleico nos extratos variou de 17,3% (150 bar e 50°C; Torta 1) a 33,4% (300 bar e 40°C; Torta 2). Como apresentado na Tabela 20 (pág. 115), em outras oleaginosas o percentual de ácido linoleico pode ser maior, como para castanha-do-pará (44,12%) (FREITAS e NAVES, 2010), ou menor, na avelã (11,45%) (ÖZKAL, SALGIN e YENER, 2005).

Com o intuito de verificar o efeito da pressão de ESC na composição de ácidos graxos dos extratos plotou-se um gráfico de composição de AG *versus* pressão, Figura 26.

**Figura 26:** Variação na porcentagem de ácido oleico, linoleico e palmítico no óleo da Torta 1 de noz pecã com o aumento da pressão na extração.



Considerando as diferentes pressões utilizadas na ESC da Torta 1 a 40°C, é possível observar, através da Figura 26 (pág. 116), o aumento da pressão acarreta acréscimo na porcentagem de ácido oleico e com aumento de pressão na ordem de 200 bar ocorre diminuição dos teores de ácido linoleico e palmítico.

Com relação à temperatura utilizada na ESC para obter os extratos, é possível afirmar que ocorre um aumento nas porcentagens de ácido oleico e diminuição do ácido linoleico com o aumento da temperatura.

Para verificar a razão entre o teor de ácidos graxos insaturados e de saturados (I/S), além da razão entre ácido oleico e ácido linoleico (O/L) os resultados da Tabela 19 (pág. 113) foram rearranjados conforme apresentado na Tabela 21.

**Tabela 21:** Razão entre ácidos graxos insaturados e saturados, razão entre ácido oleico e ácido linoleico dos óleos das Tortas 1 e 2 obtidos por diferentes técnicas de extração comparados aos respectivos óleos comerciais.

Torta	Extração	Densidade CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>1</sup>	Insaturados/ Saturados (I/S)	Oleico/ Linoleico (O/L)
1	ESC 100 bar 40°C	0,630	6,7 <sup>a</sup>	2,5 <sup>b</sup>
	ESC 150 bar 50°C	0,655	8,8 <sup>ab</sup>	4,2 <sup>d</sup>
	ESC 150 bar 40°C	0,747	8,7 <sup>ab</sup>	2,8 <sup>b</sup>
	ESC 300 bar 40°C	0,928	9,9 <sup>b</sup>	3,8 <sup>cd</sup>
	Soxhlet Hexano		9,8 <sup>b</sup>	3,5 <sup>c</sup>
	Óleo Comercial		11,33 <sup>b</sup>	4,1 <sup>d</sup>
2	ESC 300 bar 40°C	0,928	8,7 <sup>ab</sup>	1,7 <sup>a</sup>
	Óleo Comercial		11,27 <sup>b</sup>	2,0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Densidade do CO<sub>2</sub> Mukhopahyay (2000). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as razões em nível de significância de 5%.

Estas razões são avaliadas por motivos nutricionais e de estabilidade oxidativa do óleo. Os AG poli-insaturados tendem a baixar os níveis sanguíneos de colesterol, enquanto que os AG saturados tendem a elevar esse nível (FREITAS e NAVES, 2010). Por isso, é importante entender e avaliar qual a relação entre ácidos graxos insaturados e saturados no óleo. Quanto maior a razão I/S apresentada na Tabela 21 maior a quantidade de ácidos graxos insaturados no óleo. A razão entre ácido oleico e ácido linoleico é um indicativo da

estabilidade do óleo, uma vez que a maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados em relação aos poli-insaturados garante maior estabilidade oxidativa ao óleo (ALEXANDER, BRUSEWITZ e MANESS, 1997).

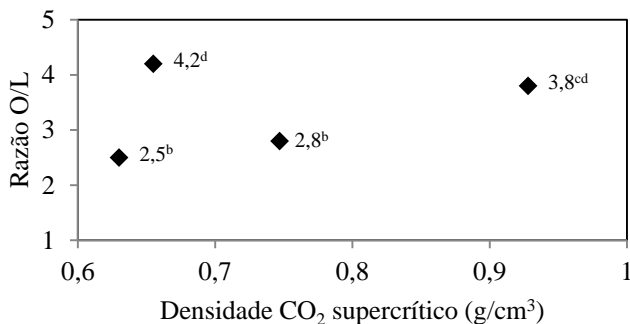
Através da Tabela 21 (pág. 117) é possível observar que a razão entre ácidos graxos insaturados e ácidos graxos saturados presentes no óleo comercial da Torta 1 (11,33) não difere significativamente do extrato obtido por ESC a 300 bar e 40°C (9,9), e o mesmo ocorre para a Torta 2. As razões de I/S dos extratos da Torta 1 só apresentaram diferença significativa entre as condições de 100 bar e 300 bar e 40°C. Não houve diferença na razão I/S dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração.

