

Heloísa Fabian Battistella Lasta

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DOS
RESÍDUOS DE BETERRABA VERMELHA (*Beta vulgaris L.*)
OBTIDOS A ALTA E A BAIXA PRESSÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.
Orientador: Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Co-orientador: Profa. Dra. Natália Mezzomo

Florianópolis

2017

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

Lasta, Heloisa Fabian Battistella

Potencial antioxidante dos extratos dos resíduos de
beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) obtidos a alta e
baixa pressão / Heloisa Fabian Battistella Lasta ;
orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira ;
coorientadora, Natália Mezzomo. - Florianópolis, SC, 2017.
163 p.

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

Inclui referências

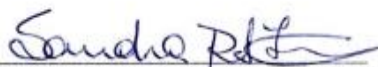
1. Engenharia de Alimentos. 2. Tecnologia supercrítica.
3. Líquido pressurizado. 4. Antioxidante. 5. Resíduo de
beterraba. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II.
Mezzomo, Natália. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

**“POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DOS
RESÍDUOS DE BETERRABA VERMELHA (Beta vulgaris
L.) OBTIDOS A ALTA E BAIXA PRESSÃO”**


Por

Heloísa Fabian Battistella Lasta

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



Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Orientadora




Dra. Natália Mezzomo
Coorientadora



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Sandra Regina
Salvador Ferreira



Prof. Dr. Julian Martinez
(videoconferência)



Profa. Dra. Carmen Maria Muller



Dr. Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues

Florianópolis, 19 de abril de 2017.

*Dedico este trabalho à minha família.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio e fortaleza, socorro bem presente no tempo da angústia (Sl 46.1).

Aos meus pais, Solange e Moacir, por todo carinho e amor demonstrados durante minha vida inteira, por acreditarem em mim, apoiando meus sonhos e projetos sempre.

Ao meu irmão Eduardo pela amizade, convivência, parceria e por todos os momentos divertidos que tornaram essa caminhada mais leve aqui em Florianópolis.

Ao meu esposo, Diogo, por todo amor e paciência durante esse período, por me incentivar e acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava.

Aos meus amigos de longe (Andressa, Claudemir, Greici, Priscila e Raquel) que de alguma forma contribuíram durante minha caminhada, seja com uma palavra de animo ou um abraço, a amizade de vocês é muito importante para mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira, pela orientação, incentivo e confiança em mim depositada para realização deste trabalho.

À minha coorientadora Profa. Dra. Natália Mezzomo, por sua ajuda, ideias, sugestões e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luíz Gustavo Gonçalves Rodrigues por toda paciência e disponibilidade na montagem e nas extrações realizadas com o Equipamento de Líquido Pressurizado, sem sua ajuda, não seria possível.

A senhora Abrelina Souza da Silva, por ter sido tão generosa, cedendo a matéria-prima necessária para concretização deste trabalho, bem como ao Viveiro da Unochapecó.

Ao Lucas, aluno de iniciação científica, pela dedicação e disposição em ajudar durante todo esse trabalho.

A todos os meus amigos e colegas do LATESC, foi muito gratificante fazer parte deste grupo de pesquisa maravilhoso, pelo companheirismo, amizade, por toda ajuda e conselhos, a todos que contribuíram na realização deste trabalho, de forma especial à Camila, Aline, Rafaela, Santiago e Nathana.

Por fim, ao PPGEAL pela oportunidade e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A beterraba de mesa (*Beta vulgaris* L.) é originária das regiões da Europa, Ásia e Mediterrâneo. A raiz da beterraba é amplamente utilizada na alimentação humana, produção de açúcar e etanol, enquanto que suas folhas e talos são geralmente descartados, servindo para compostagem ou alimentação animal. As folhas e talos da beterraba são fonte de cálcio, fósforo, vitamina A e C. A beterraba também apresenta uma elevada capacidade antioxidante que está associada ao pigmento betalaína. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante empregando diferentes técnicas para obtenção de extratos de folha e talo de beterraba vermelha. Os extratos foram obtidos através de extrações a baixa pressão (Soxhlet, maceração e ultrassom) utilizando água, mistura água e etanol, etanol e hexano como solventes. Também foi empregada a técnica de extração com fluido supercrítico (ESC) para a obtenção de extratos a partir da folha de beterraba utilizando o solvente dióxido de carbono e como cossolventes etanol e água (em diferentes concentrações) a 250 bar e 40°C. O processo de extração com líquido pressurizado (ELP), aplicado apenas a folha, foi avaliado para pressões de 75 a 125 bar a 40°C, utilizando como solvente etanol e misturas de etanol e água. As diferentes tecnologias foram avaliadas quanto ao rendimento de extração, a atividade antioxidante dos extratos (DPPH, ABTS e FRAP) e pelo teor de compostos fenólicos totais (CFT) por Folin-Ciocalteu. Os melhores resultados para potencial antioxidante e para CFT foram detectados nos extratos obtidos com etanol como solvente, tanto para folha quanto o talo de beterraba, enquanto que os maiores rendimentos foram obtidos com solvente água para folha (59,8±0,8 %) e mistura água etanol para o talo (51±2%) na técnica de Soxhlet. Nas técnicas a alta pressão, a ELP apresentou ótimos resultados em relação a ESC na utilização do etanol como solvente, demonstrando valores equivalentes ou melhores que demonstrados pelo antioxidante sintético BHT.

Palavras-chave: tecnologia supercrítica, líquido pressurizado, antioxidantes, folha e talo de beterraba.

ABSTRACT

The beetroot (*Beta vulgaris* L.) originated in Europe, Asia and the Mediterranean. The beet's root is widely used for food supply, production of sugar and ethanol while its leaves and stem are usually disposed for animal nourishment or composting. The leaves and stem of the beet are a resource of calcium, phosphorus and vitamins A and C. This product has a high antioxidante capacity, that is associated with the pigment betalain. Thus, the objective of this work was evaluate the antioxidante potencial using different techniques to obtain leaves and stem extracts of red beet. Beet leaves and stem extracts were obtained by low pressure extractions (Soxhlet, maceration and ultrasonic) with the organic solventes water, water and ethanol, ethanol and hexane. For the beet leaf, supercritical fluid extraction (SFE) with ethanol and water (in different concentrations) were carried out with parameters set at 250 bar, 0,5 kg/h and 40 °C. The pressurized liquid extraction process (PLE) was evaluated at pressures of 75 to 125 bar at 40°C, using as solvent ethanol and mixtures of ethanol and water for leaves. The different technologies were evaluated from extraction yield, antioxidante potencial of extracts (DPPH, ABTS and FRAP) and total phenolic compounds content (CFT) with Folin-Ciocalteu. It was found that the best results for potencital antioxidante and phenolic were demonstrated when ethanol was use as the solvente both leaf and stem while the highest yields were obtained with water-to-sheet solvent ($59.8 \pm 0.8\%$) and ethanol-to-stalk mixture ($51 \pm 2\%$) in the Soxhlet technique. In the high pressure techniques, the PLE presented excellent results in relation to ESC in the use of ethanol as solvent, demonstrating values equivalent or better than demonstrated by BHT synthetic antioxidants.

Keywords: Supercritical Technology, Pressurized Liquid, antioxidants, beetroot leaf and stem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Early Wonder, (<i>Beta vulgaris L.</i>)	29
Figura 2 – Estruturas do ácido betalâmico, betacianina e betaxantina.....	36
Figura 3 - Representação do diagrama de fases de um componente puro.....	41
Figura 4 - Representação da curva de extração.....	44
Figura 5 - Cinética da curva de extração do líquido pressurizado.....	47
Figura 6 – Folha de beterraba <i>in natura</i> (a); folha desidratada (b); folha triturada (c); talo <i>in natura</i> (d), talo desidratado (e) talo triturado (f) ...	52
Figura 7 - Extração de folha de beterraba em aparato Soxhlet.....	57
Figura 8 – Equipamento de Ultrassom.....	58
Figura 9 - Unidade de extração com fluido supercrítico	60
Figura 10 - Fluxograma da extração com fluido supercrítico.....	60
Figura 11 - Fluxograma de extração com líquido pressurizado LP1.....	65
Figura 12 - Unidade de líquido pressurizado LP2. (1) Seringa de solvente; (2) Bomba de solvente; (3) Banho termoeletrônico; (4) Célula de extração; (5) Válvula de bloqueio; (6) Válvula back pressure; (7) Extrato.....	67
Figura 13 - Mudança de coloração do meio reacional de captura do radical DPPH.....	72
Figura 14 – Curva padrão de trolox para o TPTZ	74
Figura 15 – Cinética de extração supercrítica de folha de beterraba a 300 bar, 55 °C e com vazão de 0,05 kgCO ₂ /h.....	81
Figura 16 – Cinéticas de extração com líquido pressurizado para a folha de beterraba a 75, 100 e 125 bar com etanol a 3 mL/min.....	83
Figura 17 – Comparativo entre rendimento global e CFT dos extratos de folha de beterraba.....	92
Figura 18 – Comparativo entre as três técnicas para determinação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante dos extratos da folha de beterraba.....	102
Figura 19 – Comparativo entre X ₀ e CFT para os extratos de talo de beterraba.....	112
Figura 20 – Comparativo entre as três técnicas para determinação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante dos extratos do talo de beterraba.....	120
Figura 21 – Curva de calibração do ácido gálico.....	147
Figura 22 – Curva de calibração: inibição do radical ABTS versus concentração do padrão trolox.....	147

Figura 23 – Curva de calibração do padrão trolox para metodologia FRAP.....	148
Figura 24- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Soxhlet com etanol.....	159
Figura 25- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Soxhlet com água.....	159
Figura 26- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Ultrassom com etanol.....	160
Figura 27 - CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Líquido Pressurizado (1) com etanol a 100 bar.....	160
Figura 28- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Líquido Pressurizado (2) com etanol a 100 bar.....	161
Figura 29- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Extração Supercrítica com 7% de etanol e água (90/10).....	161
Figura 30- CG-EM do extrato de talo de beterraba obtido por Soxhlet com etanol.....	162
Figura 31- CG-EM do extrato de talo de beterraba obtido por Soxhlet com água e etanol.....	162
Figura 32- CG-EM do extrato de talo de beterraba obtido por Extração Supercrítica com 10 % de etanol.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores nutricionais e composição por 100g da parte comestível da beterraba crua.....	31
Tabela 2- Valores médios por 100 g do vegetal fresco.....	33
Tabela 3-Valores dos intervalos de várias propriedades de gases, líquidos e fluidos supercríticos.....	42
Tabela 4 - Índices de polaridade e constantes dielétrica dos solventes utilizados nas EBP.....	56
Tabela 5 - Parâmetros para ensaios cinéticos.....	63
Tabela 6 – Composição nutricional da folha de beterraba.....	78
Tabela 7 – Caracterização do leito de partículas para a folha de beterraba.....	79
Tabela 8 – Parâmetros da cinética de extração supercrítica de folha de beterraba a 300 bar, 55 °C e vazão de 0,05 kgCO ₂ /h.....	82
Tabela 9 - Rendimento global de extração para a folha de beterraba....	85
Tabela 10 – Teor de compostos fenólicos totais para folha de beterraba.....	88
Tabela 11 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos da folha de beterraba através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % de atividade (EC ₅₀).....	94
Tabela 12 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos da folha de beterraba.....	98
Tabela 13 - Determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) dos extratos obtidos da folha de beterraba a baixa e alta pressão.....	100
Tabela 14 – Composição nutricional do talo de beterraba.....	104
Tabela 15 – Caracterização do leito de partículas para o talo de beterraba.....	105
Tabela 16 – Rendimento global de extração para o talo de beterraba..	107
Tabela 17 – Teor de compostos fenólicos totais obtidos para o talo de beterraba e padrões antioxidantes.....	110
Tabela 18 – Atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH para os extratos de talo de beterraba obtidos a baixa e a alta pressão.....	113
Tabela 19 – Atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS dos extratos obtidos do talo de beterraba pelos métodos a baixa e alta pressão.....	115

Tabela 20 - Determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) dos extratos obtidos do talo de beterraba a baixa e alta pressão.....	118
Tabela 21 – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.....	122
Tabela 22 – Dados experimentais da curva cinética de ESC.....	149
Tabela 23 – Dados experimentais da curva cinética de ELP.....	151
Tabela 24 – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.....	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Abs – Absorbância
ABTS – Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA – Análise de variância
BHT – Butil-hidroxi-tolueno
CER – Etapa de extração constante (*Constant Extraction Rate*)
CG-EM – Cromatografia gasosa e espectrofometria de massa
CFT – Compostos fenólicos totais
DCP – Etapa difusional (*Diffusion Controlled Period*)
DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG – Equivalente ao Ácido Gálico
EBP – Extração à baixa pressão
ELP – Extração com Líquido Pressurizado
ESC – Extração Supercrítica
EtOH – Etanol
FER – Etapa de Extração Decrescente (*Falling Extraction Rate*)
FRAP – Ferric reducing ability of plasma
GRAS – Geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognized as Safe*)
Hex – Hexano
LP1 – Equipamento de Líquido pressurizado em escala maior
LP2 – Equipamento de Líquido Pressurizado em escala menor
pH – Potencial hidrogênio-iônico
SOX – Soxhlet
TEAC – Atividade antioxidante equivalente ao trolox (*Trolox equivalente antioxidante capacity*)
T – Temperatura (°C)
P – Pressão (bar)
US - Ultrassom

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

% - Percentual

bar – Unidade de pressão

cm³ - Centímetro cúbico

CO₂ – Dióxido de carbono

D_P – Diâmetro médio de partícula

CE₅₀ – Concentração de antioxidante que ocasiona redução de 50 % da absorvância do radical DPPH.

m/m – Massa/massa

m/v – massa/volume

mesh – abertura da peneira (série de Tyler)

R² - Coeficiente de determinação

X₀ – Rendimento mássico

ε - Porosidade

ρ_a – massa específica

ρ_r – massa específica real

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS.....	26
1.1.1 Objetivo geral.....	26
1.1.2 Objetivos específicos.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 BETERRABA DE MESA – “EARLY WONDER”.(<i>Beta vulgarisL.</i>).....	29
2.1.1 Folhas e talos de beterraba.....	32
2.2 ANTIOXIDANTES.....	33
2.2.1 Betalainas.....	35
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	36
2.3.1 Soxhlet (SOX).....	38
2.3.2 Maceração (MAC).....	39
2.3.3 Extração assistida por ultrassom (US)	39
2.3.4 Extração Supercrítica (ESC).....	40
2.3.4.1 Curvas de extração supercrítica.....	43
2.3.4.2 Fenômenos de transporte envolvidos.....	45
2.3.5 Extração com Líquido Pressurizado (ELP).....	46
2.4 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS.....	51
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIA-PRIMAS VEGETAIS.....	52
3.2.1 Determinação da massa específica real das partículas (ρ_r).....	53
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS DA ESC.....	54
3.3.1 Determinação do diâmetro médio de partículas.....	54
3.3.2 Determinação da massa específica aparente do leito de ESC (ρ_a).....	54
3.3.3 Porosidade do leito de ESC (ϵ).....	55
3.3.4 Determinação da massa específica do CO ₂ supercrítico (ρ).....	55
3.4 EXTRAÇÕES A BAIXA PRESSÃO.....	55
3.4.1 Extração em aparato Soxhlet (SOX).....	56
3.4.2 Extração através de maceração (MAC).....	57
3.4.3 Extração assistida por ultrassom (US).....	57
3.5 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC).....	59
3.5.1 Unidade de ESC.....	59

3.5.2	Procedimento experimental.....	61
3.5.3	Experimentos cinéticos.....	62
3.5.4	Emprego de cossolvente.....	63
3.6	EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (ELP).....	64
3.6.1	Unidade de ELP em escala maior (LP1).....	64
3.6.2	Ensaio cinéticos.....	65
3.6.3	Determinação do rendimento global de extração com ELP.....	66
3.6.4	Montagem e testes de equipamento de ELP em escala menor (LP2).....	66
3.7	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0).....	68
3.8	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	68
3.8.1	Conteúdo de fenólicos totais (CFT).....	69
3.8.2	Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH.....	70
3.8.3	Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS.....	72
3.8.4	Potencial antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	73
3.9	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	75
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1	FOLHA DE BETERRABA.....	77
4.1.1	Caracterização da matéria-prima e do leito de partículas.....	77
4.1.2	Cinética de ESC.....	79
4.1.3	Testes preliminares na ESC.....	82
4.1.4	Cinética de ELP.....	83
4.1.5	Rendimento global de extração (X_0).....	84
4.1.6	Conteúdo de fenólicos totais e potencial antioxidante.....	87
4.1.6.1	Conteúdo de Fenólicos Totais (CFT).....	87
4.1.6.2	Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH.....	92
4.1.6.3	Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS.....	96
4.1.6.4	Potencial antioxidante pelo método FRAP.....	99
4.1.6.5	Considerações sobre a folha de beterraba.....	103
4.2	TALO DE BETERRABA.....	103
4.2.1	Caracterização da matéria-prima e do leito de partículas.....	103
4.2.2	Rendimento global de extração (X_0).....	105
4.2.3	Conteúdo de fenólicos totais e potencial antioxidante.....	108

4.2.3.1	Conteúdo de Fenólicos Totais (CFT).....	108
4.2.3.2	Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH.....	112
4.2.3.3	Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS.....	114
4.2.3.4	Potencial antioxidante pelo método FRAP.....	116
4.2.3.5	Considerações sobre o talo de beterraba.....	119
4.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	120
5	CONCLUSÃO.....	125
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	129
	REFERÊNCIAS.....	131
	APÊNDICES	147

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, o Brasil evoluiu de um país dependente de importação e se tornou líder em produção e exportação de café, açúcar, soja, suco de laranja e carnes para o mundo. Mesmo estando entre os cinco maiores produtores mundiais de alimentos, uma grande parte da produção brasileira é perdida na cadeia de distribuição, que compreende desde a colheita até o consumo doméstico. É muito preocupante quando, toneladas de alimentos que poderiam estar alimentando populações estão simplesmente sendo perdidas. Desta forma, a implementação de políticas de conscientização, que auxiliem desde o produtor na hora da colheita até o consumidor no supermercado, são muito importantes e urgentes. Uma ótima alternativa é a agregação de valor aos resíduos, começando pelo produtor agrícola e percorrendo toda a cadeia produtiva.

A beterraba de mesa é uma hortaliça amplamente consumida no Brasil, o Censo Agropecuário mais recente para este produto (IBGE, 2009), aponta a existência 21.937 estabelecimentos agrícolas que produzem 177.154 toneladas de beterraba. Os cinco principais Estados produtores em 2006 totalizavam mais de 75% da quantidade produzida do país. Esses Estados são: Paraná que concentra a maior produção (20,0%), São Paulo (17,0%), Minas Gerais (15,5%), Rio Grande do Sul (15,0%) e Bahia (8,0%).

Sabe-se que a comercialização da beterraba se dá principalmente por causa de sua raiz tuberosa, da qual apenas 10 % é comercializada com as folhas e talos, sendo que estes já são descartados no próprio produtor, servindo de alimentação animal ou para compostagem. A raiz, além de ser consumida em saladas *in natura*, cozida ou em conservas é utilizada também como corante natural nas indústrias, principalmente de produtos lácteos, como iogurtes e sorvetes, assim como na confecção de balas, confeitos e snacks (CONSTANT; et al, 2002; LEMES, 2013). Atualmente o interesse nos compostos desta hortaliça tem sido despertado, uma vez que ela se apresenta como fonte de betalaína, um antioxidante natural. É importante lembrar que, uma maneira de minimizar resíduos reaproveitando ao máximo o potencial de um alimento é a valorização de suas propriedades e isso pode ser feito através da extração de seus compostos bioativos.

Tanto a indústria alimentícia quanto a farmacêutica têm pesquisado novas fontes naturais com potencial de aplicação na

conservação de alimentos ou emprego em cosméticos ou medicamentos. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas e aplicadas na extração destes compostos, como alternativa aos métodos convencionais, como, por exemplo, a extração supercrítica ou a extração com líquidos pressurizados. Estas técnicas não se utilizam de altas temperaturas e podem ser realizadas em tempo reduzido, em comparação com processos convencionais, como a extração realizada em aparato Soxhlet ou por maceração.

Sabendo do grande potencial antioxidante presente na raiz de beterraba, percebe-se uma grande oportunidade no estudo das outras partes dessa hortaliça, que atualmente são tratados como resíduo, a fim de investigar seu potencial como um antioxidante natural. A importância desse estudo se dá ao fato de que ainda não estão disponíveis dados referentes a extração de compostos com potencial bioativo das folhas e talos de beterraba.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antioxidante dos extratos do resíduo de beterraba de mesa (*Beta vulgaris* L.) obtidos por meio de diferentes técnicas de extração.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Pré-tratar (secagem e moagem) e caracterizar (físicoquimicamente) folhas e talos da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.);
- b) Obter extratos provenientes da folha e do talo da beterraba vermelha, empregando as seguintes técnicas a baixa pressão: Soxhlet, maceração e ultrassom. Cada técnica foi realizada mediante a utilização de três solventes orgânicos puros (água, etanol e hexano) e uma mistura de solventes (água e etanol 1:1)
- c) Realizar a cinética de extração supercrítica com dióxido de carbono puro para folha de beterraba e empregar o uso de cossolvente (água ou etanol) no processo de extração supercrítica, aplicando a melhor condição para o talo;
- d) Construir equipamento de extração por líquido pressurizado e realizar cinética de extração e extrações para folha de beterraba com

- diferentes pressões (75, 100 e 125 bar) e diferentes solventes (água e etanol), variando sua proporção;
- e) Determinar o potencial antioxidante dos diferentes extratos de beterraba (folhas e talos) através dos métodos de captura do radical DPPH, de captura do radical ABTS e de redução do composto FRAP;
 - f) Determinar o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocateu) presentes nos diferentes extratos;
 - g) Identificar os compostos dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).
 - h) Comparar os métodos de extração quanto ao rendimento e qualidade (representado pelo potencial antioxidante) dos extratos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BETERRABA DE MESA: “Early Wonder” (*Beta vulgaris* L.)

A beterraba (Figura 1) é uma hortaliça que pertence à família das *Chenopodiaceae*, segundo a classificação com base em parâmetros morfológicos, sendo esta uma subfamília da *Amaranthaceae*, originária das regiões de clima temperado da Europa e Norte da África, caracterizada por possuir uma raiz tuberosa comestível. É uma hortaliça característica da dieta do leste e centro Europeu, sendo usada também como um remédio popular para doenças hepáticas e renais, na estimulação do sistema hematopoiético e imunológico e como uma dieta no tratamento do câncer. No Brasil, a beterraba é cultivada principalmente nas regiões Sul e Sudeste (KANNER et al, 2001; CAMARGO FILHO, MAZZEI, 2002; KUJAWSKA et al, 2009).

Figura 1 – Beterraba de mesa (“Early Wonder”, *Beta vulgaris* L.)



No Brasil, a beterraba hortícola é a variedade de beterraba mais cultivada. Em 2007, o comércio de sementes de beterraba hortícola movimentou mais de 5,6 milhões de reais, as quais são destinadas ao cultivo em mais de 20.000 ha (ABCSEM, 2011). Segundo o Censo agropecuário de 2006, o mais recente realizado para a produção de beterraba, no Brasil ocorre em 21.937 estabelecimentos e os cinco principais estados brasileiros produtores foram responsáveis por 75% da produção nacional, sendo esses: Paraná (20,0%), São Paulo (17,0%),

Minas Gerais (15,5%), Rio Grande do Sul (15,0%) e Bahia (8,0%) (IBGE, 2006).

