



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO – CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**POLLYANNA NOGUEIRA DA CRUZ
Engenheira de Alimentos (UFMT 2014)**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DOS
EXTRATOS OBTIDOS DA SEMENTE DE BUTIÁ DA PRAIA
(*Butia catarinensis*)**

**FLORIANÓPOLIS
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO – CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DOS
EXTRATOS OBTIDOS DA SEMENTE DE BUTIÁ DA PRAIA
(*Butia catarinensis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração:
Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coorientadora: Dr^ª. Daniela Alves de Oliveira

**POLLYANNA NOGUEIRA DA CRUZ
Engenheira de Alimentos (UFMT 2014)**

Florianópolis
2016

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

Cruz, Pollyanna Nogueira da
Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos
obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*)
/ Pollyanna Nogueira da Cruz ; orientadora, Sandra Regina
Salvador Ferreira ; coorientadora, Daniela Alves de
Oliveira. - Florianópolis, SC, 2016.
150 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Atividade antioxidante.
3. Atividade antibacteriana. 4. Extração supercrítica. 5.
Extratos de resíduos de butiá. I. Ferreira, Sandra Regina
Salvador. II. Oliveira, Daniela Alves de. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DOS
EXTRATOS OBTIDOS DA SEMENTE DO BUTIA DA PRAIA
(*Butia catarinensis*)**

Por

Pollyanna Nogueira da Cruz

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira
Orientadora

Prof. Dr. Marco di Luccio
Coordenador do Curso

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Sandra Regina Salvador

Prof^a. Dr^a Patrícia Benelli

Prof. Dr. Márcio José Rossi

Prof. Dr. Haiko Hense

Florianópolis, 1 de março de 2016.

*À minha família, por todo o amor,
dedicação e incentivo...*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis e me dar força para superar as dificuldades.

À meus pais, Lilia e Fernando e minha irmã, por minha educação, pelo amor incondicional, pelo incentivo e orgulho por esta conquista.

Ao meu noivo Otto Júlio pelo amor, por me apoiar e por toda ajuda cedida no decorrer do trabalho.

À Prof. Sandra Regina e Daniela Alves de Oliveira, pela excelente orientação e pelos incontáveis ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica e para a execução deste trabalho.

Ao PGEAL/UFSC, pela oportunidade de cursar o mestrado e aos professores do PGEAL pelos importantes ensinamentos acadêmicos.

À Capes pelo suporte financeiro.

À banca examinadora, pelas contribuições, sugestões e atenção dedicadas ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos amigos do LATESC, pela convivência, momentos de descontração, ajuda e troca de experiências, em especial, Páulia, Camila, Gean e Pedro que sempre que precisei, sempre estavam dispostos para me ajudar não importando as circunstâncias.

À Thatyara, minha iniciação científica, por sempre ter estado disposta e me ajudado a realizar este trabalho.

Às pós-docs Kátia Andrade e Natália Mezzomo pelo carinho, auxílio e principalmente por toda paciência em todos os momentos.

À todos que de certa forma contribuíram e torceram para o sucesso deste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A espécie *Butia catarinensis* pertence à família Arecaceae, é geralmente produzida na região Sul da América do Sul. Com o processamento da polpa para a produção de bolo, licor e sorvete, as sementes dos frutos são normalmente descartadas. Este estudo tem como objetivo fornecer uma alternativa para valorizar os resíduos industriais. Para essa proposta, a extração supercrítica (ESC) foi aplicada na obtenção de extratos de semente de butiá nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 100, 200 e 300 bar. Foram avaliados o rendimento global de extração, a modelagem matemática da cinética de extração, as atividades antioxidante e antimicrobiana e a composição dos extratos. Os resultados obtidos com o CO₂ supercrítico puro e adicionando cossolvente a ele foram comparados com os resultados de técnicas de extração à baixa pressão (Soxhlet e extração assistida por ultrassom) utilizando diferentes solventes (hexano, etanol e etanol-água). O modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais da curva de ESC foi o modelo de Martínez et al (2003). A ESC com CO₂ proporcionou maiores rendimentos na condição de 60 °C/ 300 bar e com a adição de cossolvente ao CO₂ na condição de 40 °C/ 200 bar/ 2,5% ethanol-water. Para as extrações à baixa pressão, o maior rendimento foi obtido pelo método Soxhlet com etanol. O menor valor de EC₅₀, determinado pelo método do radical DPPH, foi apresentado pelo extrato de Soxhlet com etanol-água. Esse mesmo extrato apresentou a maior atividade antioxidante avaliado pelo método de ABTS e o maior teor de compostos fenólicos, avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu. A maior atividade antioxidante, determinada pelo método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, foi apresentada pelo extrato de Soxhlet com etanol. Os extratos de Soxhlet com etanol e etanol-água, ultrassom com etanol-água e ESC 40°C/100 bar foram fortes inibidores contra *B. cereus* e os extratos de Soxhlet com etanol e etanol-água, ultrassom com hexano, etanol e etanol-água, ESC 50°C/ 100 bar e ESC 60°C/ 300 bar foram fortes inibidores contra a *E. coli*. Os compostos identificados pela análise cromatográfica gasosa (CG) em um maior número de amostras foram o ácido cinâmico e o ácido caprílico. Apesar da ESC apresentar rendimentos próximos quando comparados com os extratos de soxhlet e ultrassom, esta técnica torna-se bem interessante na obtenção de compostos de alto valor agregado, devido à seletividade do processo. Logo, os extratos obtidos da semente de butiá são potenciais fontes de antioxidantes e antimicrobianos naturais para a indústria de alimentos.

ABSTRACT

The *Butia catarinensis* species belongs to the *Arecaceae* family, is produced in the southern region of South America. The pulp is processed for the production of cake, rum and ice cream, and the fruit seeds are usually discarded. This study aims to provide an alternative to value this industrial waste. For that purpose, the supercritical fluid extraction was applied to Jelly-Palm (*Butia*) seeds at temperatures of 40, 50 and 60 °C and pressures of 100, 200 and 300 bar. The mathematical modeling of the extraction kinetics, the global extraction yield, antioxidant and antimicrobial activities and extract composition were evaluated. The results of the supercritical fluid extraction with pure CO₂ and with the addition of a cosolvent to CO₂ were compared to low pressure extraction techniques (Soxhlet and Ultrasonic extraction) using different solvents (hexane, ethanol, ethanol-water). The model that best fitted the experimental supercritical fluid extraction curve was Martínez et al. (2003) model. The supercritical fluid extraction (SFE) with CO₂ presented higher yields at 60 °C/ 300 bar and when a cosolvent was added to the extraction at 200 bar/ 40 °C/ 2.5 % ethanol-water. For the low pressure techniques, the best yield obtained by Soxhlet method with ethanol. The lowest EC₅₀ value, determined by the DPPH radical method was submitted from Soxhlet extraction with ethanol-water. This same extract submitted the highest antioxidant activity using ABTS method and total phenolic content, evaluated by the Folin-Ciocalteu technique. For the β-carotene/linoleic acid bleaching method the highest antioxidant activity was presented by the extract obtained from Soxhlet extraction with ethanol. The extracts from Soxhlet with ethanol and ethanol-water, ultrasound with ethanol-water and SFE 40 °C/ 100 bar were strong inhibitors against *B. cereus* and the extracts from Soxhlet with ethanol and ethanol-water, ultrasound with hexane, ethanol and ethanol-water, SFE 50 °C/ 100 bar and SFE 60 °C/ 300 bar were strong inhibitors against *E. coli*. The main substances identified by CG analysis were cinnamic and caprylic acid. Despite the SFE extracts presented close yields when compared to soxhlet and Ultrasonic, this technique is very interesting in obtaining the compounds of high aggregated value due to the selectivity of the process. Therefore, the extracts obtained of the Jelly Palm seed are potential sources of antioxidants and natural antimicrobial agents for the food industry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Butiazal no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, RS.....	29
Figura 2. Fruto <i>Butia catarinense</i>	30
Figura 3. Grupos que compreendem os compostos fenólicos.	33
Figura 4. Antioxidantes sintéticos.....	35
Figura 5. Diagrama pressão – temperatura para um componente puro.	40
Figura 6. Diagrama da extração supercrítica de matrizes sólidas.....	42
Figura 7. Representação da curva de ESC apresentando as três etapas de extração.	44
Figura 8. Fruto <i>in natura</i> (a), semente seca de butiá (b), semente triturada de butiá pronta para extração (c).....	47
Figura 9. Picnômetro acoplado ao cilindro de gás hélio	49
Figura 10. Equipamento de extração supercrítica.	53
Figura 11. Esquema detalhado dos componentes da unidade da ESC. .	54
Figura 12. Curva de experimental de extração com fluido supercrítico de óleo de semente de <i>Butia catarinensis</i> a 100 bar, 40°C e 6,66 g/min de CO ₂	67
Figura 13. Curva de ESC de extrato de semente de <i>Butia catarinensis</i> e modelada a 100 bar, 40 C e 6,66 ±2 g/min de CO ₂	69
Figura 14. Gráfico de pareto com os efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) da pressão e temperatura para a resposta rendimento global obtido na ESC dos extratos de semente de <i>Butia catarinensis</i>	74
Figura 15. Isotermas de extração supercrítica da semente de <i>Butia catarinensis</i> em função da pressão de operação.....	75
Figura 16. Superfície de resposta para o rendimento global obtido na ESC dos extratos de semente de <i>Butia Catarinensis</i>	78
Figura 17. Curva padrão de ácido gálico utilizada no cálculo de compostos fenólicos dos extratos de semente de <i>Butia catarinensis</i> . .	140
Figura 18. Curva padrão de trolox utilizada na determinação de atividade antioxidante pelo método de ABTS dos extratos de semente de <i>Butia catarinensis</i>	140
Figura 19. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Soxhlet Hexano.	141
Figura 20. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Soxhlet Etanol.	141
Figura 21. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Soxhlet Etanol-Água.	142
Figura 22. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Ultrassom Hexano.	142

Figura 23. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Ultrassom Etanol.	143
Figura 24. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Ultrassom Etanol-Água.	143
Figura 25. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 100 bar.	144
Figura 26. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar.	144
Figura 27. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 300 bar.	145
Figura 28. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 50 °C/ 100 bar.	145
Figura 29. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 50 °C/ 200 bar.	146
Figura 30. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 50 °C/ 300 bar.	146
Figura 31. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 60 °C/ 200 bar.	147
Figura 32. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 60 °C/ 300 bar.	147
Figura 33. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % Etanol.....	148
Figura 34. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 5 % Etanol.....	148
Figura 35. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 7,5 % Etanol.....	149
Figura 36. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % Etanol – Água.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos utilizados para analisar a atividade antioxidante.	35
Tabela 2. Grupos com propriedades antimicrobianas.	36
Tabela 3. Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica.	43
Tabela 4. Índice de polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração em Soxhlet.	51
Tabela 5. Variáveis e níveis do planejamento experimental.	56
Tabela 6. Matriz de planejamento fatorial 3 ² com a T (Temperatura) e P (Pressão) variando em três níveis.	57
Tabela 7. Teor de umidade e substâncias voláteis.	65
Tabela 8. Caracterização do leito de partículas de semente de <i>Butia catarinensis</i>	66
Tabela 9. Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico da semente de <i>Butia catarinensis</i> , realizada a 100 bar, 40 °C e 6,66 ± 2 g/min de CO ₂	67
Tabela 10. Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da ESC de semente de <i>Butia catarinensis</i> a 100 bar, 40 °C e vazão de 6,66 ± 2 g/min de CO ₂	70
Tabela 11. Valores de rendimento global (X ₀) obtidos para as extrações a baixa pressão de semente de <i>Butia catarinensis</i> com diferentes solventes.	72
Tabela 12. Resultados de rendimento global (X ₀) obtidos para a ESC de semente de <i>Butia catarinensis</i> com vazão de 6,66 ± 2 g/min e valores da massa específica do CO ₂ para cada condição.	74
Tabela 13. Estimativa do coeficiente de regressão e teste T sobre a resposta rendimento dos extratos de semente de <i>Butia catarinensis</i>	77
Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) do modelo completo da tabela de regressão para o rendimento dos extratos de <i>Butia catarinensis</i>	77
Tabela 15. Rendimentos obtidos com o emprego de cossolvente na extração supercrítica de semente de butiá a 200 bar e 40 °C.	79
Tabela 16. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>Butia catarinensis</i> através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % de atividade (EC ₅₀).	81
Tabela 17. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>Butia catarinensis</i> através do método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação para 1667 µg extrato/mL.	84

Tabela 18. Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de semente de <i>Butia catarinensis</i>	86
Tabela 19. Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos da semente de <i>Butia catarinensis</i>	89
Tabela 20. Resultados do teste de difusão em ágar expressos em tamanho do halo de inibição (mm) para os extratos de semente de butiá.	92
Tabela 21. Concentração mínima inibitória dos extratos de semente de <i>Butia catarinensis</i> obtidos por técnicas a baixa pressão e ESC contra <i>B. cereus</i> e <i>E. coli</i>	95
Tabela 22. Compostos identificados nos extratos de <i>Butia catarinensis</i> com os tempos de retenção (TR (min)) e área relativa	100
Tabela 23. Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos do experimento cinético para a semente de <i>Butia Catarinensis</i> a 100 bar, 40 °C e 6,66 g CO ₂ /min.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% AA	Percentual de atividade antioxidante
Σ	somatório
OH	Radical hidroxil
Abs	Absorbância
ABTS	2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
BHT	Butil-hidroxitolueno
C_a	Concentração
C_e	Concentração de extrato ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
CE ₅₀	Concentração efetiva a 50 %
CER	do inglês, <i>Constant extraction rate</i>
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas
CMI	Concentração mínima inibitória
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Cossolvente
DCP	do inglês, <i>Diffusion-controlled period</i>
D_{ext}	Diluição das amostras
D	Diâmetro da peneira i
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
d_s	Diâmetro médio superficial das partículas
EC ₅₀	Concentração equivalente a 50 % da atividade antioxidante
ESC	Extração supercrítica
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FER	do inglês, <i>Falling extraction rate</i>
GAE	<i>Gallic acid equivalent</i> - Equivalente de ácido gálico
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
H ₂ O	água
Hx	Hexano
M	Massa total de amostra
m	Massa
M_{CER}	Taxa de extração na etapa CER
m_{EXT}	Massa de extrato
$M_{Extrato}$	Massa de extrato

m_f	Massa final de amostra
m_i	Massa inicial de amostra ou massa de amostra retida na peneira i
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
OH ^{·-}	Radical hidroxila
P	Nível de significância
P	Pressão
R [·]	Radical alquila
RO [·]	Radical alcoxi
ROO [·]	Radical alquilperoxil
SOX	Soxhlet
T	Temperatura
t	Tempo de extração
T _c	Temperatura crítica
t_{CER}	Tempo de duração da etapa CER
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
t_{FER}	Tempo de duração da etapa FER
TFT	Teor de compostos fenólicos total
UE	extração assistida por ultrassom
X ₀	Rendimento global da extração
Y _{CER}	Concentração de soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER
ε	Porosidade do leito
ρ_a	Massa específica aparente
ρ_{CO_2}	Massa específica do solvente supercrítico
ρ_r	Massa específica real

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
2.	OBJETIVOS	27
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1.	BUTIÁ - DA – PRAIA (<i>butia catarinensis</i>).....	29
3.1.1.	Polpa de butiá	30
3.1.2.	Amêndoa de butiá.....	31
3.2.	ANTIOXIDANTES.....	32
3.3.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
3.4.	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	37
3.4.1.	Extração Soxhlet.....	38
3.4.2.	Extração assistida por ultrassom	39
3.4.3.	Extração Supercrítica	39
3.5.	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE..	46
4.	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1.	OBTENÇÃO E PRÉ TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA 47	
4.2.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS	47
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULA DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	48
4.3.1.	Determinação do diâmetro médio de partículas	48
4.3.2.	Determinação da massa específica aparente do leito de partículas (ρ_a).....	49
4.3.3.	Determinação da massa específica real das partículas (ρ_r)...	49
4.3.4.	Porosidade do leito de ESC.....	50
4.4.	EXTRAÇÕES À BAIXA PRESSÃO.....	50
4.4.1.	Extração em Soxhlet.....	51
4.4.2.	Extração com Ultrassom	52
4.5.	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	53
4.5.1.	Determinação da cinética de extração e modelagem matemática.....	55
4.5.2.	Determinação do rendimento de extração.....	56
4.5.3.	Emprego de cossolvente	57
4.6.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	58
4.6.1.	Método DPPH.....	58
4.6.2.	Método ABTS.....	58

4.6.3. Método β caroteno – Linoleato	59
4.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	61
4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ...	62
4.8.1. Método de difusão em ágar	62
4.8.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	62
4.9. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA	63
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS	65
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	65
5.3. CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	66
5.4. MODELAGEM MATEMÁTICA	68
5.5. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRATO (%).....	72
5.6. EMPREGO DE COSSOLVENTE	78
5.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH ..	80
5.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA B - CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO	83
5.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO ABTS.....	85
5.10. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)	88
5.11. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	91
5.11.1. Método de Difusão em Ágar	91
5.11.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	93
5.12. CROMATOGRAFIA GASOSA	97
6. CONCLUSÃO	105
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
9. ANEXOS E APÊNDICES	129

1. INTRODUÇÃO

As frutas e os vegetais são conhecidos como fonte de vitaminas, proteínas, carboidratos e sais minerais na alimentação humana. Esse nutrientes são cruciais para uma dieta saudável e, do ponto de vista medicinal, algumas substâncias benéficas existentes nas frutas e vegetais são capazes de curar enfermidades. A possibilidade de se isolar algum composto vegetal permitiu o desenvolvimento de produtos naturais, como suplementos alimentares e até mesmo alimentos enriquecidos com compostos benéficos ao homem. Alguns desses compostos naturais também são capazes de conservar alimentos, como é o caso de substâncias com propriedades antioxidantes e antimicrobianas. A utilização desses compostos permite produzir alimentos com maior segurança à saúde de quem os ingere, quando comparada à utilização de produtos sintéticos.

Pesquisas mostram que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e com o meio ambiente, buscando produtos naturais de melhor qualidade e com menor impacto ambiental. Diante disso, as indústrias e o setor acadêmico passaram a pesquisar processos alternativos que possam atender a essas demandas. Dentre esses processos encontram-se as técnicas de extração chamadas de “química verde”, aplicadas aos produtos naturais. Destacam-se, neste segmento, os processos que não geram poluentes químicos e nem degradam os compostos de interesse, como os processos de extração por micro-ondas, por ultrassom ou que fazem uso de altas pressões e fluidos no estado supercrítico.

A espécie *Butia catarinensis* pertence à família Arecaceae, é disseminada na região Sul da América do Sul, principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os frutos são perfumados e comestíveis, de sabor ácido e coloração amarelo-alaranjado e têm despertado a atenção pelas suas características nutraceuticas e antimicrobianas.

As sementes do *Butia catarinensis* são usualmente descartadas sem nenhum aproveitamento tecnológico quando os frutos são processados para o congelamento das polpas, necessitando de estudos que demonstrem seu potencial para as indústrias alimentícias e farmacêuticas. O aproveitamento das sementes surge como uma alternativa para valorizar estes resíduos industriais.

As frutas, folhas e sementes são fontes naturais de antioxidantes e diversas pesquisas têm apontado seu uso como alternativa para a substituição dos antioxidantes sintéticos. Estes têm sido alvo de

questionamentos quanto a sua inocuidade, levando a indústria de alimentos a procurar alternativas para a sua substituição.

A qualidade e composição dos extratos de produtos naturais estão fundamentalmente relacionadas com a técnica de extração empregada na sua preparação. Entre as diversas técnicas destaca-se a extração à alta pressão. Essa técnica de extração utiliza fluidos subcrítico ou supercrítico tem como uma de suas vantagens a obtenção do extrato livre do solvente, com elevado grau de pureza e, como desvantagem o alto custo devido a utilização de materiais e estrutura resistentes a altas pressões.

Apesar de todas as vantagens já conhecidas da extração supercrítica (ESC), a sua aplicação industrial ainda é escassa, principalmente devido à questão da viabilidade econômica, tornando necessária a realização de estudos relativos a otimização do processo. Desta forma, este trabalho dedica-se a estudar e comparar técnicas de extração a baixa pressão com os extratos obtidos à alta pressão, avaliando sua atividade biológica (antioxidante e antibacteriana) e seu perfil de compostos voláteis.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o emprego do processo de extração supercrítica na obtenção de extratos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*) e comparar com as extrações à baixa pressão, avaliando a composição química e a atividade biológica destes extratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Utilizar técnicas de extração à baixa pressão, Soxhlet e ultrassom, com solventes orgânicos de diferentes polaridades para a obtenção de extratos de semente de butiá;
- b) Determinar o rendimento de extração à baixa pressão visando a seleção de cossolvente para a ESC;
- c) Determinar a curva global de extração supercrítica para o extrato da semente de butiá, visando o estudo da cinética de transferência de massa e aplicação da modelagem matemática, utilizando os modelos de Sovová (1994), Martínez et al. (2003), Crank (1975), e Gaspar et al. (2003), disponíveis na literatura;
- d) Avaliar o rendimento da ESC em função das condições de operação e comparação com as técnicas à baixa pressão;
- e) Definir as condições ótimas de extração para a semente de butiá com CO₂ supercrítico com e sem adição de cossolvente, em termos de rendimento de processo;
- f) Analisar a atividade antioxidante dos extratos obtidos através dos métodos DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hydrazil), β caroteno/ácido linoléico e ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico));
- g) Determinar o teor de compostos fenólicos dos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu;

- h) Analisar a atividade antibacteriana dos extratos através dos métodos de difusão em ágar e pela determinação da concentração mínima inibitória, utilizando as bactérias *Escherichia coli* (CTT 1371) e *Bacillus cereus* (ATCC 8739).
- i) Identificar os compostos voláteis dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BUTIÁ - DA – PRAIA (*Butia catarinensis*)

O *Butia catarinensis* ou *Butia capitata* (nomenclatura anterior a mudança do Herbário Barbosa Rodrigues em setembro de 2011) é uma espécie da família Arecaceae, disseminada na região Sul da América do Sul, mas principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LEITMAN et al., 2010). O fruto é conhecido popularmente por outros nomes, como butiá-da-praia, butiazeiro, butiá, butiá-azedo, butiá-vinagre, butiá-branco, butiá-roxo, butiá-miúdo, butiá-pequeno, butiá-grado. Fora do Brasil é chamado de *Geleepalme*, *wine-palm* ou *jelly-palm*.

A árvore é uma palmeira de 3 a 5 m de altura, com folhas de 1 a 2 m ou mais, ascendentes e arqueadas na parte de cima, levemente azuladas ou glaucas, ao menos na face inferior (Figura 1), e o fruto (Figura 2) largamente cônico a depresso-globoso, não excedendo muito 20 mm de comprimento axial e, muitas vezes, 3 a 5 mm mais largo do que isso; caroço é quase globular, cerca de 13 mm de altura, poros proeminentes, com 1-3 compartimentos. Os frutos são perfumados e comestíveis, de agradável sabor, exceto os ácidos (REITZ, 1974).

Figura 1. Butiazal no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, RS.



Foto: Coradin et al. (2011).

Figura 2. Fruto *Butia catarinense*

Fonte: Elaborada pela autora.

Os frutos são comercializados *in natura* em feiras e beiras de estrada nas regiões de ocorrência da espécie. Em alguns municípios, como Laguna e Imbituba, ambos no Estado de Santa Catarina, os coletores separam a polpa dos frutos e congelam para produção de bolo, cachaça, suco, doce, licor e sorvete.

3.1.1. Polpa de butiá

O butiá apresenta polpa composta de umidade (85,4 %), cinzas (0,9 %), proteína (0,3 %), lipídeos totais (2,6 %), fibras em detergente neutro (FDN) (6,2 %), fibras em detergente ácido (FDA) (3,9 %) e carboidratos (0,7 %). Essa polpa também é fonte de minerais, com destaque para o potássio (462,4 mg/100g), fósforo (19,9 mg/100g), cálcio (16,8 mg.100/g), magnésio (12,5 mg/100g) e enxofre (7,3 mg/100g) (FARIA et al., 2008).

Segundo FARIA et al. (2008b), a concentração de fibras, pró-vitamina A, vitamina C, potássio e compostos fenólicos confere potencial à polpa de butiá no uso como complemento alimentar de populações locais. O teor de vitamina C encontrado na polpa de butiá foi de 53,0 mg/100g e de pró-vitamina A (Equivalente de Atividade de Retinol/100g) foi de 146,2.

FARIA et al. (2008) e TOSS (2010) reportaram a presença de compostos fenólicos como teor de catequina equivalente de 210 mg/100g de polpa, de ácido tânico de 116,3 mg/100 g de polpa e derutina equivalente de 222,63 mg/100g de polpa desidratada.

Segundo MARTÍNEZ et al. (2014) o *Butia odorata* amarelo e vermelho possuem capacidade antioxidante na proteção *in vitro* contra o dano oxidativo induzido por nitroprussiato de sódio (NPS) em estruturas

cerebrais de camundongos, o que pode estar relacionado à atividade antioxidante de fitoquímicos, como compostos fenólicos, antocianinas, carotenoides e ácido ascórbico do fruto.

3.1.2. Amêndoa de butiá

As sementes de butiá tem uma amêndoa que é rica em lipídeos (53,6 %) e fibras, sendo fibra em detergente ácido (FDA) (19,3 %) e fibra em detergente neutro (FDN) (28,4 %). O teor de lipídeo é predominantemente composto por 24 % de ácidos graxos insaturados como os ácidos oléico e linoléico, e 76 % de ácidos graxos saturados de cadeia média como os ácidos caprílico, cáprico, láurico, mistúrico, palmístico e esteárico. Os minerais em maior quantidade são potássio (327 mg/100g), fósforo (310 mg/100g), magnésio (114 mg/100g) e enxofre (141 mg/100g) (FARIA et al., 2008a,b; PERALTA et al., 2013).

O elevado teor de conteúdo lipídico, fibra e mineral das amêndoas de butiá indica um potencial para o uso como um ingrediente na indústria de alimentos ou rações para animais, melhorando a textura e fortificando os produtos (FARIA et al., 2008a,b; SGANZERLA, 2010).

Segundo Sganzerla (2010), as amêndoas de *B. catarinenses*, *B. odorata* e *B. eriospatha* são ricas em compostos fenólicos e carotenoides, que podem apresentar atividade antioxidante. Os compostos fenólicos representam os fitoquímicos presentes em maior quantidade nas amêndoas de frutos de *Butia catarinenses* com aproximadamente 416,73 mg/100g apresentando capacidade antioxidante (170,79 mg trolox/100g) superior a capacidade antioxidante da polpa (160,19 mg TE/100 g) de acordo com Genovese et al. (2008).