A razão O/L também é apresentada na Tabela 21 (pág. 117). Através das razões é possível observar que o óleo comercial da Torta 1 possui maior quantidade de ácido oleico em relação ao linoleico que o óleo comercial da Torta 2. Como já comentado anteriormente isso ocorre devido a diferença nas variedades de nozes que compõem as Tortas 1 e 2.

A razão O/L do óleo comercial da Torta 1 (4,1) é estatisticamente igual ao extrato obtido por ESC a 150 bar e 50°C (4,2) e por ESC 300 bar e 40°C (3,8). E a razão O/L do óleo comercial da Torta 2 (1,7) também é equivalente ao óleo obtido da ESC 300 bar e 40°C (2,0). Portanto, foi observada igualdade na composição de ácidos oleico e linoleico do óleo da torta de noz obtidos por ESC e da noz extraído por prensagem a frio industrial.

Na Tabela 21 (pág. 117) também é apresentada a densidade do solvente supercrítico utilizado para obter os extratos. Para melhor observar a relação entre a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico e a razão O/L (somente Torta 1) foi plotado o gráfico da Figura 27 (pág. 119), O/L *versus* densidade.

**Figura 27:** Razão O/L no óleo da Torta 1 de noz pecã com o aumento da densidade do CO<sub>2</sub> na extração.



De acordo com a Figura 27 é possível observar que não existe um comportamento uniforme da razão O/L dos extratos obtidos por ESC com o aumento da densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico. Estes resultados também podem ser observados no trabalho de outros autores com pressões de extração entre 413 e 668 bar na extração de óleo de noz pecã (MANESS *et al.*, 1995; ALEXANDER, BRUSEWITZ e MANESS, 1997). No trabalho dos autores, as razões O/L do óleo obtido por extração supercrítica fica em torno de 2,65 (ALEXANDER, BRUSEWITZ e MANESS, 1997). Assim como neste trabalho, existiram diferenças significativas entre as razões O/L em extratos obtidos em diferentes condições de extração, mas não existe um comportamento padrão com o aumento da densidade do solvente de extração.





## 5 CONCLUSÕES

Após a extração industrial do óleo, a torta de noz pecã ainda contém quantidades significativas de óleo residual e substâncias nutricionalmente interessantes, como proteínas, fibras e minerais.

A extração supercrítica das tortas de noz pecã apresentou altos rendimentos comparáveis a extrações convencionais. Os parâmetros de extração (pressão e temperatura) apresentaram efeito significativo nos rendimentos obtidos, sendo que os valores mais altos de rendimento foram obtidos nas condições a 300 bar a 40°C e 50°C.

Os rendimentos de extração supercrítica e a baixa pressão foram maiores para a Torta 1.

Os métodos de atividade antioxidante apontaram os extratos da Torta 1 e Torta 2 obtidos com solventes polares nas extrações a baixa pressão como os de maior atividade antioxidante. Algumas atividades antioxidantes destes extratos foram superiores que antioxidantes puros como TBHQ e ácido gálico.

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos da Torta 1 obtidos por extração supercrítica foram maiores para os extratos obtidos nas condições a 150 bar.

Alto teor de compostos fenólicos totais e taninos condensados foram detectados em extratos da Torta 2 obtidos por extrações a baixa pressão utilizando acetona.

A utilização de cossolvente no processo de extração supercrítica sequencial com fluido supercrítico acarretou um aumento no rendimento de extração, mas não na atividade antioxidante dos extratos.

Os perfis de ácidos graxos dos óleos das tortas de noz pecã não sofreram alteração com o emprego de diferentes técnicas de extração. A pressão e a temperatura da extração supercrítica tiveram efeito significativo nos teores de ácidos oleico, linoleico e palmítico do óleo extraído.

A extração supercrítica pode ser considerada uma técnica alternativa para extração de ácidos graxos da torta de noz pecã com alto rendimento. Além disso, o ácido oleico ( $\omega$ -9) e linoleico ( $\omega$ -6), compostos importantes para funções metabólicas no organismo humano, foram os ácidos graxos majoritários detectados nos óleos de torta de noz pecã.