A produtividade nacional média desta hortaliça oscila entre 20,0 e 35,0 t/ha (REZENDE; CORDEIRO, 2007). De acordo com a Síntese Anual da Agricultura (2011), em Santa Catarina, foram comercializados na Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina (Ceasa/SC) 4.583,04 toneladas de tubérculos de beterraba. O principal centro produtor em Santa Catarina é o Vale do Itajaí, nos municípios de Ituporanga, Vidal Ramos e Imbuína (DUARTE et al., 2012).

A beterraba pertence à espécie *Beta vulgaris* L. que é dividida em três subespécies: *Beta vulgaris* ssp. *adanesis*, *Beta vulgaris* ssp. *marítima* e *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, sendo que esta última agrupa todas as cultivares já domesticadas. As cultivares da subespécie *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* podem ser subdivididas em quatro grupos: beterrabas forrageiras, que são destinadas à alimentação animal; beterrabas folhosas, onde a parte comestível é a folha e os pecíolos (caule que fica entre a lâmina das folhas), beterrabas açucareiras, que apresentam a coloração branca, sendo cultivadas nos Estados Unidos e na Europa; e as beterrabas hortícolas, único grupo cultivado comercialmente no Brasil, apresentando uma raiz tuberosa comestível.

A cultivar mais tradicional é a “Early Wonder”, também chamada de beterraba de “mesa” ou vermelha, apresentando raízes de formato regular e forte coloração vermelha devido a presença das betalaínas em sua constituição (LANGE et al., 1999 apud FERREIRA, 2010; HERNANDES et al., 2007). Sua colheita se dá 90 a 110 dias depois do plantio (FABICHAK, 1977). Além de possuir substâncias importantes, a beterraba vem se destacando por sua composição nutricional (HERNANDES et al., 2007; VITTI et al., 2003). Na Tabela 1 estão descritas as composições em vitaminas e sais minerais apresentadas por esta hortaliça, segundo a tabela brasileira de composição dos alimentos (UNICAMP, 2006).

Tabela 1 – Valores nutricionais e composição por 100 g da parte comestível da beterraba crua.

Nutrientes	Teor
Energia (kcal)	49
Água (g)	86
Proteína (g)	1,9
Lipídeos (g)	0,1
Carboidratos (g)	11,1
Fibra Alimentar (g)	3,4
Cinzas (g)	0,9
Cálcio (mg)	18
Fósforo (mg)	19
Ferro (mg)	0,3
Sódio (mg)	10
Potássio (mg)	375
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	Traço
Piridoxina (mg)	0,04
Vitamina C (mg)	3,1

Fonte: Tabela brasileira de composição dos alimentos (UNICAMP, 2016).

A beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) é cultivada primeiramente por causa de suas raízes, que possuem um alto valor nutricional e são usualmente consumidas depois de processadas. Elas exibem um alto potencial antioxidante, que está associado com o conteúdo do pigmento betalaína. As betalaínas são efetivas na captura de radicais livres. (ESCRIBANO, J., et al. 1998; PEDRENO, ESCRIBANO, 2000 *apud* MIKOLAJCZYK-BATOR et al., 2016).

Segundo Escribano et al., (1998), a cor das raízes de beterraba (*Beta vulgaris*, L.) é devida à presença de vacúolos celulares de betacianinas vermelhas ou violetas e betaxantinas amarelas, das quais a betanina e betanidina (betacianina) e vulgaxantina I e II (betaxantinas) são as betalaínas mais abundantes.

De acordo com Kujala (2000), o interesse em compostos da beterraba vermelha tem aumentado, uma vez que, extratos de beterraba têm mostrado um excepcional potencial antioxidante. Evidências sugerem que alguns corantes naturais podem ser antioxidantes nutricionalmente importantes e sua presença na dieta pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, cancro e outras associadas ao envelhecimento (CAI et al., 2003). Alguns estudos apontam que as

betalaínas presentes na beterraba possuem um alto potencial antioxidante e efeito anti-radical, representando uma nova classe de antioxidantes catiônicos (KANNER et al., 2001).

A beterraba também se enquadra na produção de resíduos, uma vez que é cultural no Brasil descartar suas folhas, assim como as de cenoura, brócolis, e de outros produtos vegetais, mesmo que esses resíduos ainda possam ser reaproveitados (STORCK et al., 2013). Segundo Matsura (2005), a problemática do tratamento de resíduos agroindustriais tem despertado o interesse de pesquisas envolvendo a extração de componentes específicos presentes nesta matéria-prima. A geração de resíduos começa já na colheita, pois sua realização por mão-de-obra não capacitada, inadequação do local onde é deixado e os recipientes nos quais são transportados faz com que a perdas de produtos nesta etapa sejam ainda maiores.

Na América Latina e no Caribe, a maioria dos alimentos é perdida ou desperdiçada na produção e consumo, englobando todos os segmentos da cadeia de abastecimento alimentar. Cerca de 28 % das perdas de alimentos ocorrem na produção, 17 % durante a comercialização e distribuição, 22 % durante manuseio e armazenamento e o restante 6 % durante o processamento (FAO, 2014).

2.1.1 Folhas e talos de beterraba

As folhas e talos da beterraba, em quase que sua totalidade, são destinados ao descarte ainda pelo produtor, servindo como alimentação de suínos ou como adubo na própria horta. A parte aérea, que se constitui das folhas e dos talos, é mais rica em ferro, sódio, potássio, vitamina A e do Complexo B, em níveis significativamente maiores aos das raízes, o que revela a importância de seu aproveitamento na alimentação humana (TIVELLI et al., 2011).

Os estudos relacionados a esses resíduos ainda são limitados à sua composição mineral e nutricional. Melo e Farias (2014) estudaram a composição nutricional, compostos fenólicos e potencial antioxidante em partes comestíveis não convencionais de seis olerícolas, entre elas folhas e talos de beterraba. As folhas e talos apresentaram 1,8% e 4,23% para proteína e carboidratos, respectivamente. Quanto a concentração de fenóis, o talo apresentou 5,36 mg EAG/g extrato seco.

Mattos et al. (2009) afirmam que as folhas não convencionais de olerícolas podem ser utilizadas como alternativas alimentares de aproveitamento integral dos alimentos, e como fonte de nutrientes, pois

ao avaliarem a composição centesimal de folhas de beterraba e espinafre, verificaram um alto conteúdo de fibras e proteínas. Para a beterraba foi obtido 31,54% e 10,18%, em base seca, para quantificação de proteínas e fibras, respectivamente.

Monteiro (2009) avaliou hortaliças e suas partes comestíveis e não comestíveis, para beterraba de mesa. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios por 100 g do vegetal fresco.

Composição	Polpa	Folha	Talo
Rendimento (%)	44,05	27,43	28,52
Calorias (kcal)	12,43	15,80	8,80
Carboidratos (g)	1,62	0,39	1,17
Proteínas (g)	1,41	3,56	1,01
Lipídeos (g)	0,03	0,00	0,01
Fibras (g)	2,54	1,17	2,38
Ferro (mg)	0,37	4,89	3,15
Cálcio (mg)	7,39	75,86	19,87
Potássio (mg)	129,69	190,29	78,51
Umidade (g)	90,08	91,76	93,73

Fonte: adaptado de MONTEIRO (2009).

Em estudo realizado por Furlani et al. (1978) com 50 cultivares abrangendo 35 espécies, a folha de beterraba apresentou para os minerais N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Co, Al e Na, valores de, respectivamente, 4,15%, 0,688%, 6,66%, 1,49%, 1,5%, 0,270%, 34 ppm, 36054 ppm, 18,1 ppm, 684 ppm, 46 ppm, 0,2 ppm, 42 ppm, 0,21 ppm, 2196 ppm, 11886 ppm, e para água um percentual de 93,5. Através desses estudos, percebe-se que os resíduos de beterraba são uma importante fonte de minerais e nutrientes, sendo imprescindível o estudo de novas tecnologias para o seu aproveitamento.

2.2 ANTIOXIDANTES

A pesquisa envolvendo antioxidantes provenientes de fontes naturais aumentou no final do século 20 e início do século 21, permanecendo crescente no Brasil e no mundo devido aos benefícios vinculados ao consumo dessas substâncias para a saúde, bem como para a indústria alimentícia. Segundo a ANVISA (1997) antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos

alimentos. De um modo geral, os antioxidantes podem ser definidos como moléculas capazes de diminuir ou prevenir a oxidação de outras moléculas, podendo atuar em alimentos ou sistemas biológicos (BOROSKI et al, 2015).

Os antioxidantes podem ser divididos genericamente, de acordo com a sua origem, em sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos são adicionados a matrizes sem a intenção de nutrir, mas de retardar o aparecimento de alterações oxidativas no alimento durante as etapas de fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação (ANVISA, 1997). Os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria mundialmente são os compostos fenólicos butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (TAKEMOTO; TEIXERA FILHO; GODOY, 2009).

Os antioxidantes naturais podem ser substituintes dos sintéticos. Além dos apelos em manter as propriedades organolépticas e químicas de alimentos, outras propriedades, como manutenção da saúde e prevenção de doenças, associam-se ao consumo de antioxidantes naturais. Antioxidantes naturais podem ser sintetizados, mas sua obtenção deve ser de fontes naturais, não sintetizados em laboratório. Dentre os antioxidantes naturais destacam-se as enzimas, vitaminas e compostos fenólicos (ANVISA, 2015).

Os antioxidantes podem ser divididos em primários e secundários. Os antioxidantes primários geralmente são compostos sintéticos que são usados em alimentos. Como já citado anteriormente, BHA, BHT, PG e TBHQ. No entanto, alguns componentes naturais dos alimentos também agem como antioxidantes primários e são adicionados em alimentos. Tocoferóis são os antioxidantes primários mais utilizados. Os carotenoides são outro grupo de compostos naturais que agem como antioxidante primário, porém, por mecanismos diferentes (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Já os antioxidantes secundários, ou preventivos, agem de vários mecanismos possíveis. Tais antioxidantes diminuem a taxa de oxidação por diferentes formas, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repondo hidrogênio para antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos a espécies não radicais, desativar o oxigênio, absorver radiação ultravioleta ou agir como sequestrante de oxigênio. Eles são classificados como sinérgicos, pois promovem a atividade dos antioxidantes primários. Pode-se citar o ácido cítrico, ácido ascórbico e

ácido tartárico como bons exemplos (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Nos últimos anos tem crescido o interesse por estudos com antioxidantes naturais. Isso se deve à importância do conhecimento das propriedades antioxidantes de vários alimentos. Pesquisas associadas ao desenvolvimento de novas técnicas e metodologias de análise de componentes bioativos, potencial antioxidante e determinações totais de compostos ou grupos de compostos são consideradas importantes para obtenção de resultados mais confiáveis e precisos (BOROSKI, 2015).

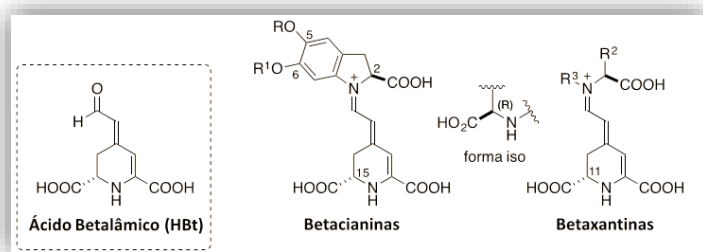
2.2.1 Betalaínas

As betalaínas são compostos N-heterocíclicos solúveis em água que estão localizados nos vacúolos das plantas, seu precursor comum é o ácido betalâmico. Na natureza identificou-se mais de cinquenta estruturas. As betalaínas não pertencem ao grupo dos alcalóides, pois na natureza se apresentam na forma ácida devido à presença de vários grupos carboxilas. Produzem coloração vermelha, amarela, rosa e laranja em flores e frutas, sendo que a beterraba constitui a principal fonte deste pigmento (CAI et al., 2005; VOLP et al., 2009).

As betacianinas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. Até o presente momento foram descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas (vermelhos) e 20 tipos de betaxantinas (amarelos). As beterrabas contêm ambos os corantes, cerca de 75-95% de betacianina (betanina) e de betaxantina (vulgaxantina I) (CAI et al., 2005).

As betalaínas são compostas de ácido betalâmico (Figura 2), um azoto contendo a estrutura do pigmento no núcleo, a condensação espontânea do ácido betalâmico com os derivados glicosil ou aminas dá origem a betacianina violeta e a betaxantina amarela.

Figura 2 – Estruturas do ácido betalâmico, betacianina e betaxantina.



Fonte: GONÇALVES et al., 2015.

Dentre suas propriedades funcionais, as betalaínas são identificadas como um antioxidante natural. Após estudos de biodisponibilidade, alguns autores sugerem que as betalaínas betanina e indicaxantina estão envolvidas na proteção da partícula de LDL-colesterol contra modificações oxidativas (TESORIERE, 2004; NETZEL, 2005). Os primeiros estudos já indicavam que a beterraba vermelha, alimento que possui maior fonte desta substância, apresentava um significativo efeito inibitório no câncer de pele e de pulmão em ratos. A atividade de várias betaxantinas e betacianinas sobre os radicais livres está muito ligada à sua estrutura, que é muito semelhante à das betalaínas. Sendo assim, a beterraba e os compostos presentes nela já se apresentam como alguns dos antioxidantes mais potentes e este potencial antioxidante foi atribuído a características estruturais das betalaínas (STINTZING; CARLE, 2004; VOLP et al., 2009).

Em estudo realizado por Davis (2004), as betaninas, em forma de extrato de beterraba, demonstraram atuar também na prevenção de alguns tipos de câncer, dentre eles os cânceres de pele e fígado, devido a suas propriedades antioxidantes. São relatadas também outras propriedades das betalaínas, como a atividade antiviral e antimicrobiana.

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

O aumento do conhecimento científico sobre o impacto dos alimentos e aditivos sintéticos na saúde humana e a conscientização dos consumidores de que compostos naturais podem substituí-los tem gerado interesse no desenvolvimento de novos processos que permitam a extração de compostos bioativos a partir de matrizes naturais (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de compostos de uma matriz, seja ela sólida ou líquida, por meio de processos químicos, físicos ou mecânicos (EGGERS; JAEGER, 2003). O processo de separação de um ou mais componentes de uma mistura complexa é um requisito em várias unidades da indústria alimentícia e farmacêutica. Geralmente, o maior objetivo dessas indústrias com essa operação é remover um componente específico, agregando valor ao produto (VIGANÓ, 2015). Esse componente específico pode ser desde um resíduo a uma substância interessante presente em matrizes vegetais.

No caso da separação de substâncias de matrizes vegetais, classifica-se como extração/separação sólido-líquido e pode ser dividida em convencional e não-convencional. Os métodos convencionais são conhecidos como técnicas clássicas baseadas na aplicação de solventes orgânicos, aplicação de calor ou agitação. Os métodos não convencionais são técnicas que usam líquidos pressurizados, ultrassom, enzimas, pulso elétrico, micro-ondas. Em contrapartida aos convencionais, as técnicas não convencionais apresentam-se como uma alternativa mais econômica e menos agressiva ambientalmente (VIGANÓ, 2015).

Quando se trata de extração é importante levar em conta o tipo de material que se está trabalhando, bem como os compostos de interesse a serem extraídos, pois cada método apresenta particularidades, algumas sendo limitantes, outras vantajosas. No que tange a extração de compostos antioxidantes de matrizes vegetais, compostos que podem ser chamados de bioativos, pode-se fazer uso de técnicas convencionais de extração, como Soxhlet, maceração e ultrassom, que utilizam solventes orgânicos ou, como alternativa, técnicas a alta pressão, como a extração supercrítica e líquido pressurizado.

As extrações com solventes orgânicos podem utilizar uma ampla variedade de solventes, como: álcool metílico, etílico e propílico, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, água, éter de petróleo. São técnicas comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos diversos (MEZZOMO, 2008).

Vale a pena ressaltar que a técnica empregada na extração de compostos de alto valor agregado de diferentes produtos naturais é fundamental para definição da qualidade do produto. A extração por processos convencionais é possivelmente responsável pela degradação

térmica e contaminação do extrato com resíduos de solvente. Paralelo a isso, a grande competitividade na área de fitoterápicos destaca a importância do emprego de técnicas modernas de extração (REVERCHON, DE MARCO, 2006).

2.3.1 Soxhlet

Em 1879, Von Soxhlet desenvolveu um novo sistema de extração, e esta técnica de lixiviação vem sendo amplamente utilizada ao longo dos anos (SOXHLET, 1879 *apud* LUQUE DE CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2010). A extração em aparato Soxhlet tem sido uma técnica-padrão a mais de um século e utilizada como referência primária para comparar novos métodos de extração (LUQUE DE CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Utilizada originalmente na determinação de gordura do leite, a amostra é colocada no aparato, que é gradualmente cheio pelo solvente condensado advindo do balão de destilação. Quando o líquido atinge o nível de volume excessivo, o soluto é retirado por um sifão, sendo este, descarregado novamente no balão de destilação. Essa operação é repetida até que a extração se complete (SOXHLET, 1879 *apud* LUQUE DE CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2010).

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

A extração em aparato Soxhlet tem vantagens atraentes, como: a amostra é exposta ao contato repetido com porções do solvente puro, o que facilita a transferência de massa; não é necessária a filtração após a extração e a produtividade pode ser aumentada através da realização de várias extrações simultâneas e paralelas; pelo baixo custo do equipamento. É uma metodologia muito simples e que requer pouco treinamento do operador (LUQUE DE CASTRO, et al., 1994; AOAC, 1990; ISSO, 1998).

As maiores desvantagens da extração em aparato Soxhlet em comparação com outras técnicas é a longa duração da extração, grande quantidade e desperdício de solvente, gerando problemas ambientais. As amostras geralmente são extraídas no ponto de ebulição do solvente,

durante longos períodos, resultando na decomposição térmica de substâncias termo sensíveis. É uma técnica limitada pelo extrator e difícil de automatizar.

2.3.2 Maceração

A maceração consiste em um processo estático no qual a matéria-prima permanece em contato com um solvente orgânico por tempo pré-determinado, sob agitação ocasional. Geralmente realizada em temperatura ambiente em um recipiente fechado e sem renovação do líquido extrator, esta é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e baixo custo em relação a outras técnicas (VINATORU, 2001).

O processo de maceração depende muito da polaridade do solvente extrator e da natureza da matéria-prima. Essa técnica não conduz ao esgotamento da matéria-prima, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre a concentração de soluto existente na matéria-prima e no solvente. A velocidade com que se obtém o equilíbrio é função do tamanho dos fragmentos de matéria-prima e do grau de intumescimento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente (JACQUES, 2005; MELECCHI, 2005).

A maceração é largamente aplicada nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos para a produção de extratos. É o método escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pela presença de oxigênio e são solúveis à temperatura ambiente, em um solvente orgânico (MELECCHI, 2005). Como desvantagens, esta técnica tem longos períodos de extração e a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da matéria-prima, uma vez que solvente e amostra entram em equilíbrio.

2.3.3 Extração assistida por ultrassom (US)

Ultrassom é um tipo especial de onda sonora que causa um fenômeno químico e físico. Os mecanismos de extração envolvem dois tipos de fenômenos físicos: difusão através das paredes da célula e lavagem da célula uma vez que a sua parede foi destruída. Ambos

fenômenos são afetados pela irradiação do ultrassom (VINATORU, 2001). Os efeitos físicos do ultrassom estão associados com frequências mais baixas, de 20 – 100 kHz, enquanto que os efeitos químicos dominam as frequências de 200 – 500 kHz (SOUZA et al., 2016). O efeito mais importante de um sonificador em um líquido é causado por cavitação acústica. Quando as ondas mecânicas são transmitidas através de um fluido, induz em uma série de compressões e rarefações nas moléculas. Tais alterações de pressão causam a produção, crescimento e colapso das bolhas. Este fenômeno é conhecido como cavitação acústica (ESCLAPEZ et al., 2011).

Na extração assistida por ultrassom (US), o principal efeito é o estresse mecânico das células da matriz vegetal, aumento da permeabilidade das paredes celulares, o que facilita a hidratação e dilatação do material através do aumento do tamanho dos poros da parede celular, o que facilita o processo de difusão e transferência de massa (BENELLI et al., 2010). O aumento no tecido celular pode, em alguns casos, quebrar a parede celular, liberando compostos, entre eles, aromáticos, aumentando a eficiência do processo e/ou diminuindo o tempo de extração através do aumento da área de contato do sólido com o solvente. Todos os benefícios referentes a essa técnica estão diretamente ligados a potência e frequência do aparelho (VINATORU, 2001; YANG, ZHANG, 2008).

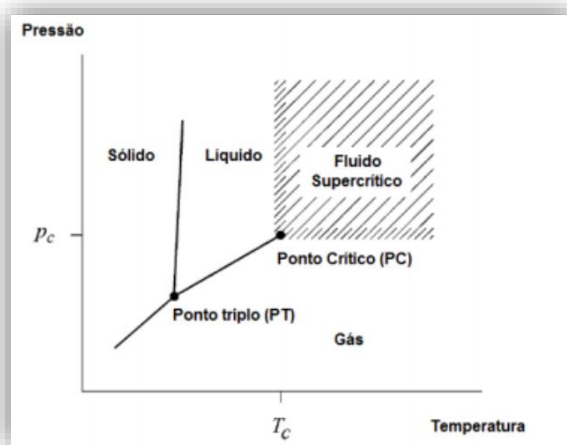
2.3.4 Extração Supercrítica (ESC)

A extração com fluido supercrítico é uma alternativa aos métodos comumente utilizados na separação de compostos ativos de ervas e produtos naturais (MICHIELIN et al., 2009). É uma operação unitária de transferência de massa que se utiliza de fluidos com temperaturas e pressões acima de seus pontos críticos, sendo denominados fluidos supercríticos, como mostra a Figura 3. De acordo com Herrero, Cifuentes e Ibañes (2006), sob estas condições, o fluido apresenta simultaneamente propriedades de gás e de líquido, sendo que a densidade do fluido é semelhante à do líquido enquanto que a viscosidade é semelhante à do gás, a respeito da difusividade, seu valor é intermediário ao do gás-líquido, aumentando seu poder de solvatação e de transferência de massa. Na Tabela 3 são apresentados os valores dos intervalos de várias propriedades de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

O estado supercrítico pode ser definido como um estado em que líquido e gás não se distinguem um do outro.

O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO_2), por possuir propriedades críticas de temperatura de $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de $73,8\text{ bar}$, sendo barato, ecológico, seguro, apresentando alta difusividade combinada com força de solvente facilmente ajustável. Uma outra vantagem do CO_2 é que a pressão ambiente ele está no estado gasoso, facilitando a recuperação do extrato. Quando se trata da preparação de amostra de produtos naturais ou alimentos, a capacidade de operação em baixas temperaturas é muito importante, pois permite a extração de compostos termicamente lábeis ou facilmente oxidáveis (BRUNNER, 1994; HERRERO et al., 2010).

Figura 3: Representação do diagrama de fases de um componente puro.



Fonte: Adaptado de MUKHOPADHYAY (2000) apud ANDRADE (2015).