Frutos de espécies nativas do Brasil pertencentes à família Palmae (Arecaceae) também têm despertado a atenção pelas suas características nutracêuticas e antimicrobianas (HIANE et al., 2003; MARIATH et al., 1989; SILVEIRA et al., 2005; TAVARES et al., 2003). Segundo Sanguinetti (1989), o óleo extraído da amêndoa de frutos de butiá é empregado empiricamente para eliminar parasitas intestinais. O óleo da semente de *Butia capitata* também foi testado em adesivos autocondicionantes dentários e mostrou desempenho anti-incrustação biológica contra bactéria acidúrica, lactobacilos e streptococos (PERALTA et al., 2013).

3.2. ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação deste substrato. Assim, os antioxidantes atuam como protetores da oxidação de biomoléculas por radicais livres e impedem a propagação da reação em cadeia provocada pelos mesmos (FANG et al., 2002).

Os radicais livres são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa. Esta configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, de meia-vida curta e quimicamente muito reativas (BARREIROS, 2006). Eles podem ser gerados por fontes exógenas ou endógenas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabagismo, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (MACHLIN; BENDICH, 1987).

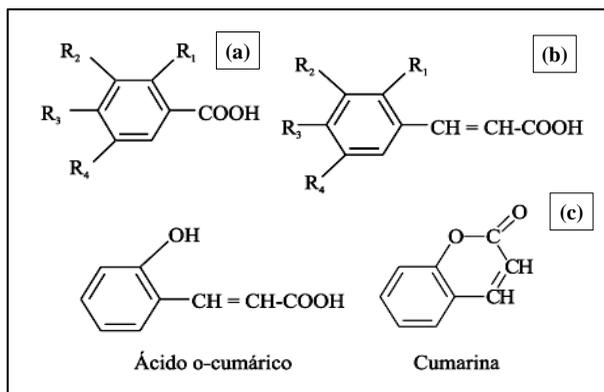
Existem evidências numerosas sobre o papel dos radicais livres em uma série de condições patológicas, incluindo envelhecimento, câncer, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares (CERIELLO; MOTZ, 2004; ROBERTS; SINDHU, 2009; TARKO et al., 2009). A fim de fortalecer o sistema de defesa antioxidante e reduzir os efeitos nocivos que um ambiente pró-oxidante pode causar ao organismo, pesquisadores têm concentrado esforços para encontrar nos alimentos compostos que atuem como redutores em meio biológico e auxiliem na prevenção e no retardo do desenvolvimento de doenças crônicas (OZSOY et al., 2009; OKARTER et al., 2010).

Para aumentar a capacidade de defesa do sistema antioxidante é necessário o consumo de alimentos que contenham substâncias com capacidade antioxidante, de forma que uma alimentação com hortaliças, frutas, grãos e cereais integrais possam fornecer nutrientes e compostos bioativos que irão atuar em conjunto com os antioxidantes enzimáticos a fim de minimizar os efeitos prejudiciais provocados pelo estresse oxidativo (VALTUEÑA et al., 2008).

Os compostos fenólicos são considerados os componentes antioxidantes mais importantes presentes em especiarias e em outros materiais derivados das plantas, existindo uma grande correlação entre a concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante total (VALTUEÑA et al., 2008).

Os compostos fenólicos, estruturalmente compreendem um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxila, e vão desde simples moléculas fenólicas a compostos altamente polimerizados. A atividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura, particularmente do número e da posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Eles são divididos em três grupos; o primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6 – C1), suas fórmulas gerais estão representadas na Figura 3a. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6 – C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 3b). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (Figura 3c) (RAMALHO; JORGE, 2006).

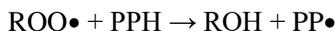
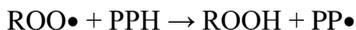
Figura 3. Grupos que compreendem os compostos fenólicos.



Fonte: Ramalho, Jorge, (2006)

Os grupos hidroxilas presentes nas estruturas dos compostos fenólicos constituem a base de sua capacidade antioxidante, atuam como agentes redutores em virtude de sua habilidade de doar o hidrogênio para o radical livre, estabilizando-o. A transferência do hidrogênio para

o radical livre interrompe a reação de oxidação e o radical fenox resultante é estabilizado por ressonância (SILVEIRA, 2013). A seguir é apresentado o mecanismo de estabilização do radical livre (ROO•) através da doação de um hidrogênio pelo composto fenólico (PPH).



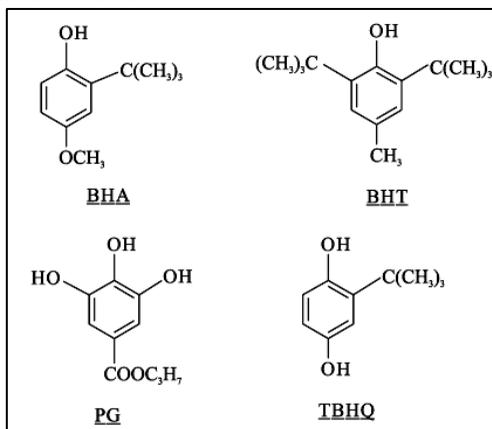
Estudos têm demonstrado, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a habilidade dos compostos fenólicos em modular a atividade de certas enzimas, devido a sua capacidade de se ligar às proteínas, bem como a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, os efeitos vasoprotetores, hipoglicêmicos e a atividade antiobesidade apresentada por esses compostos (CHO et al., 2010; BOAVENTURA et al., 2012; DAGLIA, 2012).

A indústria de alimentos utiliza antioxidantes sintéticos para inibir os processos oxidativos em alimentos lipídicos. Os antioxidantes mais utilizados são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), esses são compostos fenólicos com substituições variadas no anel (Figura 4) que contribuem para inibir alterações indesejáveis no alimento. No entanto, existe uma demanda por estudos sobre a extração e viabilidade comercial de antioxidantes naturais, uma vez que, os antioxidantes sintéticos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade (RAMALHO; JORGE, 2006).

Frente à diversidade da estrutura química dos compostos antioxidantes e de seus mecanismos de ação, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras (CAETANO, 2009).

Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, normalmente para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“Electron Spin Resonance” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (DAGLIA, 2012).

Figura 4. Antioxidantes sintéticos



Fonte: Ramalho, Jorge, (2006).

Baseado nas reações químicas envolvidas, os principais métodos usados para medir a capacidade antioxidante podem ser divididos em duas categorias segundo Tabela 1.

Tabela 1. Métodos utilizados para analisar a atividade antioxidante.

Categorias	Mecanismo	Métodos
1	Transferência de elétrons	Folin-Ciocalteu FRAP ⁽¹⁾
	Sequestro de radicais livres	DPPH ⁽²⁾ ABTS ⁽³⁾
	Reação de transferência de átomos de H	ORAC ⁽⁴⁾ β-caroteno/linoleato

⁽¹⁾ *Ferric Reducing Antioxidant Power*; ⁽²⁾ 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ⁽³⁾ 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato); ⁽⁴⁾ *Capacidade de absorção do radical oxigênio*.

Sganzerla (2010) observou atividade antioxidante pelo método difenil-picrilhidrazil (DPPH) nas polpas e nas amêndoas de *Butia Capitata* e *Butia Eriosphata*. Sendo que na polpa das duas variedades foram encontrados cinco compostos fenólicos: Ácido gálico, p-hidroxibenzóico, ferúlico, epicatequina e quercetina. Toss (2010) também observou atividade antioxidante pelo método difenil-

picrilhidrazil (DPPH) e folin Ciocalteau nos extratos supercríticos da polpa de *Butia Capitata*.

3.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade.

Desde a origem dos antibióticos na década de 1950, o número de agentes antimicrobianos derivados de plantas tem sido insuficiente. A utilização de extratos vegetais, bem como outras formas alternativas de tratamento médico, vem demonstrando grande popularidade desde a década de 1990. As razões para esse renascimento incluem diminuição de novas substâncias antimicrobianas sintéticas, além de muitas serem potencialmente tóxicas e apresentarem efeitos colaterais no paciente (BISCAIA, 2007; MAREGESI et al., 2008; SILVA Jr. et al., 2009).

O grande interesse nos produtos naturais é explicado em parte pelo uso indiscriminado de antibióticos que tem selecionado microorganismos multirresistentes e em decorrência, a necessidade de se buscar novas substâncias antimicrobianas.

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Grupos com propriedades antimicrobianas.

Grupos de compostos	Referências
Terpenóides e óleos essenciais	TORSEL, 1989
Alcaloides	FESSENDEN, 1982
Lectinas e polipeptídios	TERRAS et al., 1993; ZHAN, LEWIS; 1997
Fenóis simples, ácidos fenólicos e quinonas	STERN et al., 1996
Flavonas, flavonóis e flavonóides	FESSENDEN, 1982
Taninos	SCALBERT, 1991
Cumarina	O'KENNEDY, THORNES; 1997

Na literatura há a descrição de vários métodos que demonstram a atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais sendo que as diferentes técnicas não são igualmente sensíveis (VIEIRA, 2005). Os métodos geralmente usados são o método de difusão em ágar e o método da concentração mínima inibitória (CMI).

Em geral, primeiramente, é realizado o método de difusão em ágar, que se trata de uma teste qualitativo dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Através dele, pode-se verificar se o extrato é capaz de inibir ou não o crescimento do micro-organismo de interesse pela formação de halo de inibição. As vantagens desse método são a necessidade de pequenas quantidades de amostra e a economia na utilização de apenas uma placa de Petri para testar cinco extratos (VIEIRA, 2005).

Os extratos que apresentarem atividade antimicrobiana no método qualitativo devem ser submetidos a testes quantitativos, como o método da concentração mínima inibitória (CMI), que se baseia na determinação da quantidade mínima do extrato capaz de inibir o crescimento do micro-organismo de interesse e pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo, que se baseiam no emprego de diluições em série do extrato aplicadas a uma mesma concentração da bactéria testada (VIEIRA, 2005).

3.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (EGGERS; JAEGER, 2003). A extração por solvente é um dos primeiros métodos de separação conhecido e mais utilizados nas indústrias de alimentos para a obtenção de compostos bioativos como antioxidantes e antimicrobianos. É derivada do latim “extrahere”, que significa separação seletiva em que se retém uma das fases (o extrato) e despreza outra (o resíduo) (ANDREO; JORGE, 2006).

Existem diversos métodos para a extração dos compostos bioativos de matrizes vegetais. Dentre esses, estão os processos de extração a baixa pressão, como soxhlet e ultrassom que utilizam normalmente solventes orgânicos, e como alternativa pode-se citar também os processos baseados em tecnologia supercrítica, os quais utilizam solventes em estado supercrítico.

As técnicas a baixa pressão são geralmente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia para a obtenção de diversos extratos e podem utilizar uma ampla variedade de solventes. Porém, essas técnicas geralmente requerem um alto custo energético e podem degradar substâncias termicamente sensíveis, pois utilizam altas temperaturas de extração ou de separação da mistura soluto - solvente. A

etapa de recuperação do solvente após a extração é crucial devido a problemas econômicos e de segurança ambiental, mas, principalmente, pela possibilidade de haver resíduo do solvente no produto final (BISCAIA, 2007; MEZZOMO, 2008; PESSOA et al., 2015).

A extração supercrítica (ESC) é uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais. Seu emprego em processos industriais vem ganhando espaço, principalmente devido aos fatores ambientais e de qualidade. Trata-se de um processo que proporciona uma melhor seletividade e eficiência com menor risco de degradação térmica dos extratos e cujo solvente pode ser facilmente removido no final da extração, principalmente devido às características dos fluidos supercríticos (GÓMEZ; OSSA, 2002; PEREIRA et al., 2004; PESSOA et al., 2015).

3.4.1. Extração Soxhlet

O Soxhlet é um aparelho de laboratório inventado em 1879 por Franz von Soxhlet. Ele foi originalmente desenvolvido para a extração de lipídeos de um material sólido. Neste equipamento, o sólido é envolto por um cartucho poroso e o solvente entra em contato com o sólido em um processo intermitente. Em seguida, o solvente deve ser evaporado para obter-se a substância desejada (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; ROCHA, 2000).

As principais vantagens que o método de Soxhlet apresenta são: a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante; é uma metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da miscela após o término da extração, pois a amostra permanece envolta no cartucho durante todo o procedimento (BRUM et al., 2009).

Como desvantagens da extração em Soxhlet pode-se ressaltar: o longo tempo de processo, que pode variar de 1 h a 72 h; a elevada quantidade de solvente empregada, necessitando de uma etapa posterior de eliminação do solvente após a extração, o que exige grande dispêndio de energia, e ainda torna-se um problema ambiental pelo descarte inadequado dos resíduos; e o risco da decomposição térmica dos compostos extraídos, já que, durante a extração, o balão que contém o solvente e os compostos já solubilizados é mantido na temperatura de

ebulição do solvente (ARAÚJO, 2004; CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

3.4.2. Extração assistida por ultrassom

A descoberta do ultrassom ocorreu em cerca de 1880 por Curie estudando o efeito piezoelétrico. O ultrassom é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior aos limites audíveis pelo ouvido humano, aproximadamente 20 kHz. Estas ondas fazem com que as moléculas do meio se afastem e se aproximem inúmeras vezes causando uma variação na pressão no líquido gerando cavitação. A cavitação gera mudanças físicas e químicas permanentes aos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos, e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-sólido (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003; MELECCHI, 2005).

O ultrassom é usado em muitas áreas, podendo ser destacadas a médica hospitalar, clínicas odontológicas, limpezas de utensílios, laboratórios, indústrias química e de alimentos (MELECCHI, 2005).

A extração por ultrassom apresenta como vantagens a alta reprodutibilidade da técnica, a possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho da amostra, a rapidez no processamento da amostra e o baixo custo. Como desvantagens podem ser citadas sua inabilidade de renovação do solvente durante o processo, fazendo com que a capacidade de extração seja limitada pelo equilíbrio de fases, e a necessidade de filtração após a extração o que aumenta o tempo do processo e o perigo de perda ou contaminação do extrato durante a manipulação (ADAMS, 2002; CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998; FREITAS, 2007).

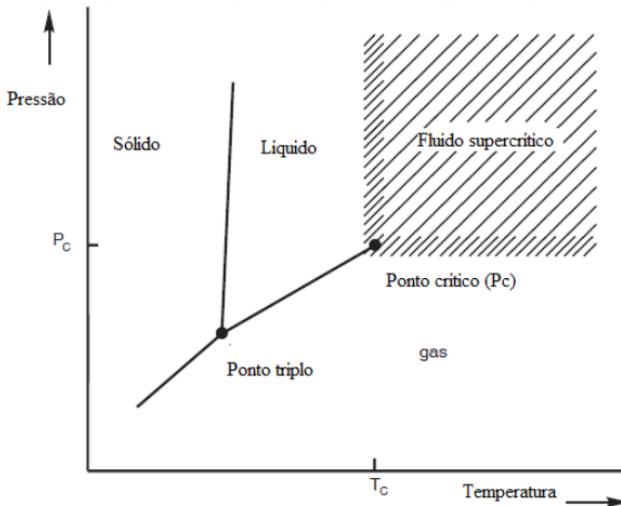
3.4.3. Extração Supercrítica

Em todo o mundo há um consenso para as indústrias adotarem novos processos sustentáveis que não requeiram o uso de solventes orgânicos prejudiciais ao ambiente. Por essa razão, a extração a alta pressão vem ganhando espaço em processos industriais nas últimas décadas. A extração supercrítica (ESC) se destaca por representar uma tecnologia que permite a obtenção de extratos de alta qualidade e que minimiza danos ao meio ambiente, devido à ausência de solvente no produto final (HERRERO et al., 2010).

Essa tecnologia de extração utiliza solventes no estado supercrítico. Um solvente puro se encontra no estado supercrítico

quando sua pressão e temperatura estão acima dos valores críticos (Figura 5), onde apresenta propriedades intermediárias entre líquido e gás. A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. A especial combinação da difusividade e viscosidade como gás, e as propriedades de solvatação e densidade como líquido dos fluidos supercríticos faz deles excelentes solventes para várias aplicações.

Figura 5. Diagrama pressão – temperatura para um componente puro.



Fonte: Mukhopadhyay, (2000).

Os fluidos supercríticos foram descobertos em 1822 por Baron Charles Cagniard La Tour durante a realização de experimentos envolvendo vários líquidos aquecidos e uma bala de canhão em um barril de canhão selado. Os fluidos supercríticos também podem ocorrer na natureza. Por exemplo, a água supercrítica é formada em alguns vulcões submarinos, devido a alta pressão da água e temperatura de erupção vulcânica (KNEZ, et al., 2014).

As aplicações da ESC na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos são inúmeras. Alguns exemplos de processos consolidados que utilizam a extração com fluido pressurizado são a remoção de nicotina do tabaco e de cafeína do café e chás, extração de aromas, óleos

essenciais e antioxidantes, extração de óleos de sementes oleaginosas, extração de ervas medicinais e produção de extrato de lúpulo para a produção de cervejas. O único resíduo acumulado ao final do processo ESC é o sólido do qual foi extraído o soluto. Como a matéria-prima é uma matriz biológica, o resíduo pode ser incorporado ao solo sem prejuízo ao meio-ambiente. Em alguns casos, como na extração da cafeína do café, tanto o resíduo (grãos de café descafeinados) quanto o extrato (cafeína) são produtos comercializáveis (MUKHOPADHYAY, 2000).

Os processos envolvendo fluidos supercríticos são sustentáveis, ecologicamente corretos, e oferecem possibilidade de obtenção de novos produtos. Sua principal vantagem reside na possibilidade de separação e secagem de produtos por expansão simples, enquanto o gás pode ser recuperado, reciclado e reutilizado sem a necessidade da etapa de purificação. Os benefícios são evidentes no uso dos mais importantes fluidos supercríticos: SCCO₂ (dióxido de carbono supercrítico) e SCW (água supercrítica). Eles não são carcinogênicos, tóxicos, mutagênicos, inflamáveis e são considerados termodicamente estáveis. Outro maior benefício é referente a possibilidade de ajustar as propriedades termofísicas dos fluidos supercríticos, tais como a difusividade, viscosidade, densidade ou constante dielétrica, pela simples variação da pressão e temperatura. Além disso, os fluidos supercríticos tem excelentes propriedades de transferência de calor, e tem sido estudada como fluidos de transferência de calor benignos ambientalmente (BRUNNER, 2010; KNEZ, et al., 2014).

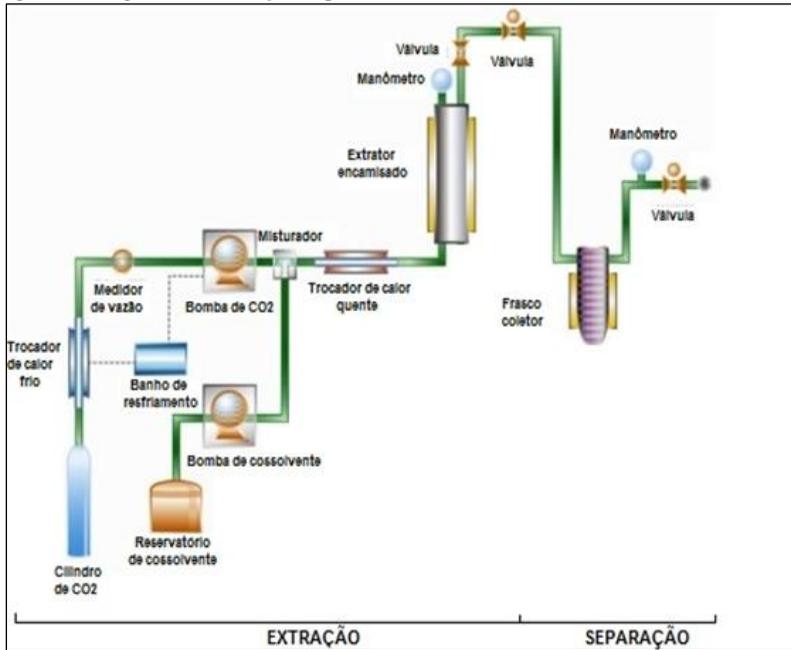
A extração de matrizes sólidas com fluido supercrítico, consiste, basicamente, de duas etapas: extração e separação da mistura soluto/solvente (Figura 6).

Durante a extração, o solvente supercrítico escoar através de um leito fixo formado por uma matriz sólida (extrator), solubilizando os componentes presentes no sólido. Conforme o solvente escoar através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluída e, em qualquer ponto dentro do extrator, a concentração de óleo a ser extraído varia continuamente em cada fase até que o equilíbrio seja alcançado. Ou seja, a força motriz para a transferência de massa no processo é o equilíbrio da concentração de solutos entre as fases sólida e fluída (BRUNNER, 1994; MICHIELIN, 2009).

A transferência de massa entre as fases depende de muitos fatores como tipo e estrutura do material vegetal, grau de maturação, tratamento da matéria-prima anterior a extração, etc. Além disso, o leito de sólidos

pode formar diferentes geometrias e tamanhos de fragmentos que ainda podem sofrer alterações durante o processo. Dessa forma, uma grande variedade de parâmetros é relevante para a modelagem da transferência de massa no substrato sólido. As substâncias podem estar adsorvidas na superfície externa, na superfície dos poros, no interior do sólido ou no interior das células das plantas. Cada uma dessas diferentes distribuições tem alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

Figura 6. Diagrama da extração supercrítica de matrizes sólidas



Fonte: Waters (2013).

O principal solvente supercrítico utilizado é o dióxido de carbono (condições críticas = 31 °C e 72,85 bar). Ele é barato, ambientalmente aceito e geralmente reconhecido como seguro pela FDA e pela AESA. A Tabela 3 apresenta uma lista dos fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica, e os valores de temperatura e pressão críticas e densidade.

Tabela 3. Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica.

Tipo de fluido	Composto	T_c (°C)	P_c (atm)	ρ (g/cm³)
Inorgânicos	CO ₂	31	72,85	0,469
	NH ₃	133	111,54	0,236
	H ₂ O	374	217,17	0,323
	N ₂ O	36	71,50	0,452
Hidrocarbonetos	Metano	-82	45,41	0,169
	Etano	32	48,17	0,203
	Propano	97	41,85	0,217
	Pentano	197	33,26	0,237
	Etileno	9	49,65	0,218
	Benzeno	289	49,65	0,218
	Tolueno	319	40,57	0,292
Compostos oxigenados	Metanol	240	79,86	0,272
	Etanol	241	60,61	0,276
	Acetona	235	46,39	0,279
	Éter etílico	194	35,93	0,265
Compostos nitrogenados	Piridina	347	55,57	0,312

T_c: Temperatura crítica, P_c: Pressão crítica.

Fonte: Hierro e Santa-maria (1991).

Na ESC de produtos naturais utilizando CO₂ puro como solvente, geralmente são extraídas misturas contendo substâncias apolares e moderadamente polares. O emprego de modificadores polares (cossolventes) altera a polaridade do fluido supercrítico e aumenta o seu poder de diluição no composto de interesse. Os modificadores também podem reduzir a interação composto-matriz melhorando a sua extração quantitativa (LI, 2008; HERRERO et al., 2010). A seleção dos cossolvente é baseada nos parâmetros de solubilidade e na polaridade do componente de interesse e solvente. Geralmente o etanol é o cossolvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos (MICHIELIN, 2009).

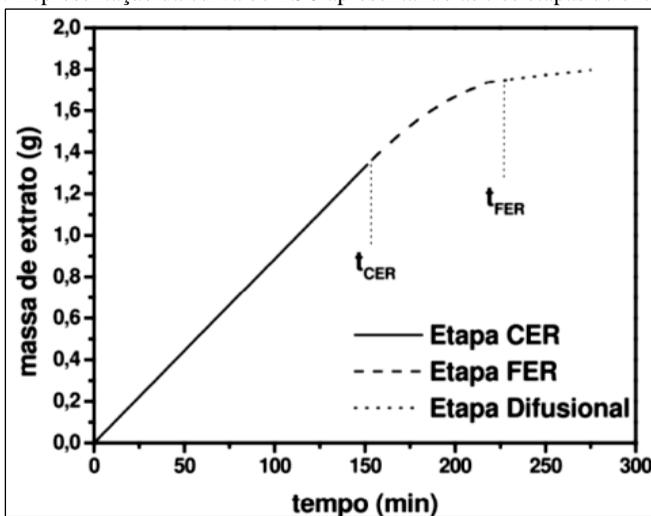
3.4.3.1. Curvas de extração

O estudo da cinética da extração pode ser realizado empregando-se modelos matemáticos que representam curvas globais de extração e permitem a predição do comportamento do sistema e,

consequentemente, da taxa de extração em escala maior, fornecendo parâmetros importantes para projetos de unidades industriais, tais como dimensões de equipamentos, vazão de solvente e tamanho de partícula (MARTÍNEZ, 2005).

As curvas de extração são divididas em três etapas, controladas por diferentes mecanismos de transferência de massa. Na Figura 7 estão representadas as etapas (1) taxa constante de extração (CER), que é aproximadamente linear; (2) taxa decrescente de extração (FER), não-linear; e (3) difusional (DCP) em que a taxa de extração é quase nula (SOVOVÁ, 1994; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Figura 7. Representação da curva de ESC apresentando as três etapas de extração.



Fonte: Martinez (2005).

Na etapa CER (do inglês, *Constant Extraction Rate*) a resistência à transferência de massa na fase fluida predomina e o extrato está prontamente disponível na interface sólido/fluido, sendo que o valor máximo da concentração do extrato no solvente supercrítico é dada pela solubilidade de equilíbrio. Dependendo da matéria-prima essa etapa corresponde à cerca de 50 % do rendimento total da extração.

Na etapa FER (do inglês, *Falling Extraction Rate*) a resistência à transferência de massa aumenta incluindo, além do efeito convectivo na fase fluida, o efeito difusional na fase sólida devido ao esgotamento do

extrato em sua superfície, sendo a quantidade de extrato no solvente supercrítico menor que a concentração de equilíbrio. Até o final desta etapa, a extração atinge mais de 70 % do rendimento total da extração.

A etapa DCP é caracterizada pela ausência de soluto facilmente acessível na superfície das partículas, é onde a taxa de transferência de massa é controlada principalmente pelo fenômeno difusivo na parte interna da partícula sólida (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999).

A representação da curva de extração pode ser utilizada na determinação de parâmetros de processo, tais como tempo de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica e determinação da solubilidade, como também na modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004).