O subproduto da indústria brasileira de óleo de noz pecã, torta de noz pecã, pode ser indicado como matéria-prima rica em óleo residual, fonte de compostos antioxidantes e ácidos graxos.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante a realização desta dissertação de mestrado, outras ideias surgiram para dar continuidade ao estudo, e ou, até formar novos projetos que melhor expliquem os fenômenos envolvidos neste trabalho.

Considerando a parte inicial do trabalho, testes preliminares, poderiam ser avaliados diferentes pré-tratamentos para a torta de noz pecã buscando maior facilidade de extração dos compostos de interesse.

Nas técnicas de extração à baixa pressão seria interessante considerar o estudo da extração por micro-ondas, que está se difundido nas pesquisas, e também a técnica de ultrassom com diferentes frequências, temperaturas e razão de solventes.

Os dados de extração supercrítica com mais alguns experimentos possibilitam a criação de modelos matemáticos que representem os fenômenos envolvidos na extração, além da possibilidade de ajuste das curvas a modelos já existentes na literatura.

Os dados disponíveis neste trabalho e algumas pesquisas de mercado permitem a elaboração de uma análise de custo da produção de um extrato com atividade antioxidante, ou rico em ácidos graxos insaturados, da torta de noz pecã em pequena (laboratorial) ou grande escala (industrial- ampliação de escala).

O extrato bruto pode ser adicionado a alimentos para verificar sua eficiência como antioxidante.

Migrando para área farmacêutica, seria interessante pesquisar a atividade antitumoral dos extratos de torta de noz pecã, já que o conhecimento popular e algumas literaturas já tratam o óleo da noz como combatente de radicais livres. Também pode ser averiguado seu potencial no tratamento de doenças de pele, uma vez que estudos indicam atividade antifúngica e indústrias já o utilizam na composição de cosméticos. A atividade hipolipemiante também pode ser testada pela quantidade de fitoesteróis presentes na noz.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS, A. C. S. **Pharmaceutical Roundtable Solvent Selection Guide**: GCI-Green Chemistry Institute: 2 p. 2011.

AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. 2. New York: Marcel Dekker Inc, 2002. 1014.

ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, n. 0, p. 86-95, 6// 2012.

ALEXANDER, W. S.; BRUSEWITZ, G. H.; MANESS, N. O. Pecan Oil Recovery and Composition as Affected by Temperature, Pressure, and Supercritical CO<sub>2</sub> Flow Rate. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 4, p. 762-766, 1997.

ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, n. 0, p. 544-552, 1/15/ 2012.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg, Maryland: AOAC International 2005.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. Champaign 1993.

\_\_\_\_\_. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. Champaign 1995.

\_\_\_\_\_. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. Champaign: AOCS Press 2003.

AOCS, A. O. C. S. **Fatty Acid Finder Version1.0**. 1 1999.

ASFAWA, N. et al. Coexistence of chrysanthenone, filifolone and (Z)-isogeranic acid in hydrodistillates. Artefacts! **Phytochemistry**, v. 58, p. 489-492, 2001.

BENELLI, P. et al. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132-141, 11// 2010.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 17-23, 11// 2009.

BLOCK, J. M.; BARRERA-ARELLANO, D. Composition and stability of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] kernels and oil. In: TOMÁS, M. B. (Ed.). **Advances in Fats and Oil Research**. India: Transworld Research Network, 2010. cap. 7,

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. 2. São Paulo: Livraria Varela, 1989.

BORTOLETTI, V. S. **II Seminário da Cultura da Noz Pecan abre os eventos técnicos da FestLeite**. Portal Região dos Vales: Portal Região dos Vales 2012.

BRANEN, A. L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 52, n. 2, p. 59-63, 1975/02/01 1975.

BRASIL. **Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva**. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Instrução normetiva nº 1: 13 p. 2012.

BREITENBECK, G.; GRAHAM, C.; IQBAL, J. **Potential for Nonmarketable Pecans for Biodiesel Production**. Louisiana Agriculture Magazine: LSUAgCenter 2009.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. New York: Springer, 1994. 386.

\_\_\_\_\_. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-33, 3// 2005.

Codex Alimentarium. **Codex Standard For Named Vegetable Oils**. ALIMENTARIUM, C. 210-1999: 16 p. 1999.