Tabela 3: Valores dos intervalos de várias propriedades de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Estado do fluido	Densidade (ρ ; g/cm ³)	Viscosidade (μ ; gs/cm)	Difusividade (D_{AB} ; cm ² /s)
Gás P= 1 atm ; T= 21°C	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
Líquido P= 1 atm ; T= 15 - 30°C	1	10 ⁻²	<10 ⁻⁵
Supercrítico P=P _C ; T=T _C	0,3 – 0,8	10 ⁻⁴ – 10 ⁻³	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴

Fonte: Adaptado de HERRERO, CIFUENTES, IBAÑES (2006).

A extração supercrítica possui vantagens em relação as técnicas convencionais, pois possibilita o ajuste contínuo do poder de solvatação e, conseqüentemente da seletividade do solvente, não se utilizando de solventes orgânicos poluentes, desta forma, não necessitando de uma etapa posterior de eliminação do solvente (REVERCHON, DE MARCO, 2006). A utilização de solventes reconhecidos como seguros (GRAS, do inglês Generally Recognized As Safe), a alta eficiência em termos de processo de extração (no que diz respeito ao rendimento e tempos de extração) e a possibilidade de se acoplar diretamente cromatografia gasosa ou cromatografia com fluido supercrítico, proporciona o destaque deste método em relação aos convencionais (HERRERO, CIFUENTES, IBAÑES, 2006).

Zougagh et al. (2004) destacam as maiores vantagens da ESC em relação as demais técnicas:

a) Manifesta um alto coeficiente de difusão e baixa viscosidade. Como consequência, difusividade e solubilidade em tais fluidos tendem a ser muito maiores que nos líquidos, resultando em uma cinética de reação relativamente rápidos;

b) O poder de solvatação do fluido pode ser facilmente manipulado pela mudança na pressão ou temperatura, conseqüentemente, uma alta seletividade é obtida. Este poder de solvatação facilmente ajustável faz da ESC um processo de extração muito útil quando se trata de matrizes complexas;

c) Na ESC, o fluido puro é continuamente forçado a passar pela coluna de extração, fazendo com que todos os compostos da matriz possam ser extraídos nesse processo.

Como desvantagens podemos citar o alto custo de implementação do processo, em função dos equipamentos utilizados, a dificuldade de extração de compostos muito polares quando se utiliza somente CO₂ como solvente supercrítico, a necessidade de mão de obra qualificada bem como a periculosidade de se trabalhar a altas pressões (MELECCHI, 2005).

De acordo com Guindani et al. (2016), o maior custo em relação a operação de extração supercrítica esta ligado às utilidades, estando relacionado ao aporte de energia necessário para o funcionamento da bomba, água de resfriamento e vapor saturado para cada ciclo de extração. O custo com o investimento, atualmente, não é o custo predominante devido ao maior conhecimento e crescimento da tecnologia, o que tem tornado os equipamentos mais acessíveis (AGUIAR, 2012).

2.3.4.1 Curvas de extração supercrítica

Assim como para o sólido, para o solvente a extração é um processo transiente. O comportamento do processo pode ser observado pela determinação da quantidade de extrato pelo tempo de extração (BRUNNER, 1994).

A cinética de extração supercrítica geralmente é feita através da curva de extração, sendo apresentada como um gráfico de massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. A obtenção dessa curva depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante o período de extração. O comportamento das curvas de extração pode ser influenciado por alguns fatores, como vazão de solvente utilizada, tamanho de partícula formadora do leito, pressão e temperatura. É difícil realizar a comparação de curvas advindas de diferentes matérias-primas e equipamentos, mas informações fornecidas, como a duração da etapa de taxa constante de extração são úteis para se comparar uma série de experimentos levando em consideração o mesmo substrato e equipamento (BRUNNER, 1994).

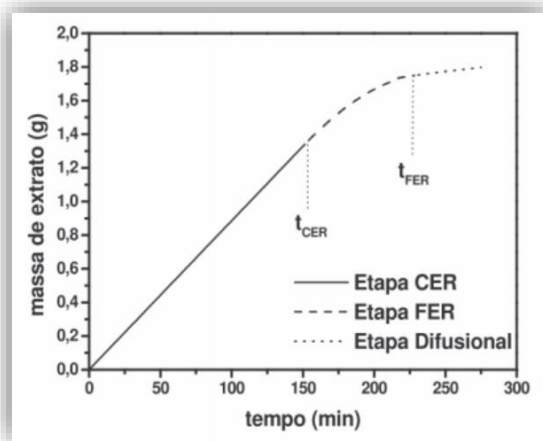
Diferentes mecanismos de transferência de massa controlam as curvas de extração, que podem ser divididas em três períodos: velocidade constante de extração (CER), velocidade decrescente de extração (FER), difusional (SOVOVÁ, 1994; BRUNNER, 1994; FERREIRA, MEIRELES, 2002):

a) Etapa com velocidade constante de extração: nesta etapa, a convecção é o mecanismo dominante e, portanto, a resistência à transferência de massa está na fase fluida, sendo que a superfície externa da partícula está coberta com soluto de “fácil acesso”;

b) Etapa com velocidade decrescente de extração: os mecanismos de transferência de massa por difusão e por convecção ocorrem em paralelo. Nesta etapa, ocorrem falhas na cobertura do soluto sobre a superfície externa, dando início a difusão presente no interior da partícula;

c) Etapa difusional: neste período a resistência a transferência de massa está na fase sólida. O soluto praticamente não mais se apresenta na camada externa das partículas.

Figura 4: Representação da curva de extração.



Fonte: (MARTÍNEZ, 2005).

Um dos objetivos da determinação da curva de extração é justamente a 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. Através da modelagem pode-se obter informações a respeito da pressão, temperatura e vazão de solvente, o que possibilita a ampliação de escala do processo de extração (SILVA, 2004; ANDRADE, 2015).

2.3.4.2 Fenômenos de transporte envolvidos

A extração supercrítica ocorre basicamente através de dois fenômenos: solubilização e separação. Durante a extração o solvente flui através do leito de partículas, solubilizando os compostos presentes na matriz, sendo carregados para fora do extrator, onde por meio da redução de pressão, ocorre a separação dos solutos do solvente (PEREIRA, MEIRELES, 2010).

No processo de ESC a transferência de massa e calor estão presentes. A capacidade do fluido em transportar a massa é determinada por sua viscosidade, enquanto que a capacidade de transportar energia é determinada por sua condutividade térmica e o transporte molecular é determinado pelo coeficiente de difusão. O aumento da pressão influencia diretamente estas propriedades de transporte (BRUNNER, 1994).

Muitos parâmetros influenciam no transporte de substâncias, como tamanho, geometria, distribuição de partículas e a distribuição inicial das substâncias dentro do substrato sólido. A distribuição das substâncias na partícula é variada, podendo estar absorvidas na superfície externa, sobre a superfície dos poros, uniformemente distribuídas dentro do sólido ou no interior das células vegetais. Cada uma destas distribuições possui influência no processo de extração. O fluido supercrítico passa através do leito e extrai os componentes até a matriz ser esgotada. A concentração do extrato aumenta na direção deste fluxo (BRUNNER, 1994).

De acordo com Brunner (1994), a extração de compostos solúveis de materiais vegetais sólidos ocorre em várias etapas paralelas e consecutivas:

- 1) A matriz da planta absorve o solvente supercrítico e outros fluidos são liberados. Isto ocasiona o inchaço das membranas e do interior das células do material, diminuindo a resistência ao transporte de massa;
- 2) Em paralelo, os compostos do extrato são dissolvidos pelo solvente;
- 3) Os compostos dissolvidos são transportados para a superfície externa do sólido, predominando o mecanismo de difusão neste caso;
- 4) Os compostos dissolvidos passam através da superfície do sólido, podendo ocorrer uma mudança de fase;

5) Os componentes são transportados da superfície do sólido para a massa de fluido supercrítico. Subsequentemente, ocorre a remoção dos compostos dessa massa de solvente.

A extração dos compostos do material sólido ocorre através do contato do substrato sólido com um fluxo contínuo do solvente supercrítico. O substrato sólido, na maior parte dos casos, forma um leito fixo, através do qual o fluido supercrítico flui e extrai componentes do produto até que o substrato seja empobrecido (BRUNNER, 1994).

2.3.5 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)

A extração com líquido pressurizado (ELP) baseia-se no uso de solventes a alta pressão e temperatura, mas sem alcançar seu ponto crítico. O maior objetivo dessa técnica é promover a extração de compostos de matrizes sólidas ou semi-sólidas em um curto período de tempo e usando uma pequena quantidade de solventes (VIGANÓ, et al., 2015). A ELP permite uma extração rápida e redução do consumo do solvente, é uma técnica distinta com baixo custo e baixo impacto ambiental, superando as desvantagens dos métodos convencionais (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

Na ELP se utilizam temperaturas que vão de 40 a 200 °C evitando atingir o ponto crítico do solvente, aumentando a cinética do processo durante a aplicação de pressões elevadas (35 a 200 MPa) para manter seus solventes no estado líquido (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). A maior vantagem da ELP é que o solvente pressurizado permanece no estado líquido mesmo que as temperaturas sejam superiores o seu ponto de ebulição. Essa condição melhora o poder de solvatação do líquido e a cinética de dessorção da matriz sólida. Além disso, assim como na ESC, o processo ocorre sem ter contato com luz ou oxigênio, sendo uma ótima alternativa na extração de compostos nutracêuticos (JU, HOWARD, 2003; MEIRELLES et al., 2012).

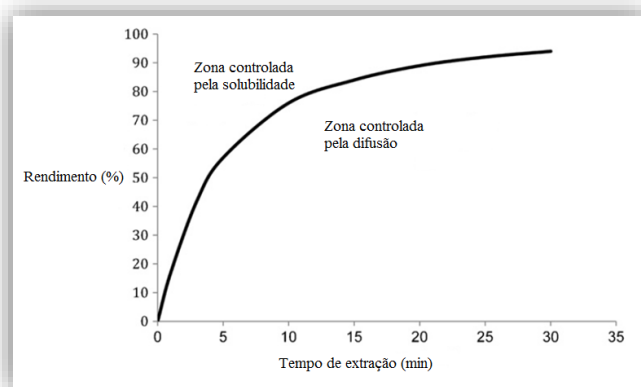
De acordo com Mustafa e Turner (2011), em 1995, a Dionex Corporation apresentou na Conferência Pittcon (principal conferência e exposição anual sobre ciência laboratorial) o primeiro equipamento de ELP, sendo apresentado como Tecnologia de Extração Acelerada com Solvente (*Accelerated Solvent Extraction - ASE®*). Esta técnica também é conhecida como a extração com líquido pressurizado, extração com solvente pressurizado e extração acelerada com solvente. Quando

utiliza-se água como solvente de extração, a técnica é denominada como Extração pressurizada com água quente (*Pressurized Hot-Water Extraction - PHWE*), extração com água sub-crítica ou de extração de água sobreaquecida.

Os processos de ELP podem ser divididos em dinâmicos e estáticos. No modo dinâmico o solvente é bombeado continuamente pelo extrator através da matriz, enquanto que a válvula de saída da célula de extração é mantida aberta (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). No modo estático, o solvente preenche o extrator, enquanto que a válvula de saída da célula de extração é mantida fechada, permanecendo em contato com a matriz durante um tempo determinado, sendo possível utilizar-se de vários ciclos de solvente. Embora a extração dinâmica seja mais eficiente que a estática, por evitar a saturação do solvente, a extração estática permite maior penetração do solvente nos nano e micro poros da matriz devido ao maior tempo de contato entre as fases (NIETO et al., 2010).

De acordo com Viganó et al. (2015), o processo de ELP pode ser dividido em dois estágios. O primeiro estágio corresponde ao período que a extração é controlada pela solubilidade enquanto que o segundo estágio é controlado pela difusão dos solutos no solvente. A Figura 5 apresenta a cinética da curva de extração do líquido pressurizado.

Figura 5- Cinética de extração com líquido pressurizado.



Fonte: Adaptada de MUSTAFA, TURNER (2011).

Mustafa e Turner (2011) destacam que em matrizes controladas pela difusão normalmente existem fortes interações entre matriz e analitos, ou caminhos de difusão longos demais para que os analitos possam passar através da matriz. Neste caso, a temperatura do solvente e o tamanho de partícula podem ser fatores importantes na melhora da eficiência de extração. Enquanto que em matrizes controladas pela solubilidade, as interações analito-matriz são bastante fracas e a taxa de extração depende, principalmente, da compartimentação do analito entre a matriz e o fluido de extração. Neste caso, o rendimento é melhorado utilizando extração em modo dinâmico.

A utilização de misturas de solventes pode auxiliar no aumento da solubilidade e interação com o composto de interesse e a utilização de temperaturas elevadas proporcionam maior rendimento da extração. O uso de alta temperatura promove a eficiência da extração e ajuda no rompimento das interações analito-amostra na matriz, diminuindo a tensão superficial do solvente, soluto e matriz, reduzindo a viscosidade do solvente líquido e promovendo um aumento na taxa de difusão (MUSTAFA; TURNER, 2011).

O desempenho das ELP depende muito do tipo de solvente, tempo de extração, pressão e temperatura. Destaca-se também a importância da natureza da matriz, as características específicas dos compostos alvo e sua localização dentro da matriz (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). A temperatura é o principal parâmetro responsável pela aceleração da extração. Temperaturas elevadas diminuem a viscosidade do solvente, ajudando-o a penetrar a matriz, e conseqüentemente melhorando o processo de extração. Além disso, a temperatura elevada diminui a tensão superficial do solvente, matriz e compostos, melhorando a penetração do solvente na matriz, possibilitando um maior contato entre solvente e compostos de interesse (MUSTAFA; TURNER, 2011). A utilização de temperaturas elevadas também aumenta o coeficiente de difusão aumentando as taxas de transferência de massa, no entanto, em algumas extrações, a utilização de temperaturas moderadas é preferível tendo em vista a degradação de compostos (CAMEL, 2001; NIETO et al., 2010).

A pressão é um parâmetro que não apresenta forte influência, tendo em vista que líquidos não são fluidos compressíveis (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). No entanto, quando a pressão de vapor dos componentes alvo é importante para sua solubilização no solvente, a pressão pode ter um papel muito importante no processo de ELP. Por outro lado, a utilização de altas pressões facilita a extração de

componentes situados no interior dos poros da matriz, devido a um aumento de pressão, forçando o solvente a penetrar em lugares onde a pressão atmosférica não seria possível (JIANG et al., 2007).

A extração com líquido pressurizado é uma alternativa aos métodos convencionais, uma vez que possibilita bons rendimentos e qualidade de extrato se utilizando de menor tempo de extração e quantidades de solvente reduzida, sendo mais amigável ao meio ambiente no que diz respeito a diminuição dos impactos ambientais (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

2.4 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

O interesse em produtos que possam não apenas alimentar, mas nutrir, tem sido despertado nos consumidores, bem como a busca por produtos e empresas que assumam responsabilidade ambiental. Desta forma, a busca por compostos bioativos de alta qualidade impulsiona as pesquisas por novas fontes de matérias-primas, como plantas e resíduos vegetais e por novos métodos de extração, que venham a ser mais seguros e limpos do ponto de vista ambiental.

Nos processos de extração de compostos com potencial bioativo a utilização de solventes se faz presente e de um modo geral, os solventes orgânicos são os mais utilizados, o que pode gerar uma grande quantidade de resíduos mesmo que se trabalhe com o reciclo de solvente. Logo, a pesquisa por solventes mais limpos do ponto de vista ambiental é muito importante, pois diminui os impactos proporcionando um produto de qualidade, como é o caso do uso de alguns flúidos supercríticos e líquidos pressurizados.

Neste trabalho estudou-se os resíduos da beterraba de mesa (*Beta vulgaris* L.), folha e talo. Esta raiz apresenta um grande potencial bioativo, graças a presença de antioxidantes, como a betalaina. É também utilizada como um remédio popular para o tratamento de doenças hepáticas e renais, estimulação do sistema hematopoiético e imunológico. Esse tipo de antioxidante, como apresentado na revisão bibliográfica, apresenta potencial na prevenção de doenças cardiovasculares e de vários tipos de cânceres, como de pele e fígado.

A realização deste trabalho é muito importante, uma vez que ainda não se tem estudos investigando o emprego de diferentes métodos de extração com diferentes solventes na obtenção de extratos com potencial bioativo para os resíduos de beterraba vermelha.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão relatados os materiais e métodos utilizados para a obtenção e preparo da matéria prima, sua caracterização físico-química, caracterização do leito de partículas, extrações à baixa e a alta pressão. Os ensaios foram realizados em sua maioria no LATESC, salvo a caracterização da matéria-prima (Laboratório de Análises – LABCAL, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFSC) e a composição dos extratos (Central de Análises EQA/UFSC).

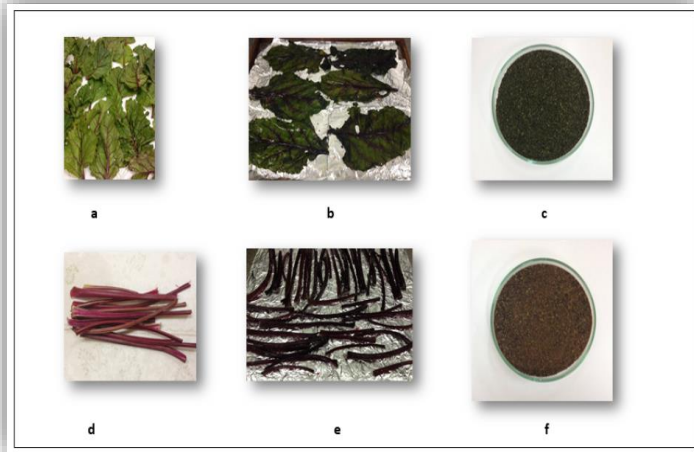
3.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS

Em dois lotes as folhas e os talos de beterraba foram colhidos e cedidos nos meses de novembro e dezembro de 2015, por produtores do oeste catarinense vinculados ao Viveiro Florestal Universitário da Unochapecó (Chapecó, SC) e ao Programa dos Trabalhadores Rurais Sem Terra (Abelardo Luz, SC). As folhas e talos apresentaram tamanho variado, com folhas na coloração verde arroxeada, estando íntegras e livres de pestes e manchas e os talos apresentavam-se na cor vinho. Realizou-se uma pré-lavagem para retirada de terra com água clorada, seguida de secagem superficial com papel toalha. As folhas foram separadas do talo manualmente, sendo divididas em lotes, embaladas em saco de polietileno, envoltas em papel alumínio, sendo congeladas em freezer doméstico (-18°C) e transportadas até Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para realização de análises experimentais.

A secagem das folhas e talos foi realizada em estufa com circulação de ar (DeLeo, Porto Alegre/RS, Brasil) na temperatura de 45 °C. O tempo de secagem para a folha foi de 10 h, enquanto que para o talo o tempo estabelecido foi de 24 h. O tempo foi determinado com base no teor de umidade obtido após a secagem, valores tratados nas seções 4.1.1 e 4.2.1, respectivamente. A matéria prima foi triturada em moinho tipo Willey (DeLeo, Porto Alegre/RS, Brasil). Em seguida, folhas e talos foram armazenados separadamente em pequenas porções, em sacos de polietileno, protegidas da luz através de uma camada de papel alumínio e congelada a -18°C em freezer doméstico. Todo o procedimento foi realizado visando ao abrigo da matéria-prima da luz,

reduzindo a oxidação das amostras. A Figura 6 mostra a matéria-prima *in natura*, desidratada e triturada.

Figura 6 – Folha de beterraba *in natura* (a); folha desidratada (b); folha triturada (c); talo *in natura* (d), talo desidratado (e) talo triturado (f).



Fonte: Autora.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS

As análises de caracterização das matérias-primas vegetais (teor de umidade e voláteis, cinzas, gordura, fibra bruta e proteína) foram realizadas no LABCAL.

A determinação do teor de umidade e compostos voláteis da folha e talo de beterraba desidratados foi realizada conforme as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), onde 5 g de amostra foram aquecidos a 105 °C por 3 h em cápsulas de alumínio, resfriados em dessecador e o processo repetido até se obter peso constante. O resultado foi expresso em g/100 g de amostra.

A quantificação do teor de cinzas foi realizada de acordo com IAL (2008), sendo que 5 g de amostra em cápsulas de porcelana, carbonizadas por 2 h em chapa elétrica e incineradas a 550 °C até eliminação completa do carvão, obtendo-se cinzas brancas.

A determinação de lipídios foi realizada através do método de extração direta em Soxhlet, 032/IV (IAL, 2008), onde 5 g de massa da

amostra foram colocadas em cartucho de papel filtro, sendo transferido para o extrator de lipídios (Extrator de lipídios Tecnal, TE-044), utilizando-se como solvente 150 mL de hexano (P.A, Lafan).

A quantidade de fibra bruta presente na matéria-prima foi determinada através de 2 g de amostra envolvidas em papel filtro e submetida à extração contínua em Digestor de fibra (Tecnal, TE 1468/50), de acordo com metodologia do IAL (2008). O resíduo foi aquecido em estufa para eliminação do solvente. Adicionou-se 100 mL de solução ácida e 0,5 g de agente de filtração, mantendo-se um refluxo por 40 min sob aquecimento. Posteriormente, filtrou-se em terra diatomácea, lavou-se com água fervente até não se observar reação ácida. Por fim, lavou-se com 20 mL de etanol e 20 mL de éter, aqueceu-se em estufa a 105 °C por 2 h e resfriou-se em dessecador com a operação sendo repetida até peso constante. Em seguida, o resíduo foi incinerado, sendo esta operação repetida até peso constante. O teor de fibra foi calculado pela perda de peso da amostra durante todo o processo.

As proteínas presentes nas folhas e talos da *Beta vulgaris* L. foram determinadas pelo método de Kjeldahl (RDC, 2003 – método n° 360). Assim, 0,2 g de foram adicionados de 2 g da mistura catalítica e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram colocados no bloco digestor a 450 °C, até que o conteúdo ficasse límpido e transparente (azul ou verde claro). Posteriormente, realizou-se a destilação da amônia e titulação do borato de amônio com ácido cítrico 0,1 N. Para os cálculos utilizou-se fator de conversão geral do nitrogênio em proteína de 6,25.

Os carboidratos foram determinados como a diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, fibra alimentar, umidade e cinzas.

3.2.1 Determinação da massa específica real das partículas (ρ_r)

A massa específica real foi determinada no LATESC em picnômetro com gás hélio (Micrometrics, Accu Pyc II 1340, São Paulo - SP). Esta técnica segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos. Nesta análise o hélio penetra nos poros da matriz sólida, determinando o volume verdadeiro de um sólido por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido. A utilização dessa técnica geralmente apresenta bons resultados, uma vez que o gás Hélio possui

uma baixa tensão superficial, penetrando nos poros da matriz vegetal sem alterar as características das partículas (GUINDANI, 2014)

3.3 Caracterização do leito de partículas da ESC

3.3.1 Determinação do diâmetro médio de partículas

Para determinar o perfil granulométrico das partículas, pesaram-se 100 g de amostra em balança semi-analítica (Gehaka, BG 2000, $\pm 0,02$ g São Paulo/SP). Posteriormente, as amostras foram dispostas em agitador de peneiras (Bertel Metalurgic, Caieiras/SP) e agitadas durante 30 min com peneiras da série Tyler de 20, 25, 32, 48, 65 e 80 Mesh (W.S. Tyler, Wheeling, EUA), em duplicata. A massa das frações retidas (x_i) foi medida e o diâmetro médio de partículas (D_p) foi calculado de acordo com as equações 1 e 2, propostas por Gomide et al. (1983):

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

$$x_i = \frac{m_i}{m} \quad (2)$$

Onde:

D_p = diâmetro médio superficial das partículas (mm);

D_{pi} = diâmetro médio da peneira i (mm);

M_i = massa de amostras retidas na peneira i (g);

m = massa total das peneiras (g);

n = número total de frações;

O diâmetro médio de partícula foi expresso em milímetro (mm).