O poder de solubilização e a seletividade do solvente quanto aos componentes de interesse e a capacidade de difusão destes no fluido supercrítico também são fatores determinantes para o processo de extração. A seleção correta destes parâmetros é crucial para a otimização da extração dos compostos desejados em menor tempo (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

3.4.3.2. Modelagem matemática

A modelagem matemática de dados experimentais de ESC consiste numa ferramenta muito útil para a ampliação de escala laboratorial para industrial, uma vez que tem como principal objetivo a determinação de parâmetros para projeto de processo, tais como dimensões de equipamentos, vazão de solvente e tamanho de partícula (MARTÍNEZ et al., 2003).

Três diferentes abordagens têm sido propostas para a modelagem matemática do processo de extração supercrítica de matrizes vegetais:

- 1) Modelos empíricos;
- 2) Modelos baseados na analogia com a transferência de calor;
- 3) Modelos resultantes da integração do balanço de massa diferencial, podendo ser obtidos perfis de concentração em função do tempo para ambas as fases, sólida e fluida. São, geralmente, os que proporcionam uma análise mais adequada do processo (REVERCHON, 1997; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A maioria dos modelos disponíveis na literatura trata o extrato como uma substância pura, apesar do fato dele poder conter vários compostos de natureza química diferentes. Sendo assim, as dificuldades em modelar sistemas complexos residem no número elevado de componentes na mistura e em estabelecer as interações entre os

componentes do extrato, o solvente e a fase sólida (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 2003).

Neste trabalho a modelagem das curvas de extração da semente de *Butia Catarinensis* foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994), Martinez et al. (2003), Crank (1975), e Gaspar et al. (2003).

A explicação detalhada de cada modelo matemático utilizado neste trabalho está no Anexo I, onde encontram-se todas as equações e considerações necessárias para aplicação de cada modelo.

3.5. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

A busca por alimentos com características especiais, além das normais para a alimentação, é uma tendência mundial. Cresce a procura, principalmente, por frutas com poderes nutricionais, que além de nutrir, tenham em sua composição compostos que possam inferir em benefícios para a saúde humana, como a prevenção contra várias doenças.

Outra tendência é o aproveitamento de resíduos com intuito de minimizar seu impacto ambiental, podendo, ao mesmo tempo, agregar valor a esses subprodutos. A composição das sementes de butiá, conforme relatado anteriormente, faz com que esse subproduto da produção de polpa dessa fruta tenha grande potencial para reaproveitamento e agregação de valor.

Poucos são os estudos a respeito de métodos de extração e avaliação de atividade antioxidante in vitro das polpas e sementes das diversas espécies de butiás. Foi encontrado apenas um estudo na literatura envolvendo extração supercrítica da polpa do *Butia capitata*, mas no momento não foram encontrados trabalhos que reportem o estudo dessa técnica em sementes de *Butia catarinensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E PRÉ TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

A amostra de butiá (*Butia catarinensis*) utilizada para as extrações foi fornecida pela fazenda Sambaqui, Imbituba – SC, colhida nos meses de fevereiro e março de 2015. Os frutos foram lavados, despulpados manualmente e separada somente a semente para as extrações. As mesmas foram secas à 46 °C durante 16 horas, moídas em moinho tipo Willey, empacotadas em saco plástico e armazenados em congelador a -18 °C. A Figura 8 mostra a matéria-prima antes e após o pré-tratamento.

Figura 8. Fruto *in natura* (a), semente seca de butiá (b), semente triturada de butiá pronta para extração (c).



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

O teor de umidade e substâncias voláteis presentes na matéria-prima foi determinado pela metodologia 925.09 da AOAC (2005) fundamentada na perda de umidade e substâncias voláteis da amostra submetida a 105 °C. Brevemente, 5 g de amostra em triplicata foi medida - em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) - em cápsula de alumínio previamente aquecida em estufa (E.L. 003, Odontobrás, Ribeirão Preto/SP, Brasil) a 105 °C por 1 hora, resfriada em dessecador e medida sua massa. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por 3 horas, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas novamente. Repetiram-se essas operações de aquecimento e

resfriamento em intervalos de 1 hora, até massa constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi empregada a Equação 1.

$$\% \text{ umidade} = \frac{m_p}{m_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: m_p é a perda de massa em gramas e m_i é a massa inicial da amostra em gramas.

O experimento foi realizado em triplicata e o resultado expressos como média \pm desvio padrão.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULA DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

4.3.1. Determinação do diâmetro médio de partículas

O perfil granulométrico das partículas foi determinado por ensaio em agitador de peneiras (Bertel Metalurgic Ind. Ltda., Caieiras/SP, Brasil) durante 60 min com peneiras de 6, 16, 20, 25 e 32 mesh (série Tyler, W.S. Tyler, Wheeling, EUA), em duplicata. A massa das frações retidas em cada peneira foi medida e o diâmetro médio de partículas foi calculado de acordo com as Equações (2) e (3), propostas por GOMIDE (1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i}{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i^3}} \quad (2)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (3)$$

Onde \bar{d}_s é o diâmetro médio superficial dos fragmentos (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), m_t é a massa total de amostra (g), d_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número total de frações.

4.3.2. Determinação da massa específica aparente do leito de partículas (ρ_a)

A massa específica aparente do leito de partículas foi determinada através da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume ocupado no leito de extração supercrítica (Equação 4).

$$\rho_a = \frac{\text{massa da amostra em gramas}}{\text{volume do leito em cm}^3} \quad (4)$$

4.3.3. Determinação da massa específica real das partículas (ρ_r)

A massa específica real (ρ_r) foi determinada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) pela técnica de picnometria em gás hélio, utilizando-se o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos com o uso do equipamento Accu Pyc II 1340 da Micromeritics (Figura 9). A utilização dessa técnica proporciona boa precisão nos resultados, visto que o gás Hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar suas características, determinando o volume verdadeiro de um sólido, por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido. Normalmente, é utilizado o gás hélio por ser inerte, além de penetrar facilmente nos poros da amostra devido ao pequeno tamanho dos seus átomos (MOURA; FIGUEIREDO, 2002).

Figura 9. Picnômetro acoplado ao cilindro de gás hélio



Fonte: Elaborada pela autora.

O picnômetro de hélio é constituído por duas câmaras de volumes conhecidos: a câmara onde se coloca a amostra e a câmara de expansão, ligadas por uma válvula (válvula de expansão). Antes do início da análise, a amostra colocada na respectiva câmara é sujeita a um processo de degaseificação que consiste em repetidas purgas com hélio, para remoção de impurezas e umidade que eventualmente possa conter. Depois que todo o sistema é levado à pressão atmosférica, a câmara de expansão é isolada pelo fechamento da válvula de expansão (operação realizada automaticamente pelo equipamento) e a câmara que contém a amostra é pressurizada até uma pressão P_1 . Em seguida, a válvula de expansão é aberta (operação também realizada automaticamente pelo equipamento) e, conseqüentemente, ocorre uma redução de pressão para P_2 . Admitindo comportamento ideal do gás hélio, o volume do sólido pode ser calculado a partir da Equação 5 (SMITH, 1996).

$$P_1(V_a - V_s) = P_2(V_a - V_s + V_e) \quad (5)$$

Onde V_a é o volume da câmara da amostra; V_e é volume da câmara de expansão e V_s é volume do sólido.

A principal vantagem deste método está na sua capacidade para medir apenas o volume da amostra descontando o volume de todos os poros. A partir da determinação do volume do sólido pode-se determinar a sua densidade real, sendo esse resultado calculado pelo *software* do equipamento.

4.3.4. Porosidade do leito de ESC

Conhecendo os valores de massa específica real e aparente, a porosidade do leito de ESC pode ser determinada com cálculo através da equação (6):

$$\varepsilon = \frac{1 - \rho_a}{\rho_r} \quad (6)$$

Onde ρ_a é a massa específica aparente e ρ_r é a massa específica real.

4.4. EXTRAÇÕES À BAIXA PRESSÃO

Os processos de extração a baixa pressão utilizando diferentes solventes orgânicos foram realizados a fim de compará-los com o

processo de extração supercrítica, em termos de rendimento dos extratos, atividade antioxidante, compostos fenólicos e atividade antimicrobiana. As extrações a baixa pressão também foram realizadas com objetivo de selecionar um cossolvente para utilização em extração supercrítica, considerando os solventes que apresentaram melhores resultados em termos de atividade antioxidante, teor de fenólicos totais e rendimento.

Os extratos obtidos após a extração em Soxhlet e com ultrassom passaram por um processo de eliminação de solvente, em evaporador rotativo com arrefecimento e controle de vácuo. As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes utilizados, a fim de evitar alterações do extrato devido à aplicação de calor, e o vácuo ajustado em 500 mmHg.

4.4.1. Extração em Soxhlet

A extração Soxhlet da semente de butiá foi realizada de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando os solventes orgânicos hexano, etanol e etanol + água (1:1, v/v). A proporção utilizada na mistura etanol + água foi baseado no estudo de Oliveira (2015), no qual trabalhou com extratos de resíduo do processamento de maracujá e observou que os melhores resultados de atividade antioxidante foram encontrados nos extratos obtidos com essa mistura de solventes.

A Tabela 4 apresenta os valores de polaridade dos solventes empregados.

Tabela 4. Índice de polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração em Soxhlet.

Solvente	Índice de Polaridade
Hexano	0,0
Etanol	5,2
Etanol+Água	7,1

Fonte: BYERS, 2008.

O sistema Soxhlet consiste de um extrator que é acoplado na extremidade inferior a um balão e na extremidade superior a um condensador. Para cada extração, 5 g de amostra foram envolvidas em um cartucho de papel filtro e inseridas no extrator. O balão foi

preenchido com 150 mL de solvente, o que corresponde a uma proporção de amostra-solvente igual à 1:30.

No processo de extração o solvente é aquecido até sua temperatura de ebulição por uma manta. O vapor do solvente sobe até o condensador, resfria e condensa gotejando sobre a matriz vegetal, solubilizando os compostos. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido até o final de extração. As extrações foram realizadas durante 6 h e os extratos brutos obtidos acondicionadora em frascos âmbar e armazenados freezer doméstico à -18 °C.

As extrações foram realizadas em duplicata e os resultados dos rendimentos expressos como média \pm desvio padrão de acordo com a equação 7.

$$\text{Extrato (\%)} = \frac{N \times 100}{P} \quad (7)$$

Onde N é a massa de extrato (g) e P é a massa da amostra (g).

4.4.2. Extração com Ultrassom

A técnica foi adaptada de Vinatoru (2001), onde 5 g de butiá permaneceram em contato com 150 mL de solvente em balão de fundo chato, imersos em banho indireto em ultrassom (Unique, USC-1880 A, Brasil, potência: 132 w, frequência: 37 Khz), à temperatura ambiente por 1 h. Os solventes utilizados foram os mesmo empregados na extração em Soxhlet: hexano, etanol e etanol + água (1:1, v/v). Ao final da extração, o sistema foi filtrado para separação da amostra sólida da solução com extrato.

Em seguida, os extratos, acondicionados em frascos âmbar, foram armazenados em freezer doméstico, a -18° C. As extrações foram realizadas em duplicata e os resultados dos rendimentos expressos como média \pm desvio padrão.

$$\text{Extrato (\%)} = \frac{N \times 100}{P} \quad (8)$$

Onde N é a massa de extrato (g) e P é a massa da amostra (g).

4.5. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no LATESC em uma unidade de extração que opera até a pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,7 a 36,7 g/min. As condições operacionais utilizadas na ESC foram selecionadas de forma que abrangessem uma ampla faixa de massa específica de solvente, com o objetivo de determinar quais condições de temperatura e pressão proporcionam o maior rendimento global e os melhores parâmetros de qualidade, dentro dos limites de operação do equipamento utilizado.

Os experimentos cinéticos (curvas de extração), foram realizados através do método dinâmico de extração, caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999; DANIELSKI et al., 2007). A partir desse método pode-se determinar o percentual de soluto extraível do material sólido para essa determinada condição de processo, assim como definir o tempo total de extração a ser utilizado nos ensaios de determinação do rendimento global de extração.

A Figura 10 apresenta a unidade de extração supercrítica, descrita por Zetzl, Brunner e Meireles (2003), desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha, que é utilizada no LATESC, enquanto a Figura 11 apresenta um esquema detalhado dos componentes dessa unidade.

Figura 10. Equipamento de extração supercrítica.



Fonte: Elaborada pela autora.

Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da tubulação e das válvulas agulha (V3 e V4) durante a depressurização da mistura soluto/solvente e diminuir a possibilidade de recristalização/precipitação de extrato na tubulação, causando entupimento. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (BT3) (DC30-B30, Thermo Haake, Alemanha). No início do processo de extração, a válvula (V2) (10-11NFA, HIP, Erie, PA, USA) é mantida fechada e, após a pressurização do solvente, é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A válvula (V3) (10-11NFA-V, HIP, Erie, PA, USA) também conectada na saída do extrator auxilia a V4 (10-11NFA, HIP, Erie, PA, USA) na depressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o extrato é coletado em frascos âmbar (F1) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (R1) (10A61ABB, Automation Products), regulado por V3 e V4. As pressões do cilindro (PI1), da bomba (PI2) e do extrator (PI3) são monitoradas por manômetros (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10).

4.5.1. Determinação da cinética de extração e modelagem matemática

A curva global de extração fornece informações sobre o comportamento cinético da extração, possibilitando a determinação do tempo de ciclo mais viável para um processo. No ensaio para a determinação da cinética de extração a coluna foi preenchida com 15 g de matéria-prima, o que permitiu a formação de um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com esta relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial pode ser desprezada. Após a pressurização, o CO₂ puro foi admitido no sistema a uma vazão de $6,66 \pm 2$ g/min.

Os ensaios foram realizados a uma pressão de 100 bar e 40 °C . Os frascos de coleta foram previamente medidos e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Após 2 min da coleta, a massa dos frascos foi medida e determinou-se a massa de extrato obtida em função do tempo.

Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir da curva de extração. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente. A taxa de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com o

auxílio de planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} . Os valores experimentais de massa de extrato estão apresentados no Apêndice I.

Para a modelagem matemática das curvas de extração utilizou-se os modelos de Crank (1975), Gaspar et al. (2003), Martínez et al. (2003), e Sovová (1994) modificado por Martínez e Martínez (2008). Estes modelos foram escolhidos por apresentarem diferentes maneiras de interpretação dos dados.

A modelagem matemática das curvas de extração foi realizada através do *software Mass Transfer*, desenvolvido por Correia, Michielin e Ferreira (2006) no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica - LATESC/EQA-UFSC, que utiliza o método da máxima verossimilhança para minimizar a soma dos quadrados dos desvios calculados (KITZBERGER et al., 2009).

4.5.2. Determinação do rendimento de extração

O rendimento global de extração (X_0) é a quantidade de óleo extraível presente na matriz sólida, referente a uma dada condição de extração. A influência da pressão e da temperatura no rendimento global (X_0) da ESC foi avaliada por meio de um planejamento experimental com 3 níveis e 2 variáveis, totalizando 9 experimentos (Tabela 6). Nos experimentos, realizados em duplicata, foram empregadas temperaturas entre 40 e 60 °C e pressões entre 100 e 300 bar. O tempo de extração foi definido em 4,0 h por meio da observação da curva global de extração obtida com 100 bar, 40 °C e vazão de solvente de $6,66 \pm 2$ g/min (Figura 12).

Tabela 5. Variáveis e níveis do planejamento experimental.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura	40	50	60
Pressão	100	200	300

Tabela 6. Matriz de planejamento fatorial 3^2 com a T (Temperatura) e P (Pressão) variando em três níveis.

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais	
	Temperatura	Pressão	Temperatura	Pressão
1	-1	-1	40	100
2	-1	0	40	200
3	-1	+1	40	300
4	0	-1	50	100
5	0	0	50	200
6	0	+1	50	300
7	+1	-1	60	100
8	+1	0	60	200
9	+1	+1	60	300

Nos experimentos de rendimento global, utilizou-se, aproximadamente, 15 g de amostra para a formação do leito. Esta quantidade de amostra foi escolhida com intuito de se obter quantidade de extrato suficiente para a posterior realização das análises de qualidade do extrato e para formar um leito de partículas com altura de, pelo menos, o dobro do diâmetro do extrator, a fim de se desprezar a dispersão axial no leito durante a extração na modelagem matemática.

A massa de extrato obtida nos frascos foi medida em balança analítica e armazenada em congelador doméstico a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios de avaliação da atividade biológica. O valor de X_0 foi calculado através da razão entre a massa de extrato obtida e a massa de semente de utilizada para formar o leito.

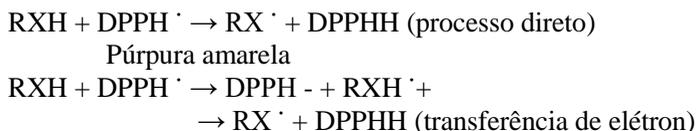
4.5.3. Emprego de cossolvente

Para a adição de cossolvente junto à extração supercrítica, uma bomba de cossolvente (BC) (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) foi acoplada ao equipamento de extração supercrítica. Após a bomba de cossolvente há uma válvula de retenção (VR) que evita o retorno do solvente orgânico para a BC, caso haja um aumento na pressão da bomba de CO_2 durante o experimento. Os solventes etanol (2,5%; 5%; 7,5%) e etanol+água (1:1, v/v) (2,5%) foram selecionados com base nos resultados de rendimento e de atividades antioxidantes das extrações a baixa pressão.

4.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1. Método DPPH

O método 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) consiste na capacidade do DPPH reagir com doadores de H + ou de elétrons, sendo então reduzido, mudando sua coloração de púrpura para amarela. O radical DPPH é facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região do visível:



A absorção máxima ocorre em 517 nm. A solução estoque da amostra 1 mg/mL foi diluída em concentrações de 1000, 500, 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL em uma solução de DPPH na concentração 0,3mM, incubadas por 30 minutos a 25 °C. O cálculo da porcentagem de atividade antioxidante foi realizado de acordo com a Equação 9 (MENSOR et al., 2001).

$$AA \% = 100 - [(Abs amostra - Abs branco) * 100 / Abs controle] \quad (9)$$

A concentração das amostras necessárias para captar 50% do radical livre DPPH (EC₅₀ - Effective concentration) é calculada por análise de regressão exponencial e linear (MENSOR et al., 2001). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC₅₀) foram expressos como média.

4.6.2. Método ABTS

A atividade antioxidante dos extratos da semente de butiá foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999), utilizando Trolox, vitamina E sintética (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA) como antioxidante referência. O radical ABTS foi dissolvido em água destilada até a concentração de 7,0 mM, e submetido à reação com 2,45 mM de persulfato de potássio para a formação do radical em solução de proporção 1:1. A solução foi armazenada no escuro em refrigerador doméstico por 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS·+ foi diluída em etanol até uma absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734

nm. Foram preparadas diferentes diluições dos extratos e alíquotas de 30 μL de cada diluição foram transferidas para tubos de ensaios, adicionado 3 mL do radical ABTS na amostra e deixados ao abrigo da luz durante 6 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, e a partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, foi determinado a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante, substituiu-se na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 μM do padrão trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 μM de trolox (Equação 10).

$$y = -ax + b \quad (10)$$

Onde y é absorbância correspondente a 1000 μM de trolox e x é a diluição (mg/L) equivalente a 1000 μM de trolox.

A partir do resultado encontrado (x) na equação 9, dividiu-se por 1000 para ter o valor em g (Equação. 11). O resultado final foi calculado pela divisão de 1000 (μM) pelo valor de $X(\text{g})$ e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em μmol trolox / g de fruta (porção comestível) (Equação 12).

$$X(\text{g}) = \frac{x}{1000} \quad (11)$$

$$y = \frac{1000}{X(\text{g})} \cdot 1 \quad (12)$$

4.6.3. Método β caroteno – Linoleato

Este método utiliza uma emulsão formada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico para avaliar a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, determinando a capacidade de uma amostra, nesse caso dos extratos de semente de butiá, de proteger um substrato lipídico da oxidação. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (KATALINIĆ et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Pela metodologia utilizada, descrita por Matthäus (2002), o sistema formado por β -caroteno e ácido linoléico é induzido a uma

rápida descoloração na ausência de um composto antioxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoléico e por um átomo de hidrogênio retirado de um dos grupos metila da molécula de β -caroteno. A taxa de descoloração da solução de β -caroteno é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm e após 120 minutos.

Inicialmente, foram preparadas duas emulsões, uma com adição de β -caroteno e outra sem (branco). Para a emulsão de β -caroteno, em um balão de 250 mL, foram pesados 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween-20 e 3,34 mg de β -caroteno. A este balão foi adicionado 1 mL de clorofórmio e foi agitado bem até a completa solubilização das partículas de β -caroteno. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo (Fisatom, Mod. 550 e 802, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a 40 °C. Logo após foram adicionados 100 mL de água destilada na mistura, agitando vigorosamente para formar uma solução estável. A emulsão de branco foi preparada com 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween-20 e 100 mL de água destilada, e também agitada vigorosamente. As duas emulsões foram mantidas ao abrigo da luz até a realização das análises.

Um alíquota de 5 mL da solução de β -caroteno foi adicionada à 200 μ L do extrato, sendo que cada um dos extratos a ser testado foi diluído em etanol P.A. na concentração final de 1667 mg/L. Imediatamente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (8500IIIUV/ VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong) em comprimento de onda de 470 nm com respectivas soluções de branco, constituídas de 5 mL de emulsão de branco e 200 μ L do extrato. Os tubos foram imediatamente imersos em banho termostático (Biomatic Aparelhos Científicos Ltda., Porto Alegre/RS, Brasil) a 50 °C durante 2 horas de reação, realizando-se leituras nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos. Em paralelo, foi realizado também o controle do teste, em que a amostra foi substituída por etanol. Os resultados de atividade antioxidante (% AA) foram calculados pela Equação 13 e expressos como média \pm desvio padrão.

$$AA\% = 1 - \left\{ \left| \frac{(Abs_{t:0} - Abs_{t:120})}{Abs_{controle:0} - Abs_{controle:120}} \right| \right\} \cdot 100 \quad (13)$$

Onde $Abs_{t:0}$ é a absorvância da amostra no tempo 0 minutos, $Abs_{t:120}$ é a absorvância da amostra no tempo 120 minutos, $Abs_{controle:0}$ é a absorvância do controle no tempo 0 minutos e $Abs_{controle:120}$ é a absorvância no tempo 120 minutos.

4.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos da semente de butiá foi realizada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) através do método de Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006).

Para a construção de uma curva padrão de ácido gálico foi preparado uma solução estoque de 0,005 g/mL de ácido gálico em água destilada. Em balões volumétricos de 100 mL, foram diluídas alíquotas da solução estoque para a obtenção de frações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferidos para estes 100 μ L de cada uma das concentrações, 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após 30 segundos, e antes de 8 min, após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 2 h para que a reação ocorresse. A absorvância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro. Para o branco foi realizada a leitura apenas com água destilada. A curva padrão de ácido gálico foi representada através do gráfico de absorvância versus concentração de ácido gálico (mg/L).

Os extratos avaliados foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A. na fração final de 1667 mg/L, e seguiu o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva padrão. Os valores de absorvância encontrados para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva padrão, e o teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi determinado através da Equação 14. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg de EAG/g de extrato, como média \pm desvio padrão.

$$TFT \left(mg \frac{EAC}{g_{EXT}} \right) = \frac{(EAC \cdot 1000)}{D_{EXT}} \quad (14)$$

Onde EAG é equivalente em ácido gálico, obtido através da curva padrão (mg EAG/L) e D é a diluição da amostra (mg extrato/L).

4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.8.1. Método de difusão em ágar

A atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar foi realizada no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

A atividade antibacteriana dos extratos da semente de butiá foi avaliada para as bactérias *Escherichia coli* CTT 1371 (Gram-negativa) e *Bacillus cereus* ATCC 8739 (Gram-positiva). O método de difusão em ágar é um método qualitativo, amplamente utilizado na seleção dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Através deste método verifica-se a capacidade do extrato de inibir ou não o crescimento do microrganismo de interesse.

No método de difusão em gel, uma suspensão bacteriana de cada espécie contendo 10^8 UFC/mL foi semeada em placa com meio ágar de Müller-Hinton com auxílio de *swab* estéril.

Após, 50 µL de solução de extrato de concentração 200 mg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido) a 60 % foram aplicados diretamente em orifícios de 7 mm de diâmetro feitos no ágar. Foram feitos 6 furos em cada placa de Petri, com auxílio de um furador de aço estéril, onde foram testados três extratos, em duplicata. A solução de DMSO a 60 %, não oferece nenhuma inibição aos micro-organismos testados de acordo com testes realizados.

Os sistemas foram incubados por 24 h a 36 °C, em estufa bacteriológica e em condições aeróbicas. Após a incubação, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido em milímetros, sendo que halos com tamanho acima de 9 mm são considerados resultados positivos (VALGAS et al., 2007; SMÂNIA et al., 1995, MICHIELIN et al., 2009).

4.8.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A atividade antibacteriana foi avaliada também através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Essa análise foi realizada no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por Ávila et al. (2008). Os extratos testados (75 mg) foram dissolvidos em 150 μL de DMSO previamente esterilizado em autoclave. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas desses, no mesmo solvente, e distribuídos 10 μL em orifícios distintos de uma placa de microdiluição de 96 poços. Em cada orifício-teste ainda foi adicionado 85 μL de caldo de Müeller-Hinton. Como controles de crescimento e esterilidade foram usados apenas as misturas do meio de cultura e DMSO sem a adição de extrato. Nos orifícios-teste e de controle de crescimento foram adicionados 5 μL de inóculo bacteriano, o qual consistiu de uma suspensão contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL de *Bacillus cereus* ou *Escherichia coli*.

Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24 h a 36 °C. Para a leitura dos experimentos foi utilizada uma solução reveladora de crescimento bacteriano (cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium). A CMI foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.9. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSA

O perfil de compostos voláteis dos extratos de semente de butiá foi realizada na Central de análises do curso de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e segundo a metodologia descrita por Aguiar et al. (2014).

A extração dos compostos voláteis foi realizada utilizando-se um sistema de *headspace estático*, em que o amostrador do *headspace* está acoplado ao injetor do cromatógrafo a gás. O amostrador automático Combi PAL possui recipiente para amostra que permite o seu aquecimento (forno) e agitação.

Os experimentos foram realizados utilizando-se vial de 20 mL com tampa de alumínio e septo de silicone. Para análise do efeito da pressão reduzida, ao vial contendo 1 g de cada extrato, foi adicionado solução de NaCl 15% (m/v) até seu completo preenchimento, ocorrendo transbordamento da solução, homogeneizado em vórtex e, em seguida, o vial foi selado com tampa de alumínio e septo de silicone. Foram removidos deste sistema 10,0 mL da solução com o auxílio de seringa de 5 mL (HAMILTON, USA), sendo a agulha desta introduzida no vial

perfurando-se o septo de silicone. Este vial permaneceu na temperatura de 75 °C por cinco minutos antes da injeção.