D'AVILA, R. F. et al. **Rendimento de extração e parâmetros de qualidade do óleo de castanha do brasil extraído por prensagem e por solvente**. XIII ENPOS. Pelotas, RS 2011.

DE CAMPOS, L. M. A. S. et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 11// 2008.

DE LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 219 Tese de Doutorado (Doutor). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- DÍAZ\_REINOSO, B. et al. Antioxidant Extraction by Supercritical Fluids. In: MARTINEZ, J. L. (Ed.). **Supercritical Fluid extraction of nutraceutical and bioactive compounds**. Estados Unidos: CRC Press, 2006. cap. 9, p.275-293.
- DO PRADO, A. C. P. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz-pecã [Carya illinoensis(wangenh) c. Koch]**. . 2008. 131 (Mestre). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DO PRADO, A. C. P. et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [Carya illinoensis (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops and Products**, v. 52, n. 0, p. 552-561, 1// 2014.
- DO PRADO, A. C. P. et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [Carya illinoensis (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, n. 0, p. 64-73, 2// 2013.
- DUNFORD, N. T.; TEMELLI, F. Extraction Conditions and Moisture Content of Canola Flakes as Related to Lipid Composition of Supercritical CO2 Extracts. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p. 155-159, 1997.
- FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (Piper nigrum L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 263-269, 10// 2002.
- FIRESTONE, D. **Physical and Chemical characteristics of Oil, Fats and Waxes**. Washington, D. C.: AOCS Press, 1999.
- FOURIE, P. C.; BASSON, D. S. Changes in the tocopherol content of almond, pecan and macadamia kernels during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, n. 8, p. 1113-1115, 1989/08/01 1989.
- FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact in food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 4, 1996.
- FRANKEL, E. N. 25 - Natural Phenolic Antioxidants and Their Impact on Health. In: LESTER, P.; MIDORI, H., et al (Ed.). **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999. p.385-392. ISBN 978-0-12-543590-1.
- FRANKEL, E. N.; FINLEY, J. W. How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4901-4908, 2008/07/01 2008.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 10/ 2000.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 269-279, 2010.

GELMEZ, N.; KİNCAL, N. S.; YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 217–224, 2009.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Catalogação na Publicação Câmara Brasileira do Livro, 1983.

GRUSZYNSKI, C. **Resíduo Agro-industrial "casca de tungue" como componete de substrato para plantas**. 2002. (Msc.). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HAWKER, J. S. Insoluble invetase from grapes: an artifact of extraction **Phychemist**, v. 8, p. 337-344, 1968.

INC, I. N. A. D. F. **Nut And Dried Fruit Global Statistical Review**. Espanha: 1-72 p. 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, I. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 032/IV: 114-116 p. 2008.

KHATTAB, R. et al. Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid, and condensed tannins in canola. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1266-1272, 10/15/ 2010.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 330-334, 1982/03/01 1982.

LI, M.; BELLMER, D. D.; BRUSEWITZ, G. H. Pecan Kernel Breakage and Oil Extracted by Supercritical CO<sub>2</sub> as Affected by Moisture Content. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1084-1088, 1999.

LIU, G. et al. Effects of supercritical CO<sub>2</sub> extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 573-578, 7// 2012.



LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, 8/10/ 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 4/16/ 2010.

LUZ, E. D. N. M. et al. **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural Ltda, 2001. 754.

MANESS, N. et al. Quantitative extraction of pecan oil from small samples with supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 665-669, 1995/06/01 1995.

MANHEZI, A. C.; BACHION, M. M.; PEREIRA, A. L. **Utilização de Ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas**. Revista Brasileira de Enfermagem. 61: 620-628 p. 2008.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487-496, 1// 2007.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas. 26: 380-385 p. 2006.

MATTHÄUS, B. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002/06/01 2002.

MEIRELES, M. A. A. **Extracting Bioactive Compounds for Food Products**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009. 464.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 71-75, 1// 1998. ISSN 0308-8146.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 11// 2009.