3.3.2 Determinação da massa específica aparente do leito de ESC (ρ_a)

A massa específica aparente das partículas de folha e talo de beterraba foi determinada através da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume por ela ocupado no leito de ESC.

As massas das amostras foram medidas em balança analítica (Shimadzu, AY220, $\pm 0,0001$ g, São Paulo/SP), e o volume determinado através das medidas da altura e diâmetro do extrator com uso de paquímetro (Starrett, 125 MEA, Brasil $\pm 0,0002$ m). Utilizaram-se as

Equações 3 e 4, onde ρ_a é a massa específica aparente da amostra (g/cm^3), m é a massa (g), V é o volume (cm^3), A é a altura (cm) e r é o raio do extrator (cm).

$$\rho_a = \frac{m}{V} \quad (3)$$

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot A \quad (4)$$

3.3.3 Porosidade do leito de ESC (ε)

Sabendo os valores referentes a massa específica real e aparente das amostras de folha e talo da beterraba, a porosidade do leito (ε) de ESC pode ser calculada por meio da Equação 5:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (5)$$

Onde ε é a porosidade (adimensional), ρ_a é a massa específica aparente (g/cm^3) e ρ_r a massa específica real (g/cm^3) da amostra.

3.3.4 Determinação da massa específica do CO_2 supercrítico (ρ)

A massa específica do CO_2 supercrítico (ρ) nas condições de operação planejada foi determinada utilizando a equação de Angus, Armstrong e De Reuck (1976), baseada em dados experimentais, através de uma planilha eletrônica de cálculo. Este valor foi aplicado na avaliação da influência da pressão e temperatura na variação de massa específica do solvente.

3.4 EXTRAÇÕES A BAIXA PRESSÃO

As extrações a baixa pressão (EBP) são aquelas realizadas a pressão atmosférica com solventes. Os métodos de EBP foram realizados a fim de comparação com os meios de extração a alta pressão, em termos de rendimento dos extratos e potencial antioxidante e também com o objetivo de selecionar um cossolvente para utilização na ESC e como solvente na ELP, selecionando os solventes que apresentaram melhores resultados de rendimento, potencial antioxidante e/ou conteúdo de fenólicos totais.

Os solventes selecionados para os ensaios de extração a baixa pressão foram etanol (P. A. 99,8% NEON, Vila Prudente, São Paulo), hexano (P. A. Lafan, Várzea Paulista, São Paulo), água destilada e mistura de etanol P. A. e água na proporção de 1:1 (v/v). Os índices de polaridade e as constantes dielétricas desses solventes são apresentados na Tabela 4, conforme observa-se a seguir:

Tabela 4 - Índices de polaridade e constantes dielétrica dos solventes utilizados nas EBP.

Solvente	Índice de polaridade¹	Constante dielétrica²
Água	9,0	78,4
Etanol+Água	7,2	n.d.
Etanol	5,2	24,8
Hexano	0	1,9

Fonte: ¹Byers (2009); ²Gu et al. (2004); n.d.: não determinado.

Os extratos obtidos após a extração através dos aparatos de Soxhlet, maceração e ultrassom passaram por processo de eliminação do solvente, em rotaevaporador (Fitason, Mod. 801 e 802, São Paulo/SP) com arrefecimento por banho termostático na temperatura de 45 °C (Microquímica, MQBTZ99-20, Palhoça/SC). Após o processo de rotaevaporação, os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (Freezer 250, Brastemp, São Paulo/SP) a -18°C. As extrações foram feitas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

3.4.1 Extração em aparato Soxhlet (SOX)

A extração em aparato Soxhlet (SOX) foi realizada de acordo com a metodologia 032/IV do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). Foram utilizados 5 g de amostra para cada extração e 150 mL de solvente a ser utilizado, garantindo uma proporção de 1:30 (m/v). A temperatura do solvente foi mantida próxima da temperatura de ebulição do mesmo, proporcionando um gotejamento de 4 a 5 gotas por segundo, sendo a duração da extração de 8 h.

A estrutura do aparato é composta de manta de aquecimento (Fisatom 102E, São Paulo/SP), balão de fundo redondo (destilação) com solvente, aparato Soxhlet, cartuxo de papel filtro (poro 14 μ m) com amostra, condensador e banho termostático (Micro-Química, MQBMP-

01, Palhoça/SC.). A Figura 7 apresenta a extração realizada em aparato Soxhlet.

Figura 7: Extração de folha de beterraba em aparato Soxhlet.



Fonte: Autora.

3.4.2 Extração através de maceração (MAC)

A extração utilizando o processo de maceração foi realizada conforme adaptado de Oliveira (2015) à temperatura ambiente (25 °C) mantendo-se a proporção amostra-solvente igual a 1:5 (m/m). Foram medidas 5 g em balança analítica (Shimadzu, AY220, $\pm 0,0001$, São Paulo/SP) e 25 mL de solvente foram colocados em frasco âmbar. Os frascos foram fechados e mantidos ao abrigo da luz por 4 dias, sendo agitados uma vez ao dia manualmente. Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (Fisatom Brasil, 825T, São Paulo/SP) em funil de Buchner com papel-filtro e o filtrado recolhido em Kitasato. Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente através do rotaevaporador (como descrito na seção 3.4) e armazenados em freezer doméstico (Freezer 250, Brastemp, São Paulo/SP) a -18 °C. As extrações foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

3.4.3 Extração assistida por ultrassom (US)

Os parâmetros para US foram estabelecidos de acordo com os melhores resultados obtidos por Souza et al. (2016) na extração de compostos fenólicos de folhas de *Phyllanthus amarus* com água desionizada variando os parâmetros tempo, intensidade do ultrassom e

proporção solvente/amostra. Aproximadamente 5 g de matéria-prima foram pesadas em balança analítica (ShymadzuAY220, $\pm 0,0001$, São Paulo/SP) sendo adicionado 150 mL de solvente mantendo-se a proporção de solvente igual a utilizada na extração em aparato Soxhlet (1:30, m/v). O béquer com a amostra e o solvente foram dispostos no ultrassom (Eco-sonic QR500, Indaiatuba/SP) ajustando a altura da base de modo que a micro ponta ficasse 0,5 cm dentro da solução. A extração foi conduzida durante 7 min com uma potência de 500 W. O equipamento é apresentado na Figura 8. A diferença de temperatura (ΔT) foi acompanhada no início e no término da extração.

Após a extração o sistema foi filtrado com auxílio de uma bomba de vácuo (Fisatom, 825T, São Paulo/SP) em funil de Büchner com papel filtro, sendo o filtrado recolhido em Kitasato.

Figura 8 – Equipamento de Ultrassom.



Fonte: Autora.

Os filtrados obtidos foram submetidos ao processo de eliminação do solvente por rotaevaporador (como descrito na seção 3.4) e armazenados em freezer doméstico (Freezer 250, Brastemp, São

Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. As extrações foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

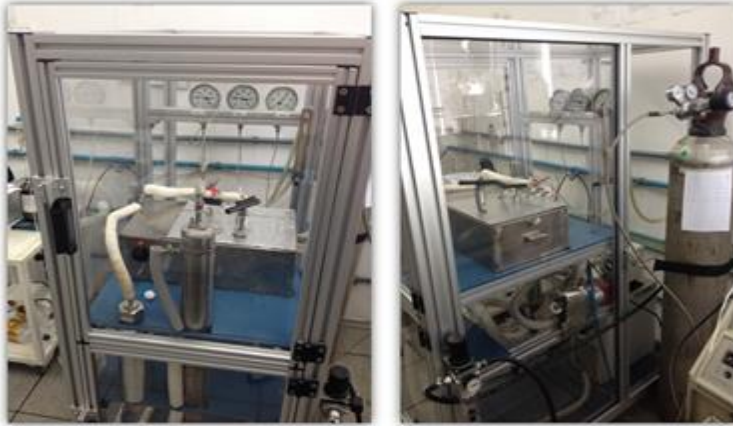
3.5 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

O método dinâmico de extração foi aplicado neste trabalho, tanto nos experimentos cinéticos quanto na determinação do rendimento global de ESC. De acordo com Ferreira et al. (1999), o método dinâmico é caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida.

3.5.1 Unidade de ESC

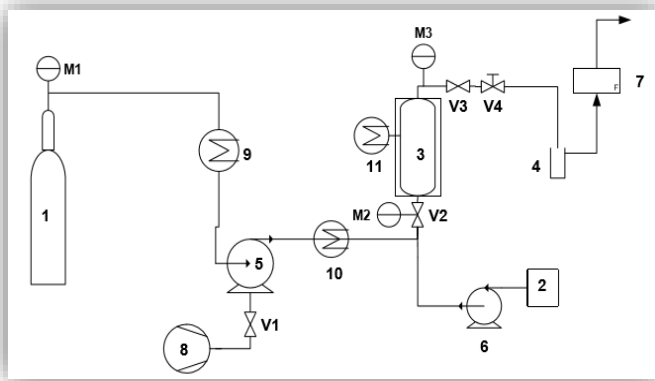
As ESC foram realizadas em uma unidade de extração desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH, Alemanha), apresentada na Figura 9 e descrita por Zetzl et al. (2003), e adaptada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC/UFSC). O equipamento opera até uma pressão de 300 bar e vazões de solvente variando de 1,67 g/min a 36,67 g/min. O fluido supercrítico utilizado como solvente foi o CO_2 com 99,9% de pureza, que provém de um cilindro equipado com tubo pescador (White Martins LTDA, Joinville/SC – Brasil), adicionado de cossolvente (etanol e a mistura etanol+água). As Figuras 9 e 10 apresentam a unidade de extração e um esquema detalhado dos componentes utilizados nesta unidade, respectivamente:

Figura 9 - Unidade de extração.



Fonte: Autora.

Figura 10 - Fluxograma da extração com fluido supercrítico



Fonte: Mazzutti, 2016.

Onde:

- 1 - Cilindro de CO₂;
- 2 - Reservatório de cossolvente;
- 3- Coluna de extração;
- 4- Frasco coletor;

- 5- Bomba de CO₂;
- 6- Bomba de cossolvente;
- 7- Rotâmetro;
- 8 - Compressor de ar;
- 9 - Banho de resfriamento do CO₂;
- 10 - Banho de aquecimento;
- 11 - Banho de aquecimento da coluna de extração;
- V1 – Válvula de entrada de ar comprimido na bomba;
- V2- Válvula de CO₂ no extrator;
- V3 – Válvula de saída de CO₂ no extrator;
- V4 – Válvula de expansão (micrométrica)
- M1 – Manômetro de controle do cilindro de CO₂;
- M2 – Manômetro de controle da bomba;
- M3 – Manômetro de controle do extrator.

3.5.2 Procedimento experimental

Como base para o procedimento de ESC, utilizaram-se literaturas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do LATESEC (ANDRADE et al. 2012; MEZZOMO et al. 2013, MAZZUTI, 2016). Conforme apresentado na Figura 10, a unidade de extração com fluido supercrítico consiste de um cilindro de dióxido de carbono com tubo pescador 99,9% de pureza (1) (White Martins, Joinville/SC), que alimenta diretamente a linha de extração com uma pressão de 60 bar. A linha de solvente (CO₂) é imersa em um banho termostático (Thermo Haake, C10 – K10, Niedersachsen/Alemanha) utilizando uma mistura de água e etileno glicol programado a uma temperatura inferior a 0°C (9), garantindo assim, que o mesmo esteja no estado líquido antes de sua entrada no multiplicador de pressão (5) (Maximator, *booster* M111, Niedersachsen/Alemanha), que trabalha sendo alimentado por uma linha de ar comprimido, filtrado e mantido na pressão mínima de 1 bar. A pressão na unidade de ESC é controlada através da pressão do ar comprimido, uma vez que a bomba opera a uma vazão de 1:130.

Durante o processo de extração, a bomba encaminha o CO₂ pressurizado a uma pressão estabelecida para a linha de extração, passando pelo extrator (3), o qual consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 32,90 cm de comprimento, 2,04 de diâmetro interno e 107,74 mL de volume, com as extremidades rosqueadas. A linha de

saída do extrator é mantida submersa em um banho de aquecimento com circulação (Microquímica, MQBTZ99 – 20, Palhoça/SC) a uma temperatura de 65 °C (10), evitando o congelamento da linha e da válvula agulha micrométrica (V4) durante o processo de despressurização da mistura soluto/solvente. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (Thermo Haake, DC30 – B30, Niedersachsen / Alemanha) (11).

No início do processo de extração as válvulas V2, V3 e V4 permanecem fechadas, o cilindro (1) é aberto e o *booster* (5) é acionado através da regulagem do ar comprimido (V1) que entra na bomba que estabelece a pressão de trabalho desejada, ou seja, multiplica a pressão do ar comprimido para o sistema na ordem 1:130. Após o estabelecimento da pressão desejada, o fluxo de CO₂ é aberto e mantido constante através da regulagem das válvulas V3, conectada na saída do extrator, e V4, na despressurização da mistura solvente + solutos. Após passar pela V4, o CO₂ é expandido a gás, soluto é precipitado e coletado em fracos âmbar (4) e a vazão de CO₂ é medida através do rotâmetro (Automation Products, ABB 10A61) (7). Para a utilização de cossolvente, a bomba de líquidos (6) (Waters 515 HPLC, UK) é conectada a linha antes da entrada do extrator e a mistura de solventes se realiza através de adaptador antes da entrada do extrator.

3.5.3 Experimentos cinéticos

A curva global de extração fornece informações sobre o comportamento cinético da ESC, possibilitando a determinação do tempo mais viável para um processo. Foram realizados dois ensaios cinéticos apenas com a folha de beterraba e CO₂ puro, conforme apresentado na Tabela 5, com o objetivo de determinar o tempo ideal de extração dos compostos da folha de beterraba. A temperatura foi determinada tendo em vista a não degradação dos compostos fenólicos. Foram utilizados 15 g de folha de beterraba seca e moída, medidos em balança analítica (Shimadzu, AY220, São Paulo/SP). Os frascos âmbar utilizados para coleta de extrato foram previamente pesados em balança analítica (Shimadzu, AY220, São Paulo/SP). A coleta dos extratos foi

realizada em tempos pré-determinados, conforme os parâmetros para cada ensaio cinético apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros para ensaios cinéticos da folha de beterraba a uma vazão de 0,5 kg CO₂/h.

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
E1	200	45
E2	300	55

As curvas cinéticas de extração foram construídas através da obtenção da massa de extrato acumulado em função do tempo de processo. As extrações foram encerradas em um tempo de 6,5 h para E1 e em 5,5 h para E2, como será detalhado posteriormente na seção 4.6. Desta forma, através da literatura, definiram-se os parâmetros de extração, com a utilização de cossolvente. Com base em alguns trabalhos realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), os parâmetros massa de amostra, temperatura de extração, vazão (ALMEIDA et al., 2012), tempo e pressão (MICHIELIN et al., 2009) foram pré-determinados. A massa utilizada em todos os experimentos de ESC foi de 15 g, temperatura igual a 40 °C, vazão de 0,5 kg CO₂/h e pressão de 250 bar durante 4 h.

3.5.4 Emprego de cossolvente

Para adição de cossolvente à extração supercrítica (ESC-CS), utilizou-se uma bomba de cossolvente (Waters 515 HPLC, UK) que trabalha em vazões de 0,1 a 10 mL/min, acoplada ao equipamento de ESC. Como solventes de extração foram utilizados etanol (EtOH) e uma mistura Etanol+Água 90:10 (v/v) (EtOH+H₂O). As condições de concentração foram 4, 7 e 10 % (m/m), calculadas em relação a massa total de CO₂ utilizado. O rendimento global de extração (X_o) foi calculado através da razão de massa de extrato obtida e a massa de matéria-prima utilizada para formar o leito.

A escolha dos solventes utilizados como cossolvente baseou-se nos resultados obtidos nas EBD quanto ao rendimento e conteúdo de fenólicos totais, enquanto que a concentração de cossolvente foi determinada com base em testes realizados, onde verificou-se que, a

quantidade máxima de cossolvente água que a matriz suportava durante o tempo de extração era de 10 %.

3.6 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (ELP)

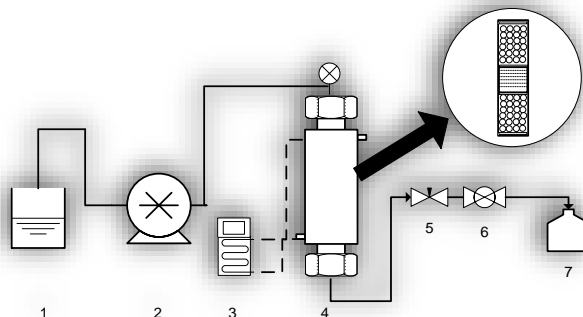
Na ELP, assim como na ESC, o método de extração empregado foi o dinâmico, que consiste na passagem contínua do solvente através do leito de partículas dentro de uma coluna de extração. Este método de extração foi empregado apenas para a folha de beterraba seca e moída. Nesse estudo, foram utilizadas duas unidades experimentais de extração com líquido pressurizado com diferentes volumes, conforme será mostrado a seguir.

3.6.1 Unidade de ELP em escala maior (LP1)

Inicialmente, as extrações de líquido pressurizado foram realizadas em uma unidade adaptada do equipamento de ESC descrita por Zetzi et al. (2003), no presente trabalho nomeada de LP1, que se encontra no Laboratório LATEC. O equipamento, ilustrado esquematicamente na Figura 11, foi adaptado a fim de flexibilizar o uso da unidade para outros propósitos.

Na unidade de líquido pressurizado o solvente (1) é bombeado através de uma bomba de cromatografia líquida de alta eficiência (2) (Waters 515 HPLC, UK) que opera até pressão máxima de 340 bar e vazões variando de 0,001 a 10,000 mL/min, passando através da coluna de extração (4), a qual é aquecida por um banho termostático (3) (MQBMP-01, Microquímica, Palhoça/SC) que assegura a temperatura de processo. A coluna de extração constitui-se de um cilindro de aço inox encamisado de 34,0 cm de comprimento, 2,2 cm de raio com extremidades rosqueadas. Uma válvula de bloqueio (5) (HIP, 10-11NFA-REG, PA USA) e uma válvula *black pressure* (6) (Tescom, UK) foram utilizadas para controlar e manter a pressão do sistema.

Figura 11 - Fluxograma de extração com líquido pressurizado LP1. (1) Suprimento do solvente; (2) Bomba de Solvente; (3) Banho termostático; (4) Coluna de extração com manômetro; (5) Válvula de bloqueio; (6) Válvula *back pressure*; (7) Recipiente de coleta do extrato. (Destaque para o preenchimento da coluna de extração).



Fonte: Autora.

3.6.2 Ensaios cinéticos

Os ensaios cinéticos de ELP foram realizados com adaptações da metodologia proposta por Trentini et al. (2015). Os parâmetros para os ensaios estabeleceram-se em temperatura e vazão de líquido constantes de 40 °C e 3 mL/min, respectivamente, e com as pressões de 75, 100 e 125 bar. A célula de extração foi aquecida previamente, preenchida com algodão, esferas de vidro (aproximadamente 40 mL) e 5 g de amostras aferidas em balança analítica (SHIMADZU, AY220, São Paulo/SP), conforme detalhe do empacotamento do leito da célula visualizado na Figura 11, que visa não formação de caminhos preferenciais no leito de extração. Após o acionamento da bomba de cromatografia na vazão desejada, a célula de extração foi preenchida com o solvente e pressurizada. As válvulas permaneceram fechadas até que a pressão de processo, visualizada no manômetro seja atingida e, neste momento, abre-se a válvula de bloqueio lentamente até que a pressão possa ser controlada de modo que a bomba de solvente não desarme ao atingir a pressão máxima programada. A *back pressure* é aberta controlando a pressão do sistema e dá-se início a extração. O solvente entra em contato com a amostra solubilizando os compostos e os carregando através do

sistema, sendo coletado em frasco âmbar (previamente pesados) no final da linha.

O extrato foi coletado de 3 em 3 minutos e após 12 minutos de extração a cada 5 minutos, totalizando 122 minutos de ensaio. O extrato recolhido foi rotaevaporado, conforme procedimento descrito na seção 3.4, e armazenado posteriormente em freezer (Freezer 250, Brastemp, São Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.3 Determinação do rendimento global de extração com ELP

O leito de extração para os ensaios de determinação de rendimento de ELP, como pode ser visualizado na Figura 11 foi formado de maneira similar ao procedimento de empacotamento para os ensaios cinéticos (seção 3.6.2). As extrações utilizaram aproximadamente 5 g de folha de beterraba, aferidas em balança analítica (Shimadzu, AY220, São Paulo/SP), e foram aplicadas pressões de 75, 100 e 125 bar, temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e vazão de 3 mL/min, utilizando etanol como solvente durante 90 minutos. Posteriormente, a melhor condição de extração, dentre as diferentes pressões, foi determinada avaliando a qualidade do extrato (procedimentos descritos nas seções 3.7.1 a 3.7.4), foi reproduzida avaliando o tipo de solvente, ou seja, utilizando mistura de etanol e água nas proporções de 90:10 e 70:30 (v/v), respectivamente. O rendimento global de extração (X_o) foi calculado através da razão de massa de extrato obtida após rotaevaporação (conforme seção 3.4) e a massa de matéria-prima utilizada para formar o leito, como segue na seção 3.7. Os ensaios foram realizados em duplicata.

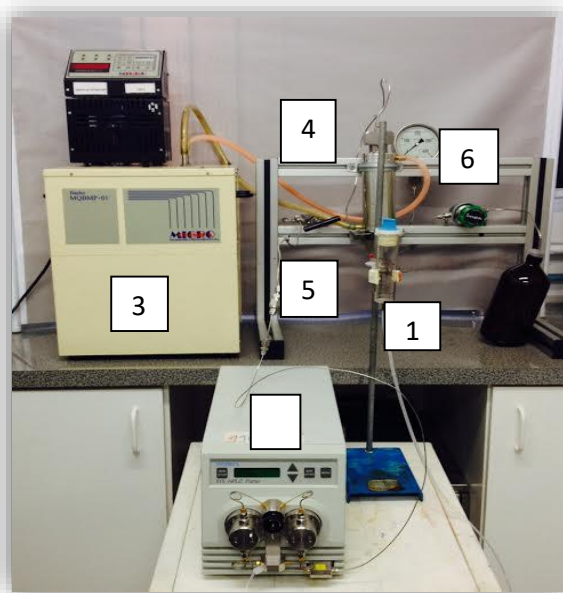
3.6.4 Montagem e testes de equipamento de ELP em escala menor (LP2)

A construção de uma segunda e mais compacta unidade de ELP foi realizada no LATEC, baseada no equipamento descrito por Santos et al. (2012). Essa unidade mais compacta, denominada neste trabalho por LP2, apresenta uma célula de extração de menor volume (30,7 mL) do que a apresentada no LP1 e, portanto, reduz o volume de solvente utilizado durante a extração. Todas as ligações do sistema são feitas de tubos de aço inoxidável 1/8". Uma foto do equipamento LP2 é apresentado na Figura 12.