Para cada experimento realizado, 1000 µL da fase vapor foram recolhidos com seringa HD-Type Syringe Plunger (HAMILTON, USA) e injetados no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM). As condições utilizadas foram selecionadas avaliando-se a quantidade e a área relativa dos picos no cromatograma referentes aos compostos extraídos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e agitação de 500 rpm.

Os compostos voláteis foram separados e identificados utilizando-se um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7820A) acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975C), com coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies), fase estacionária composta por 5% fenil e 95% dimetilsiloxano (30 m x 250 µm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme) e hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹).

As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 220 °C; a coluna inicialmente a 35 °C foi mantida por 2 minutos, posteriormente foi aquecida a uma taxa de 2 °C min⁻¹ até 80 °C, a 4 °C min⁻¹ até 150 °C e a 8 °C min⁻¹ até 230 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 minutos. A temperatura de transferência da interface foi de 240 °C e a injeção do tipo *splitless* (FERRÃO, 2012). O volume de amostra introduzido foi de 1000 µL.

O detector de massas foi operado no modo impacto de elétrons (70eV) e analisador de massas quadrupolar operando com varredura na faixa de 35 a 550 u para o modo SCAN. A identificação dos compostos extraídos das amostras foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (NIST 2.0 e Willey 7.0) e com dados da literatura (ADAMS, 2009).

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento global, teor de compostos fenólicos totais, atividades antioxidante e antimicrobiana foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA), utilizando o software Statistica para Windows 7,0 (StatsoftInc., EUA). A análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de rendimento em função do antioxidante. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram analisadas pelo teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

Os valores de umidade e substâncias voláteis determinados para a semente de butiá-da-praia, estão apresentados na Tabela 7, como média \pm desvio padrão.

Tabela 7. Teor de umidade e substâncias voláteis.

Matéria prima	Umidade inicial (%)	Umidade após secagem (%)
Semente de Butiá-da-praia	28,9 \pm 0,8	9,30 \pm 0,01

Alguns estudos têm mostrado a influência da água contida em alimentos submetidos à extração supercrítica quando o solvente é o dióxido de carbono, podendo se observar efeitos positivos e negativos no rendimento da extração. A água melhora o desempenho da extração abrindo os poros da matriz e aumentando a polaridade do fluido, o que permite a solubilização de compostos relativamente polares. Apenas 0,3 % dessa água é solúvel no CO₂ supercrítico, então em amostras com teor elevado de umidade a água afeta negativamente a extração, agindo como solvente para algumas substâncias, competindo com o CO₂ supercrítico e diminuindo a retirada do extrato (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

A umidade final das sementes foi alcançada após secagem em estufa com circulação de ar à 46 °C por 16 horas.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

Para a compreensão da cinética de extração e dos fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo, através da análise dos parâmetros e curvas obtidos pela modelagem matemática, fez-se necessário a caracterização das partículas que compõem o leito de extração supercrítica.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para o diâmetro médio de partícula, calculado de acordo com as Equações 2 e 3; a densidade aparente e a densidade real do sólido conforme as Equações 4 e 5, respectivamente, e finalmente a porosidade do leito, calculada conforme a Equação 6.

Tabela 8. Caracterização do leito de partículas de semente de *Butia catarinensis*.

Diâmetro médio (mm)	Massa específica real (g/cm ³)	Massa específica aparente (g/cm ³)	Porosidade (ϵ)
0,5 ± 0,1	1,30 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,34

Após definida a condição de umidade da matéria-prima, realizou-se a determinação do diâmetro médio de partícula da fração da semente seca triturada de tamanho compreendido entre 6 a 80 mesh. O diâmetro médio de partícula encontrado foi de 0,5 ± 0,1 mm. A matriz sólida foi avaliada visualmente após a extração com fluido supercrítico, onde se observou a compactação adequada e coloração homogênea tanto na direção radial quanto na direção longitudinal, indicando que não houve formação de caminhos preferenciais na passagem do CO₂ através do leito de extração (MARTÍNEZ, 2005).

O volume ocupado pela massa de matéria-prima no extrator foi calculado a partir da altura preenchida pelas partículas sólidas dentro do leito, sendo esta altura igual a 6,1 cm e, conseqüentemente, o volume ocupado igual a 27,6 cm³.

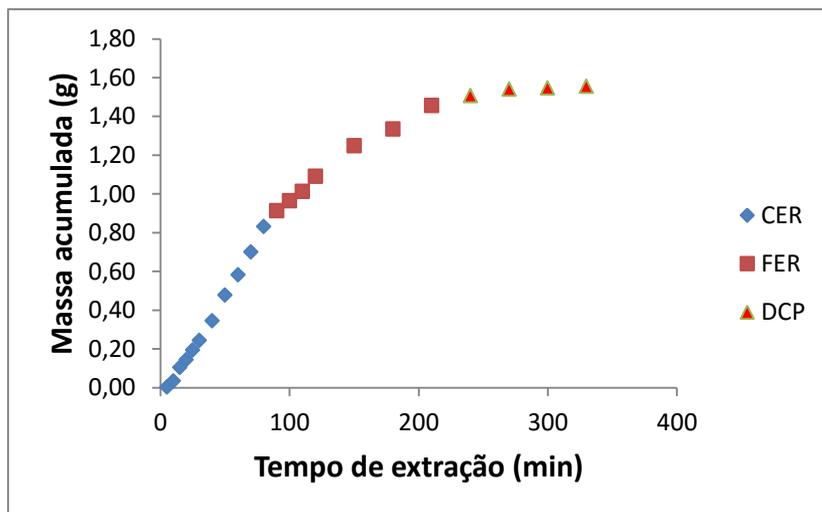
A massa específica real e a porosidade do leito são utilizadas para explicar o comportamento da amostra durante a transferência de massa para o fluido supercrítico, através da aplicação dos modelos matemáticos.

Estas características também são importantes para a padronização da amostra da semente de butiá utilizada durante o experimento, facilitando a discussão dos parâmetros e resultados obtidos da extração supercrítica.

5.3. CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

A cinética de extração foi realizada preliminarmente e utilizada como base para a definição do tempo de extração e da vazão de solvente utilizados como parâmetros para os ensaios de rendimento das ESC, em diferentes condições de operação. Para isso, empregou-se uma condição de pressão e temperatura baixas (que geralmente corresponde a uma menor taxa de extração), 100 bar e 40 °C, e vazão de CO₂ de 6,66 ± 2 g/min), a fim de garantir que a etapa difusional de extração seja alcançada em todas as demais condições aplicadas. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 12 e os parâmetros cinéticos de extração são apresentados na Tabela 9, conforme descrito no item 4.5.1.

Figura 12. Curva de experimental de extração com fluido supercrítico de óleo de semente de *Butia catarinensis* a 100 bar, 40°C e 6,66 g/min de CO₂.



CER: etapa de extração constante; FER: etapa de extração decrescente; DCP: etapa de extração difusional.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico da semente de *Butia catarinensis*, realizada a 100 bar, 40 °C e 6,66 ± 2 g/min de CO₂.

Parâmetro	Período de extração		
	CER	FER	DCP
$t^{(1)}$ (min)	0 – 80	80 – 210	> 210
$m_{ext}^{(2)}$ (g)	0,8315	0,6245	0,099
$X_0^{(3)}$ (%)	5,534	4,1563	0,659
$M^{(4)}$ (g/min)	0,0104	0,0048	0,001
$Y^{(5)}$ (g/g CO ₂)	0,0016	0,0007	0,0001

$t^{(1)}$: duração da etapa de extração; $m^{(2)}$: massa de extrato aproximada; $X_0^{(3)}$: rendimento da etapa; $M^{(4)}$: taxa de extração; $Y^{(5)}$: concentração de soluto na fase solvente; CER⁽⁶⁾: etapa de extração constante; FER⁽⁷⁾: etapa de extração decrescente; DCP⁽⁸⁾: etapa de extração difusional.

Para a determinação do rendimento global de extração (X_0) com fluido supercrítico é necessário fixar um tempo de extração para verificar a influência das condições de temperatura e pressão empregadas. Esse tempo é definido com base nas etapas da curva de extração. A etapa CER ocorreu entre 0 e 80 minutos, a etapa FER entre

80 e 210 minutos e a última etapa (DCP) ou etapa difusional ocorreu a partir de 210 minutos.

De acordo com a análise da Figura 12, o tempo para alcançar a etapa difusiva é de aproximadamente 4 horas. Sendo esse tempo fixado para todos os experimentos de determinação de X_0 devido à necessidade da extração da maior parte do soluto disponível.

O Apêndice I apresenta os dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do tempo para a curva de extração com fluido supercrítico da semente de butiá a 100 bar e 40 °C para vazão de CO_2 de $6,66 \pm 2$ g/min.

5.4. MODELAGEM MATEMÁTICA

Para a modelagem da curva de extração da semente de *Butia catarinensis* na condição de 100 bar, 40 °C e vazão de CO_2 de $6,66 \pm 2$ g/min foram empregados dois modelos baseados na equação de balanço de massa diferencial, o modelo de Sovová (1994) e o modelo logístico apresentado por Martínez et al. (2003); e dois modelos baseados na analogia a transferência de calor, o modelo difusivo de placa apresentado por Gaspar et al. (2003) e o modelo de difusão, proposto por Cranck e apresentado por Reverchon (1997).

Para aplicação destes modelos matemáticos é necessário o conhecimento de algumas variáveis do processo.

No modelo de Sovová (1994), as variáveis necessárias são: vazão de solvente, porosidade do leito, massa de soluto inicial (X_0), densidade do solvente, raio do extrator, altura do leito, densidade do sólido (densidade real), massa de inerte, solubilidade do extrato, tempo de extração, tempo de duração da etapa CER, taxa de extração na etapa CER (M_{CER}) e concentração de soluto na etapa CER (Y_{CER}).

No modelo de Crank (1975) e no modelo de Matínez et al. (2003), apenas a massa de soluto inicial e raio da partícula sólida são necessárias. Para o modelo de Gaspar et al. (2003) são necessárias a massa do soluto inicial e a espessura da partícula sólida.

A Tabela 10, apresenta os coeficientes, parâmetros ajustáveis e os erros médios quadráticos (EMQ) obtidos através do software *Mass Transfer* para cada modelo. A Figura 13 apresenta os dados experimentais e modelados obtidos para a ESC de extrato da semente na condição 100 bar, 40 °C e vazão de CO_2 igual a $6,66 \pm 2$ g/min.

Figura 13. Curva de ESC de extrato de semente de *Buitia catarinensis* e modelada a 100 bar, 40 C e 6,66 \pm 2 g/min de CO₂.

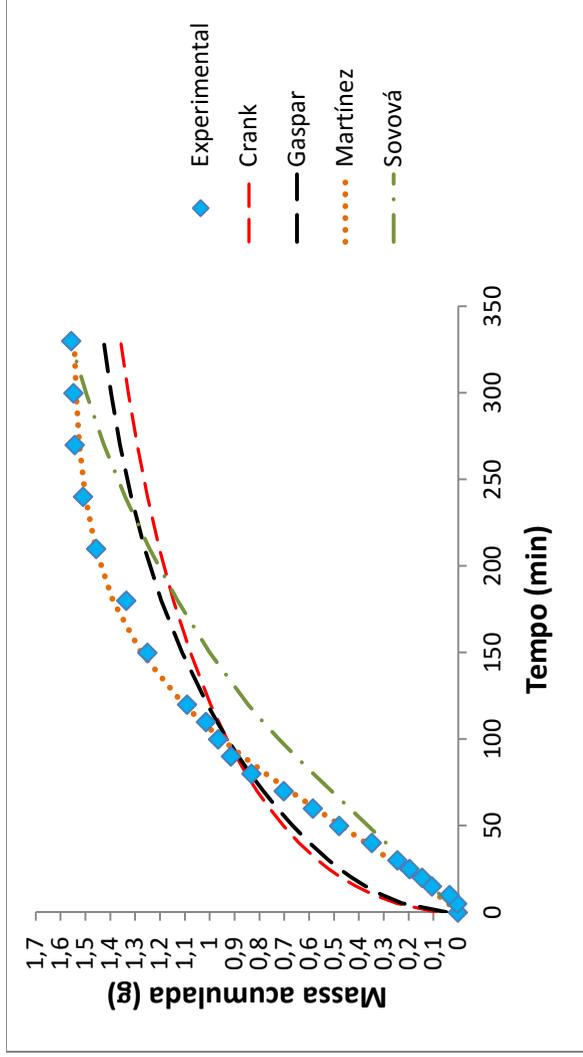


Tabela 10. Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da ESC de semente de *Butia catarinensis* a 100 bar, 40 °C e vazão de $6,66 \pm 2$ g/min de CO².

Modelo	Parâmetros		EMQ
Crank (1975)	D (m ² / min)	$3,0076 \times 10^{-11}$	0,0485
Martínez et al. (2003)	b (min ⁻¹)	0,0192	0,0008
	T _m (min)	51,2299	
Sovová (1994)	X _k	0,0819	0,0248
	K _{xa} (min ⁻¹)	0,0040	
	K _{ya} (min ⁻¹)	0,4449	
Gaspar et al. (2003)	D (m ² / min)	$1,7402 \times 10^{-10}$	0,0330

m (soluto): massa do soluto; b, T_m: parâmetro ajustável; EMQ: erro médio quadrático; N: massa de inerte; r (partícula): raio da partícula; D: coeficiente de difusão; X_k: razão mássica de soluto de difícil acesso; K_{xa}: coeficiente de transferência de massa para a fase sólida; a: coeficiente de transferência de massa para a fase fluida.

De acordo com a Figura 12 e os valores do EMQ da Tabela 10, o modelo que melhor se adaptou aos dados experimentais foi de Martínez et al. (2003), seguido pelo de Sovová (1994). O parâmetro T_m do modelo de Martínez significa o tempo em que a taxa de extração é máxima. Neste caso, em aproximadamente 51,23 min, sendo a taxa de extração crescente para a semente de Butiá. Segundo Oliveira (2010) com uma maior vazão de solvente a taxa de extração máxima é alcançada em menor tempo. Estudos com a semente de tamarindo, bagaço de uva e óleo de pequi também mostraram que o modelo de Martínez foi o que melhor se adaptou aos dados experimentais (OLIVEIRA et al., 2013; PESSOA et al., 2015; REIS et al., 2016).

O modelo de Martínez é baseado no balanço de massa diferencial no leito de extração, considerando os fenômenos de transferência de massa que ocorrem na fase fluida e na fase sólida. (MARTÍNEZ et al., 2003).

A principal vantagem do modelo de Sovová (1994) é a adequada descrição dos fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo de ESC (convecção e difusão), apresentando significado físico consistente para os parâmetros ajustáveis K_{xa} e K_{ya} (coeficientes de transferência de massa na fase fluida e fase sólida, respectivamente). Por outro lado, o uso desse modelo é limitado aos sistemas em que os parâmetros utilizados tenham sido corretamente determinados, assim como a solubilidade do soluto no solvente supercrítico conhecida para a

condição de temperatura e pressão do processo, ou seja, densidade do CO_2 (REVERCHON; MARRONE, 2001; SOUZA et al., 2004). Assim, é provável que com um valor de solubilidade adequado para representar a complexa mistura de componentes que constituem os extratos em questão o ajuste do modelo seria melhor. O valor de solubilidade usado ($0,00228 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{g CO}_2$) é referente a apenas um dos componentes do extrato, o ácido láurico que constitui 42% dos ácidos graxos na amêndoa do *Butia Capitata* de acordo com Faria et al. (2008). Este valor foi adotado uma vez que não foram encontrados dados na literatura de solubilidade de óleo de semente de butiá em CO_2 e pela impossibilidade operacional de realizar uma análise de determinação de solubilidade mais adequada.

O parâmetro K_{ya} do modelo de Sovová (1994), definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, é diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido que, por sua vez, aumenta com o incremento da vazão de solvente. Já o valor de K_{xa} , definido como o coeficiente de transferência de massa na fase sólida, não sofre a influência da vazão do solvente, pois é representado pela difusão do CO_2 e da mistura de CO_2 + soluto no interior dos fragmentos de matéria-prima (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; MICHIELIN et al., 2005; SOVOVÁ, 1994). Conforme os dados da Tabela 10, o valor do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (K_{ya}) (0,44490) foi bastante superior ao do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (K_{xa}) (0,0040). Isso indica que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção na extração de semente de butiá. Na literatura são encontrados alguns trabalhos que relatam comportamento semelhantes como por Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009) na ESC de óleo de amêndoa de pêssego, por Andrade et al. (2012) na ESC de casca de café, e por Pessoa et al. (2015) na extração de óleo de pequi usando propano subcrítico.

Os modelos de Crank (1975) e de Gaspar et al. (2003) (SSP) consideram que a transferência de massa na extração se dá unicamente pela difusão, desconsiderando o mecanismo de transferência de massa por convecção. Crank (1975) gerou o maior valor de erro médio quadrático e este comportamento também observado por Pessoa et al. (2015) em óleo de polpa de pequi. Analisando a Figura 12, percebemos que esses modelos geram curvas com comportamento semelhante entre si, mas, diferente da curva de dados experimentais. Esses modelos parecem ser inadequados para descrever o sistema com semente de butiá, devido ao seu alto teor de óleo. O mesmo faz com que se obtenha,

no início da extração, um maior gradiente de concentração entre a superfície dos sólidos e a fase fluida. Isto também foi observado por Oliveira (2015) na ESC de semente de maraujá.

A modelagem das curvas de ESC é uma ferramenta que possibilita a otimização de projetos e aumento de escala, como a definição do volume do extrator, rendimento e predição do comportamento da extração ao longo do processo, como o tempo de extração para uma dada condição operacional (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

5.5. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRATO (%)

Os rendimentos dos extratos da amêndoa de *Butia catarinensis* obtidos por meio das técnicas de extração à baixa pressão (Soxhlet e ultrassom) com diferentes solventes estão apresentados na Tabela 11, assim como o índice de polaridade desses solventes (BYERS, 2003).

Tabela 11. Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de semente de *Butia catarinensis* com diferentes solventes.

Técnica	Solvente	Polaridade ⁽¹⁾	Rendimento ⁽²⁾ (%)
Soxhlet	Hexano	0	$17,5 \pm 2,2$ ^{abcd}
Soxhlet	Etanol	5,2	$18,4 \pm 0,4$ ^{abcd}
Soxhlet	Etanol-água	7,1	11 ± 1 ^{def}
Ultrassom	Hexano	0	16 ± 1 ^{abcd}
Ultrassom	Etanol	5,2	$14,9 \pm 0,7$ ^{abcdef}
Ultrassom	Etanol-água	7,1	$10,3 \pm 0,4$ ^{def}

⁽¹⁾ índice de polaridade do solvente ; ⁽²⁾ Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados de rendimento variaram entre $10,3 \pm 0,4$ % para os extratos de ultrassom com etanol-água e $18,4 \pm 0,4$ % para os extratos de soxhlet com etanol.

O maior rendimento da extração com a técnica de Soxhlet foi observado com o solvente etanol com $18,4 \pm 0,4$ %, seguido pelos solventes hexano e etanol-água, e todo os três não diferiram estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. Rossato et al. (2007) encontraram valores semelhantes em amêndoas das espécies *Butia capitata* e *Butia eriosphata* utilizando a

técnica de Soxhlet com solvente hexano, sendo 16,7 e 17,03 % de rendimento, respectivamente.

O maior rendimento das extrações ultrassônicas foi utilizando hexano como solvente com 16 ± 1 % e não diferiu significativamente dos demais para essa mesma técnica. O rendimento encontrado nos extratos de ultrassom para o solvente etanol-água foi semelhante aos 10% encontrado por Oliveira (2015) em sementes de maracujá, porém os extratos que foram extraídos com hexano e etanol apresentaram rendimentos inferiores.

Comparando as duas técnicas de extração para o mesmo solvente, a Soxhlet apresenta maiores rendimentos que a ultrassônica. Segundo Markon et al. (2007) este fato pode ser justificado pois, na extração em Soxhlet, realizada na temperatura de ebulição do solvente, a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas quando comparadas a extrações em temperatura inferior, como é o caso extração com ultrassom. Assim, com uma maior temperatura de processo, o solvente pode alcançar os espaços da matriz que contêm solutos com maior facilidade, solubilizando uma maior quantidade e diferentes tipos de solutos. Este mesmo comportamento foi observado por Oliveira et al. (2013) em extratos de bagaço de uva das variedades Merlot e Syrah.

Ao se analisar a influência da polaridade dos solventes, o extrato de semente de butiá apresentou rendimentos mais elevados com solventes com índices de polaridade intermediária (etanol) e baixa (hexano), sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade intermediária a baixa. Em contrapartida, as extrações com o solvente de maior polaridade, etanol-água, apresentaram os menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos polares presentes na matriz vegetal da semente de butiá. Este comportamento é semelhante a Sganzerla (2010), que também encontrou altos rendimentos nos extratos obtidos por Soxhlet das amêndoas de butiás da espécie *Butia capitata* (28,74 %) e *eriosphata* (26,31 %) utilizando o solvente apolar éter de petróleo.

Os resultados de rendimento para extração supercrítica de semente de Butiá estão apresentados na Tabela 12, com os valores de P, T e massa específica de solvente correspondente, obtida de acordo com Angus et al. (1976).

Os efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) encontrados para as variáveis no rendimento global das extrações podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentados na Figura 14. O Gráfico de Pareto ilustra graficamente a influência das variáveis independentes sobre as variáveis respostas, considerando-se significativas aquelas cujas colunas

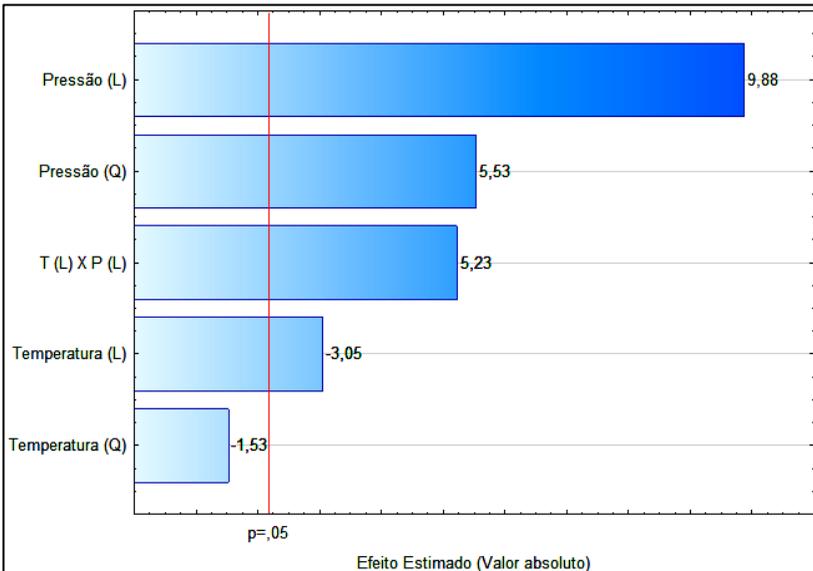
horizontais ultrapassam as linhas tracejadas, representativas para intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

Tabela 12. Resultados de rendimento global (X_0) obtidos para a ESC de semente de *Butia catarinensis* com vazão de $6,66 \pm 2$ g/min e valores da massa específica do CO_2 para cada condição.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Pressão (bar)	ρCO_2 (g/cm^3) ⁽¹⁾	Rendimento (%) ⁽²⁾
40	100	0,629	$10,5 \pm 0,6^b$
40	200	0,840	$12,6 \pm 0,7^a$
40	300	0,911	$12,6 \pm 0,1^a$
50	100	0,385	$2,2 \pm 0,7^c$
50	200	0,785	$13,1 \pm 0,2^a$
50	300	0,871	$12,8 \pm 0,8^a$
60	100	0,295	$0,35 \pm 0,03^c$
60	200	0,724	$13,3 \pm 0,4^a$
60	300	0,830	$13,9 \pm 0,2^a$

⁽¹⁾ ANGUS et al. 1976; ⁽²⁾ Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 14. Gráfico de pareto com os efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) da pressão e temperatura para a resposta rendimento global obtido na ESC dos extratos de semente de *Butia catarinensis*.



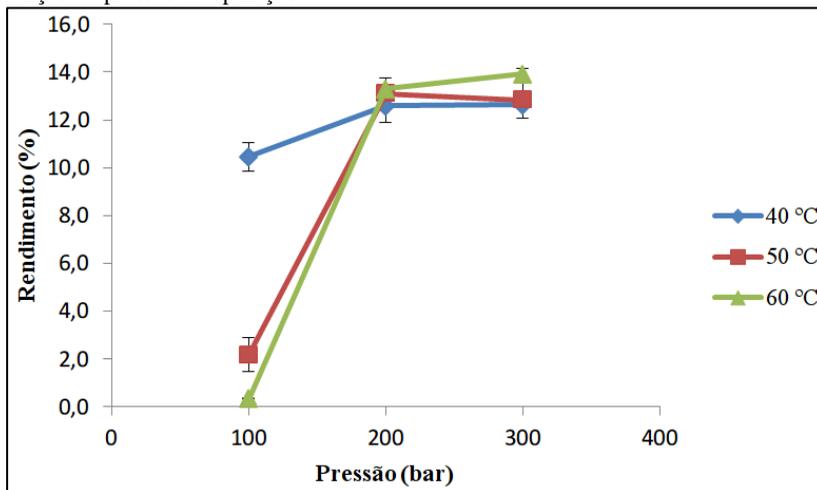
De acordo com os resultados apresentados, o maior rendimento apresentado para a semente de *Butia Catarinensis* foi de 13,9 % para a condição de 60 °C/ 300 bar, sendo estatisticamente igual aos valores de obtidos nas condições de 200 e 300 bar nas temperaturas 40 e 50 °C. O menor rendimento foi de 0,35 % para a condição de 60 °C/ 100 bar, sendo estatisticamente igual ao valor na condição de 50 °C/ 100 bar.

É possível observar que em condição isotérmica, os resultados do rendimento aumentam com o aumento da pressão. Fato este que corrobora com estudo de Brunner (1994) que afirma que a massa específica do solvente é o fator predominante no rendimento da extração, ou seja, o X_0 aumenta devido ao aumento no poder de solvatação do fluido supercrítico com a pressão.

Já em condição isobárica, dois fatores podem afetar o rendimento, a pressão de vapor do soluto e a massa específica do solvente. Esses efeitos opostos geralmente resultam na inversão das isotermas de rendimento (Figura 15), próximo de 200 bar (MICHELIN *et al.*, 2005).