- MEZZOMO, N. et al. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5622-5632, 7// 2010.
- MICHIELIN, E. M. Z. et al. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 2, p. 131-138, 2// 2005.
- MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6615-6623, 12// 2009.
- MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 421-427, 11/15/ 2008.
- MOHAMED, R. S.; MANSOORI, G. A. **The use of supercritical fluid extraction technology in food processing.** Food Technology Magazine: 15 p. 2002.
- MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide.** Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. 339.
- MURGA, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Study of the extraction of natural polyphenols from grape seeds by using supercritical carbon dioxide. 5 Meeting on Supercritical Fluids: Material and Natural Products Processing, 1998, France. ISASF-International Society for the Advancement of Supercritical Fluids p.529-532.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 10/29/ 2004.
- O'FALLON, J. V. et al. **A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs.** 2010.
- OETTERER, M.; REGITANO-D'ACE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Manole, 2006. 612.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 423-432, 4/10/ 2013.
- ORO, T. **Composição nutricional , compostos bioativos e vida de prateleira de noz e óleo prensado a frio de noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]** 2007. 105 (Mestre). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- ORO, T. et al. Physicochemical and Sensory Quality of Crude Brazilian Pecan Nut Oil during Storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 10, p. 971-976, 2009/10/01 2009.
- ÖZKAL, S. G.; SALGİN, U.; YENER, M. E. Supercritical carbon dioxide extraction of hazelnut oil. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 2, p. 217-223, 7// 2005.
- PALMA, M.; TAYLOR, L. T. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 1, p. 117-124, 7/16/ 1999.
- PALMA, M. et al. Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5044-5048, 1999/12/01 1999.
- PANIWNYK, L. et al. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 299-301, 7// 2001.
- PARISOTTO, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, n. 0, p. 101-107, 1// 2012.
- PEREDA, S.; BOTTINI, S. B.; BRIGNOLE, E. A. Fundamentals of Supercritical Fluid Technology. In: MARTINEZ, J. L. (Ed.). **Supercritical Fluid extraction of nutraceutical and bioactive compounds** Estados Unidos: CRC Press, 2007. cap. 1, p.1-21.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 8// 2006.
- PESCHEL, W. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 7// 2006.
- PIGHINELLI, A. L. M. T. et al. Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, p. 66-71, 2008.
- PIZZOLATTI, M. G. et al. **Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia. Brasil. 12: 21-26 p. 2002.
- POLETTI, T. et al. **Análise de características dos frutos de cultivares de Nogueira-pecã cultivadas no Rio Grande do Sul**. XVI Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão. Santa Maria 2012.

RAHMAN, N. N. A. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of the residual oil from palm kernel cake. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 166-170, 1// 2012..

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. **The properties of gases and liquids**. New York: Mc Graw-Hill, 1989.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, 9// 2006.

**RGui**. The R Foundation for Statistical Computing 2013.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, // 1996.

RIO GRANDE DO SUL. Diretor da Emater/RS conhece maior pomar de noz pecã da América Latina. Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: < <http://www.rs.gov.br/master.php?capa=1&int=noticia&notid=66746&pag=12&edito ria=&midia=&orig=1> >. Acesso em: 08-2012.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (Cocos nucifera) shell powder. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 869-872, 6// 2007.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (Cocos nucifera) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95-100, 1// 2008.

SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 240-253, 11// 2009.

SANTA CATARINA. Reunião aborda perspectivas da noqueira pecan para o Alto Vale do Itajaí., Santa Catarina, 2012. Disponível em: < [http://www.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3370:reuniao-aborda-perspectivas-da-nogueira-pecan-para-o-alto-vale-do-itajai-&catid=34:noticias-epagri&Itemid=51](http://www.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=3370:reuniao-aborda-perspectivas-da-nogueira-pecan-para-o-alto-vale-do-itajai-&catid=34:noticias-epagri&Itemid=51) >. Acesso em: 08-2012.

SANTERRE, C. R. **Pecan Technology**. New York: Chapman & Hall: 161 p. 1994.

SAS\_INSTITUTE\_INC. **The SAS System for Windows**. Estados Unidos 2002.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1–2, p. 21-40, 5/16/ 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Porto Alegre Florianópolis: Editora UFRGS Editora UFSC, 2003. 1102.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 09/01/ 1965.

SMITH JR, R. L. et al. Separation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid with supercritical carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 1, p. 1-7, 5// 2003.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>—I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, // 1994.

TEMELLI, F. et al. Supercritical Fluid Extraction of Specialty Oils. In: MARTINEZ, J. L. (Ed.). **Supercritical Fluid extraction of nutraceutical and bioactive compounds**. Estados Unidos: CRC Press, 2007. cap. 3, p.52-91.

USDA. **Nutrient data for 12142, Nuts, pecans** 2001.