O extrator LP2 foi construído de maneira que se possa trabalhar com os modos de extração dinâmico e estático. Para se trabalhar com o modo estático de extração, além da válvula de bloqueio já instalada na entrada da célula de extração, outra válvula de bloqueio pode ser facilmente adicionada na saída da célula.

O equipamento LP2 constitui-se de uma bomba de solvente (2) (Waters 515 HPLC *pump*, UK), um banho termostático (3) (Microquímica, model MQBMP-01, Palhoça, Brazil) válvula de bloqueio macrométrica (5) (HIP, model 10-11NFA, USA), manômetro na entrada da coluna (Wika, Germany) coluna de extração de aço inoxidável 316 L encamisada (4) com extremidades rosqueadas (AISI 316, projetada e desenvolvida por Souza (2015), válvula *back pressure* (6) (Swagelok, KPB series, UK). Neste equipamento utilizou-se a pressão de 100 bar, vazão de 3 ml/min, temperatura de 40 °C por 90 minutos, utilizando etanol como solvente.

Figura 12 - Unidade de líquido pressurizado LP2. (1) Suprimento de solvente; (2) Bomba de solvente; (3) Banho termostático; (4) Célula de extração; (5) Válvula de bloqueio; (6) Válvula *back pressure*.



Fonte: Autora.

3.7 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0)

O rendimento global de extração (X_0) foi calculado através da razão de massa de extrato (M_{extrato}) obtida e a massa de amostra (M_{amostra}) utilizada para realizar a extração. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

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

3.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

As determinações do conteúdo de fenólicos totais e do potencial antioxidante dos extratos de folha e talo de *Beta vulgaris L.* foram realizadas no LATESC. O potencial antioxidante *in vitro* dos extratos foi avaliado por três técnicas distintas, sendo elas: método do radical DPPH, método FRAP de redução do ferro e ABTS. A determinação do conteúdo de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu.

Tendo em vista a grande diversidade química existente, principalmente entre os compostos fenólicos, vários ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras. Entre esses diversos métodos e sistemas de solventes para a extração de compostos antioxidantes em vegetais, existem alguns fatores que afetam o processo, como: tipo de solvente e polaridade que pode afetar a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio e a presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006 *apud* BERGAMASCH, 2010).

Os métodos *in vitro* são potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato. Dentre os métodos espectrofotométricos *in vitro* mais utilizados estão o ensaio do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), autooxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico, método ABTS (2,2-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (ROBARDS, 2003).

O ensaio do DPPH tornou-se bastante popular no estudo de antioxidantes naturais, sendo uma das razões por ser apresentar como um método simples e altamente sensível, preciso para uso em frutas e

extratos vegetais (ATMANI et al., 2009). O ensaio ABTS pode avaliar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, vale ressaltar que a reação com doadores de hidrogênio apresenta baixa seletividade, e dependendo do composto, como por exemplo, alguns polifenóis e produtos de origem natural, a reação com ABTS é muito lenta podendo influenciar no resultado (SURVESWARAN, et al., 2007). Ambos, DPPH e ABTS são eficientes na determinação de compostos antioxidantes primários. O método FRAP oferece resultados rápidos e reprodutíveis, baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , sendo aplicado na identificação de compostos antioxidantes secundários (BERGAMASCHI, 2010). Levando em consideração a variedade de compostos, a utilização de mais de uma metodologia para análise do potencial antioxidante se faz necessária.

3.8.1 Conteúdo de fenólicos totais (CFT)

A determinação do conteúdo de fenólicos totais (CFT) presentes nos extratos de folha e talo de *Beta vulgaris* L. foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (KOSAR et al., 2005; SINGLETON et al., 1999). Para este método avaliou-se também o CFT das amostras secas *in natura*, folha e talo, preparadas através do padrão internacional (ISO 14502-1) para determinação de substâncias características de chá verde e preto.

Para a construção da curva analítica padrão de ácido gálico, preparou-se uma solução estoque de 0,02 mg/mL de ácido gálico monihidratado (≥ 98 % de pureza, Sigma Aldrich) em água destilada. Em tubos de ensaio foram preparadas as diluições do padrão nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$. A reação de oxidação foi realizada em tubos de ensaio de 10 mL, sendo transferidos para estes 100 μL de cada uma das frações, com exceção do branco, através de micropipeta 6000 μL de água destilada e 500 μL do reagente fenol de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma Aldrich). Após 30 s e antes de 8 min, foram adicionados 1500 μL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v) P.A. (Lafan). Para completar o volume de 10000 μL foram adicionados 1900 μL de água destilada, os tubos foram agitados em vórtex, incubados ao abrigo da luz em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por 2 h para que a reação ocorresse. A absorvância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (Femto 800 XI). A curva analítica de ácido gálico foi representada

através do gráfico de absorvância *versus* concentração de ácido gálico (mg/L) e está apresentada no Apêndice A.

Os extratos de folha e talo de *Beta vulgaris* L. avaliados foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A. (NEON) na fração final de 1,667 mg/mL em frascos âmbar, com utilização de banho indireto de ultrassom (Sonicator Unique USC 2500) durante 10 min para total solubilização das amostras. Seguiu-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva analítica de ácido gálico com 100 µL de cada amostra. Os valores de absorvância encontrados para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva analítica, e o CFT foi determinado através da diferença entre o valor da absorvância e do controle da amostra, a absorvância foi substituída na equação do ácido gálico e o valor da concentração (C) foi calculado. Em seguida, o CFT foi calculado conforme a Equação 6. Os ensaios foram realizados em triplicada e os resultados expressos em miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg_{EAG}/g_{extrato}), como média ± desvio padrão.

$$\text{CFT (mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}) = \frac{C \cdot 1000}{C_{\text{extrato}}} \quad (6)$$

Onde CFT corresponde ao conteúdo de fenólicos totais (mg_{EAG}/g_{extrato}), C é a concentração (mg/L) equivalente ao ácido gálico e C_{extrato} à concentração do extrato (mg/L).

3.8.2 Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH

O potencial antioxidante determinado pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Mensor et al. (2001). Este ensaio se baseia no potencial antioxidante de uma substância em sequestrar o radical, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada à solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança na coloração do violeta ao amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

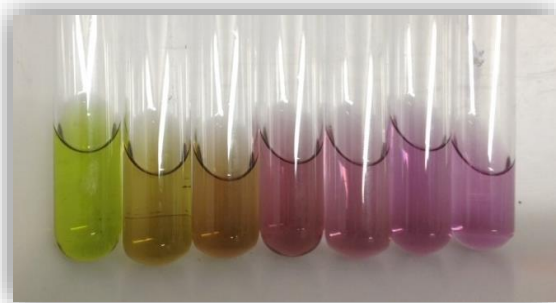
Os extratos de talo e folha de *Beta vulgaris* L. foram diluídos em etanol P.A na concentração de 1 mg/mL em frascos âmbar com a utilização de banho indireto de ultrassom (Sonicador Unique USC 2500) durante 10 min sem aquecimento, para melhor solubilização, produzindo a “solução mãe de extrato”.

A solução de DPPH foi preparada em uma concentração de 0,3 mM, a partir da solução mãe de extrato, sendo preparadas diluições com etanol como solvente de 0 a 500 µg/mL para as extrações feitas da folha e de 0 a 900 µg/mL para as de talo, totalizando 2,5 mL. Em cada tubo, adicionou-se 1 mL do radical DPPH 0,3 mM. Os tubos foram homogêneos em vórtex e incubados ao abrigo da luz durante 30 min. A leitura da amostra ($Abs_{amostra}$) foi feita em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm. O controle da amostra ($Abs_{controle}$) continha etanol puro e os tubos em branco (Abs_{branco}) continham extrato e etanol, num volume de 3,5 mL. Com os valores das respectivas absorbâncias, o potencial antioxidante (PA%) foi calculado conforme a Equação 7. Na Figura 13, apresenta-se a amostra referente à extração em aparato Soxhlet da folha com etanol como solvente, demonstrando a mudança da coloração do violeta para o amarelo/esverdeado, representando o consumo do radical.

$$PA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (7)$$

Após a determinação do PA, calcula-se a concentração efetiva para reduzir em 50% a atividade oxidativa do radical DPPH (CE_{50}). Para se calcular o CE_{50} , conforme descrito por Maia (2016), é necessário plotar o gráfico da concentração de extrato versus a absorbância. Se a PA equivalente a 50% estiver contida nos pontos, com coeficiente de regressão próximo a 1, considerando também que $20\% < PA < 80\%$, obtém-se a equação da reta, substitui-se o y por 50%, calculando dessa forma o CE_{50} (x).

Figura 13 - Mudança de coloração do meio reacional de captura do radical DPPH.



Fonte: Autora.

3.8.3 Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS

Inicialmente, preparou-se o radical $ABTS^+$ a partir da reação de 5 mL da solução estoque ABTS (Sigma Aldrich) 7 mM preparado com água com 88 μ L da solução de persulfato de potássio (Vetec) 140 nM preparada em água. A solução foi armazenada ao abrigo da luz durante 16 horas para estabilização do radical. No momento em que se iniciou a análise, alíquotas do radical foram diluídas em etanol até obter-se uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a $734 \pm 0,05$ nm.

Os extratos de folha e talo de *Beta vulgaris* L. foram diluídos em etanol P.A. Posteriormente, as soluções de extrato foram preparadas em frasco âmbar utilizando banho indireto de ultrassom (Sonicador Unique USC 2500), durante 10 min, auxiliando na solubilização do extrato. Quatro concentrações em etanol da solução de extrato foram preparadas e o meio reacional consistiu na adição de 30 μ L da diluição do extrato em 3 mL de radical $ABTS^+$. Os tubos foram armazenados ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 6 min, sendo feita a leitura das absorbâncias a 734 nm.

A curva padrão trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma Aldrich) foi construída através de uma solução estoque de trolox 2 mM com etanol PA (NEON), realizando diluições a partir desta solução nas concentrações de 100, 500, 1000 e 1500 μ M. Do mesmo modo que realizou-se para o extrato, o meio reacional da curva padrão trolox foi realizada, adicionando-se 30 μ L de cada uma das concentrações mais 3 mL de radical $ABTS^+$, os tubos foram

armazenados ao abrigo da luz após agitação em vórtex por 6 min, sendo realizada leitura em espectrofotômetro a 734 nm.

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 determinada 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 8).

$$y = ax + b \quad (8)$$

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 8, dividiu-se por 1000 para ter o valor em g (Equação. 9). O resultado final foi calculado pela divisão de 1000 (μM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 1 (g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em μmol trolox / g de extrato (Equação 10).

$$X \text{ (g)} = \frac{x}{1000} \quad (9)$$

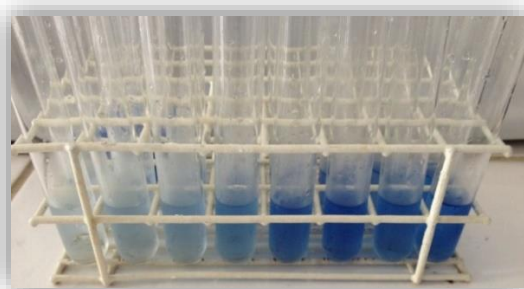
$$Z = \frac{1000}{X(g).1} \quad (10)$$

3.8.4 Potencial antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Inicialmente preparou-se a solução de Trolox 2 mM para construção da curva padrão. Foram feitas diluições de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 μM . Dessas diluições, passou-se 200 μL para tubos de ensaio mais 200 μL da solução de Cloreto Férrico Anidro 3 mM em duplicata. Os tubos foram agitados manualmente e colocados em banho maria a 37 °C por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 3,6 mL da solução de TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine) (Sigma Aldrich) e os tubos foram homogeneizados em vórtex e colocados em banho de gelo por 10 min para estabilização da reação. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (FEMTO, 800-XI) no comprimento de onda de 620 nm. Para construção da curva, plotou-se a

concentração de Trolox μM no eixo “x” e as respectivas absorbâncias no eixo “y”, calculando a equação da reta. A curva é apresentada no Apêndice A e abaixo, a Figura 14 mostra o aspecto da curva padrão de trolox para o TPTZ.

Figura 14 – Curva padrão de trolox para o TPTZ.



Fonte: Autora.

Para o preparo das “soluções mãe”, dissolveu-se 0,01g de extrato de folha e talo de *Beta vulgaris* L. em 5 mL de álcool etílico P.A. Utilizou-se de ultrassom durante 5 min sem aquecimento, para melhor solubilização dos extratos. O meio reacional foi preparado semelhantemente a curva padrão de Trolox, sendo que, 200 μL de solução mãe foram pipetados em triplicata em tubos de ensaio, adicionando-se de 200 μL de Cloreto Férrico Anidro 3 mM, para o branco, ao invés da solução mãe, adicionou-se 200 μL de álcool etílico P.A., os tubos foram agitados manualmente e colocados em banho-maria a 37 °C durante 30 min. Após isso, adicionou-se 3,6 mL de TPTZ aos tubos e agitou-se em vórtex, sendo colocados em banho de gelo por 10 min. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (FEMTO, 800-XI) a 620 nm.

Para os cálculos utilizaram-se as Equações 11 e 12.

$$C_{\mu\text{mol/L}} = \frac{(Abs - Abs_b) - A}{B} \quad (11)$$

$$C_{\mu\text{mol/g de amostra}} = C_{\mu\text{mol/L}} * 100 * (1/C_{\text{solução-mãe}}) \quad (12)$$

Onde: Abs é a absorvância da amostra e Abs_b é a absorvância do branco, A e B são os coeficientes da reta, C_{μmol/L} é a concentração obtida na equação 8 e C_{solução-mãe} é a concentração da solução-mãe (m/V).

3.9 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

O perfil de compostos voláteis dos extratos de folha e talo de beterraba foi realizada na Central de análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com 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 extratos que apresentaram maior quantidade de CFT e os de maior rendimento foram escolhidos para a realização desta análise. Adicionou-se 0,1 g de extrato aos vials, sendo adicionados 3 mL de NaCl 15 % (m/v) (Vetec).

A análise foi estática e utilizou um PAL Syr HS 2,5 mL para Combi-PAL. Para a amostragem de headspace pelo sistema de amostragem automático foi utilizado um injetor de amostra Combi PAL. A instrumentação consistiu em utilizar um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (GC Sampler 80 789 A GC system; 5975 MSD) equipado com coluna HP-5 mS 19091S-433 (dimensões: DI 0,250 mm, comprimento 30 m, film 0,25 μm) com fase estacionária de sílica com (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane. A temperatura do detector foi programada para 35 °C por 2 min, aumentando para 80 °C a 2 °C/min, para 150 °C a 4 °C/min, para 230 °C a 8 °C/min, e 230 °C (2 min). A temperatura do injetor era de 250 °C. O gás de arraste foi o hélio a uma vazão de 1 mL/min. O modo de injeção foi splitless e o volume de amostra injetado foi de 1000 μL. A temperatura da interface foi de 240 °C e a faixa de massa de aquisição foi de 35-550 m/z.

A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação dos espectros de massa armazenados na biblioteca NIST (Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology – Mass-spectral library with Windows Search Program) do sistema de dados de CG-MS. A composição percentual de cada componente foi determinada a partir da área do componente dividida

pela área total de todos os componentes isolados sob estas condições. Apenas compostos com confiabilidade ≥ 70 % foram considerados.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento global de extração, conteúdo de fenólicos totais e potencial antioxidante, pelas diferentes metodologias, foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA). Ao serem verificadas diferenças significativas ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey. Dessa forma, a análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de rendimento de extração, conteúdo de fenólicos totais e potencial antioxidante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção será dividida entre os resultados referentes a extração da folha de beterraba (seção 4.1) e extração do talo de beterraba (seção 4.2). Os resultados foram apresentados desta forma de modo a facilitar a discussão dos mesmos, uma vez que, embora sejam parte integrante da mesma hortaliça, representam partes vegetais distintas e, assim, apresentaram resultados diferentes. É importante ressaltar que os ensaios realizados para ESC do talo foram escolhidos com base nos melhores resultados apresentados pelos extratos da folha.

4.1 FOLHA DE BETERRABA

4.1.1 Caracterização da matéria-prima e do leito de partículas

Como pode ser visualizado na tabela 6, a desidratação das amostras promoveu uma grande perda de água e voláteis, resultando num valor de 8,48 (g/100g), uma vez que Monteiro (2009) retratou para a folha *in natura* um valor de umidade de 91,76 (g/100g). A folha desidratada apresentou carboidratos e proteínas como seus constituintes majoritários, o que já era esperado por se tratar de uma matéria-prima fibrosa e de alto valor nutritivo.

Os valores para carboidratos, proteína, gordura, fibra e cinzas encontrados neste trabalho apresentam variação em relação aos descritos na literatura para folha *in natura* (MONTEIRO, 2009), onde foi encontrado 43,20 g/100g, 4,73 g/100g e 14,20 g/100g para proteína, carboidratos e fibras, respectivamente em base seca. Em comparação com os valores para raiz crua apresentada pela Tabela de Composição Nutricional (UNICAMP, 2006), de 86 %, 13,57 g/100g, 0,71 g/100g, 79,28 g/100g, 24,28 g/100g, 0,9 g/100g para umidade, proteínas, lipídios, carboidratos, fibras e cinzas, respectivamente em base seca.

Em estudo realizado por Tivelli et al., (2011) para parte aérea, foram apresentados valores de 90,9 %, 24,17 g/100g, 3,30 g/100g, 50,55 g/100g, 14,28 g/100g e 21,98 g/100g para umidade, proteínas, lipídios, carboidratos totais, fibras e cinzas, respectivamente em base seca; e em trabalho de Melo e Farias (2014), para folha e talo de beterraba os

valores encontrados em base seca para cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos, respectivamente, foram de 22,22g/100g, 23,00 g/100g, 0,64 g/100g e 54,02 g/100g.

A diferença dos resultados obtidos para a composição nutricional da folha de beterraba em comparação com outros trabalhos da literatura, pode ser condicionado a existência de inúmeras variáveis como: plantio, colheita, solo, intensidade solar, chuvas, entre outros, mesmo se tratando da mesma matéria-prima.

Tabela 6 – Composição nutricional da folha de beterraba seca.

Nutriente	Composição (g/100g)
Carboidratos totais	36,77
Proteína	25,13
Gordura (lipídios)	4,22
Fibra bruta (matéria fibrosa)	6,72
Umidade e voláteis	8,48
Cinzas	18,78

Na Tabela 7, são apresentados os valores para cada parâmetro referente ao leito de partículas formado pela folha de beterraba. O valor apresentado pelas partículas da folha (0,258 mm) está de acordo com Reverchon e Marco (2006), os quais afirmam que o valor médio a ser utilizado em extrações supercríticas está entre 0,25 – 2 mm.

O percentual médio retido em cada peneira, para a folha de beterraba foi: 1,71% (20 Mesh), 1,49 % (25 Mesh), 19,53 % (32 Mesh), 45,57 % (48 Mesh), 22,26 % (65 Mesh) e 9,44 % (80 Mesh), indicando que a maioria das partículas ficou retida na peneira de 0,3 mm de abertura (48 Mesh). Quanto menor o tamanho das partículas, maior será o rendimento de extração obtido (BRUNNER, 1994), isso acontece devido ao fato de que um menor tamanho de partículas promove uma maior área de exposição do soluto ao solvente.

Tabela 7 – Caracterização do leito de partículas para a folha de beterraba.

Parâmetro	Valor
Diâmetro médio das partículas (mm)	0,2580
Massa específica real (g/cm ³)	1,4724±0,0008
Massa específica aparente (g/cm ³)	0,2830
Porosidade	0,8077

Os valores de massa específica real e porosidade são bem próximos aos encontrados por Almeida (2006) para folha de hortelã, onde obteve 1,4409 g/cm³ para massa específica real e 0,8956 para porosidade. Os valores referentes a massa específica aparente obtidos por Maia (2016) com a mangaba, Andrade (2015) com pimenta-do reino e pimenta rosa e Guindani (2014) com torta de semente de chia são superiores a folha de beterraba, com 0,5603 g/cm³, 0,6470 e 0,3700 g/cm³ e 0,4700 g/cm³, respectivamente.

4.1.2 Cinética de ESC

A cinética de ESC foi realizada e utilizada para a definição do tempo de extração e parâmetros para os ensaios de rendimento, nas diferentes condições de operação. Desta forma a cinética de ESC foi realizada com a folha de beterraba em duas condições: 200 bar/45 °C ($\rho_{CO_2} = 0,812 \text{ g/cm}^3$) e 300 bar/55 °C ($\rho_{CO_2} = 0,850 \text{ g/cm}^3$), mas apenas com a segunda condição obteve-se extrato, em pouca quantidade e no momento da despressurização, provavelmente devido à polaridade e a baixa solubilidade dos compostos da matriz sólida no solvente nessas condições. Em tese, dependendo da matéria-prima, proporcionalmente quanto menor a massa específica do solvente menor será seu poder de solvatação. Neste caso isso não se verificou, pois o alto valor da massa específica do CO₂ não foi suficiente para extração dos compostos polares presentes na folha, devido a sua baixa polaridade (HERRERO; CIFUNTES; IBANEZ, 2006). A maioria das substâncias com propriedades antioxidantes, bem como as betalainas, são compostos hidrossolúveis. A solubilidade dos solutos no solvente supercrítico é dependente, além dos fatores temperatura e pressão, da massa

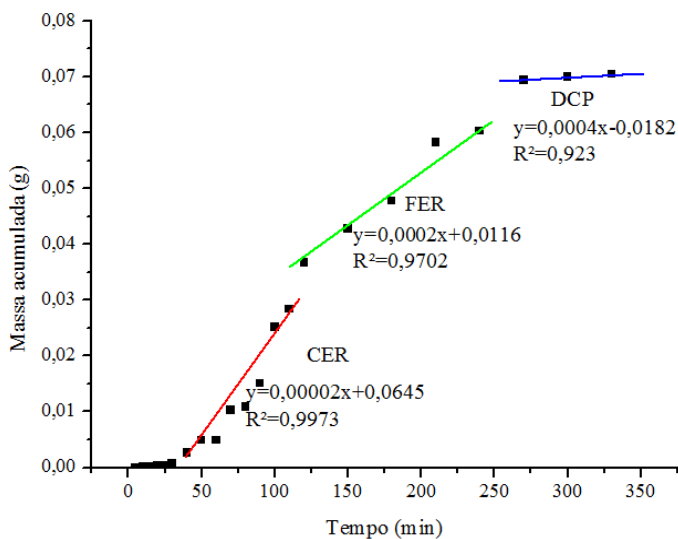
molecular, polaridade e pressão de vapor dos solutos (BRUNNER, 1994).

Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em: características do material e parâmetros de processo. As características específicas do material incluem sua massa específica, diâmetro do poro, porosidade, geometria e teor de umidade, enquanto que os parâmetros do processo incluem pressão e temperatura de extração, vazão do solvente, tempo, temperatura e pressão de separação (MARTÍNEZ; VANCE, 2007).