A Figura 15 apresenta as isotermas de rendimento do extrato de semente de *Butia Catarinensis* em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação, de acordo com os dados da Tabela 12, para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C.

Figura 15. Isotermas de extração supercrítica da semente de *Butia Catarinensis* em função da pressão de operação.



Em pressões mais baixas, com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição na massa específica do solvente, ocasionando assim a diminuição do rendimento da extração. Isso pode ser observado na condição de 100 bar, onde o rendimento diminuiu de 10,5 para 0,35 % com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C. Já em pressões mais altas, após a inversão das isotermas, com o aumento da temperatura ocorre também uma diminuição na massa específica do solvente, porém muito sutil, então o aumento da pressão de vapor torna-se predominante, ocasionando o aumento do rendimento da extração. Esse fato ocorreu na condição de 300 bar, na qual o rendimento aumentou de 12,6 para 13,9% com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C.

Na literatura são encontrados vários estudos que relatam comportamento semelhante ao encontrado nesse trabalho. Andrade et al. (2012) relataram que a faixa de inversão das isotermas para o extrato de casca de café foi entre 150 e 200 bar. Os mesmos autores detectaram também para o extrato da borra de café uma inversão ocorreu entre 200 e 250 bar. Segundo Oliveira et al. (2013), em seu estudo com extrato de uva da variedade Merlot, ocorreu uma inversão das isotermas testadas acima de 170 bar.

A faixa de inversão é determinada pela composição dos extratos, ou seja, pela influência dos grupos funcionais e estrutura dos ácidos graxos presentes no soluto sobre a pressão de vapor dos diferentes extratos e, portanto, na solubilidade destes no solvente supercrítico (MEZZOMO et al., 2010).

Além das interpretações individuais dos resultados, por intermédio do experimento fatorial 3^2 , foi possível medir o efeito da utilização das diferentes pressões e temperaturas, bem como a interação entre eles em toda a faixa avaliada. Para a resposta rendimento houve efeitos significativos (Tabela 13).

Tabela 13. Estimativa do coeficiente de regressão e teste T sobre a resposta rendimento dos extratos de semente de *Butia catarinensis*.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t calculado	P valor
Média	12,208	0,812	15,034	0,0000000037
Temperatura (L)	-1,356	0,445	-3,048	0,010114231
Temperatura (Q)	1,177	0,770	1,529	0,152306246
Pressão (L)	4,394	0,445	9,880	0,0000004081
Pressão (Q)	-4,263	0,770	-5,533	0,0001292057
T (L) X P (L)	2,846	0,545	5,225	0,0002129151

Nível de significância, α : 0,05 %; R^2 : 93,30 %

Conforme a tabela acima os coeficientes de regressão para o rendimento mostra que os efeitos lineares de temperatura, pressão, a interação entre esses dois efeitos e o efeito quadrático da pressão (valores em negrito) foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$), mostrando que as variáveis exerceram influência entre os diferentes ensaios e como o R^2 apresentou um valor de 93,30 %, pôde-se efetuar a ANOVA (tabela 14).

Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) do modelo completo da tabela de regressão para o rendimento dos extratos de *Butia catarinensis*.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}
Regressão	391,249	4	97,812	37,361
Erro	34,031	13	2,618	
Total	425,28	17		

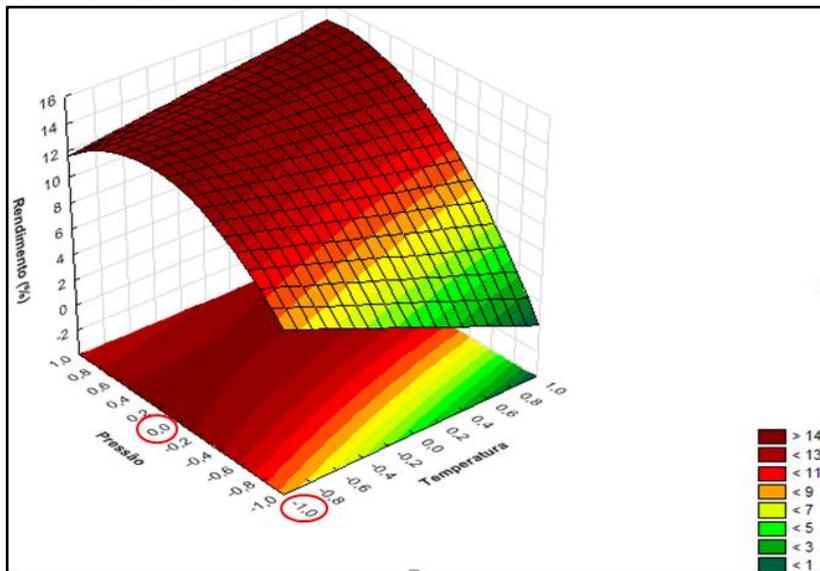
Nível de significância, α : 0,05 %; R^2 : 92 %

Conforme demonstram os dados da Tabela 14, o valor de $F_{\text{calculado}}$ é igual a 37,36 sendo este um valor aproximadamente 11,75 vezes maior do que o F_{tabelado} de valor 3,18. Segundo Box e Draper (1987), para que uma regressão não seja estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser no mínimo dez vezes maior que o valor do F_{tabelado} . Por isto, assumiu-se que o modelo representado pela Equação 14 é preditivo. O valor obtido de R^2 foi igual a 92 %, ou seja, o modelo explica 92 % das respostas preditas pelo mesmo e foi possível gerar a superfície de resposta, a partir da equação 14 em níveis codificados.

$$Y = 12,99 - 1,356x_1 + 4,394x_2 - 4,263x_2^2 + 2,846x_1x_2 \quad (15)$$

Em que Y = rendimento; x_1 = temperatura; x_2 = pressão

Figura 16. Superfície de resposta para o rendimento global obtido na ESC dos extratos de semente de *Butia Catarinensis*.



Analisando a superfície de resposta, nota-se que a pressão teve maior influência na resposta rendimento do que a temperatura. Quando trabalhou-se com pressões intermediárias a altas, independentemente da temperatura utilizada, maior foi o rendimento encontrado nos extratos. O nível ótimo de rendimento se encontrou no ponto que utilizou a pressão de 200 bar e a temperatura de 40 °C.

Mediante a análise da superfície de resposta e do teste de Tukey, as extrações com CO₂ combinado com os cossolventes foram realizadas na pressão e temperatura que obtiveram o nível ótimo de rendimento (200 bar e 40 °C).

5.6. EMPREGO DE COSSOLVENTE

Na extração supercrítica usando o CO₂ como solvente, os extratos obtidos são polares, pois são solúveis no CO₂. Pensando nisso, dois

cossolventes polares foram selecionados para atuar em conjunto com o CO₂ visando o aumento da extração de substâncias polares, haja visto que grande parte das substâncias com propriedades antioxidantes são substâncias polares.

Com base nos rendimentos obtidos nas extrações à baixa pressão com diferentes solventes (Tabela 11), e também nos resultados de atividade antioxidante e antimicrobiana (apresentados nas seções 5.7 – 5.11) os solventes etanol e etanol-água foram escolhidos como cossolvente para a extração supercrítica.

O uso de cossolvente acrescenta uma etapa ao processo de extração (remoção do solvente do extrato final) e por isso as quantidades utilizadas devem ser reduzidas. Assim, para que todas as vantagens da extração supercrítica fossem mantidas, empregou-se os cossolventes nas frações de 2,5, 5 e 7,5 %. Os resultados obtidos para ESC com cossolvente estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Rendimentos obtidos com o emprego de cossolvente na extração supercrítica de semente de butiá a 200 bar e 40 °C.

Solventes	Rendimento (%) *
0 %	12,6 ± 0,7 ^{bc}
Etanol 2,5 %	14,5 ± 0,9 ^b
Etanol 5 %	15,3 ± 0,1 ^{ab}
Etanol 7,5 %	15,3 ± 0,2 ^{ab}
Etanol-água 2,5 %	15,3 ± 0,8 ^{ab}

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica com CO₂ elevou os valores de rendimento do extrato, mas não houve diferença significativa entre os valores encontrados. O maior rendimento encontrado foi de 15,3 ± 0,8 % com a concentração de 2,5 % de etanol-água, já o menor rendimento foi encontrado no extrato que utilizou 0 % de etanol.

Foi utilizada somente a concentração de 2,5 % de etanol-água, pois para evaporar a água é necessário o uso de altas temperaturas, podendo causar perdas de compostos termolábeis, e assim diminuir a qualidade do extrato. Observou-se que esse cossolvente foi o que proporcionou o melhor rendimento dos extratos, com um aumento de 21% em relação ao rendimento obtido para as mesmas condições de extração com CO₂ puro.

Fazendo um comparativo dos rendimentos obtidos com o emprego de cossolventes na ESC (Tabela 15) com os rendimentos

obtidos nas extrações à baixa pressão (Tabela 11) utilizando os mesmos solventes pode-se observar que a primeira técnica utilizando 5 e 7,5 % de etanol apresentou resultados 2,6 % superiores ao extrato obtido por ultrassom e levemente inferior ao ensaio com Soxhlet. Porém, as vantagens da extração supercrítica com adição de etanol como cossolvente em relação ao método convencional Soxhlet é a utilização desse solvente orgânico em quantidade muito menor e a temperatura de processo mais baixa, o que evita a degradação de alguns compostos de interesse (CAMPOS, 2005). Já o rendimento do extrato com 2,5 % de etanol-água foi aproximadamente 48,5 % superior à técnica do ultrassom e 39 % que técnica de Soxhlet.

Segundo Oliveira et al. (2013) este aumento nos rendimentos usando os cossolventes é justificado pelo fato do etanol e a água serem solventes com características polares; assim, a sua adição fez com que substâncias polares passassem a ser solubilizadas, aumentando a extração desses compostos polares não extraídos pelo CO₂ supercrítico puro (apolar). Com isso, aumenta-se o rendimento, mas reduz-se a seletividade.

5.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH

A atividade antioxidante dos extratos de semente de butiá foi avaliada pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e expressa em EC₅₀. O valor de EC₅₀ representa a concentração efetiva para que se atinja 50 % de atividade antioxidante. Diante disso, quanto menor o valor de EC₅₀, maior é a atividade antioxidante do extrato.

A análise estatística dos dados das atividades antioxidantes foram realizadas separadamente para extrações à baixa pressão e para ESC. A Anova e post-hoc Tukey separados facilitaram a identificação da diferença de atividade antioxidante dos extratos.

A comparação de resultados de atividade antioxidante independente do método utilizado, do extrato de semente de butiá, é dificultada pela escassez de estudos disponíveis na literatura.

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos das sementes de butiá e do BHT, utilizado como referência para comparação, obtidos pelo método de captura do radical DPPH são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *Butia catarinensis* através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % de atividade (EC_{50}).

Técnica	Condições de processo		Solventes	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*
Soxhlet			Hexano	10853 ^a
			Etanol	626 ^d
			Etanol-água	66 ^e
Ultrassom			Hexano	4969 ^b
			Etanol	2581 ^c
			Etanol-água	615 ^d
Extração supercrítica	40 °C	100 bar		1799 ^G
		200 bar	CO ₂	12839 ^B
		300 bar		9234 ^{DE}
	50 °C	100 bar		1425 ^G
		200 bar	CO ₂	10431 ^{CD}
		300 bar		4331 ^F
	60 °C	100 bar		ND
		200 bar	CO ₂	11798 ^{BC}
		300 bar		16340 ^A
Extração supercrítica com cossolvente	40 °C	200 bar	CO ₂ + 2,5 % etanol	7496 ^E
			CO ₂ + 5 % etanol	7570 ^E
			CO ₂ + 7,5 % etanol	8759 ^{DE}
			CO ₂ + 2,5 % etanol-água	7252 ^E
BHT				67 ^e

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$), como segue: (a) Letras minúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por EBP e o BHT; (b) Letras maiúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por ESC. ND – Não determinado.

Conforme apresentado na Tabela 16, o extrato que apresentou a maior atividade antioxidante foi o obtido com etanol-água (66 $\mu\text{g/mL}$) pelo método Soxhlet, sem diferença significativa ao nível de 5 % pelo teste de Tukey com o valor de EC_{50} do antioxidante sintético BHT (67 $\mu\text{g/mL}$). Esse resultado torna esse extrato da semente de butiá um potencial antioxidante para ser testado em alimentos. Segundo Campos et al. (2008), valores de EC_{50} a baixo de 250 $\mu\text{g/mL}$ são considerados de alto potencial antioxidante.

O melhor desempenho foi apresentado pelos extratos obtidos com etanol-água, que é mais polar. Esse comportamento evidencia que os solventes de polaridade intermediária e alta aplicados nas extrações favoreceram a solubilização de compostos com atividade antioxidante, detectáveis pelo método DPPH. Isso porque o radical DPPH apresenta inacessibilidade estérica para moléculas grandes - como é o caso da maioria dos compostos lipídicos. Sendo, assim, menos eficiente para a determinação da atividade antioxidante desses materiais (APAK et al., 2007).

Oliveira (2015) no estudo de semente e da torta de semente de maracujá também observou que o solvente etanol-água proporcionou os extratos com melhores atividades antioxidantes, porém com técnicas analisadas diferentes.

Os extratos supercríticos apresentaram baixa atividade antioxidante, mas esse comportamento já era esperado pois os resultados da atividade antioxidante, em geral, são função da polaridade do solvente, com valores maiores de EC_{50} para os solventes apolares (hexano e CO_2). Não é possível definir um comportamento da atividade antioxidante frente às variações de temperatura e pressão. Este comportamento aleatório pode estar associado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, refletindo em variações no potencial antioxidante (BENELLI, 2010). Comportamento semelhante foi observado com Andrade et al. (2012) em extratos supercríticos de borra e casca de café.

Os valores de EC_{50} dos extratos mais oleosos, ou seja, obtidos por solventes de menor polaridade como CO_2 e hexano, são da mesma ordem de grandeza dos dados apresentados por Toss (2010) em extratos supercríticos da polpa de *Butia capitata*, Ferreira et al. (2011) em óleo de semente de maracujá refinado e Oliveira (2015) em extratos supercríticos de semente e torta de maracujá.

A adição de cossolvente na extração supercrítica elevou a atividade antioxidante dos extratos, mas não houve diferença significativa comparado àquela obtida na mesma condição de pressão e temperatura, empregando somente CO_2 . Este comportamento deve estar associado à extração de compostos mais polares pelos cossolventes, responsáveis pelo potencial antioxidante. Porém, mesmo com a adição de etanol, os extratos supercríticos ainda apresentaram desempenho bastante inferior ao proporcionado pelos extratos obtidos pelas técnicas à baixa pressão com etanol e etanol- água.

5.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA B - CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

No método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o β -caroteno sofre descoloração na ausência de um composto antioxidante, o que resulta na redução da leitura espectrofotométrica da absorbância da solução, num dado tempo de reação. Isso ocorre devido à formação de radicais livres a partir da oxidação do β -caroteno e do ácido linoleico.

Os resultados de atividade antioxidante (AA) dos extratos das sementes de butiá obtidos pelo método de β -caroteno/ácido linoleico são apresentados na Tabela 17.

A atividade antioxidante dos extratos de butiá variou entre 4 ± 1 e $60,0 \pm 0,3$ %, sendo que o extrato obtido por Soxhlet com etanol ($60,0 \pm 0,3$ %) apresentou a maior atividade antioxidante, porém sem diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5 % de significância, para os extratos de Soxhlet etanol-água (59 ± 3 %) e ultrassom etanol ($51,6 \pm 1,3$ %). O último não apresentou diferença significativa para o extrato de ultrassom etanol-água ($43,5 \pm 1,2$ %).

Os resultados dos extratos da semente de butiá obtidos por Soxhlet e ultrassom com os solventes etanol e etanol-água foram superiores aos valores de atividade antioxidante encontrados por Miraliakbari e Shahidi (2008) para amêndoas de avelã ($45,2 \pm 1,3$ %) e pistache ($48,5 \pm 1,3$ %) e inferiores aos extratos de nozes ($70 \pm 1,4$ %) e castanha-do-pará ($62,5 \pm 1,1$ %). O extrato de ultrassom com etanol foi semelhante aos $51,59$ % de atividade antioxidante reportado por Benites et al. (2015) em extratos de sementes de *Annona Coriacea* (araticum-do-campo) e os extratos de soxhlet e ultrassom com hexano foram superiores ao valor ($12,89$ %) encontrado para o extrato de semente de *Annona sylvatica* (araticum-grande).

Todos os valores de atividade antioxidante encontrados nos extratos de butiá à baixa pressão foram menores estatisticamente que o valor obtido para o antioxidante sintético BHT ($118,0 \pm 0,5$ %). Benelli et al. (2010) encontraram valor levemente inferior ao do presente trabalho para o mesmo antioxidante sintético com 113 % AA.

Analisando os extratos da extração supercrítica com CO_2 puro, o extrato que obteve maior porcentagem de atividade antioxidante foi encontrado na condição de 60 °C/ 300 bar (33 ± 1 %) que diferiu significativamente dos outros extratos com apenas CO_2 , mas foi igual estatisticamente à todos os extratos com cossolvente.

Tabela 17. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *Butia catarinensis* através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação para 1667 μg extrato/mL.

Técnica	Condições de processo		Solventes	(% AA após 120 min) ⁽¹⁾
Soxhlet			Hexano	20,1 \pm 0,1 ^d
			Etanol	60,0 \pm 0,3 ^b
			Etanol-água	59 \pm 3 ^b
Ultrassom			Hexano	16 \pm 7 ^d
			Etanol	51,6 \pm 1,3 ^{bc}
			Etanol-água	43,5 \pm 1,2 ^c
Extração supercrítica	40 °C	100 bar	CO ₂	7,8 \pm 0,3 ^{DE}
		200 bar		12,3 \pm 0,8 ^{BCDE}
		300 bar		11,4 \pm 1,2 ^{CDE}
	50 °C	100 bar	CO ₂	5,25 \pm 0,01 ^{DE}
		200 bar		1,40 \pm 0,01 ^E
		300 bar		4 \pm 1 ^E
	60 °C	100 bar	CO ₂	ND
		200 bar		19,2 \pm 0,4 ^{ABCD}
		300 bar		33 \pm 1 ^A
Extração supercrítica com cossolvente	40 °C	200 bar	CO ₂ + 2,5 % etanol	25,0 \pm 2,3 ^{ABC}
			CO ₂ + 5 % etanol	26 \pm 1 ^{AB}
			CO ₂ + 7,5 % etanol	25 \pm 2 ^{ABC}
			CO ₂ + 2,5 % etanol-água	19,1 \pm 0,6 ^{ABCD}
BHT				118,0 \pm 0,5 ^a

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$), como segue: (a) Letras minúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por EBP e BHT; (b) Letras maiúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por ESC. ND – Não determinado.

Nenhuma tendência foi possível de ser observada em relação a variação na pressão em uma condição isotérmica, ou quando há uma variação na temperatura em uma condição isobárica. Este comportamento é oposto ao encontrado por Oliveira (2015) em extratos supercríticos de semente de maracujá que observou redução dos valores de atividade antioxidante quando há uma variação na pressão mantendo

a temperatura constante e quando há um aumento na temperatura em uma condição isobárica.

Na extração supercrítica com cossolvente, o extrato na condição de 40 °C/ 200 bar/ 5 % de etanol apresentou maior atividade antioxidante com 26 ± 1 %. A adição de etanol nessa concentração aumentou o resultado de atividade antioxidante quando comparado com a condição sem etanol de 40 °C/ 200 bar ($12,3 \pm 0,8$ %). Este comportamento também foi observado por Benelli et al. (2010) em extratos de bagaço de laranja obtidos por fluidos supercríticos, onde trabalhou com 50 °C/ 250 bar e concentrações de etanol de 2, 5 e 8 % e constatou que com a concentração intermediária de etanol (5 %) obteve a maior atividade antioxidante.

Como o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico é mais indicado para avaliar a atividade antioxidante de frações lipídicas, facilmente extraídas por solventes de menor polaridade como CO₂ e hexano, esperava-se melhor desempenho de seus extratos que apresentaram valores de % AA baixos. Isso pode indicar que, no caso da matéria-prima estudada, a atividade antioxidante não estaria relacionada à fração lipídica. Inferência corroborada pelo estudo de Oliveira et al. (2009) com o resíduo industrial de maracujá abrangendo sementes e casca juntos, em que o extrato obtido por Soxhlet com hexano não apresentou atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH• e de sequestro do radical ânion superóxido (O^{•2-}), enquanto o extrato metanólico do resíduo desengordurado apresentou antioxidante.

5.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO ABTS

Esta análise teve o objetivo de verificar a capacidade dos extratos de semente de butiá em sequestrar o radical cátion 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), comparado a um padrão antioxidante (Trolox, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) em uma curva dose-resposta. Este método é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos doadores de hidrogênio e de compostos terminadores de cadeias (RE et al. 1999).

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos das sementes de butiá são apresentados na Tabela 18 em μ M TEAC/g, μ M atividade antioxidante em equivalente Trolox por grama de extrato.

Tabela 18. Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de semente de *Butia catarinensis*.

Técnica	Condições de processo		Solventes	ABTS ($\mu\text{M TEAC/g}_{\text{extrato}}$)* ⁽¹⁾
Soxhlet			Hexano	$85 \pm 5^{\text{d}}$
			Etanol	$102 \pm 87^{\text{d}}$
			Etanol-água	$43478 \pm 100^{\text{a}}$
Ultrassom			Hexano	$41,2 \pm 0,4^{\text{d}}$
			Etanol	$274 \pm 7^{\text{d}}$
			Etanol-água	$758 \pm 5^{\text{c}}$
Extração supercrítica	40 °C	100 bar	CO ₂	$87,5 \pm 1,0^{\text{ABC}}$
		200 bar		$123 \pm 15^{\text{ABC}}$
		300 bar		$79,2 \pm 0,1^{\text{ABC}}$
	50 °C	100 bar	CO ₂	$139 \pm 10^{\text{ABC}}$
		200 bar		$195,6 \pm 6,0^{\text{A}}$
		300 bar		$57 \pm 2^{\text{BC}}$
	60 °C	100 bar	CO ₂	ND
		200 bar		$116 \pm 2^{\text{ABC}}$
		300 bar		$47 \pm 1^{\text{C}}$
Extração supercrítica com cossolvente	40 °C	200 bar	CO ₂ + 2,5 % etanol	$84 \pm 2^{\text{ABC}}$
			CO ₂ + 5 % etanol	$105 \pm 1^{\text{ABC}}$
			CO ₂ + 7,5 % etanol	$175 \pm 5^{\text{AB}}$
			CO ₂ + 2,5 % etanol-água	$136 \pm 16^{\text{ABC}}$
BHT				$5238 \pm 236^{\text{b}}$

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$), como segue: (a) Letras minúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por EBP e BHT; (b) Letras maiúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por ESC. ⁽¹⁾ capacidade antioxidante em Trolox equivalentes. ND – Não determinado.

Observando os resultados, nota-se que mais uma vez os extratos extraídos com etanol-água em ambas as técnicas apresentaram as maiores capacidades antioxidantes ($43478 \pm 100 \mu\text{M TEAC/g}$ extrato e $758 \pm 5 \mu\text{M TEAC/g}$ extrato) respectivamente e diferiram estatisticamente entre si e dos demais extratos, demonstrando a afinidade dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante por solventes de polaridade intermediária a alta.

O valor de atividade antioxidante encontrada para o extrato extraído com etanol-água pelo método de Soxhlet foi estatisticamente superior ao encontrado para o antioxidante sintético BHT ($5238 \pm 236 \mu\text{M TEAC/g}$), demonstrando o potencial da semente de butiá para futuros testes na indústria de alimentos como antioxidante natural, levando em consideração as características sensoriais do produto.

Os resultados apresentados para o solvente apolar hexano por Soxhlet ($85 \pm 5 \mu\text{M TEAC/g}$) são condizentes com os reportados por Miraliakbari e Shahidi (2008) cujos valores de TEAC foram $67,6 \pm 19,5$ e $81,8 \pm 9,8 \mu\text{M TEAC/g}$ para extratos de amêndoa sem casca e castanha-do-Brasil respectivamente, utilizando o mesmo solvente e método de extração.

A atividade antioxidante pelo método de ABTS apresentou os melhores resultados para os extratos da extração supercrítica, comparativamente com as outras metodologias analisadas nesse estudo. Este comportamento já era esperado, pois de acordo com Re et al. (1999) essa é uma metodologia recomendada para medir a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica.

Entre os extratos obtidos por ESC destaca-se a capacidade antioxidante daquele obtido à $50 \text{ }^\circ\text{C}/ 200 \text{ bar}$ com $195,6 \pm 6,0 \mu\text{M TEAC/g}$ pois apresentou a maior atividade antioxidante dentre as pressões e temperaturas utilizadas e, traçando um comparativo com o teor de compostos fenólicos obtido para esse mesmo extrato, apresentado no item seguinte (Tabela 19), sugere-se que a atividade antioxidante está associado ao teor de fenólicos, já que o valor encontrado foi o maior quando comparado com os demais extratos da ESC.

Analisando os resultados dos extratos da ESC nas pressões de 200 e 300 bar, quanto maior a temperatura observou-se menor atividade antioxidante. Esse decréscimo da atividade antioxidante com o aumento da pressão também foi observado por Liu et al. (2012) na extração supercrítica de óleo de semente de romã e por Salvador (2014) em extratos supercríticos da torta de noz pecã.

A adição de etanol como cossolvente na extração supercrítica, de maneira geral, não alterou significativamente os resultados de atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com CO_2 puro. Isso também foi observado por Oliveira (2015) em extratos de semente e torta de semente de maracujá.

Os métodos para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* representam indicadores das potenciais atividades biológicas, refletindo apenas uma biodisponibilidade teórica. Maiores avaliações são

necessárias para a identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos e para verificar sua contribuição na atividade antioxidante total, assim como para testar sua atividade antioxidante em sistemas biológicos.

De maneira geral, em termo de atividade antioxidante o extrato a baixa pressão obtido por Soxhlet com etanol-água foi mais eficiente que o antioxidante sintético (BHT). Já os extratos obtidos da ESC foram menos eficientes, mas outros potenciais biológicos podem estar presentes no extratos executando outras funções, como a antimicrobiana. Porém para afirmarmos isso, seria necessário estudos mais aprofundados nesses extratos.

5.10. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

Os resultados de compostos fenólicos totais presentes nos extratos da semente de butiá obtidos por diferentes técnicas de extração são apresentados na Tabela 19. A curva padrão de ácido gálico, utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais consta no Apêndice III.

O teor de compostos fenólicos total dos extratos de butiá variou entre 15,6 e 193 mg EAG/g. Os valores verificados estão bem abaixo dos 266,4 mg EAG/g obtido para o antioxidante sintético BHT, que diferiu significativamente de todos os extratos à baixa pressão, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Valor semelhante foi encontrado para o mesmo antioxidante sintético por Benelli et al. (2010), que reportou valor de compostos fenólicos de 268 mg EAG/g usando a mesmo método de determinação.