VENKATACHALAM, M. **Chemical Composition of Select Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] Varieties and Antigenic Stability of Pecan Proteins**. 2004. 106 (Doctor of Philosophy). Department of Nutrition, Food and Exercise Sciences, Florida State University, Florida.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241-1249, // 2007.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 7// 2001.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos Graxos em óleos e gorduras: Identificação e Quantificação**. São Paulo: Livraria Varela, 2006. 120.

WOOD, B. W.; PAYNE, J. A.; GRAUKE, L. J. An overview of the evolution of the U.S. pecan industry. In: SANTERRE, C. R. (Ed.). **Pecan Technology**. New York: Chapman and Hall, 1994. cap. 1, p.1-11.

WU, X. et al. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004/06/01 2004.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 12// 2009.

ZETZL, C.; LOZANO, G. A.; BRUNNER, G. **Compilation of batch SFE-Models for natural products. Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA)**. Foz do Iguaçu, Paraná, : Caderno de Resumos do PROSCIBA 2007.

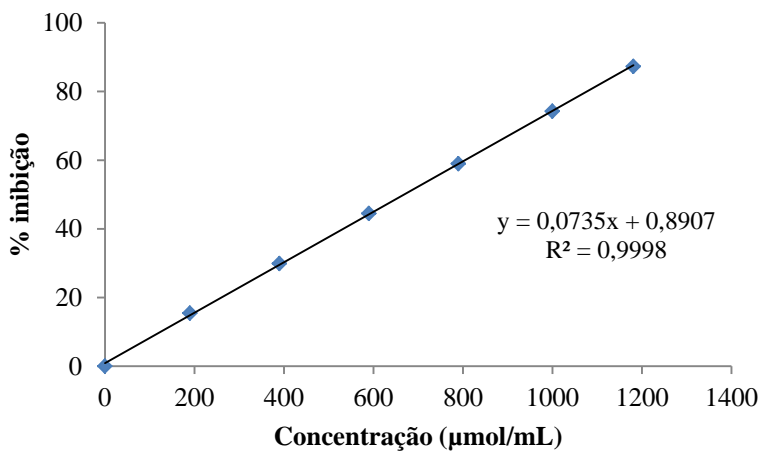
ZHANG, C. et al. **Feasibility of using supercritical carbon dioxide for extracting oil from whole pecans**. American Society of Agricultural and Biological Engineers. Michigan. 38: 1763-1767 p. 1995.

ZHANG, Z.-S. et al. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 1, p. 192-198, 8/1/ 2008.

ZHAO, X.-Y. et al. The Effect of Pecan Oil on Hippocampal Cells Apoptosis of Ovariectomized Rats. **Procedia Engineering**, v. 18, n. 0, p. 375-380, // 2011.

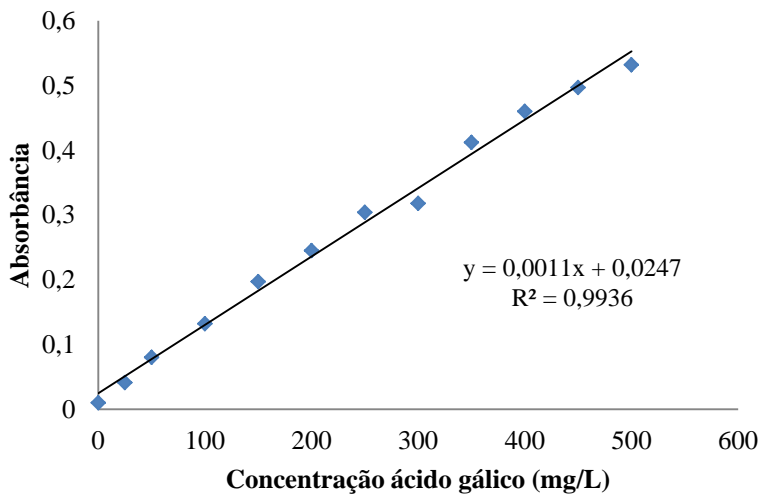
**APÊNDICE A** – Curva analítica do método de atividade antioxidante do radical ABTS.

**Figura 28:** Curva analítica de Trolox necessária para determinar a atividade antioxidante dos extratos pelo método do radical ABTS.







**APÊNDICE B** – Curva analítica do método de Fenólicos Totais.**Figura 29:** Curva analítica de ácido gálico necessária para determinar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos.



**APÊNDICE C** – Curva analítica do método de Taninos condensados.**Figura 30:** Curva analítica de catequina necessária para determinar o teor de taninos condensados dos extratos.