A Figura 15 apresenta a curva cinética da extração supercrítica a 300 bar e 55 °C. Analisando o comportamento da curva de extração, na Figura 15, foi possível verificar as três etapas de extração, embora não tão distintas, tornando possível o ajuste das três retas aos dados experimentais. No Apêndice B são apresentados os dados experimentais, tempo e massa acumulada, utilizados na construção da curva cinética de ESC.

A inclinação da primeira reta representaria a velocidade de transferência de massa da etapa CER. O tempo correspondente à intersecção entre as duas primeiras retas é o tempo de duração da extração em CER, o qual pode representar o tempo mínimo de duração de um ciclo de ESC; o tempo de intersecção entre a segunda e terceira retas é o tempo de duração da extração em FER, que em geral, representa a duração máxima que um ciclo de ESC pode ter para manter a viabilidade econômica do processo (MEIRELES, 2007).

Figura 15 – Cinética de extração supercrítica de folha de beterraba a 300 bar, 55 °C e com vazão de 0,5 kgCO₂/h.



Embora já se estivesse na etapa difusional, a cinética foi conduzida até 360 min, garantindo a extração máxima possível da matéria-prima. Finalizando a cinética de extração após os 360 min, como descrito em materiais e métodos, a massa acumulada durante a cinética apenas com CO₂ puro não foi suficiente na extração dos compostos presentes na folha de beterraba, por serem polares, sendo que os parâmetros de extração foram determinados, não através da cinética de extração, mas sim, através da literatura, onde se utilizou o cossolvente como auxiliar. Mesmo não se utilizando dos parâmetros da cinética de ESC neste trabalho, sua realização foi muito importante, tendo em vista a análise do comportamento da matéria-prima quando exposta a extração com CO₂ puro.

Utilizando os dados obtidos pela cinética de extração, calculou-se os parâmetros cinéticos da extração, conforme apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros da cinética de extração supercrítica de folha de beterraba a 300 bar, 55 °C e vazão de 0,5 kgCO₂/h.

Parâmetro	Etapa de extração		
	CER	FER	DCP
Tempo de duração da extração (min)	0-120	120-240	>240
Massa de extrato (g)	0,0367	0,0236	0,0102
Rendimento mássico (%)	0,2446	0,1573	0,0680
Taxa de extração (g/min)	0,0003	0,0002	0,0001

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

A necessidade de fixar um tempo de extração está ligada diretamente à determinação do rendimento global de extração (X_0), possibilitando a análise da influência das demais variáveis, como temperatura e pressão empregadas. De acordo com a Figura 15, o tempo necessário para que a etapa controlada pela difusão fosse alcançada aconteceu por volta dos 240 min, analisando o rendimento mássico a extração realizada apenas com dióxido de carbono apresenta rendimentos muito baixos em relação a demais estudos cinéticos.

Mazzuti (2017) obteve um acúmulo mássico aos 240 min da cinética de extração de aproximadamente 0,175 g e 0,125 g para *P. lanceolata* e *P. major*, respectivamente. Cruz (2016), aos 240 min acumulou 1,45 g de extrato para a semente de *Butia catarinensis*. Desta forma, como foi descrito na seção 3.5.3, os parâmetros de extração com cossolvente foram fixados de acordo com estudos já realizados no LATESC.

4.1.3 Testes preliminares com cossolventes na ESC

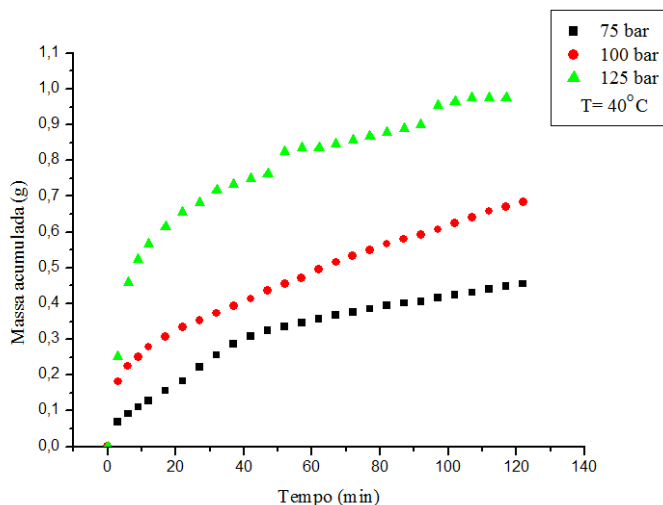
Para se determinar as condições de cossolvente, foram realizadas extrações na pressão de 250 bar, 40 °C ($\rho_{CO_2} = 0,879 \text{ g/cm}^3$), a uma vazão de 0,5 kgCO₂/h com uma concentração de cossolvente de 10 % (m/m). Foram realizadas extrações com cossolvente etanol (PA, 99,9 %), etanol e água (70/30, v/v) e água (100%). Na extração realizada com cossolvente água e com a mistura etanol e água (70/30, v/v), a extração precisou ser interrompida aos 40 min e 100 min, respectivamente, pois a

matriz no leito absorveu água de forma demasiada, formando uma espécie de “massa tampão” e impedindo a passagem do CO_2 , ocorrendo a obstrução total do sistema. Desta forma, foi fixada a concentração máxima de cossolvente durante a extração em 10 % para quantidade máxima de água, selecionando a proporção de etanol e água em 90/10 (v/v).

4.1.4 Cinética de ELP

Assim como para a ESC, a curva cinética de ELP é importante na determinação do tempo ideal de processo. Na Figura 16 são apresentadas as curvas obtidas nas pressões de 75, 100 e 125 bar a uma vazão de 3 mL/min, 40 °C com etanol (100%).

Figura 16 – Cinéticas de extração com líquido pressurizado para a folha de beterraba a 75, 100 e 125 bar e temperatura de 40 °C com etanol a 3 mL/min.



Analisando as curvas de extração, percebe-se que com o aumento da pressão houve um aumento no rendimento, embora a temperatura e vazão permanecessem fixas. Isso pode ser explicado através da influência da pressão como um parâmetro de extração, embora ela não seja a principal responsável pela aceleração da extração e aumento de

rendimentos. Isto se explica pelo fato de que líquidos não são fluidos compressíveis, ou seja, quando a pressão de vapor dos componentes alvo é importante para sua solubilização no solvente, a pressão pode ter um papel importante como parâmetro durante o processo de ELP. A utilização de altas pressões facilita a extração de componentes situados no interior dos poros da matriz, pois, devido a esse aumento de pressão, o solvente é forçado a penetrar em lugares onde a baixas pressões não seria possível (JIANG et al., 2007; RIZVI, 2010; OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

O tempo de extração é um dos parâmetros a ser avaliado, pois ele influencia não só no rendimento, como também na qualidade dos extratos. Neste trabalho, o tempo de extração foi estabelecido em 90 min para as três condições de pressão, período no qual a extração já entrou na parte em que é conduzida pela difusão. Este tempo é suficiente para ter bons rendimentos sem degradar compostos, uma vez que a temperatura utilizada é baixa e o extrato não entra em contato com a luz ou oxigênio, em comparação aos métodos convencionais, como em aparato Soxhlet. As tabelas apresentadas no Apêndice C mostram o acúmulo de massa por tempo de extração para as três pressões, justificando a escolha deste tempo de processo.

4.1.5 Rendimento global de extração (X_0)

Os resultados referentes ao rendimento global de extração obtidos nas técnicas a baixa e alta pressão para a folha de beterraba são apresentados na Tabela 9.

O melhor rendimento de extração para folha de *Beta vulgaris* L. foi $59,8 \pm 0,8$ % para extração em Soxhlet utilizando água como solvente.

Tabela 9 - Rendimento global de extração para a folha de beterraba.

Método	Solvente	Rendimento (\bar{X}_0) %
Folha seca <i>in natura</i>	Metanol 70%*	1,92 ^{jk,ζ}
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	59,8 ^{a,A} ±0,8
	Água+EtOH	37,4 ^{b,B} ±0,7
	EtOH	21 ^{d,D} ±1
	Hexano	1,8 ^{jk,GH} ±0,7
Maceração	Água	6,7 ^{fgH,EF} ±1,5
	Água+EtOH	5,3 ^{ghi,EF} ±0,5
	EtOH	1,6 ^{jk,GH} ±0,7
Ultrassom	Hexano	7,6 ^{fg,E} ±0,7
	Água	31,3 ^{c,C} ±0,6
	Água+EtOH	38,9 ^{b,B} ±0,1
	EtOH	4,04 ^{hij,FG} ±0,2
	Hexano	0,15 ^{k,H} ±0
Extração a alta pressão		
Extração Supercrítica		
250 bar / 40°C	CO ₂ +4% EtOH	2,4 ^{ijk,eζ} ±0,8
	CO ₂ +4% EtOH+Água (90/10)	1,1 ^{k,ζ} ±0,2
	CO ₂ +7% EtOH	1,17 ^{jk,ζ} ±0,01
	CO ₂ +7% EtOH+Água (90/10)	2,05 ^{jk,eζ} ±0,41
	CO ₂ +10% EtOH	4,06 ^{hij,e} ±0,08
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	14,45 ^{e,γ} ±1,3
Extração com Líquido Pressurizado LP1		
40°C / 3mLmin ⁻¹	75 bar EtOH	7,0 ^{fg,δ} ±0,3
	100 bar EtOH	12,3 ^{e,γ} ±0,9
	100 bar EtOH+Água (90/10)	23,24 ^{d,β} ±0,4
	100 bar EtOH+Água (70/30)	36,03 ^{b,α} ±0,04
	125 bar EtOH	13,35 ^{e,γ} ±0,24
Extração com Líquido Pressurizado LP2		
40°C / 3mLmin ⁻¹	100 bar EtOH	8,8 ^{f,δ} ±0,4

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras minúsculas indicam análise de todos os resultados, b) letras maiúsculas indicam análise somente entre as extrações à baixa pressão e c) símbolos gregos sinalizam análise somente entre

as técnicas à alta pressão. *Metodologia de acordo com Padrão Internacional ISO 14502-1.

Como pode ser observado, os extratos obtidos utilizando água e a mistura água e etanol proporcionaram os melhores rendimentos nas técnicas a baixa pressão, com exceção da maceração, que os resultados para os diferentes solventes não diferiram significativamente. O fato de se obter maiores rendimentos com esses solventes se deve a sua polaridade (apresentadas na Tabela 4). O alto rendimento das extrações utilizando água como solvente pode estar relacionado com a possível solubilização de carboidratos hidrossolúveis, como pectinas, mucilagens, gomas e hemiceluloses (BENELLI, 2010).

Este comportamento também foi observado para os extratos obtidos a alta pressão. Quanto maior a quantidade de água presente como cossolvente (ESC) e como mistura de solventes (ELP), maior o rendimento obtido.

Entre as ESC, aquela com incremento de 10 % de cossolvente água e etanol apresentou um maior rendimento ($14,4 \pm 1,3$ %) em relação às demais. Este comportamento se deve à maior solubilização de compostos polares na mistura cossolvente/ CO_2 , reduzindo desta forma a seletividade do processo e aumentando o rendimento. Esse comportamento se deve à interação cossolvente/soluto e ao inchamento da matriz (PEREIRA, MEIRELES, 2010).

Da mesma forma, para ELP, o maior rendimento observado foi para a mistura etanol e água (70:30) na extração a 100 bar. Isso consolida a influência da polaridade do solvente no rendimento, e que para a folha de beterraba, quanto maior a polaridade do solvente, maior o rendimento.

Comparando as técnicas de extração para um mesmo solvente, verifica-se que os maiores rendimentos foram obtidos quando se empregou a técnica Soxhlet, com exceção do rendimento com o solvente hexano, cujo rendimento foi maior na técnica de maceração. O alto rendimento em aparato Soxhlet pode ser dado em função do longo período de extração e pela amostra sempre entrar em contato com o solvente puro, durante vários ciclos. De acordo com Markon et al. (2007) a extração em Soxhlet ocorre na temperatura de ebulição do solvente. Sendo assim, a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas, possibilitando que o solvente alcance espaços da matriz que contêm solutos com maior facilidade, solubilizando uma maior

quantidade e diferentes tipos de solutos. Quando comparadas a extrações em temperaturas inferiores, como é o caso da extração com ultrassom isso não ocorre. Este mesmo comportamento foi verificado por Cruz (2016) na extração de compostos de butiá da praia.

A técnica de maceração com água proporcionou baixo rendimento, diferente das demais EBP. Isso pode ser explicado pela absorção do solvente pela amostra, o que dificultou o processo de filtração e conseqüentemente a obtenção do extrato. O rendimento para esta técnica com o solvente hexano foi superior se comparado as demais técnicas a baixa pressão, provavelmente devido à presença de compostos apolares que foram mais facilmente extraídos pelo contato prolongado da matriz com o solvente.

4.1.6 Conteúdo de fenólicos totais e potencial antioxidante

4.1.6.1 Conteúdo de Fenólicos Totais (CFT)

Os resultados referentes ao conteúdo de compostos fenólicos para as extrações a baixa e alta pressão para folha de beterraba são apresentados na Tabela 10. A curva padrão de ácido gálico, utilizada para o cálculo do CFT consta no Apêndice II.

O CFT dos extratos da folha de beterraba de mesa variou entre 3 ± 2 e $252,2\pm 1,5$ mg_{EAG}/g_{extrato}. O extrato que apresentou o maior CFT foi o extraído por ELP a 100 bar, com $252,2\pm 1,5$ mg_{EAG}/g_{extrato}, valor próximo ao obtido para o antioxidante sintético BHT por Cruz (2016), de 266,4 mg_{EAG}/g_{extrato}. Entre as extrações a alta pressão, ELP apresentou maiores resultados utilizando etanol como solvente, se comparado a ESC com cossolvente etanol. Isso pode ser explicado pela utilização do método dinâmico de extração (possibilitando a passagem do solvente puro pela matriz) e uma temperatura de 40 °C (evitando a degradação de compostos termos sensíveis).

Tabela 10 – Conteúdo de fenólicos totais (CFT) para folha de beterraba.

Método	Solvente	CFT (mg _{EAG} /g _{extrato})
Folha seca <i>in natura</i>	Metanol 70%	33 ^{g,BC} ±4
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	3 ^{i,D} ±2
	Água+EtOH	45 ^{f,B} ±3
	EtOH	47 ^{f,B} ±2
	Hexano	16 ^{ghi,C} ±2
Maceração	Água	17 ^{gh,C} ±3
	Água+EtOH	19 ^{gh,C} ±0
	EtOH	21,3 ^{g,C} ±0,6
Ultrassom	Hexano	21 ^{g,C} ±2
	Água	21 ^{g,C} ±2
	Água+EtOH	23 ^{g,C} ±2
	EtOH	73 ^{e,A} ±4
	Hexano	22 ^{g,C} ±4
Extração a alta pressão		
Extração Supercrítica		
250 bar / 40°C	CO ₂ +4% EtOH	6,2 ^{i,0} ±0,6
	CO ₂ +4% EtOH+Água (90/10)	70 ^{e,E} ±4
	CO ₂ +7% EtOH	49 ^{f,5} ±6
	CO ₂ +7% EtOH+Água (90/10)	99 ^{d,8} ±4
	CO ₂ +10% EtOH	18 ^{gh,η} ±3
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	11 ^{hij,ηθ} ±3
Extração com Líquido Pressurizado		
40°C / 3mL/min	75 bar EtOH	196 ^{b,β} ±3
	100 bar EtOH	252 ^{a,α} ±2
	100 bar EtOH+Água (90/10)	19 ^{gh,η} ±2
	100 bar EtOH+Água (70/30)	7,0 ^{ij,0} ±0,7
	125 bar EtOH	159 ^{c,γ} ±7
Extração com Líquido Pressurizado LP2		
40°C / 3mL/min	100 bar EtOH	104 ^{d,δ} ±1

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras minúsculas indicam análise de todos os resultados, b) letras maiúsculas indicam análise somente entre as extrações à baixa pressão e c) símbolos gregos sinalizam análise somente entre as técnicas à alta pressão. *Metodologia de acordo com Padrão Internacional ISO 14502-1.

Nos extratos de folha de beterraba obtidos por ELP a variação da pressão influenciou no CFT, pela mudança da pressão de vapor dos solutos presentes na matriz quando a pressão é elevada. Embora os líquidos sejam incompressíveis, a alteração da pressão pode alterar a pressão de vapor dos compostos de interesse, alterar a conformação da matéria-prima, disponibilizando os solutos, facilitando sua extração pelo solvente.

Em trabalho realizado por Paes et al. (2014) para resíduos de *blueberry* (*Vaccinium myrtillus* L.), a quantidade de CFT foi inferior à obtida para folha de beterraba, utilizando temperatura de 40 °C, 200 bar e vazão de 10 mL/min e etanol como solvente na ELP. Os resultados de CFT obtidos para o resíduo *in natura* foram de 87,36 mg_{EAG}/g_{extrato} e para o liofilizado de 101,71 mg_{EAG}/g_{extrato}.

Machado et al. (2015) estudaram a influência da temperatura na obtenção de extratos dos resíduos de amora, tendo como parâmetros o tempo em 30 min, pressão em 75 bar, 5 g de amostra e as temperaturas de 60, 80 e 100 °C. A variação na temperatura não apresentou influência sobre o CFT, que variou de 3,18 a 4,12 mg_{EAG}/g_{extrato}.

Analisando os resultados referentes as técnicas a baixa pressão, a extração assistida por ultrassom com etanol apresentou o melhor resultado quanto ao CFT (73±4 mg_{EAG}/g_{extrato}), diferindo estatisticamente dos demais solventes e métodos EBP. As extrações realizadas com a mistura água e etanol e etanol puro pela metodologia Soxhlet também mostraram uma quantidade de fenólicos superior as demais (44,7±2,7 e 47±2 mg_{EAG}/g_{extrato}). Biscaia (2007), afirma que o etanol e misturas etanol água são os solventes mais indicados na extração de compostos antioxidantes, pois devido às suas características polares, promovem a extração de compostos como ácidos fenólicos, que geralmente são classificados como polares.

O menor resultado para as EBPs foi obtido para Soxhlet com água como solvente. Percebe-se que, embora para esta técnica e solvente tenha sido obtido o maior rendimento, a qualidade do extrato foi prejudicada provavelmente devido às altas temperaturas empregadas durante a extração que proporcionaram o arraste de substâncias como carboidratos e fibras. Também segundo Shaidi e Naczki (1995) *apud* Santos-Sartori et al. (2013), não existe sistema de extração com solventes que seja satisfatório para o isolamento de todos ou de classe

específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores. A natureza química desses compostos nos alimentos varia do simples ao altamente polar. Há grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alta massa molecular, são altamente insolúveis em água.

Para a extração supercrítica, o melhor resultado foi obtido com a concentração de cossolvente de 7% etanol e água (99 ± 4 mg_{EAG}/g_{extrato}). Quando se empregou a concentração de cossolvente 10 % etanol e água para ESC e também para as ELP utilizando as misturas etanol e água os valores obtidos de CFT foram baixos. Percebeu-se que, assim como observado na EBP, a água nestes casos pode ter influenciado nas interações com carboidratos, proteínas e outros componentes.

Kalt et al. (2001) relatou que existe uma grande variação entre o conteúdo de fenólicos totais presentes nas frutas e vegetais e essas diferenças estão relacionadas à variabilidade das matérias-primas e à complexidade dos grupos constituintes. É importante destacar que as diferenças encontradas na literatura para uma mesma fruta ou vegetal quanto ao conteúdo de compostos fenólicos dependem das diferentes técnicas empregadas na extração e na quantificação destes compostos. Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas (ANGELO, JORGE, 2007).

O valor de CFT para folha de beterraba seca *in natura* foi de 33 ± 4 mg_{EAG}/g_{extrato}. Esse valor não diferiu significativamente de todas as EBP, com exceção da realizada em aparato Soxhlet com água e ultrassom com EtOH. A pré-extração foi realizada conforme a ISO 14502-1 para caracterização de substâncias presentes no chá verde e preto. Percebe-se que, alguns métodos de extração e solventes são mais eficientes quando se trata de compostos fenólicos, como é o caso do Soxhlet com EtOH. Quando se analisa técnicas a alta pressão, tanto a

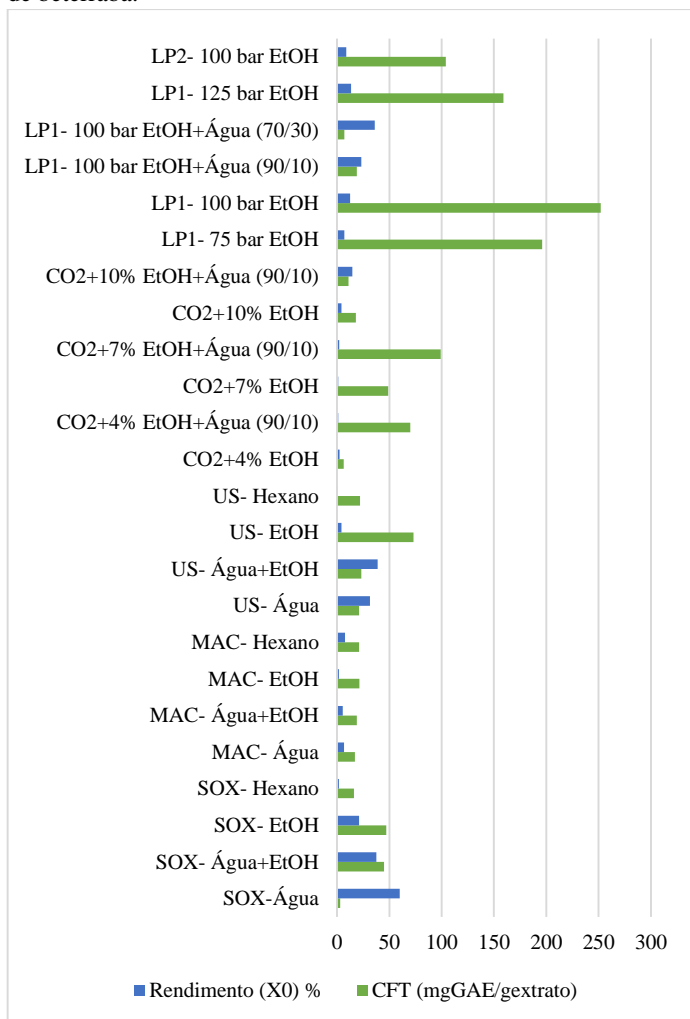
ESC com 4 e 7% de cossolvente EtOH+Água quanto as ELP1 e ELP2 com EtOH como solvente apresentaram resultados superiores a matéria prima seca *in natura*.

ELP é uma técnica aplicável em processos onde se tem compostos sensíveis a degradações, seja pela temperatura, contato com oxigênio ou luz, pois proporciona condições de operação que evitam a ação dessas variáveis. O uso de altas pressões facilita a extração de compostos localizados dentro dos poros da matriz, devido a um aumento de pressão, que força o solvente a penetrar em locais que normalmente não atingiria em pressões atmosféricas (MEIRELES, OSORIO-TOBÓN, 2013), possibilitando melhores resultados para CFT em relação as EBP e a folha seca *in natura*.

Analizando o gráfico na Figura 17, que traz um comparativo entre o rendimento global e o CFT de cada extração, percebe-se que a CFT não esta ligada diretamente ao rendimento obtido durante o processo de extração, pois, o rendimento se mostrou inversamente proporcional ao CFT apresentado, o que pode ser atribuído a falta de seletividade apresentada por essas extrações.