Entre os métodos de extração avaliados o melhor resultado de teor de fenólicos total foi obtido com etanol-água na técnica de Soxhlet com 193 ± 3 mg EAG/g, que diferiu significativamente dos demais extratos à baixa pressão. Nas extrações com ultrassom, o maior teor de compostos fenólicos foi verificado no processo utilizando etanol como solvente apresentando valor de $56,0 \pm 0,4$ mg EAG/g. Esses dados corroboram com os de Biscaia (2007), que afirma que o etanol e etanol-água são os solvente mais indicados na extração de compostos antioxidantes, pois, devido às suas características polares, promove a extração de compostos como ácidos fenólicos, que geralmente são classificados como polares.

Tabela 19. Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos da semente de *Butia catarinensis*.

Técnica	Condições de processo		Solventes	TFT (mg EAG/g _{extrato})*
Soxhlet			Hexano	44,0 ± 0,4 ^f
			Etanol	76,1 ± 0,4 ^c
			Etanol-água	193 ± 3 ^b
Ultrassom			Hexano	51,8 ± 0,8 ^{de}
			Etanol	56,0 ± 0,4 ^d
			Etanol-água	51,0 ± 0,4 ^e
Extração supercrítica	40 °C	100 bar	CO ₂	20,0 ± 0,5 ^{ABC}
		200 bar		20,3 ± 0,6 ^{ABC}
		300 bar		21 ± 1 ^{ABC}
	50 °C	100 bar	CO ₂	16,2 ± 1,6 ^D
		200 bar		22,6 ± 0,3 ^A
		300 bar		20,6 ± 0,4 ^{ABC}
	60 °C	100 bar	CO ₂	ND
		200 bar		17,5 ± 0,5 ^{CD}
		300 bar		20 ± 2 ^{ABC}
Extração supercrítica com cossolvente	40 °C	200 bar	CO ₂ + 2,5 % etanol	18,50 ± 0,06 ^{BCD}
			CO ₂ + 5 % etanol	21 ± 1 ^{AB}
			CO ₂ + 7,5 % etanol	15,6 ± 0,1 ^D
			CO ₂ + 2,5 % etanol-água	19 ± 0 ^{BCD}
BHT				266,4 ± 0,4 ^a

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$), como segue: (a) Letras minúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por EBP e BHT; (b) Letras maiúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por ESC. ND - Não determinado.

Na extração supercrítica com CO₂ puro o maior teor de compostos fenólicos totais encontrados foi de 22,6 ± 0,3 mg EAG/g na condição de 50 °C/ 200 bar. Pode-se observar que o aumento da pressão na condição isotérmica mostrou pouca influência no teor de compostos fenólicos. Já na condição isobárica e com o aumento da temperatura pareceu influenciar negativamente a extração dos compostos fenólicos. Na extração supercrítica com cossolvente o maior teor encontrado foi de 21 ± 1 mg EAG/g, na condição de 40 °C/ 200 bar/ 5 % de etanol, mostrando que a adição dos cossolvente na extração não alterou

significativamente os resultados, comportamento que se assemelha a Mezzomo et al.(2010) com amêndoa de pêssego e Oliveira (2015) com torta da semente de maracujá.

Sganzerla (2010), encontrou valores de compostos fenólicos bastante inferiores aos encontrados nesse trabalho para extratos obtidos com metanol-água das amêndoas de *Butia capitata* e *Butia eriosphata*, sendo 4,17 mg EAG/g e 4,43 mg EAG/g, respectivamente. O mesmo autor estudou também extratos das polpas desses frutos, onde observou que os mesmos possuem menores teores de compostos fenólicos que os extratos das amêndoas, com 2,60 mg EAG/g para o extrato da polpa de *Butia Capitata* e 2,78 mg EAG/g para o extrato da polpa de *Butia Eriosphata*. Na literatura são encontrados outros estudos reportando os compostos fenólicos do butiá, porém os dados foram reportados de forma diferente do presente estudo o que desqualifica a comparação, como Toss (2010) que estudou extratos da polpa de *Butia Capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico e obteve valores de compostos fenólicos entre 3,12 e 222,63 mg rutina/g de polpa desidratada e Faria et al. (2008) que realizaram extrações etanólicas da polpa fresca dos frutos do butiá e encontraram teores entre 163 a 259 mg catequina equivalente/100 g de polpa fresca e entre 78 e 166 mg de ácido tânico equivalente/100 g de polpa fresca.

Kornsteiner, Wagner e Elmadfa, (2006), em estudo com extratos oleosos de castanha-do-Brasil, amêndoa e amendoim obtidos por Soxhlet, apontam valores de compostos fenólicos de 11,23 e 42 mg GAE/g, respectivamente, análogos aos obtidos no presente trabalho.

As diferenças encontradas na literatura no teor de compostos fenólicos total para uma mesma fruta ou vegetal dependem, principalmente, das diferentes técnicas empregadas na extração e quantificação desses compostos (BRAVO, 1998; KALT et al., 2001). Com base na literatura, sabe-se que o conteúdo de compostos fenólicos determinado pelo método de Folin-Ciocalteau não é uma medida absoluta da quantidade desse tipo de substância na matéria-prima, uma vez que algumas moléculas respondem diferentemente a esse experimento e que esses componentes presentes nas frutas são encontrados nas formas livre e ligada; porém, esta última geralmente é excluída das análises, sendo o teor de compostos fenólicos total subestimado (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURACALIXTO, 1999; SUN et al., 2002). Segundo Naczk e Shahidi (2004), a metodologia de determinação de fenóis totais não quantifica somente os grupos fenólicos presentes no extrato, mas as proteínas que são extraíveis pelo sistema de solventes utilizados, como também reduz

substâncias como o ácido ascórbico. Em contrapartida, as técnicas de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) são extensamente usadas e indicadas tanto na separação quanto na quantificação de misturas fenólicas (SGANZERLA, 2010).

Sganzerla (2010) utilizou a CLAE com o intuito de melhor identificar a fração de compostos fenólicos nos extratos das polpas de *Butia capitata* e observou que o principal ácido fenólico presente nos extratos foi o ácido gálico (85,98 mg/100g) seguido pelo p-hidroxibenzóico (54,18 mg/100g), epicatequina (9,69 mg/100g), quercetina (1,44 mg/100g) e ácido ferúlico (0,44 mg/100g).

Os ácidos fenólicos mais comumente encontrados nas frutas são os ácidos cinâmicos e benzóicos. Os ácidos cinâmicos frequentemente encontrados são o ácido caféico, p-cumárico e ferúlico, e os ácidos benzóicos mais comuns em pequenas frutas são p-hidroxibenzóico, ácido gálico e elágico, sendo o último mais encontrado em membros da família Rosaceae, especificamente em morango, framboesa e amora (SKREDE; WROLSTAD, 2002).

A literatura reporta que o teor de compostos fenólicos tem influência na atividade antioxidante de produtos naturais, entretanto eles não caracterizam completamente essa atividade, representando apenas um indicativo dessa propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005).

5.11. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.11.1. Método de Difusão em Ágar

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada inicialmente pelo método qualitativo de difusão em ágar, segundo o procedimento descrito no item 4.8.1. Essa técnica funciona como um teste de triagem para avaliar se o extrato inibe ou não o crescimento do micro-organismo de interesse. Para as análises foram selecionadas uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*) e uma Gram-positiva (*Bacillus cereus*). A Tabela 20 mostra os resultados obtidos em termos de tamanho dos halos de inibição para os micro-organismos testados. São apresentados somente os extratos que inibiram o crescimento de ao menos uma das bactérias testadas; os demais extratos não inibiram crescimento (NIC).

A análise estatística dos dados das atividades antibacterianas foram realizadas separadamente para extrações à baixa pressão e para ESC. A Anova e post-hoc Tukey separados facilitaram a identificação da diferença de atividade antioxidante dos extratos.

Tabela 20. Resultados do teste de difusão em ágar expressos em tamanho do halo de inibição (mm) para os extratos de semente de butiá.

Técnica	Solventes	Halo de inibição (mm)	
		<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Soxhlet	Hexano	10,4 ^d	12,4 ^e
	Etanol	18,2 ^b	14,7 ^b
	Etanol- água	24,3 ^a	18,7 ^a
Ultrassom	Hexano	NIC	14,3 ^c
	Etanol	9,2 ^e	12,8 ^d
	Etanol- água	11,7 ^c	11 ^f
ESC 40°C/100 bar	CO ₂	10 ^A	NIC
ESC 40°C/200 bar	CO ₂	9,6 ^A	11,8 ^A
ESC 40°C/300 bar	CO ₂	NIC	11,3 ^A
ESC 50°C/100 bar	CO ₂	11 ^A	10 ^A
ESC 60°C/300 bar	CO ₂	NIC	9,4 ^A
ESC 40°C/200 bar	CO ₂ + 5 %	11 ^A	NIC
	etanol		
	CO ₂ + 7,5 % etanol	10,2 ^A	NIC

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$), como segue: (a) Letras minúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por EBP; (b) Letras maiúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por ESC. NIC - Não inibiu crescimento

Segundo Mothana & Lindequist (2005), halos de inibição de 8 a 13 mm são considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos, já halos de inibição a partir de 14 mm são extratos muito ativos.

Todos os extratos obtidos com as técnicas a baixa pressão apresentaram atividade antimicrobiana para as duas bactérias pelo método de difusão em ágar, exceto o extrato obtido por ultrassom com hexano que apresentou apenas para a *E. coli*. Os extratos obtidos por Soxhlet com etanol-água foram considerados muito ativos e apresentaram os maiores halos de inibição para as duas bactérias

testadas diferindo estatisticamente dos demais extratos. Esse comportamento também foi observado por Oliveira (2015) com semente de maracujá, onde o solvente etanol-água apresentou melhor atividade antimicrobiana, porém com diferente técnica de extração.

Não houve diferença significativa entre os extratos obtidos pela ESC, mas pode-se observar que nas extrações com CO₂, a maioria dos extratos apresentou potencial antibacteriano, e os extratos da condição de 40 °C/ 200 bar e 50 °C/ 100 bar foram efetivos contra as duas bactérias testadas. A bactéria *B. cereus* mostrou-se mais resistente aos extratos obtidos com CO₂ puro, sendo inibida por somente três extratos, sendo dois deles extraídos a 40 °C. Em contrapartida, nas extrações com cossolvente, a *E. coli* não foi inibida por nenhum extrato. Isto pode ser explicado devido a diferenças na estrutura celular desses grupos de bactérias. A membrana externa da bactéria Gram-negativa é altamente hidrofílica agindo como uma barreira à permeabilidade (SMITH-PALMER et al., 1998), enquanto que a membrana externa da bactéria Gram-positiva tem caráter lipofílico que reduz a sua resistência à penetração de compostos com propriedades antibacterianas (ULTEE et al. 1999).

De maneira geral, a temperatura de 40 °C parece favorecer a extração de substâncias ativas contra o crescimento de microrganismos, não representado por maior tamanho de halo, mas sim por maior número de inibições. De acordo com o critério de Mothana & Lindequist (2005), todos os extratos da ESC são considerados moderadamente ativos.

Segundo Palma e Taylor, (1999) a fração lipídica (mais facilmente extraída por CO₂ e hexano) é mais efetiva contra alguns micro-organismos devido à presença de esteróis. Essa suposição pode ser corroborada pelos resultados apresentados por Baydar et al. (2004), em que não foi observada atividade antimicrobiana em extratos de casca de uva, enquanto extratos de sementes dessas uvas (ricos em ácidos graxos) foram altamente ativos.

Assim, as análises de atividade antimicrobiana indicam uma alta eficiência dos extratos supercríticos e dos oriundos das extrações a baixa pressão.

5.11.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os extratos que apresentaram halo de inibição de crescimento acima de 8 mm para algum dos micro-organismos testados no método de difusão em ágar (Tabela 21), foram submetidos ao método quantitativo de microdiluição em caldo de cultivo para a determinação

da CMI (concentração mínima inibitória) que se refere à menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento de determinado micro-organismo. Os extratos selecionados para o teste de microdiluição em caldo de cultivo são apresentados na Tabela 21.

Conforme os dados da Tabela 21, a concentração mínima inibitória variou de 98 a 6250 µg/mL para os extratos de semente de butiá. De acordo com Duarte et al. (2007), Wang et al. (2008) e Sartoratto et al. (2004), é possível classificar a intensidade dos extratos como agentes antimicrobianos baseando-se no seu valor de CMI. Comumente, a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 µg/mL; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 µg/mL e fraco inibidor para CMI acima de 1600 µg/mL (MICHIELIN et al., 2009).

Analisando os resultados para o método de Soxhlet, observou-se que os extratos obtidos com etanol e etanol-água são classificados como fortes inibidores antimicrobianos e foram estatisticamente mais ativos que os demais extratos contra *B. cereus* e contra *E. coli*. Já os extratos extraídos com hexano são considerados fracos inibidores apresentando valores de 4687 µg/mL para o *B. cereus* e 2344 µg/mL para *E. coli*. Este comportamento foi semelhante ao encontrado por Oliveira et al. (2013) em extratos de bagaço de uva para a bactéria *B. cereus* e por Mazutti et al. (2012) em extratos de cogumelos contra *E. coli* usando a mesma metodologia e hexano como solvente de extração.

Na extração por ultrassom, os extratos foram mais efetivos contra a bactéria *E. coli*, sendo todos considerados fortes inibidores para essa bactéria, com destaque para o extrato obtido com hexano que foi estatisticamente superior que os demais nessa mesma técnica. Já para a bactéria *B. cereus*, apenas o extrato obtido por ultrassom com etanol-água foi considerado um forte inibidor (196 µg/mL). O extrato obtido com etanol pelo mesmo método apresentou moderado poder de inibição (1563 µg/mL) e o extrato obtido com hexano não foi testado, pois apresentou halo de inibição inferior à 8 mm.

Na extração supercrítica com CO₂ puro, três extratos foram considerados fortes inibidores antimicrobianos. Contra a bactéria *B. cereus* o extrato obtido à 40 °C/ 100 bar (587 µg/mL) foi estatisticamente superior aos demais extratos e contra a *E. coli* os extratos obtidos à 50 °C/ 100 bar (196 µg/mL) e 60 °C/ 300 bar (98 µg/mL) apresentaram melhores resultados ($p < 0,05$) que os outros extratos. Os extratos obtidos à 40 °C/ 200 bar e 40 °C/300 bar não diferiram entre si e foram considerados moderados inibidores antimicrobianos para a *E. coli*, enquanto os outros extratos foram

considerados fracos inibidores. Analisando os resultados da ESC, os extratos foram melhores para a inibição da bactéria *E. coli*, comportamento semelhante aos extratos a baixa pressão.

Tabela 21. Concentração mínima inibitória dos extratos de semente de *Butia catarinensis* obtidos por técnicas a baixa pressão e ESC contra *B. cereus* e *E. coli*.

Técnica	Solventes	Concentração Mínima Inibitória ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Soxhlet	Hexano	4687 ^a	2344 ^a
	Etanol	98 ^d	98 ^c
	Etanol + água	98 ^d	98 ^c
Ultrassom	Hexano	NIC	98 ^c
	Etanol	1563 ^b	391 ^b
	Etanol + água	196 ^c	391 ^b
ESC 40°C/100 bar	CO ₂	587 ^D	NIC
ESC 40°C/200 bar	CO ₂	4687 ^B	782 ^A
ESC 40°C/300 bar	CO ₂	NIC	782 ^A
ESC 50°C/100 bar	CO ₂	6250 ^A	196 ^B
ESC 60°C/300 bar	CO ₂	NIC	98 ^c
ESC 40°C/200 bar	CO ₂ + 5 % etanol	4687 ^B	NIC
	CO ₂ + 7,5 % etanol	782 ^c	NIC

* Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$), como segue: (a) Letras minúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por EBP; (b) Letras maiúsculas indica comparação entre os resultados obtidos por ESC. NIC - Não inibiu crescimento

A adição de cossolvente na ESC, de maneira geral, não alterou significativamente os resultados da atividade antibacteriana. Somente o extrato obtido a 40 °C/ 200 bar/ 7,5% etanol bar apresentou bom resultado sendo classificado como moderado inibidor (782 $\mu\text{g/mL}$) contra a *B. cereus* quando comparado com o extrato de CO₂ puro que foi

considerado fraco inibidor para a mesma bactéria. Segundo Guindani (2014), extratos do resíduo de chia obtidos por ESC com cossolvente também apresentaram atividade contra a mesma bactéria.

Por meio dos resultados apresentados, pode-se observar o que os extratos de semente de butiá são mais eficientes contra bactérias Gram-negativas, o que também foi observado Carvalho (2011) e Silveira et al. (2005) para extratos de buriti, que é da mesma família do butiá. Contudo é necessário que haja mais estudos com uma maior quantidade de bacterias para confirmar esse comportamento.

Essa característica observada nos extratos de butiá é muito importante, indicando um potencial de aproveitamento dos resíduos de semente de butiá para controle de crescimento microbiano, visto que a indústria farmacêutica possui dificuldade de produzir novas classes de substâncias com atividade contra as Gram-negativas, pois elas são mais resistentes que as Gram-positivas (LEWIS; AUSUBEL, 2006). A maior resistência das bactérias Gram-negativas provavelmente é devida a diferenças na parede celular dessas bactérias. A parede celular das bactérias Gram-negativas apresenta uma sofisticada barreira à permeabilidade quando comparada à parede simples das bactérias Gram-positivas, que apresenta caráter lipofílico e menor resistência à penetração de compostos (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998). Na parede celular das espécies Gram-negativas há uma camada externa adicional lipopolisacarídica que restringe a penetração de grande parte das moléculas; os nutrientes, por exemplo, entram através de poros ou mecanismos de transporte especializados.

Os compostos que exercem essa atividade antibacteriana ainda não estão completamente esclarecidos na literatura, porém, é possível que este efeito seja causado pelos ácidos graxos e compostos fenólicos presentes nos extratos (OLIVEIRA, 2015; GUINDANI, 2014).

Faria et al. (2008) identificaram na composição química da amêndoa do butiá a presença de ácidos graxos, dentre eles, o ácido láurico (42 %) e ácido oléico (16,9 %) que segundo Silveira et al. (2005) e Liu et al. (2009) apresentam atividade antimicrobiana inativando tanto bactérias Gram positivas quanto Gram - negativas.

O efeito inibitório dos compostos fenólicos poderia ser explicado por sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio de pontes de hidrogênio de seus grupos hidroxila que alterariam sua permeabilidade; ou ainda pela penetração dessas substâncias na célula bacteriana provocando a coagulação de seu conteúdo (SENGUL et al., 2009). Além disso, de acordo com a literatura, a atividade antibacteriana pode estar associada às condições de cultivo das plantas visto que

componentes ativos, geralmente, são sintetizados como resposta a algum tipo de estresse como ataque de microorganismos, forte radiação ultravioleta, entre outros (REVILLA; ALONSO; KOVAC, 1997).

5.12. CROMATOGRAFIA GASOSA

O perfil dos compostos voláteis dos extratos da semente de butiá foi obtida por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) e estão apresetados na Tabela 22. Os compostos químicos foram identificados baseando-se na comparação do espectro de massa da substância com um sistema de banco de dados para CG-EM. No Apêndice IV, estão apresentados os espectros de massas de todos os extratos de semente de butiá.

A formação dos compostos responsáveis pelo sabor/aroma das frutas ocorre sob controle genético durante o processo de amadurecimento dos mesmos, mais precisamente durante a ascensão climática da respiração (no caso de frutos climáticos), atingindo seu ápice no período pós-climático, ou seja, no fruto maduro. Nesse período o metabolismo da fruta se altera para catabolismo e passa a converter enzimaticamente lipídios, carboidratos, proteínas e aminoácidos em açúcares simples, ácidos e compostos voláteis. A partir desta fase, várias vias metabólicas agem, separadamente ou interligadas, gerando produtos responsáveis pelo aroma do fruto (REINECCIUS, 2006). Esses produtos formados pertencem a diversas classes químicas que contribuem com intensidades diferentes para o aroma da fruta, de modo que, a união de todos eles determina o aroma característico de um determinado fruto.

A partir dos dados da Tabela 22, observa-se que foram identificados vinte e cinco compostos presentes nos diferentes extratos de semente de butiá analisados. O principal composto identificado em termos de percentual de área relativa dos extratos foi o ácido cinâmico p-(trimetilsiloxi) metil éster, independente da técnica de extração empregada. Esse composto foi identificado em todos os extratos, porém com maior área de retenção nos extratos da ESC na condição de 40 °C/ 200bar (3B), 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % etanol-água (6G) e no extrato obtido por Soxhlet com etanol-água (1C).

O ácido cinâmico, também denominado ácido 3-fenil-2-propenóico, consiste em um ácido graxo aromático de ocorrência natural, originado de plantas superiores, óleos de canela e folhas de coca. Esse composto pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, e

alguns de seus derivados desempenham um importante papel na defesa da planta contra o ataque de microrganismos, insetos e também se mostrou eficaz como agente terapêutico antimicrobiano e antifúngico (THIMANN, 1969; EKMEKCIOGLU et al., 1998). Derivados desse composto podem ser encontrados em diversos produtos de origem vegetal como café, maçãs, frutos cítricos, cereais, além de outros. Seus derivados fenólicos incluem o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ácido ferúlico) e o ácido 3,4-dihidroxicinâmico (ácido caféico) (WATTENBERG et al., 1980; CLIFFORD, 1999). Este último tem significativo efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (KAMPA et al., 2003; LEE et al., 2003).

O Metoxi-fenil oxima e o ácido octanóico também foram verificados em quase todos os extratos analisados. O primeiro apresentou maior área de retenção no extrato da ESC na condição 50 °C/ 300 bar (4C) e o último na condição 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % etanol (6D).

Uma oxima é uma classe de compostos orgânicos cuja fórmula geral é $RR'C=NOH$, onde R é um grupo organila ($R \neq H$) e R' pode ser um hidrogênio (grupo hidro, $R' = H$) ou um grupo organila ($R' \neq H$). Uma oxima é o resultado da condensação da hidroxilamina com um aldeído, então pode ser chamada de aldoxima, ou uma cetona, podendo-se denominar neste caso cetoxima. Moléculas das classes das oximas como a pralidoxima são utilizados como fármacos para o tratamento antídoto à intoxicação por compostos organosfosforados (KUCA et al., 2005; PETROIANU et al., 2006; SANTOS, 2013).

O ácido octanóico, também conhecido por ácido caprílico é um ácido graxo de cadeia normal aberta homogênea formada por oito carbonos. É encontrado em sua forma natural nos coqueiros e no leite materno. O ácido caprílico é usado comercialmente na produção de ésteres usados em perfumarias, é conhecido por suas propriedades antifúngicas, e tratamento de algumas bactérias infecciosas. Também é bastante recomendado por dermatologistas no tratamento de candidíase (NOBRE et al., 2002). Ferrão (2012) em estudos de compostos voláteis de polpa de *Butia odorata* observou também a presença do ácido octanóico na composição da polpa do fruto. Segundo Pino; Queris (2010) no metabolismo do ácido octanóico são formados os éteres octanoatos e os com radicais octila e estes apresentam notas de frutas frescas (PINO; QUERIS, 2010).

O Canfeno foi encontrado em quatro extratos analisados, sendo eles obtidos por Ultrassom com etanol-água (2C), ESC 40 °C/ 200 bar; (3B), ESC 50 °C/ 300 bar (4C) e ESC 40 °C/ 200 bar/ 7,5 % etanol (6F). Esse composto é um monoterpeno bicíclico. Segundo Simões et al.

(2007) os terpenos ou terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética é o isopreno. Os esqueletos de carbono dos terpenoides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpênicos (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Estes compostos encontram-se em sementes, flores, folhas, raízes e madeira de plantas superiores assim como em musgos, algas e líquens, enquanto que alguns são encontrados em mamíferos. Os monoterpênicos apresentam atividades farmacológicas e, segundo Bakkali et al. (2008) e Andrade et al. (2012), isso pode ser explicado pelos mesmos serem hidrofóbicos e provavelmente preferirem se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana. O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática confere a esta uma característica de permeabilidade, promovendo a dissipação da força próton motiva, redução do pool de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e a perda de íons como potássio e fosfato. Esses danos na membrana levam ao comprometimento das suas funções.

Os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram uma composição mais rica nos compostos importantes como o ácido cinâmico, metoxi-fenil oxima e o canfeno, quando comparados aos extratos obtidos à baixa pressão. A menor capacidade dos métodos tradicionais em extrair esses compostos pode estar relacionada a: (i) métodos convencionais não são seletivos e muitas vezes necessitam de várias etapas para obter o composto de interesse, sendo que pode ocorrer perda desse composto durante as etapas de fracionamento e (ii) as altas temperaturas empregadas no Soxhlet podem degradar os compostos termolábeis (MOURA et al., 2012).

Os extratos que apresentaram as melhores atividades antioxidantes foram obtidos por Soxhlet com etanol e Soxhlet com etanol-água e os que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas foram obtidos por Soxhlet com etanol, Soxlet com etanol-água, ultrassom com hexano, ultrassom com etanol-água e os extratos supercríticos obtidos à 40°C/100 bar, 50°C/100 bar e 60°C/300 bar. Estes extratos mostraram a presença do ácido cinâmico, oxima e do ácido octanóico em suas composições, sugerindo esses componentes como os principais responsáveis pelas atividades antioxidantes e antimicrobiana detectadas. Contudo, a atividade biológica de um extrato não pode ser atribuída à ação de um único componente, já que os efeitos de sinergismo entre os componentes desempenham um papel importante (ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001).

A composição química da semente de butiá enriquece e agrega valor a este resíduo, sendo necessário, um estudo sobre a viabilidade econômico da extração destes compostos.

A análise por CG-EM mostrou ser uma forte ferramenta na identificação dos compostos dos extratos da semente de butiá obtidos em diferentes condições. Entretanto, o uso de outros métodos, como HPLC, poderia detectar a presença de outras substâncias com maior polaridade.

6. CONCLUSÃO

O estudo da cinética de extração da semente de butiá indicou que o principal mecanismo de transferência de massa é a convecção, sendo o processo limitado pela difusão e o modelo matemático que melhor se adaptou aos dados experimentais foi o de Martínez et al. (2003).