É perceptível também que o solvente que apresentou os melhores resultados na extração de compostos fenólicos foi o etanol, de forma geral, como já havia sido explorado. Analisando os métodos de extração, as extrações a alta pressão obtiveram destaque em relação as EBP, sendo que o processo de ELP apresentou os melhores resultados nas três pressões testadas, com destaque para a LP1 a 100 bar, quando empregou-se o etanol como solvente. Desta forma, é possível concluir que o emprego de tecnologias a alta pressão, especialmente por meio de líquido pressurizado, são eficazes na extração de CFT, sendo superiores aos métodos convencionais.

Figura 17 – Comparativo entre rendimento global e CFT dos extratos de folha de beterraba.



Fonte: A autora.

4.1.6.2 Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos da folha de beterraba foi avaliada pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e

expressa em CE_{50} . O valor de CE_{50} representa a concentração efetiva para que se atinja 50% de atividade antioxidante. Diante disso, quanto menor o valor de CE_{50} , maior é a atividade antioxidante do extrato. Os resultados da avaliação do potencial antioxidante dos extratos à baixa e alta pressão para folha de beterraba são apresentados na Tabela 11. Os resultados apresentados pelos extratos de folha de beterraba variaram de CE_{50} $58,45 \pm 5,9$ e < 1700 $\mu\text{g/mL}$.

A análise estatística das atividades antioxidantes foram realizadas separadamente para extrações à baixa pressão e para alta pressão, facilitando a identificação da diferença de atividade antioxidante dos extratos.

Entre as técnicas a baixa pressão, avaliando a influência do solvente na extração de compostos com potencial antioxidante percebe-se que o solvente etanol foi o mais eficiente para as três técnicas. O melhor resultado entre as EBP foi observado para maceração com etanol 139 ± 7 $\mu\text{g/mL}$, esse resultado não diferiu significativamente ($p < 0,05$) da amostra maceração com solvente etanol e água, Soxhlet etanol e hexano e ultrassom com etanol. Pode-se concluir que, os antioxidantes ativos nesse teste são preferencialmente menos polares, e, portanto, com maior afinidade pelo etanol, no que diz respeito às técnicas EBP.

Entre os extratos obtidos através das técnicas a alta pressão, para a ESC, a melhor condição de extração foi com 10% de cossolvente com a mistura etanol e água (150 ± 7 $\mu\text{g/mL}$). Na extração supercrítica a utilização de água juntamente com o etanol como cossolvente auxiliou no processo de extração, aumentando não só o rendimento, mas a qualidade do extrato (potencial antioxidante).

Tabela 11 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos da folha de beterraba através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % de atividade (CE₅₀).

Método	Solvente	CE ₅₀ (µg/mL)
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	1085 ^{b,BC} ±43
	Água+EtOH	523 ^{de,EF} ±19
	EtOH	302 ^{fgh,G} ±7
	Hexano	398 ^{L,FG} ±9
Maceração	Água	673 ^{cde,DE} ±25
	Água+EtOH	304 ^{fgh,G} ±19
	EtOH	139 ^{ghij,G} ±7
	Hexano	872 ^{c,CD} ±2
Ultrassom	Água	<1700 ^{a,A}
	Água+EtOH	732 ^{cd,DE} ±1
	EtOH	275 ^{fghi,G} ±4
	Hexano	1231 ^{b,B} ±22
Extração a alta pressão		
Extração Supercrítica		
250 bar / 40°C	CO ₂ +4% EtOH	334 ^{fg,β} ±5
	CO ₂ +4% EtOH+Água (90/10)	266 ^{fghij,γ} ±31
	CO ₂ +7% EtOH	346 ^{fg,β} ±6
	CO ₂ +7% EtOH+Água (90/10)	322 ^{fgh,β} ±18
	CO ₂ +10% EtOH	326 ^{fgh,β} ±11
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	150 ^{ghij,δ} ±7
	Extração com Líquido Pressurizado	
40°C / 3mL/min	75 bar EtOH	58 ^{t,ε} ±6
	100 bar EtOH	65 ^{ij,ε} ±2
	100 bar EtOH+Água (90/10)	470 ^{ef,α} ±19
	100 bar EtOH+Água (70/30)	304 ^{fgh,βγ} ±19
	125 bar EtOH	120 ^{hij,δ} ±3
Extração com Líquido Pressurizado LP2		
40°C / 3mL/min	100 bar EtOH	138 ^{ghij,δ} ±18

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras minúsculas indicam análise de todos os resultados, b) letras maiúsculas indicam análise somente entre as extrações à baixa pressão e c) símbolos gregos sinalizam análise somente entre as técnicas à alta pressão.

O líquido pressurizado se comportou de forma inversa, uma vez que o emprego das misturas etanol e água, mesmo elevando o rendimento, prejudicou a qualidade do extrato. A existência de compostos hidrossolúveis na matriz associada a utilização de água como solvente acabaram prejudicando os resultados de CE_{50} , o que pode estar associado a pouca seletividade que solventes polares proporcionam.

As extrações realizadas por meio de ELP apresentaram melhores resultados quando se utilizou etanol como solvente. As ELP realizadas a 75 e 100 bar se mostraram superiores às demais, apresentando valores de CE_{50} de 58 ± 6 e 65 ± 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Não se pode definir um comportamento tendencioso 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).

Os valores obtidos para a folha são inferiores ao encontrado por Cruz (2016) para o antioxidante sintético BHT, 67 $\mu\text{g/mL}$, apresentando-se assim, o extrato de folha de beterraba por ELP com etanol, como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos industrializados, assim como destacado por REYNERTSON et al. (2008), os quais indicaram que valores de CE_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ demonstram um forte potencial antioxidante.

Bergamaschi (2010) obteve para folha de rabanete extraídos a baixa pressão assistida por ultrassom com etanol (80 %) e água os valores de CE_{50} de 2710 e 1170 $\mu\text{g/mL}$. Neste mesmo trabalho, avaliou-se a folha e talo de cenoura, e os resultados de CE_{50} para os mesmos solventes foi de 2530 e 1310 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados obtidos para folha de beterraba com solvente água e mistura etanol água (50:50) por ultrassom foram inferiores aos obtidos por Bergamaschi (2010).

Os valores encontrados para folha de beterraba na extração supercrítica com cossolvente apresentaram um CE_{50} menor em comparação com a literatura. Para o butiá da praia, Cruz (2016) encontrou no emprego de 5% e 7,5% de cossolvente etanol, valores superiores a 7000 $\mu\text{g/mL}$. Benelli (2010) encontrou para o bagaço de laranja pelo método de extração supercrítica com 5 e 8% de cossolvente, a pressão de 250 bar e temperatura de 50°C, valores de CE_{50} de 414 ± 6 e

403±22 µg/mL, demonstrando um potencial antioxidante inferior aos encontrados para os extratos de folha de beterraba obtidos por ESC com emprego de cossolvente para a análise de DPPH.

4.1.6.3 Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS

Esta análise teve o objetivo de verificar a capacidade dos extratos de folha de beterraba 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 do potencial antioxidante pelo método ABTS dos extratos obtidos através dos métodos à baixa e alta pressão, são apresentados na Tabela 12. Os resultados variaram de 4,4±0,1 a 858±21 ($\mu\text{mol}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

Entre as técnicas à baixa pressão a extração com etanol em Soxhlet (586±82 $\mu\text{mol}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) foi a que apresentou o melhor resultado diferindo significativamente das demais. Percebe-se que o solvente etanol foi o que apresentou os melhores resultados de TEAC para as técnicas a baixa pressão embora solventes mais apolares, como hexano, também apresentaram bons resultados, como é o caso da maceração e ultrassom.

De acordo com Re et al. (1999) essa é uma metodologia recomendada para medir a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica, o que explica os resultados significativos para ambos os solventes.

Os resultados obtidos para ESC são satisfatórios quando comparados a de alguns extratos obtidos a baixa pressão. A comparação com resultados de ESC de outros trabalhos é dificultado em virtude da falta de estudos com essa matéria-prima e que apresentem as mesmas condições e parâmetros de operação. Oliveira (2015) trabalhou com a semente da torta de maracujá e utilizando as mesmas condições de pressão, temperatura e 5 % de cossolvente etanol no mesmo extrator, obteve para a torta de maracujá 29±3 $\mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, valor este inferior

aos obtidos para folha de beterraba com 4, 7 e 10 % de cossolvente etanol.

Dentre as técnicas a alta pressão, comparando ESC e ELP, percebe-se que as extrações com líquido pressurizado demonstraram maior potencial antioxidante, bem como para as demais técnicas de extração. As ELP apresentam um potencial antioxidante medido pelo método de ABTS superior às demais e o solvente etanol destacou-se nesta técnica também. As extrações com líquido pressurizado a 125 bar e no equipamento LP2, apresentaram os maiores resultados, 823 ± 48 e 858 ± 21 ($\mu\text{mol}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) respectivamente. Estes resultados foram estatisticamente diferentes das demais técnicas.

Floegel et al. (2011), estudaram diversas variedades de frutas e vegetais *in natura*, além de derivados destes (por ex., sucos). Neste estudo, eles compararam metodologias de quantificação de compostos antioxidantes. Dentre as frutas estudadas, encontram-se as *berry*, como a *blueberry* e a *cranberry*, estas apresentaram potencial antioxidante de 477 ± 29 e 120 ± 8 ($\text{mg}_{\text{eq.vitamina C}}/\text{100g}$), estes resultados são inferiores aos observados para folha de beterraba com etanol a 125 bar no ELP1 e 100 bar no ELP2.

Paes et al. (2014) obteve para resíduos de *blueberry* (*Vaccinium myrtillus L.*) utilizando ELP a uma temperatura de 40 °C, 200 bar, vazão de 10 mL/min e etanol como solvente um valor de 69,0 ($\mu\text{mol TEAC/g}$) para amostra *in natura* e de 80,5 ($\mu\text{mol TEAC/g}$) para amostra liofilizada, ambos inferiores aos obtidos para folha de beterraba. Percebeu-se também, que o LP2 mostrou um maior potencial em relação ao LP1 nas mesmas condições. O fato de se utilizar uma célula menor, com comprimento das conexões e tubulações menor, diminui-se a perda de extrato, aumentando a concentração de compostos com potencial antioxidante.

Tabela 12 - Potencial antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos da folha de beterraba.

Método	Solvente	TEAC ($\mu\text{mol}_{\text{trolox}}/\text{g}$ extrato)
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	4,4 ^{i,H} ±0,1
	Água+EtOH	58 ^{hi,FGH} ±12
	EtOH	586 ^{b,A} ±82
	Hexano	14,9 ^{i,GH} ±0,2
Maceração	Água	142 ^{fg,DEF} ±14
	Água+EtOH	97 ^{gh,DEFG} ±2
	EtOH	254 ^{d,C} ±24
	Hexano	149 ^{fg,DE} ±24
Ultrassom	Água	384 ^{c,B} ±27
	Água+EtOH	82 ^{ghi,EF} ±1
	EtOH	384 ^{c,B} ±6
	Hexano	173 ^{ef,CD} ±42
Extração a alta pressão		
Extração Supercrítica		
250 bar / 40°C	CO ₂ +4% EtOH	111 ^{fgh,δε} ±13
	CO ₂ +4% EtOH+Água (90/10)	142 ^{fg,δε} ±12
	CO ₂ +7% EtOH	113 ^{fgh,δε} ±14
	CO ₂ +7% EtOH+Água (90/10)	139 ^{fg,δε} ±19
	CO ₂ +10% EtOH	99 ^{fgh,ε} ±24
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	157 ^{fg,δ} ±2
	Extração com Líquido Pressurizado	
40°C / 3mLmin ⁻¹	75 bar EtOH	397 ^{c,β} ±6
	100 bar EtOH	400 ^{c,β} ±14
	100 bar EtOH+Água (90/10)	252 ^{de,γ} ±1
	100 bar EtOH+Água (70/30)	103 ^{fgh,δε} ±1
	125 bar EtOH	823 ^{a,α} ±48
	Extração com Líquido Pressurizado LP2	
40°C / 3mLmin ⁻¹	100 bar EtOH	858 ^{a,α} ±21

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras minúsculas indicam análise de todos os resultados, b) letras maiúsculas indicam análise somente entre as extrações à baixa pressão e c) símbolos gregos sinalizam análise somente entre as técnicas à alta pressão.

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 (CRUZ, 2016).

4.1.6.4 Potencial antioxidante pelo método FRAP

Os resultados referentes a determinação do potencial antioxidante por redução do ferro para os extratos obtidos pelas diferentes técnicas de extração são apresentados na Tabela 13. Os resultados variaram de 6 ± 1 a $275 \pm 3 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$.

Comparando as técnicas a baixa pressão percebe-se que maceração e ultrassom se comportaram de forma similar quanto a polaridade dos solventes. O extrato obtido por maceração utilizando o solvente etanol, entre as EBP, foi o que apresentou maior valor ($259 \pm 5 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) assim como para o método ABTS, sendo que este valor diferiu de todos os demais ($p < 0,05$). De forma geral, o solvente etanol apresentou-se com os melhores resultados nas EBP, seguido do hexano. Bergamaschi (2010), através de extrações assistidas por ultrassom com etanol (80 %) com diversos vegetais, obteve para folha e talo de rabanete ($127 \mu\text{mol}/\text{g}$), folha e talo de cenoura ($101 \mu\text{mol}/\text{g}$) e folha e talo de nabo ($193 \mu\text{mol}/\text{g}$), resultados semelhantes aos obtidos por meio do ultrassom para folha de beterraba com etanol ($139,5 \mu\text{mol}/\text{g}$) e com hexano ($161 \mu\text{mol}/\text{g}$).

Entre os resultados obtidos para os extratos a alta pressão, comparando os solventes, percebeu-se que quando se utilizou etanol puro (como solvente ou cossolvente), os resultados foram melhores em comparação com as misturas de etanol e água na técnica ELP. Por outro lado, para a ESC isso não se aplicou ao incremento de 4 e 7 % onde os resultados não diferiram entre si (4 %) ou foram melhores quando se utilizou a mistura (7 %).

Tabela 13 - Determinação do potencial antioxidante (PA) pelo método de redução do ferro (FRAP) dos extratos obtidos da folha de beterraba a baixa e alta pressão.

Método	Solvente	PA ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$)	
Extração a baixa pressão			
Soxhlet	Água	134 ^{g,DE} ±4	
	Água+EtOH	91 ^{h,F} ±6	
	EtOH	182 ^{d,B} ±12	
	Hexano	123 ^{g,E} ±10	
Maceração	Água	9 ^{k,H} ±4	
	Água+EtOH	18 ^{k,H} ±5	
	EtOH	259 ^{ab,A} ±5	
	Hexano	146 ^{ef,CD} ±12	
Ultrassom	Água	6 ^{k,H} ±1	
	Água+EtOH	45,1 ^{j,C} ±0,7	
	EtOH	140 ^{fg,CDE} ±3	
	Hexano	161 ^{e,BC} ±3	
Extração a alta pressão			
Extração Supercrítica			
250 bar / 40°C	CO ₂ +4% EtOH	130,2 ^{g,ε} ±0,7	
	CO ₂ +4% EtOH+Água (90/10)	124 ^{g,ε} ±0	
	CO ₂ +7% EtOH	187 ^{d,δ} ±2	
	CO ₂ +7% EtOH+Água (90/10)	218 ^{c,γ} ±6	
	CO ₂ +10% EtOH	240 ^{b,β} ±3	
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	71 ^{i,η} ±4	
	Extração com Líquido Pressurizado		
	40°C / 3mL/min	75 bar EtOH	271,5 ^{a,α} ±0,4
100 bar EtOH		275 ^{a,α} ±3	
100 bar EtOH+Água (90/10)		18 ^{k,θ} ±2	
100 bar EtOH+Água (70/30)		10 ^{k,θ} ±1	
125 bar EtOH		101 ^{h,ζ} ±8	
Extração com Líquido Pressurizado LP2			
40°C / 3mL/min	100 bar EtOH	68,5 ^{i,η} ±0,5	

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p<0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras minúsculas indicam análise de todos os resultados, b) letras maiúsculas indicam análise somente entre as extrações à baixa pressão e c) símbolos gregos sinalizam análise somente entre as técnicas à alta pressão.

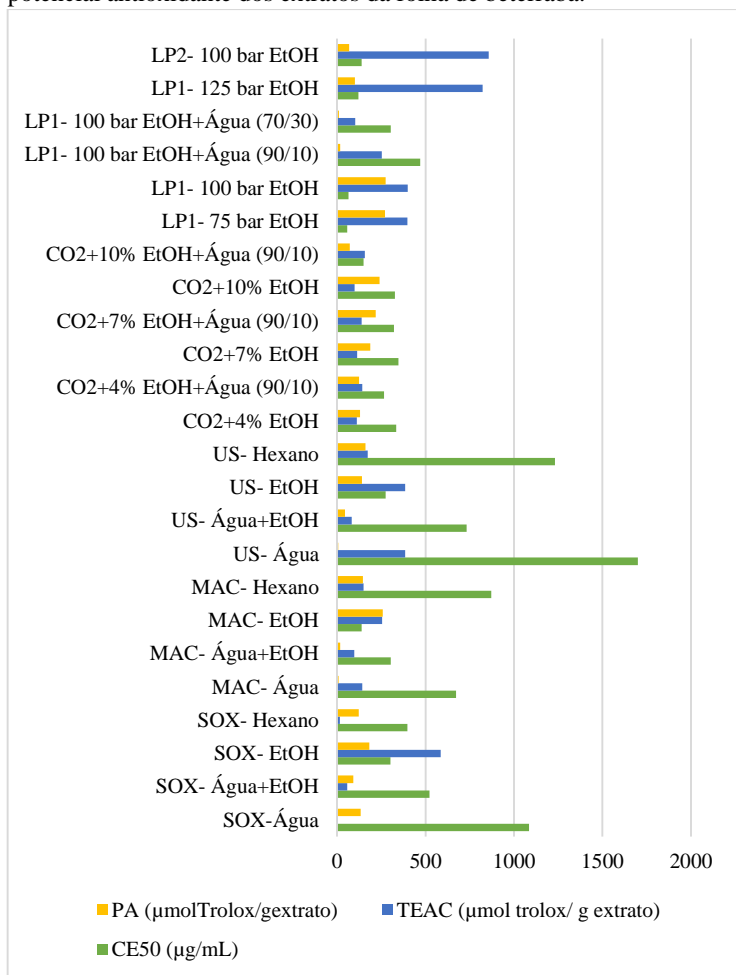
Analisando os resultados, a ELP apresentou valores para o método de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} superiores aos obtidos com a ESC nas pressões de 75 e 100 bar utilizando etanol como solvente. Analisando os resultados obtidos com o solvente etanol e diferenciando as técnicas de extração, percebe-se que ELP a 75 e 100 bar e a maceração apresentaram os melhores valores em relação as demais, estes, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O etanol apresentou-se, assim como para CFT, DPPH e ABTS, o solvente que melhor extraiu compostos com potencial antioxidante.

Halvorsen *et al.* (2009) utilizou amostras vegetais trituradas com água, formando uma pasta, homogeneizadas em sonificador em metanol, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para realização das análises. Nesse estudo eles encontraram valores de FRAP para raiz de beterraba (1980 $\mu\text{mol/g}$), couve (2650 $\mu\text{mol/g}$), alcachofra (2080 $\mu\text{mol/g}$), brócolis (350 $\mu\text{mol/g}$) e rabanete (390 $\mu\text{mol/g}$) que diferem dos obtidos neste trabalho. O valor para raiz de beterraba é muito superior aos extratos, mas deve-se levar em consideração a influência do pré-tratamento, método de extração, armazenamento e que mesmo sendo parte integrante do mesmo vegetal, possuem estrutura celular, morfológica e composição nutricional diferentes, fatores estes que causam discrepâncias nos valores de redução do FRAP.

O método FRAP é um indicador adicional da atividade antioxidante, mas é importante considerar suas limitações, como a de que qualquer composto com potencial redox menor que o do par Fe^{3+} e Fe^{2+} , possa teoricamente reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , contribuindo para o valor do FRAP e induzindo a resultados maiores e falsos (MAGALHÃES *et al.*, 2008). O que explica a grande variação entre diferentes resíduos vegetais e até mesmo entre os mesmos resíduos obtidos por diferentes técnicas, provavelmente ocorreu pelo mecanismo específico do FRAP na avaliação do potencial antioxidante, uma vez que este método é limitado à medição de compostos que promovam a transferência de elétrons (PRIOR, XIANLI, SCHAICH, 2005).

A Figura 18 mostra um comparativo entre as três técnicas de determinação *in vitro* do potencial antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) para os extratos obtidos da folha de beterraba.

Figura 18 – Comparativo entre as três técnicas para determinação *in vitro* do potencial antioxidante dos extratos da folha de beterraba.



Fonte: A autora.

Analisando a Figura 18, pode-se perceber que o método que apresentou os melhores resultados para o conjunto de análises antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) foi o líquido pressurizado utilizando etanol como solvente. Tanto como que para o CFT, aqui, nas análises do potencial antioxidante, a água se mostrou como ineficiente na extração de compostos bioativos que apresentassem potencial

antioxidante, isso pode ser devido a falta de seletividade proporcionada por esse solvente, como foi destacado nas discussões anteriormente.

4.1.6.5 Considerações sobre a folha de beterraba

Analisando os diferentes resultados para a folha de beterraba, percebe-se que o solvente que apresentou melhor capacidade na extração de compostos com potencial antioxidante foi o etanol, tanto nas EBPs quanto como cossolvente na ESC e solvente na ELP. Dentre todas as metodologias empregadas, a extração por líquido pressurizado utilizando etanol como solvente merece destaque por ter apresentado os melhores resultados em relação aos CFT e também ao potencial antioxidante, analisado através das metodologias *in vitro* DPPH, ABTS e FRAP. A folha de beterraba apresentou um potencial antioxidante comparável à antioxidantes sintéticos, provando a possibilidade de seu emprego como um aditivo concorrente aos empregados atualmente na indústria alimentícia e cosmética, agregando valor a este resíduo agrícola.

4.2 TALO DE BETERRABA

4.2.1 Caracterização da matéria-prima e do leito de partículas

A composição nutricional do talo de beterraba é apresentada na Tabela 14. A umidade do talo *in natura*, segundo Monteiro (2009) é de 93,73%, mostrando que a desidratação proporcionou que a matéria-prima estivesse abaixo dos 15% de umidade, valor adequado para ESC (MAIA, 2016). Os resultados para proteína, carboidratos e fibra encontrados neste trabalho foram inferiores aos de Monteiro (2009), que encontrou os valores de 16,11 (g/100g), 18,66 (g/100g), 0,16 (g/100g) e 37,96 (g/100g), respectivamente, com excessão dos lipídios, que apresentaram um valor de 0,16 (g/100g).

Tabela 14 – Composição nutricional do talo de beterraba desidratado.