Os extratos obtidos por extrações à baixa pressão apresentaram rendimentos superiores aos das extrações da ESC com CO₂ puro. Os melhores resultados de rendimento para as extrações à baixa pressão foram obtidos por Soxhlet com etanol e Soxhlet hexano, enquanto que para a ESC com CO₂ puro foram obtidos nas condições 60°C/ 300 bar e 60 °C/ 200 bar. O uso de cossolvente na ESC aumentou consideravelmente o rendimento da extração, no qual o cossolvente etanol-água foi o que proporcionou o melhor rendimento dos extratos.

No ensaio do radical DPPH, ABTS e Folin os melhores resultados foram obtidos para o extrato obtido por soxhlet etanol-água. Quando o potencial antioxidante foi avaliado pelo método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico o melhor resultado foi encontrado para o extratos obtidos por Soxhlet com etanol e etanol-água.

Os extratos obtidos por Soxhlet com etanol e etanol-água apresentaram-se como os mais efetivos contra as duas bactérias testadas, e os extratos da ESC obtidos à 60 °C/ 300 bar e 50 °C/ 100 bar apresentaram forte inibição contra *E. coli*.

O principal composto volátil encontrado nos extratos de semente de butiá foi o ácido cinâmico com maior área de retenção nos extratos da ESC 40 °C/ 200 bar, ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % etanol-água e no extrato obtido por Soxhlet com etanol-água. Outros compostos importantes também foram identificados com polaridades semelhantes aos solventes utilizados.

Considerando o grande volume de resíduo de butiá e o pequeno número de estudos envolvendo o uso desses resíduos encontrados na literatura, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os extratos da semente de butiá apresentam potenciais antioxidantes e antibacterianos podendo ser utilizados para a geração de outros produtos com valor agregado.

É importante salientar que cada método de extração tem uma especificidade e, como apresentado neste trabalho, a ESC mostrou-se como uma técnica de destaque para obtenção de compostos, uma vez que é uma metodologia seletiva e ambientalmente amigável.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Secagem da matéria-prima em liofilizador;
- b) Utilizar água como solvente para extração;
- c) Utilizar outras concentrações da mistura etanol-água para extração;
- d) Fracionamento dos extratos na ESC;
- e) Incluir na modelagem matemática outros modelos de literatura recente;
- f) Avaliação do potencial antioxidante in vivo dos extratos empregando culturas de células endoteliais;
- g) Verificação da atividade antibacteriana com outras cepas e atividade antifúngica;
- h) Avaliação da composição química dos extratos por outras técnicas cromatográficas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. M. Estudo de diferentes métodos de extração por ultrassom de pesticidas em latossolo utilizando técnicas cromatográficas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2002.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass Spectrometry. Illinois: Allured Business Media, 2009. 804 p.

AGUIAR, M. C. S.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, P.; LOPES, P. S. N. FIDÊNCIO, P. H.; VENTURA, S. J. Volatile compounds from fruits of *Butia capitata* at different stages of maturity and storage. *Food Research International* 62 (2014) 1095–1099.

ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oils of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, v. 57, p. 99-102, 2001.

ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHI, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, v. 88, p. 544-552, 2012.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *B.CEPPA, Curitiba* v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18. ed. Maryland:AOAC, 2005.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S.;

BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K.; ÖZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, v. 12(7), p. 1496-1547, 2007.

ÁVILA, H. P. et al. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 22, p. 9790-9794, 2008.

ARAÚJO, J. M. A. *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. 4.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2004. 415p.

BAKKALI, F et al. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 02, p. 446-475, 2008.

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, v. 15, p. 335-339, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-23, janeiro/fevereiro 2006.

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.

BENITES, R. S. R.; FORMAGIO, A. S. N.; ARGANDOÑA, E. J. S.; VOLOBUFF, C. R. F.; TREVIZAN, L. N. F.; VIEIRA, M. C.; SILVA, M. S. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 15, n. 3, p. 685-691, 2015.

BISCAIA, D. Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas. Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BOAVENTURA, B.C.B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p.657-664, 2012.

BOX, G. E. P. ; DRAPER, N. R. Empirical Model-Building and response surfaces. New York, Wiley, p.212, 1987.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56(11), p. 317-333, 1998.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; ARCE, M. A. B. R. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química nova*, v.32, n 4, 2009.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Darmstadt: Steinkopff, v. 4, p. 387, 1994.

BRUNNER, G. Applications of supercritical fluids. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, v. 1:3, p. 21-42, 2010.

BYERS, J. Available at. Disponível em:
<www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm>. Acesso em: 10 set. 2008.

CAETANO, A. C. S. Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia Emarginata* D. C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa do óleo de soja. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRP), 2009.

CAMPOS, L. M. A. S. et al. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 163-170, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S., LEIMANN, F. V., PEDROSA, R. C., FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource. Technology*, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

CARVALHO, C. O. comparação entre métodos de extração do óleo de maurítia flexuosa l.f. (arecaceae - buriti) para o uso sustentável na reserva de desenvolvimento tupé: rendimento e atividade antimicrobiana. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2011.

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

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

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 24, n. 5, p. 816-823, May 1 2004.

CHO, A.S. *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 937-943, 2010.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, v. 79, p. 362-372, 1999.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011.

CORREIA, J.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. Estudo de modelos de transferência de massa para processos de extração supercrítica. Florianópolis: UFSC, 2006. Relatório (Iniciação Científica PIBIC- CNPQ), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

CRANK, J. *The Mathematics of Diffusion*: second edn., Clarendon Press, Oxford, 85 p, 1975.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology, v. 23, n.2, p. 174-181, 2012.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli. Journal of Ethnopharmacology, v. 111, p. 197-201, 2007.

EGGERS, R.; JAEGER, P. Extraction Systems. In: (Ed.). Extraction Optimization in Food Engineering: CRC Press, 2003.

EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. Cancer Lett. v. 128, p. 137-144, 1998.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition, Nova York, v.18, n. 10, p.872-879, outubro 2002.

FARIA, J.P., ARELLANO, D.B., GRIMALDI, R., SILVA, L.C.R., VIEIRA, R.F., SILVA, D.B., AGOSTINI-COSTA, T.S., 2008. Chemical characterization of nut of *Butia capitata* var *capitata*. Rev. Bras. Frutic. 30, 549–552.

FARIA, J.P., ALMEIDA, F., SILVA, L.C.R., VIEIRA, R.F., AGOSTINI-COSTA, T.S., 2008b. Chemical characterization of pulp of *Butia capitata* var *capitata*. Rev. Bras. Frutic. 30, 827–829.

FERRÃO, T. S. Compostos voláteis e parâmetros de qualidade de diferentes genótipos de frutos de *Butia odorata*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. RS, 2012.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J., Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. Journal of Supercritical Fluids, v. 14, p. 235-45, 1999.

FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, C. G.; FAZA, L. P.; ALMEIDA, A.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L.; GRAZUL, R. M.; LE HYARIC, M. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. *Molecules*, v. 16, p. 5875-5885, 2011.

FESSENDEN, R.J. Organic chemistry. Boston: Willard Grant Press, 1982.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de Procedimentos de Extração do Óleo de Semente de Uva e Caracterização Química dos Compostos Extraídos. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2007.

GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, v. 25, p. 247-260, 2003.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. DA SILVA; GONÇALVES, A. E. DE SOUZA SCHMIDT; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*; v.14, p.207-214. 2008.

GÓMEZ, A. M.; OSSA, E. M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, v. 88, p. 103-109, 2002.

GOMIDE, R. (1983). Operações com sistemas sólidos granulares, v. 1, Catalogation of Brazilian Chamber Publication Book, São Paulo, Brazil.

GUINDANI, C. Otimização da extração de compostos de alto valor agregado do resíduo de processamento de chia (*Salvia hispanica*). UFSC, 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

HIANE, P.A. et al. Carotenóides pró-vitamínicos A e composição em ácidos graxos do fruto e da farinha do bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 2, p. 206-209, 2003.

HIERRO, M. T.; SANTA-MARIA, G. Extracción con fluidos supercríticos: Aplicación a los alimentos. *Cromatografía y Técnicas Afines*, v. 12, p. 62-8, 1991.

KAMPA, M. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.*, v. 6, n. 2, p. R63-74, 2004.

KALT, W.; RYAN, D. A. J.; DUY, J. C.; PRIOR, R. L.; EHLENFELDT, M. K.; VANDER KLOET, S. P. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity among genotypes of high bush and low bush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v. 49, p. 4761-4767, 2001.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIĆ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, v. 119, p. 715-723, 2010.

KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. *Journal of Food Engineering*, v. 90, p. 35-43, 2009.

KNEZ, Z.; MARKOCIC, E.; LEITGEB, M.; PRIMOZIC, M.; HRNCIC, M. K.; SKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, v. 77, p. 235-243, 2014.

KORNSTEINER, M., WAGNER, K.-H., ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, v. 98, p. 381-387, 2006.

KUCA, K.; Cabal, J.; Jun, D. et al. Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators – antidotes used for treatment of nerve

agent poisonings. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149(2):429-431, 2005.

LEE, Y-J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 66, p. 2281-2289, 2003.

LEITMAN, P.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L. *Arecaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>; Acesso em: 07 Mai. 2015.*

LEWIS, K.; AUSUBEL, F. M. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, v. 24 (12), p. 1504-1507, 2006.

LI, S. Application of Supercritical Fluids in Traditional Chinese Medicines and Natural Products. In: MARTÍNEZ, J. L. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. CRC Press, 2008. cap 7, p. 215-242.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LIU, S.; YANG, F.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P.; DENG, C. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 48, p. 9-14, 2009.

LIU, G. et al. Effects of supercritical CO₂ 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-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MACHLIN, L.J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MAREGESI, S.M.; PIETERS, L.; NGASSAPA, O. D.; APERS, S.; VINGERHOETS, R.; COS, P.; BERGHE, D.A.V.; VLIETINCK, A.. J. Screening os some tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p. 58-66, 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, 2007.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Industrial Engineering of Chemistry Research*, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

MARTÍNEZ, J. Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. Campinas: UNICAMP, 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MARTÍNEZ, D. M.; VICTORIA, F. N.; CASTRO, M.; LENARDAO, E. J.; VIZZOTTO, M. Capacidade antioxidante de araçá e butiá em estruturas cerebrais de camundongos. In: ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 6., 2014, Pelotas. Palestras e resumos... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 189 p., 2014.

MARTINS, R.C., FILGUEIRAS, T.S., ALBUQUERQUE, U.P., 2014. Use and diversity of palm (Arecaceae) resources in Central Western Brazil. *Sci. World J.* 2014, 1–14, doi: 10.1155/2014/942043.

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.

MARIATH, J.G.R. et al. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.49, p.849-853, 1989.

MELECCHI, M. I. S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 127-30, 2001.

MEZZOMO, N. Óleo de amêndoa de pêssego: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala. Florianópolis: UFSC, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

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, 2009.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, v.101, n. 14, p. 5622- 5632, 2010.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, p. 131-8, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z. Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases. Florianópolis: UFSC, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 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.

MOTHANA R. A. A. & LINDEQUIST U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology* *Ethnopharmacology*, v. 96, p. 177-181, 2005.

MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M. Aplicação das técnicas de picnometria de gás e deporosimetria de mercúrio à caracterização da madeira de *E. globules*. *Silva Lusitana*, v. 10(2), p. 207-216, 2002.

MUKHOPADHYAY, M. *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*: CRC Press, 2000.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. v.1054, n.1-2, p.95-111. 2004.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

OKARTER, N. et al. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chemistry*, v. 119, n. 1, p. 249-257, 2010.

O'KENNEDY, R. & THORNES, R. D. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. New York: John Willey, 1997.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, v. 115, p. 469-475, 2009.

Oliveira, D. A. Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah. Florianópolis: UFSC, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

OLIVEIRA, D. A.; SALVADOR, A. A.; SMÂNIA A. J.; SMÂNIA E F.A.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R.S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, v 16, p. 423–432, 2013.

OLIVEIRA, D. A. Aplicação das tecnologias supercrítica e convencionais para o Reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Florianópolis: UFSC, 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

OZSOY, N.; YILMAZ, T.; KURT, O.; CAN, A.; YANARDAG, R. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry*, v. 116, n. 4, p. 867-872, 2009.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T. 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, p. 5044-5048, 1999.

PERALTA, S.L., CARVALHO, P.H.A., VAN DE SANDE, F.H., PEREIRA, C.M.P., PIVA, E., LUND, R.G., 2013. Selfetching dental adhesive containing a natural essential oil: anti-biofouling performance and mechanical properties. *Biofouling*. p. 29, 345–355.

PEREIRA, C. G.; MARQUES, M. O. M.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of índole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 30, n. 1, p. 51-61, 2004.

PEREIRA, C.; MEIRELES, M. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n. 3, p. 340-372, 2010.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, v. 97, p. 137-50, 2006.

PESSOA, A. S.; PODESTÁ, R.; BLOCK, J. M.; FRANCESCHI, E.; DARIVA, C.; LANZA, M. Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 101, p. 95-103, 2015.

PETROIANU, GA; Hasan, MY; Nurulain, SM. et al. Ranitidine in acute high-dose organophosphate exposure in rats: effect of the time-point of administration and comparison with pyridostigmine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 99(4):312-316, 2006.

PINO, J. A.; QUERIS, O. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. *Food Chem.* v. 122, p. 1241–1246, 2010.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. H. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal Chromatography A*, v. 1163, p. 2-24, 2007.

RAMALHO, V. C.; JORGE. N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, Vol. 29 n°. 4 São Paulo. July/Aug. 2006

REITZ, R. Palmeiras. In: REITZ, R. (ed.). *Flora ilustrada catarinense*. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues (HBR), p. 55-59, 1974.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REINECCIUS, GARY. Flavor chemistry and technology. In. Flavor formation in fruits and vegetables, 2nd ed, Boa Roton; London; New York: Taylor & Francis group, cap. 4, p. 73-98, 2006.

REIS, P. M. C. L.; DARIVA, C.; VIEIRA, G. A. B.; HENSE, H. Extraction and evaluation of antioxidant potential of the extracts obtained from tamarind seeds (*Tamarindus indica*), sweet variety. *Journal of Food Engineering* 173, p. 116-123, 2016.

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

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 161-175, 2001.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 146-66, 2006.

REVILLA, E.; ALONSO, E.; KOVAC, V. The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices. *Wine*, v. 661, p. 69-80, 1997.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, v. 84, n. 21-22, p. 705-712, 2009.

ROCHA, Wagner Xavier. Extração com solvente. *Química* 2000.

Disponível em:

http://govtandeducationchat.reocities.com/Vienna/choir/9201/extracao_c_om_solvente.htm. Acesso em 16 de set. de 2011

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas, SP: Casa do pão editora, 2005. 325p. ISBN 859838903 X (broch).

ROSSATO, M.; BARBIERI, R.L.; SCHÄFER, A.; ZACARIA, J. Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia*

do Rio Grande do Sul através de marcadores ISSR. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 4, p. 311-318, 2007.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144-58, 1965.

SALVADOR, A. A. Atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos de extratos da torta de noz pecã (*Carya illinoensis*) obtidos por extração supercrítica. Florianópolis: UFSC, 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, v. 32, p. 407-412, 1999.

SANGUINETTI, E. E. *Plantas que curam*. Porto Alegre: Rigel, 1989. 102p.

SANTOS, A. A. Avaliação dos efeitos tóxicos induzidos por malation e malaaxon e a possível proteção por oximas. UFSC, 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 4, 2004.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v.30, p.3875-3883, 1991.

SENGUL, M.; YILDIZ, H.; GUNGOR, N.; CETIN, B.; ESER, Z.; ERCISLI, S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.*, v. 22, p. 102-106, 2009.

SGANZERLA, M., 2010. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante do butiá. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, pp. 104 (Dissertação Mestrado).

SILVEIRA, C.S. PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S.; NEVES Jr., I.; MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.C.. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. Revista Brasileira de Farmacognosia, (Brazilian Journal of Pharmacognosy). v.15, n.2, p.143-148. 2005.

SILVA, D. C. M. N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less). Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SILVA JR., I.E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S.A.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 1b, p. 242-248, 2009.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, M. C. S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F.S.; KAPLAN, M. A. C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 15(2): 143-148, Abr/Jun. 2005.

SILVEIRA, T. F. F. Compostos fenólicos transferidos da erva-mate para os extratos aquosos durante o preparo do chimarrão e do chá mate. 2013. 135f Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2013.

SKREDE, G.; WROLSTEAD, R. E. Flavonoids from berries and grapes. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. v.2, CRC Press., p.71-133. 2002.

SMÂNIA JR, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Journal Ethnopharmacol, v. 45, n. 3, p. 177-181, 1995.

SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SMITH, D. Characterization of lactose by helium pycnometer. In Stephens, K. (ed.), *The microreport: News and ideas for decision makers*, 2nd. Quarter, v. 7 (2), Micro-meritics Instrument Corporation, USA, 1996.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, v. 26, p. 118-122, 1998.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, A. T.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L.; GUIRARDELLO, R.; MEIRELES, M. A. A. Phase Equilibrium Measurements for the System Clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂. *Journal Chem. Eng. Data*, v. 49, p. 352-356, 2004.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*. v.49(3), p. 409-14, 1994.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; S TEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*, v.22, p.1887-1899, 1996.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 7449-7454, 2002

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; TUSZYŃSKI, T. Simulation of Phenolic Compounds Transformations and Interactions in an In Vitro Model of the Human Alimentary Tract. *Food Science and Technology International*, v. 15, n. 3, p. 235-241, June 1, 2009

TAVARES, M. et al. Composição química e estudo anatômico dos frutos de buriti do Município de Buritizal, Estado de São Paulo. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.62, n.3, p.227-232, 2003.

TERRAS, F. R. G.; S CHOOFs , H. M. E.; T HEVISSEN , H. M. E.; B ROEKAERT , W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. Plant Physiology, v.103, p.1311-1319, 1993.

THIMANN, K. V. The Auxins. IN: WILKINS, M. B. Physiology of plant growth and development. McGraw-Hill, London, p. 2-45, 1969.

TORSSEL, B.G. Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. New York: John Willey, 1989. 401p.

TOSS, D. Extração de compostos fenólicos de *Butia Capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico. Porto Alegre: UFRS, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J.. Mechanisms of actions of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, p. 4606-4610, 1999.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F .A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, p. 370-380, 2007.

VALTUEÑA, S. *et al.* Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 87, n. 5, p. 1290-1297, May 1, 2008.

VIEIRA, G. R. T. Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando à produção de substâncias antibacterianas. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 8, p. 303-13, 2001.

VIOLA, Z. G. G. Avaliação da qualidade das águas da bacia do rio doce/mg: caracterização da matéria orgânica e seus impactos ambientais. Belo Horizonte: UFMG, 2008. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

WANG, Y. S.; HE, H. P.; YANG, J. H.; DI, Y. T.; HAO, X. J. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules*, v. 13, p. 931–937, 2008.

WATTENBERG, L. W.; COCCIA, J. B.; LAM, L. K. T. Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. *Cancer Res.*, v. 40, p. 2820-2823, 1980.

WATERS, 2013. Disponível em:

<http://www.waters.com/waters/pt_BR/Supercritical-Fluid-Extraction-%28SFE%29-Systems/nav.htm?cid=10146521&locale=pt_BR>. Acesso em: 10 set. 2013.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids, v. 1, 2003, p. 577-581.

ZHANG , Y. & LEWIS , K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiological Letters*, v.149, p.59-64, 1997.

9. ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO I: MODELOS MATEMÁTICOS

APÊNDICE I: DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

APÊNDICE II: CURVAS DE CALIBRAÇÃO

APÊNDICE III: CROMATOGRAFIA GASOSA

ANEXOS

ANEXO I – MODELOS MATEMÁTICOS

Modelo difusional de Crank (1975)

O modelo de Crank (1975), apresentado por Reverchon (1997), considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor. Para isso, estima que as substâncias a serem extraídas estejam uniformemente distribuídas em partículas sólidas esféricas, que – como um corpo quente perde calor para o meio – liberam o soluto no solvente supercrítico com o tempo. No entanto, este modelo pode ser chamado de modelo difusional, pois considera que a transferência de massa se dá unicamente devido à difusão do soluto, contido no interior das partículas sólidas, para a fase supercrítica (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008; MICHELIN, 2009; REVERCHON, 1997).

Resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula e aplicando a segunda Lei de Fick para difusão, tem-se a Equação 16 que representa a massa de soluto que se difunde através de uma partícula (MEZZOMO, 2008; MICHELIN, 2009).

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D t}{r^2}\right) \right] \quad (16)$$

Onde t , tempo de extração (min); m_{ext} é a massa de extrato (kg) no tempo t ; m_0 , massa inicial de soluto (kg); n é um número inteiro; $D=D_{AB}$, é o coeficiente de difusão, um parâmetro ajustável do modelo (m^2/min) e r , raio da partícula sólida (m) (MEZZOMO, 2008).

Modelo de Placa (SSP) proposto por Gaspar et al. (2003)

O modelo de placa, proposto por Gaspar et al. (2003) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor assim como o modelo proposto por Crank (1975) e também é um modelo difusional. A diferença entre estes dois modelos está na geometria considerada em cada modelo, ou seja, no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placas, enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas. O modelo SSP ainda assume que a concentração de soluto na fase fluida é desprezível quando comparada à concentração na fase sólida, que a

resistência à transferência de massa na fase fluida é desprezada e que o balanço de massa na fase fluida é negligenciado (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008).

Ao se aplicar a segunda Lei de Fick para a difusão e resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula, a massa de extrato obtida com o tempo é representada pela Equação 17 proposta por Gaspar et al. (2003), com modificação apresentada por Campos et al. (2005).

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \sum_0^{\infty} \frac{0,8}{(2n + 1)^2} \exp\left(\frac{-D_m (2n + 1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad (17)$$

Onde m_{ext} é a massa de extrato (kg); m_0 , é a massa inicial de soluto (kg); D_m , é a difusividade na matriz sólida (m_2/min); t , é o tempo (min); δ é a meia espessura das partículas (placas) (m) e n é um número inteiro (MEZZOMO, 2008).

Modelo logístico de Martínez et al. (2003)

Como os extratos de plantas, geralmente, são misturas de vários compostos, o modelo logístico de Martínez et al. (2003) leva em conta a variação da composição do extrato ao longo da extração, de forma a otimizar o processo para a obtenção dos compostos de interesse. Para isso, divide o extrato em grupos de componentes com estrutura química similar.

O modelo é baseado no balanço de massa do leito de extração, considerando o leito como um cilindro de comprimento H muito maior que o diâmetro, cujo volume está completamente preenchido por ambas as fases envolvidas no processo (sólida e fluida), no qual o solvente escoar na direção axial com velocidade U e as condições de temperatura, pressão e as propriedades físicas de ambas as fases são mantidas constantes durante toda a extração. O acúmulo e a dispersão na fase fluida são negligenciados por estes fenômenos não apresentarem influência significativa no processo quando comparado ao efeito de convecção (MARTÍNEZ et al., 2003; MICHELIN, 2009).

Em princípio, o modelo logístico possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis: A_i , b_i e t_{mi} . Se a composição do óleo tiver sido determinada experimentalmente, é possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos, conforme apresentado na Equação 18. Desta forma, o modelo pode ser reduzido a

dois parâmetros ajustáveis, b e t_m , e a massa de cada grupo de compostos representada pela Equação 19.

$$m_{ti} = \frac{\%m_t}{100} = x_{0i}m_t \quad (18)$$

$$m_i(h = H, t) = \frac{x_{0i}m_t}{\exp(b_it_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_it_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad (19)$$

Onde m_t é a massa total de sólidos extraível (kg); x_0 é a razão mássica inicial de soluto extraível (kg/kg) e m_{ti} é a massa total de cada grupo de composto (kg) (MICHIELIN, 2009).

A Equação 20 representa a curva de extração obtida pelo modelo de Martínez et al. (2003) para um único grupo de componentes.

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{m_t}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (20)$$

Onde h , é uma coordenada axial (m); H , é o comprimento total do leito (m); m_{Ext} , é a massa de óleo extraído (kg); m_t , é a massa total extraível de sólido no leito (kg); t , é o tempo de extração (min), b e t_m , são parâmetros ajustáveis do modelo (min^{-1} e min, respectivamente), sendo que o parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou o máximo (MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009).

Modelo de Sovová (1994)

Sovová (1994) propôs um modelo baseado na hipótese de que a parte interna da matriz vegetal é formada por células, que contêm o soluto. Como resultado da moagem, as células localizadas na superfície das partículas estão rompidas, tornando parte do soluto exposto ao solvente, enquanto a estrutura interna permanece intacta, o que explicaria a repentina redução na taxa de extração normalmente observada durante processos de extração com fluido supercrítico. Aplicado principalmente no caso de sementes, esse modelo foi um dos primeiros a introduzir uma descrição da estrutura da matriz na modelagem matemática (MEZZOMO, 2008; REVERCHON; DELLA PORTA; FALIVENE, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

A estrutura das sementes, de um modo geral, é formada por celulose e lignina. Esta última é um polímero natural bastante compacto, com um grau de polimerização maior que a celulose. Assim, a lignina é praticamente inacessível ao fluido supercrítico e seu conteúdo, que varia em cada tipo de semente, pode influenciar a resistência à transferência de massa, ou seja, a resistência interna à transferência de massa aumenta com o conteúdo de lignina da semente. A existência de estruturas formadas pela lignina pode explicar também o menor rendimento da extração com partículas maiores, uma vez que, nestas partículas, a estrutura da lignina pode não ter sido destruída pela moagem e a parte interna da partícula pode não estar acessível ao solvente (REVERCHON; MARRONE, 2001).

Também conhecido como modelo das células rompidas e intactas, baseia-se em balanços de massa que consideram o escoamento axial do solvente com velocidade superficial através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. Admite também que, na entrada do extrator, o solvente está livre de soluto, negligenciando seu acúmulo na fase fluida durante a extração, e a temperatura e pressão de operação são mantidas constantes. O tamanho das partículas e a distribuição do soluto no interior do sólido são considerados homogêneos (CAMPOS, 2005; FERREIRA; MEIRELES, 2002; REVERCHON; DELLA PORTA; FALIVENE, 2000).

Esse modelo emprega o coeficiente de transferência de massa da fase fluida para descrever o período de taxa de extração constante (CER) e o da fase sólida para descrever a etapa na qual a resistência à transferência de massa é dominada pela difusão. Nesse modelo, o perfil da concentração do soluto na fase fluida é dividido em três etapas: (a) a primeira etapa considera que o soluto de fácil acesso (x_p), disponível na superfície das partículas sólidas, vai se esgotando ao longo do leito, chamada etapa CER (taxa de extração constante); (b) na segunda etapa, inicia-se a extração do soluto de difícil acesso, chamado etapa FER (taxa de extração decrescente); (c) na terceira etapa, são retirados os solutos de difícil acesso (x_k) presentes no interior das partículas sólidas, e esta é denominada etapa difusional e controlada pela resistência interna à transferência de massa (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008).

A curva de extração obtida pelo modelo de Sovová (1994) é representada pelas Equações 21, 22 e 23, com a massa total de extrato obtida na saída do extrator, em função do tempo.

Para $t < t_{CER}$: período de taxa constante de extração (CER)

$$m_{ext} = Y^*[1 - \exp(-Z)]Q_{CO_2}t \quad (21)$$

Para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$: período de taxa decrescente de extração (FER)

$$m_{ext} = Y^*[t - t_{CER} \exp(z_w - Z)]Q_{CO_2} \quad (22)$$

Para $t \geq t_{FER}$: período controlado pela difusão

$$m_{ext} = N \left\langle x_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{Wx_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\left(\frac{WQ_{CO_2}}{N} \right) (t_{CER} - t) \right] \frac{x_k}{x_0} \right\} \right\rangle \quad (23)$$

Onde m_{ext} é a massa de extrato (kg); t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (min); t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (min); N é a massa de matéria-prima livre de soluto (kg); Y^* é a solubilidade (kg/kg); Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/min); x_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida (kg/kg); x_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas (kg/kg) e W é um parâmetro para o período de taxa de extração lenta (MICHIELIN, 2009).

Nas equações do modelo de Sovová pode-se dizer que a quantidade Z , apresentada na Equação 24, é um parâmetro para o período CER porque essa quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER.

$$Z = \frac{Nk_{Ya}\rho_{CO_2}}{Q_{CO_2}(1 - \varepsilon)\rho_s} \quad (24)$$

Onde ρ_{CO_2} é a densidade do solvente (kg/m³) e ρ_s é a densidade das partículas sólidas (kg/m³).

Para a resolução do modelo de Sovová (1994), é necessário conhecer alguns parâmetros: M_{CER} , taxa de extração na etapa CER (kg/min); Y_{CER} , razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg_{Extrato}/kg_{CO2}); t_{CER} , duração da etapa CER (min)

(CAMPOS, 2005). O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e, a partir dele, obtêm-se o valor de Y_{CER} através da Equação 25.

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad (25)$$

As demais restrições e definições são descritas pelas Equações 26 a 29:

$$t_{CER} = \frac{x_0 - x_k}{Y^*Z} \cdot \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad (26)$$

$$W = \frac{Nk_{Xa}}{Q_{CO_2}(1 - \varepsilon)} = k \frac{ZY^*}{x_k} \quad (27)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{Wx_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \cdot \exp[(WQ_{CO_2}/N)(t - t_{CER}) - x_k]}{x_0 - x_k} \right\} \quad (28)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2}} \ln \left[\frac{x_k + (x_0 - x_k)\exp(Wx_0/Y^*)}{x_0} \right] \quad (29)$$

Os parâmetros k_{Xa} e k_{Ya} são, respectivamente, os coeficientes de transferência de massa na fase fluida e fase sólida (min^{-1}), e são definidos pelas Equações 30 a 34:

$$k_{Ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2}SH\overline{\Delta Y}} \quad (30)$$

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya}\rho_{CO_2}\overline{\Delta Y}}{\rho_s\Delta X} \quad (31)$$

$$\Delta X = \frac{(x_p + x_k)}{2} \quad (32)$$

$$x_p = x_0 + x_k \quad (33)$$

$$\overline{\Delta Y} = \frac{Y_{CER}}{\ln\left(\frac{Y^*}{Y^* - Y_{CER}}\right)} \quad (34)$$

Onde ρ_{CO_2} é a densidade do solvente (kg/m^3), S é a área de seção transversal do leito (m^2), H é o comprimento do leito (m), ΔY é a média logarítmica para a razão mássica de soluto na fase fluida (kg/kg) e ΔX é a média aritmética da razão mássica de soluto na fase sólida (kg/kg) (MICHIELIN, 2009).

APÊNDICES I – DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

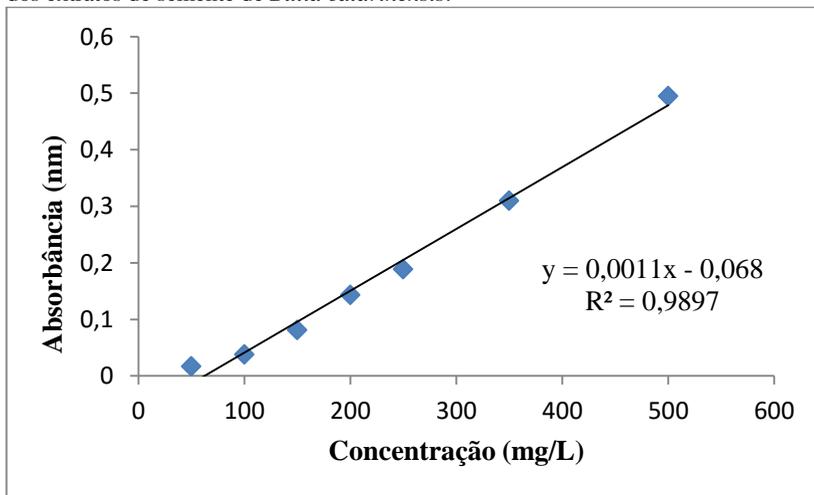
Tabela 23. Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos do experimento cinético para a semente de *Butia Catarinensis* a 100 bar, 40 °C e 6,66 g CO₂/min.

Tempo (min)	Massa (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
5	0,0028	0,0028	0,02
10	0,0315	0,0343	0,23
15	0,0699	0,1042	0,69
20	0,0403	0,1445	0,96
25	0,0504	0,1949	1,3
30	0,0495	0,2444	1,63
40	0,102	0,3464	2,31
50	0,1319	0,4783	3,18
60	0,1049	0,5832	3,88
70	0,1174	0,7006	4,66
80	0,1309	0,8315	5,53
90	0,0825	0,914	6,08
100	0,0504	0,9644	6,42
110	0,0494	1,0138	6,75
120	0,0765	1,0903	7,26
150	0,1588	1,2491	8,31
180	0,0854	1,3345	8,88
210	0,1215	1,456	9,69
240	0,0521	1,5081	10,04
270	0,0331	1,5412	10,26
300	0,0062	1,5474	10,3
330	0,008	1,5554	10,35

APÊNDICES II – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

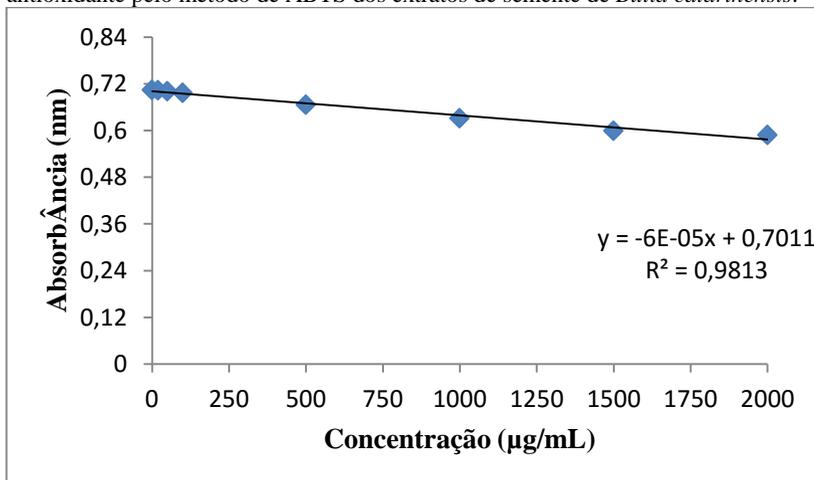
CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Figura 17. Curva padrão de ácido gálico utilizada no cálculo de compostos fenólicos dos extratos de semente de *Butia catarinensis*.



CURVA PADRÃO DE TROLOX

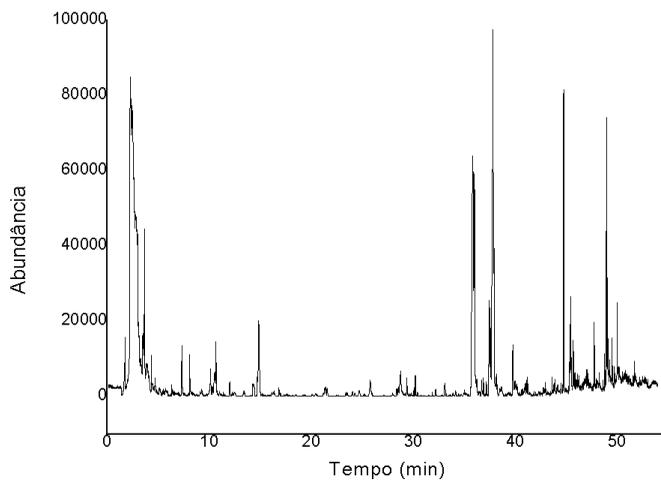
Figura 18. Curva padrão de trolox utilizada na determinação de atividade antioxidante pelo método de ABTS dos extratos de semente de *Butia catarinensis*.



APÊNDICES III – CROMATOGRAFIA GASOSA

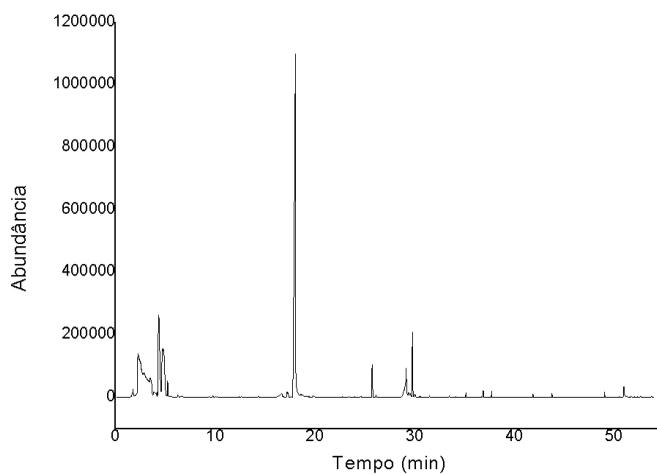
A1. CG-EM Soxhlet Hexano

Figura 19. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Soxhlet Hexano.



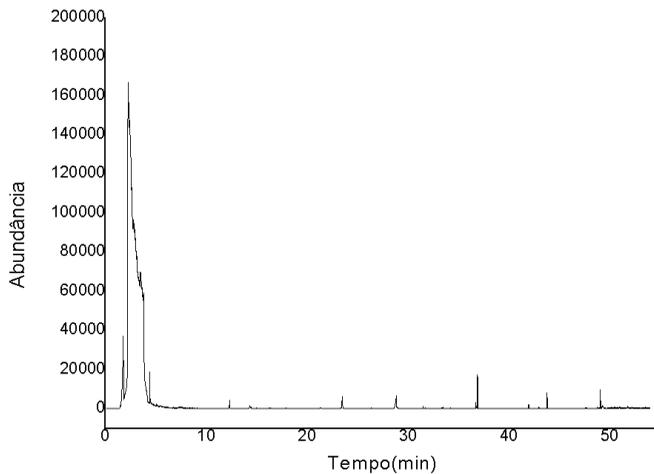
A2. CG-EM Soxhlet Etanol

Figura 20. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Soxhlet Etanol.



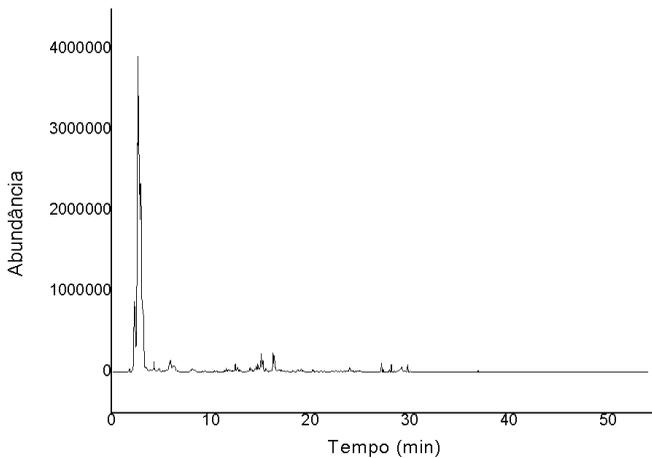
A3. CG-EM Soxhlet Etanol-Água

Figura 21. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Soxhlet Etanol-Água.



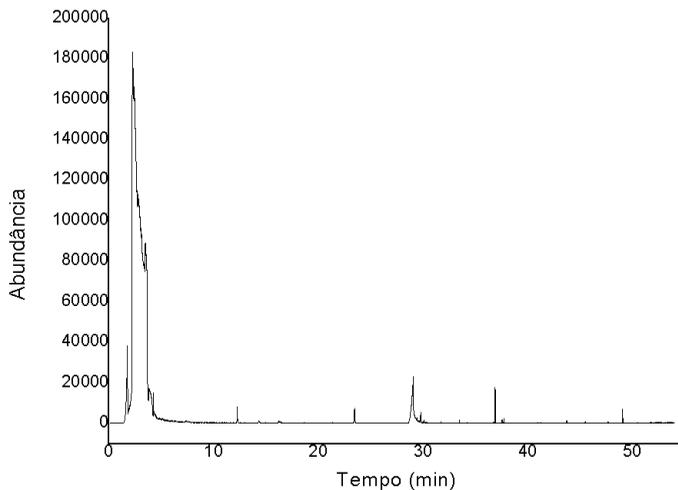
A4. CG-EM Ultrassom Hexano

Figura 22. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Ultrassom Hexano.



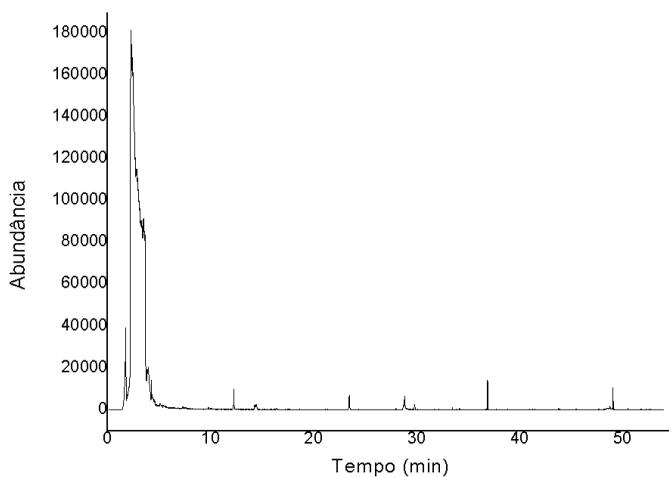
A5. CG-EM Ultrassom Etanol

Figura 23. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Ultrassom Etanol.



A6. CG-EM Ultrassom Etanol-Água

Figura 24. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por Ultrassom Etanol-Água.



A7. CG-EM ESC 40 °C/ 100 bar

Figura 25. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 100 bar.

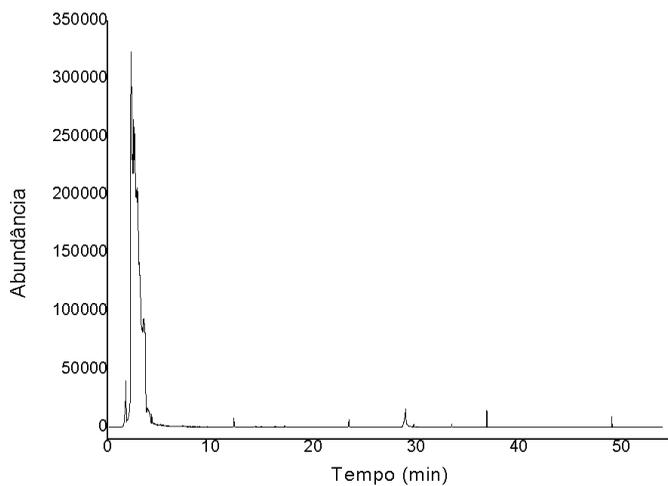
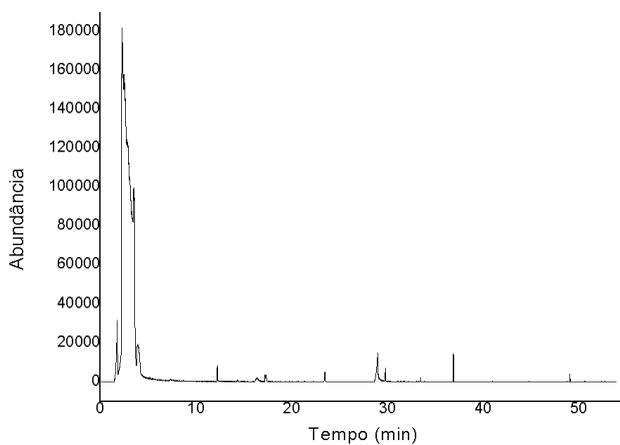
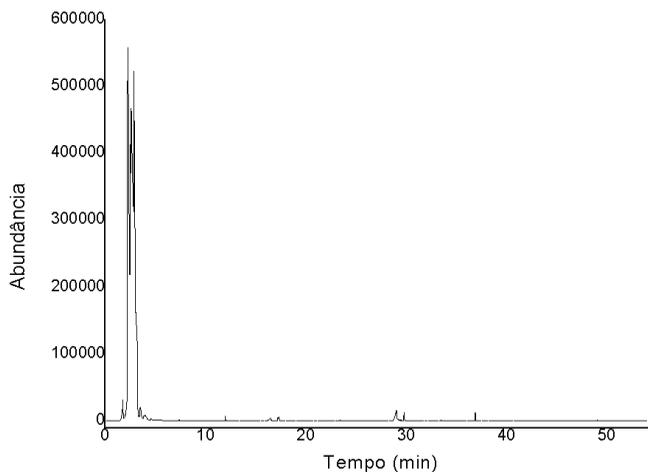
**A8. CG-EM ESC 40 °C/ 200 bar**

Figura 26. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar.



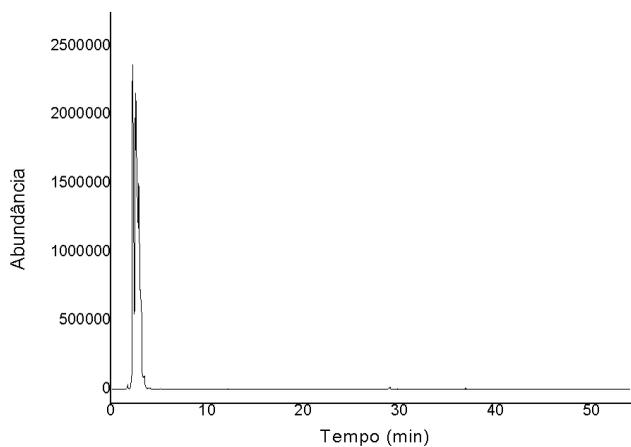
A9. CG-EM ESC 40 °C/ 300 bar

Figura 27. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 300 bar.



A10. CG-EM ESC 50 °C/ 100 bar

Figura 28. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 50 °C/ 100 bar.



A11. CG-EM ESC 50 °C/ 200 bar

Figura 29. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 50 °C/ 200 bar.

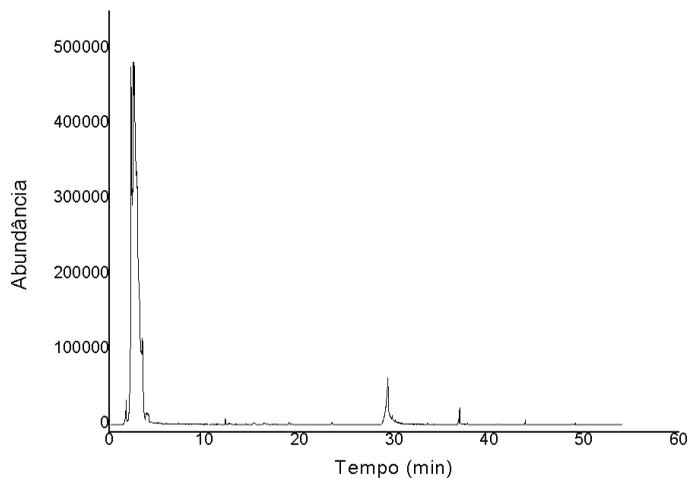
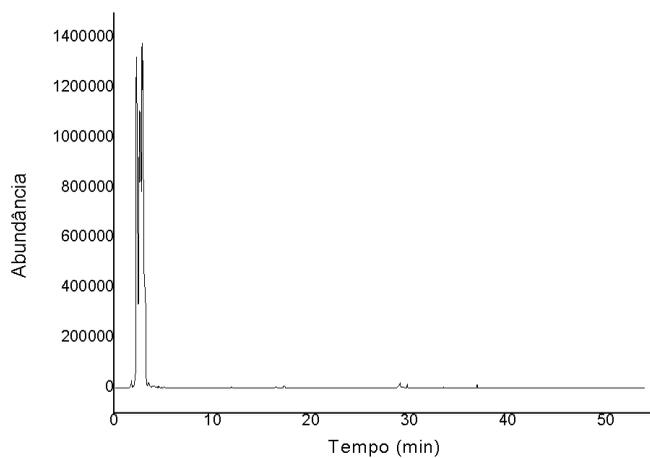
**A12. CG-EM ESC 50 °C/ 300 bar**

Figura 30. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 50 °C/ 300 bar.



A13. CG-EM ESC 60 °C/ 200 bar

Figura 31. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 60 °C/ 200 bar.

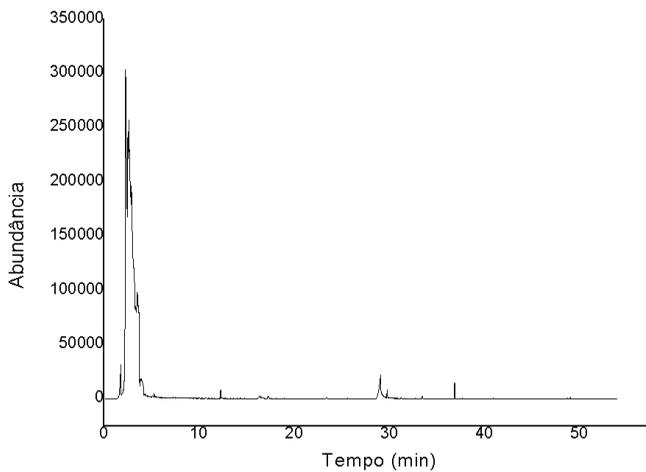
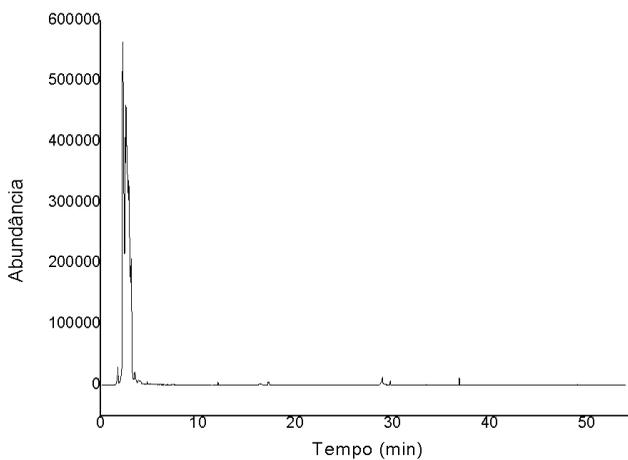
**A14. CG-EM ESC 60 °C/ 300 bar**

Figura 32. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 60 °C/ 300 bar.



A15. CG-EM ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % Etanol

Figura 33. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % Etanol.

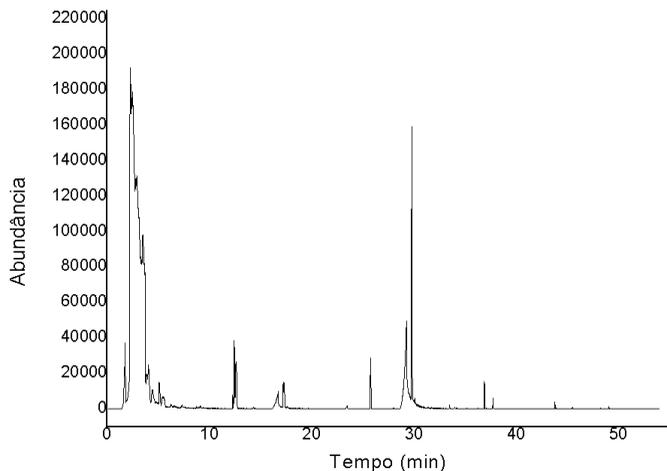
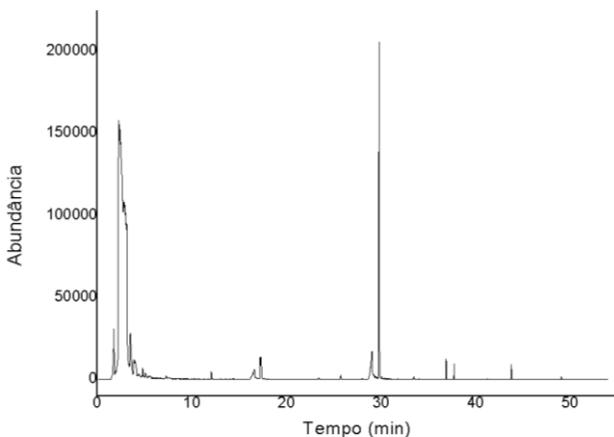
**A16. CG-EM ESC 40 °C/ 200 bar/ 5 % Etanol**

Figura 34. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 5 % Etanol.



A17. CG-EM ESC 40 °C/ 200 bar/ 7,5 % Etanol

Figura 35. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 7,5 % Etanol.

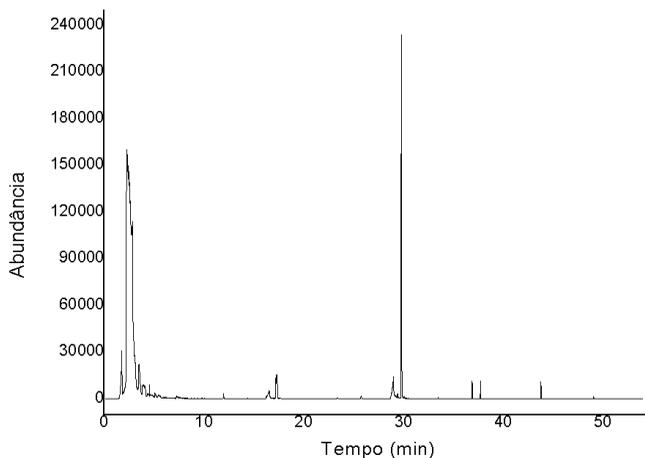
**A18. CG-EM ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % Etanol-Água**

Figura 36. CG-EM do extrato de semente de butiá obtido por ESC 40 °C/ 200 bar/ 2,5 % Etanol - Água.