Nutriente	Composição (g/100g)
Carboidratos totais	49,69
Proteína	13,66
Gordura (lipídios)	1,84
Fibra bruta (matéria fibrosa)	10,09
Umidade e voláteis	6,62
Cinzas	18,10

Em estudo realizado por Tivelli et al., (2011) para parte aérea (folha e talo) da beterraba, foram apresentados valores de 24,17 (g/100g), 3,30 (g/100g), 50,55 (g/100g), 14,28 (g/100g) e 21,98 (g/100g) para proteínas, lipídios, carboidratos totais, fibras e cinzas, respectivamente em base seca, todos superiores aos obtidos para o talo de beterraba desidratado.

De acordo com a tabela brasileira de composição dos alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, 2006), os valores para esta cultivar (raiz crua) apresentam-se superiores aos encontrados para a composição do talo, com valores de 13,57 g de proteína, 0,71 g de lipídios, 79,28 g de carboidratos, 24,28 g de fibra e 6,43 g de cinzas. A diferença entre os valores pode se dar pelo fato de que, neste trabalho as análises foram realizadas com a matéria-prima já seca e triturada, sendo que desta forma a concentração dos nutrientes é maior do que na matéria-prima *in natura*. Além disso, existem inúmeras variáveis a serem consideradas nestes resultados, como: local de plantio, sazonalidade, estágio de maturação, condições do solo e do clima, época da colheita, genótipo das plantas, exposição solar e manuseio pós-colheita.

A caracterização do leito de partículas utilizado na ESC é fundamental para a compreensão dos fenômenos de transferência de massa que ocorrem durante o processo de extração (GUINDANI, 2014). Na Tabela 15, são apresentados os valores para cada parâmetro referente ao leito de partículas formado pelo talo de beterraba.

Tabela 15 – Caracterização do leito de partículas para o talo de beterraba.

Parâmetro	Valor
Diâmetro médio das partículas (mm)	0,267
Massa específica real (g/cm ³)	1,604±0,001
Massa específica aparente (g/cm ³)	0,290
Porosidade	0,819

O valor apresentado pelas partículas do talo (0,267 mm) está de acordo com Reverchon e Marco (2006), que afirmam que o valor médio a ser utilizado em extrações supercríticas está entre 0,25 – 2 mm. O percentual médio retido em cada peneira, para o talo de beterraba foi: 8,28 % (20 Mesh), 7,91 % (25 Mesh), 24,4 % (32 Mesh), 33,06 % (48 Mesh), 17,89 % (65 Mesh) e 8,46 % (80 Mesh), indicando que a maioria das partículas ficou retida na peneira de 0,3 mm de abertura (48 Mesh).

O interesse nas etapas de secagem, moagem/trituração da matéria-prima está relacionado com o aumento da superfície de contato entre solvente e soluto. Mazutti (2016) encontrou para a *P. major* e *P. lanceolata* valores de diâmetro médio das partículas de 0,22 e 0,21 mm, e massa específica real de 1,70 e 1,45 g/cm³, respectivamente, valores estes, muito próximos ao obtidos no presente trabalho, qualificando o talo para os ensaios de ESC. Os valores encontrados para o alecrim em estudo de extração realizado por Genena (2005), tanto para a densidade específica aparente quanto para a porosidade, foram muito próximos aos encontrados para o talo de beterraba (0,3348 g/cm³ e 0,7483, respectivamente).

4.2.2 Rendimento global de extração (X₀)

O foco principal deste trabalho foi a realização dos ensaios utilizando a folha de beterraba, em virtude da falta de estudos com o resíduo da *Beta vulgaris* L., achou-se por bem, investigar as particularidades apresentadas pelo talo. Essas informações são importantes no que diz respeito ao estudo completo do resíduo e também, na compreensão das diferenças presentes em ambas as partes. Desta forma, os métodos EBP utilizados para o talo de beterraba foram

os mesmos utilizados para a folha, quanto a ESC, utilizou-se a melhor condição com base no rendimento e para esta parte do resíduo não se realizou as ELP, uma vez que neste trabalho objetivou-se a montagem do equipamento e a realização de apenas alguns testes.

O rendimento global de extração obtido através dos métodos a baixa pressão e ESC são apresentados na Tabela 16. Os rendimentos variaram de $0,5\pm 0,3$ a $47,2\pm 0,7$ entre todas as técnicas e solventes.

Analisando a influência da técnica no rendimento do extrato de talo de beterraba, percebe-se que a extração em aparato Soxhlet apresentou os maiores resultados, assim como na extração da folha de beterraba. Pode-se observar que a possibilidade de renovação do solvente durante a extração, a duração do processo e o emprego de altas temperaturas favorece a dissolução das substâncias no solvente possibilitando um rendimento superior. É importante ressaltar que, o emprego de altas temperaturas e a falta de seletividade deste processo acaba prejudicando a qualidade do extrato, justamente pela decomposição térmica das espécies alvo (CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010. Segundo Jochmann (2000), a temperatura influencia o poder de solvatação do solvente supercrítico mediante dois mecanismos, o primeiro devido à redução da densidade do solvente com o aumento da temperatura e o segundo com relação ao aumento da pressão de vapor do soluto (ou volatilidade) com o aumento da temperatura.

Tabela 16 – Rendimento global de extração para o talo de beterraba.

Método	Solvente	Rendimento (X₀) %
Talo seco <i>in natura</i>	Metanol 70%*	4,26 ^g
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	47,2 ^b ±0,7
	Água+EtOH	51 ^{ab} ±2
	EtOH	9,0 ^f ±0,7
	Hexano	7,1 ^{fg} ±0,6
Maceração	Água	15,8 ^e ±0,3
	Água+EtOH	29 ^d ±1
	EtOH	5,0 ^g ±0,4
	Hexano	35 ^c ±2
Ultrassom	Água	36,7 ^c ±0,5
	Água+EtOH	53,0 ^a ±0,7
	EtOH	4,7 ^g ±0,2
	Hexano	0,6 ^h ±0,1
Extração a alta pressão		
ESC (250 bar/40 °C/ 0,5 kgCO ₂ /h)	CO ₂ +10% EtOH	0,5 ^h ±0,3
	CO ₂ +10%	
	EtOH+Água (90/10)	6 ^{fg} ±1

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey. *Metodologia de acordo com Padrão Internacional ISO 14502-1.

Verifica-se que o solvente que apresentou os melhores resultados para o X₀ foi a mistura água e etanol, com exceção da técnica por maceração, onde o hexano apresentou-se como melhor alternativa. A polaridade, neste caso, é a variável que mais vai influenciar no rendimento no que diz respeito ao solvente a ser empregado. Este comportamento indica que o talo de beterraba possui grande quantidade de compostos solúveis em solventes com polaridade alta, entre 9,0 (polaridade da água) e 5,2 (polaridade do etanol) (BYERS, 2009). A polaridade de um composto é definida em função da habilidade da molécula em participar de interações, de todos os tipos, com outras moléculas polares presentes no sistema (BARWICK, 1997).

A solubilidade de diferentes compostos naturais varia de acordo com os solventes empregados, solutos polares são solúveis em solventes polares como etanol e água, por exemplo, e solutos apolares dissolvem-

se em solventes apolares como hexano. A solubilidade dos compostos naturais geralmente aumenta com o aumento nos índices de polaridade (JADHAV et al., 2009).

Quanto ao comportamento dos extratos obtidos por maceração, percebeu-se que quando foi utilizada água e a mistura água e etanol como solvente a matriz absorveu o solvente, prejudicando o processo de separação amostra/solvente. A proporção utilizada de solvente/amostra foi diferente, na maceração utilizou-se de 1:5 enquanto que para Soxhlet e ultrassom de 1:30.

A ESC com cossolvente EtOH e EtOH+água (90/10) proporcionou valores de X_0 estatisticamente diferentes, enquanto que o primeiro apresentou resultado semelhante a extração assistida por ultrassom com hexano sendo estes, os menores resultados obtidos, já o segundo não apresentou diferença significativa das demais extrações com etanol e Soxhlet hexano. Observa-se que, para todas as técnicas, a mistura água e EtOH foi a que apresentou os maiores resultados.

Maia (2016) avaliou a extração de mangaba desidratada (*Hancornia speciosa*), e seus resultados com o solvente água para as EBP foram superiores aos encontrados para o talo de beterraba. O autor encontrou para os solvente água e etanol os valores para maceração 26 ± 4 % e $21,0\pm 0,7$, Soxhlet 69 ± 4 e $53,8\pm 0,8$ e para ultrassom 61 ± 2 e 32 ± 2 , respectivamente. O autor não fez uso da mistura etanol e água. Para este fruto, assim como para o talo, Soxhlet apresentou melhores resultados em relação às demais quanto ao X_0 .

4.2.3 Conteúdo de fenólicos totais e potencial antioxidante

4.2.3.1 Conteúdo de Fenólicos Totais (CFT)

Os resultados referentes a composição fenólica dos extratos obtidos a baixas e alta pressão são apresentados na Tabela 17. Os valores para CFT variaram de 11 ± 5 a 98 ± 6 ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

O método que apresentou maior eficiência na extração de compostos fenólicos para o talo de beterraba quanto ao CFT foi a ESC utilizando etanol como cossolvente, apresentando um valor significativamente diferente de todos os demais resultados (98 ± 6 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$). A ESC é uma técnica que apresenta alta seletividade, e a extração dos compostos fenólicos foi facilitada com o emprego de um

solvente de polaridade intermediária. O emprego de baixa temperatura, em relação a extração em aparato Soxhlet também é uma vantagem, pois diminui a degradação dos compostos com potencial antioxidante (ZOUAGH, et al., 2004; REVERCHON, MARCO, 2006).

Analisando os solventes empregados percebe-se que a mistura água e etanol e o etanol puro apresentaram os melhores resultados para todas as técnicas, mais uma vez, com exceção de maceração. Percebe-se que a extração em aparato Soxhlet se destacou na extração utilizando os solventes etanol e a mistura água e etanol, apresentando um CFT de $55,0 \pm 0,7$ e 54 ± 3 $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, respectivamente. Mesmo empregando uma alta temperatura, este método apresentou-se como superior em relação as demais EBP. Quanto a diferença no comportamento do CFT em relação aos solventes na técnica de maceração, assim como no X_0 , o hexano superou os demais solventes, apresentando um CFT de 31 ± 5 ($\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$). Como explicado anteriormente, esta técnica não se apresentou como uma boa opção para as amostras que utilizaram o solvente água e a mistura água e etanol. Interessante destacar que a amostra obtida por maceração com hexano, após o processo de rotaevaporação permaneceu oleosa, o que não aconteceu nas demais técnicas para este solvente.

Tabela 17 – Conteúdo de fenólicos totais (CFT) obtidos para o talo de beterraba e padrões antioxidantes.

Método	Solvente	CFT (mg _{EAG} /g _{extrato})
Talo seco <i>in natura</i>	Metanol 70%*	26 ^{cde} ±3
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	11 ^g ±5
	Água+EtOH	54 ^b ±3
	EtOH	55,0 ^b ±0,7
	Hexano	24 ^{cdef} ±4
Maceração	Água	16 ^{efg} ±1
	Água+EtOH	15 ^{fg} ±2
	EtOH	22 ^{defg} ±2
	Hexano	31 ^{cd} ±5
Ultrassom	Água	14 ^{fg} ±1
	Água+EtOH	25 ^{cde} ±5
	EtOH	33 ^c ±4
	Hexano	14 ^{fg} ±4
Extração a alta pressão		
ESC250 bar / 40°C / 0,5 Kg/h	CO ₂ +10% EtOH	98 ^a ±6
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	23 ^{cdef} ±2

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey. *Metodologia de acordo com Padrão Internacional ISO 14502-1.

O talo seco *in natura* apresentou um valor de 26±3 (mg_{EAG}/g_{extrato}) que foi inferior ao obtido em aparato Soxhlet com EtOH e Água+EtOH e com ESC com 10% de EtOH. Percebe-se que, de uma forma geral, o etanol se apresentou como o melhor solvente na extração de compostos fenólicos para o talo de beterraba e neste caso, as variáveis de processo em aparato Soxhlet (tempo de contato amostra/solvente, temperatura, ciclos de solvente) e ESC (pressão, temperatura, solvente+cossolvente) contribuíram nos maiores resultados de CFT se compararmos com a amostra seca *in natura*.

Bergamaschi (2010) trabalhou com extração por ultrassom de diversos resíduos de origem vegetal, entre eles, o talo da beterraba. O conteúdo de fenólicos totais determinados foi de 56,92 e 12,50

($\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) utilizando etanol (80 %) e água, respectivamente. Esses resultados comparados aos obtidos por ultrassom deste estudo, demonstram que para o solvente água ($14 \pm 1 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$), foi obtido um valor superior ao de Bergamaschi, enquanto que para a mistura água+EtOH ($25 \pm 5 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) e para etanol puro ($33 \pm 4 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) foram inferiores.

Tiveron (2010) estudou diversas hortaliças, entre elas a beterraba. Os extratos foram obtidos da matéria-prima liofilizada e sonificada com etanol (80%), sendo os sobrenadantes utilizados para as análises. O resultado apresentado para o CFT foi de $2,9 \pm 0,2 \text{ (mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}})$, inferior a todos os resultados das técnicas utilizadas para o talo de beterraba. Melo e Farias (2014) em estudo da composição centesimal, fenólica e potencial antioxidante em partes comestíveis não convencionais de seis olerícolas (por exemplo folhas e talos da beterraba), realizaram uma extração simples utilizando etanol (95 %) em agitação, seguida de repouso e filtração. Os autores obtiveram um valor igual a $5,4 \pm 0,5 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Esse valor, mesmo se comparando a técnica de maceração com etanol ($22 \pm 2 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) é inferior aos resultados obtidos neste trabalho.

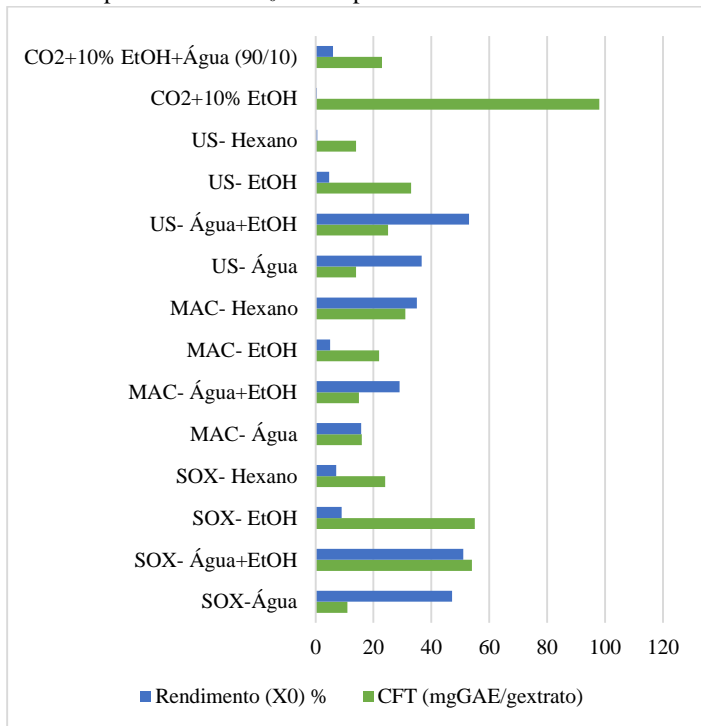
De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), existem vários fatores que podem interferir no conteúdo de metabólitos secundários nas plantas, dos quais os compostos fenólicos fazem parte. Dentre esses fatores estão a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, adição de nutrientes, poluição atmosférica, danos mecânicos e ataques de patógenos.

De forma geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares, embora alguns possam ser solubilizados por hexano ou dióxido de carbono. Esta característica pôde ser verificada nos resultados obtidos nas técnicas de extração aplicadas ao talo de beterraba.

A Figura 19 apresenta um comparativo entre o rendimento e o CFT dos extratos obtidos através do talo de beterraba. Analisando a figura entende-se que extratos com maiores rendimentos apresentaram uma quantidade de CFT menor se comparada aos métodos de extração mais seletivos, como é o caso da ESC com 10% de cossolvente etanol. Isso, como explicado anteriormente, tem relação com o método de extração e com o solvente utilizado. Percebeu-se que no caso do talo, assim como para a folha, o solvente que apresentou melhor capacidade

de extração de CFT foi o etanol, neste caso, juntamente com a mistura água e etanol (1:1).

Figura 19 – Comparativo entre X_0 e CFT para os extratos de talo de beterraba.



Fonte: A autora.

Observando apenas as EBP, a extração com etanol e com a mistura água e etanol através do aparato Soxhlet apresentaram um ótimo conteúdo de CFT, já em comparação com os ensaios a alta pressão, a ESC utilizando como solvente etanol a 10 % apresentou o melhor resultado para CFT em relação a todos os demais métodos utilizados na extração do talo de beterraba.

4.2.3.2 Potencial antioxidante pelo método do radical DPPH

Os resultados do potencial antioxidante dos extratos de talo de beterraba à baixa e alta pressão analisados pelo método de captura do

radical DPPH estão dispostos na Tabela 18. Os valores de CE_{50} variaram de $59,4 \pm 3,2$ a concentrações superiores a $2000 \mu\text{g/mL}$.

Avaliando as técnicas de extração, a que apresentou melhores resultados num aspecto geral para extração de compostos antioxidantes foi a maceração.

Tabela 18 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de talo de beterraba através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % de atividade (CE_{50}).

Método	Solvente	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	$1294,6^b \pm 0,8$
	Água+EtOH	$1232^{bc} \pm 186$
	EtOH	$59,4^f \pm 3,2$
	Hexano	$800^{cde} \pm 5$
Maceração	Água	$797^{cde} \pm 2$
	Água+EtOH	$702^{de} \pm 40$
	EtOH	$518^{ef} \pm 4$
	Hexano	$1131^{bcd} \pm 35$
Ultrassom	Água	$<2000^a$
	Água+EtOH	$<1500^b$
	EtOH	$1147^{bcd} \pm 60$
	Hexano	$1428^b \pm 69$
Extração a alta pressão		
ESC250 bar / 40°C / $0,5 \text{ Kg h}^{-1}$	$\text{CO}_2+10\% \text{ EtOH}$	$<1500^b$
	$\text{CO}_2+10\%$	
	$\text{EtOH}+\text{Água} (90/10)$	$738^{cde} \pm 33$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey.

Segundo Reynertson et al. (2008), valores de CE_{50} até $50 \mu\text{g/mL}$ são considerados muito ativos, valores de $50 - 100 \mu\text{g/mL}$ são moderadamente ativos, de 100 a $200 \mu\text{g/mL}$ possuem uma certa capacidade de inibição, enquanto que superiores a $200 \mu\text{g/mL}$ são considerados inativos no que diz respeito aos radicais livres no método da captura do radical livre por DPPH. Logo, o extrato obtido através do aparato Soxhlet utilizando etanol como solvente foi o único que se apresentou muito ativo, com um valor de $59,4 \pm 3,2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}_{\text{extrato}}$. Este

resultado é inferior ao potencial antioxidante encontrado para o antioxidante sintético BHT (67 µg/mL) no trabalho realizado por Cruz (2016), o que indica o alto potencial antioxidante do extrato de talo de beterraba e seu possível emprego como antioxidante industrial.

Avaliando os solventes empregados nos processos de extração, os melhores resultados encontrados estão ligados ao etanol, evidenciando a polaridade intermediária dos solutos presentes na matriz do talo de beterraba. Em contrapartida, o emprego de etanol na ESC, acabou apresentando um resultado inferior ao da mistura etanol e água, isso pode ser explicado pela facilidade da solubilização dos compostos presentes na matriz pela água, possibilitando sua extração e consequentemente, quantificação. Água e solventes hidroalcoólicos são preferidos quando o objetivo é a obtenção de corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos (GÓMEZ-PLAZA et al, 2006).

Comparando ao trabalho de Bergamaschi (2010), na extração via ultrassom do talo de beterraba utilizando como solvente etanol (80 %) e água, obtive um CE_{50} de 260 µg/mL e 640 µg/mL, respectivamente, melhores que os encontrados para o talo utilizando etanol puro e água como cossolvente desse estudo.

4.2.3.3 Potencial antioxidante pelo método do radical ABTS

Na Tabela 19 são apresentados os resultados obtidos para os extratos a técnicas de baixa e alta pressão quanto sua determinação do potencial antioxidante pelo método de captura do radical ABTS. Esta análise objetiva a verificação da capacidade dos compostos presentes nos extratos de talo de beterraba 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). Este método se apresenta como uma excelente ferramenta para determinar o potencial antioxidante de compostos doadores de hidrogênio e de compostos terminadores de cadeias (RE et al. 1999).

Tabela 19 – Potencial antioxidante pelo método de captura do radical ABTS dos extratos obtidos do talo de beterraba pelos métodos a baixa e alta pressão.

Método	Solvente	TEAC ($\mu\text{mol/g}_{\text{extrato}}$)*
Extração a baixa pressão		
Soxhlet	Água	49,20 ^{de} ±0,03
	Água+EtOH	6,70 ^g ±0,05
	EtOH	730 ^a ±14
	Hexano	24,6 ^{efg} ±0,2
Maceração	Água	10,30 ^g ±0,01
	Água+EtOH	41,6 ^{ef} ±0,4
	EtOH	11 ^{fg} ±3
	Hexano	0,0 ^g ±0
Ultrassom	Água	9 ^g ±4
	Água+EtOH	17 ^g ±3
	EtOH	83 ^c ±2
	Hexano	41,4 ^{ef} ±0,5
Extração a alta pressão		
ESC250 bar / 40°C / 0,5 Kgh ⁻¹	CO ₂ +10% EtOH	137 ^b ±33
	CO ₂ +10% EtOH+Água (90/10)	79 ^{cd} ±12

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey. *TEAC: equivalente ao trolox.

Os resultados obtidos com esta análise *in vitro* variaram do 0,0 a 730 ($\mu\text{mol/g}_{\text{extrato}}$). Avaliando a melhor técnica quanto a extração de compostos com potencial antioxidante, pode-se destacar a realizada em aparato Soxhlet e extração supercrítica. Ambos os métodos apresentaram para o etanol valores de 730±14 e 137±33 ($\mu\text{mol/g}_{\text{extrato}}$) respectivamente.

O etanol se mostrou como melhor solvente quanto a extração de compostos antioxidantes detectáveis pelo método de captura do radical ABTS, para todas as técnicas a baixa pressão e quando utilizado na concentração de 10 % como cossolvente ao CO₂ na ESC.

Quando avaliou o potencial antioxidante dos extratos do talo de beterraba obtidos por ultrassom, Bergamaschi (2010) encontrou 121,48 ($\mu\text{M}_{\text{Trolox/g}_{\text{extrato}}}$) utilizando etanol (80 %) e 79,67 ($\mu\text{M}_{\text{Trolox/g}_{\text{extrato}}}$) utilizando água, respectivamente. Esses valores são superiores aos obtidos na técnica em ultrassom neste trabalho, com exceção do

resultado obtido para etanol (83 ± 2), que foi superior ao de água obtido por Bergamaschi. Essa diferença envolve inúmeras variáveis, pode-se levar em consideração as diferenças entre as matérias-primas, como a terra de cultivo, clima, região, período de colheita, manuseio, método de armazenamento e processamento, entre outros.

Tiveron (2010) estudou diversas hortaliças, entre elas a beterraba. Os extratos foram obtidos da matéria-prima liofilizada e sonificada com etanol (80%), o sobrenadante foi utilizado para a análise de ABTS, sendo encontrado um valor de $11,1 \pm 1,2 \mu\text{M}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ para a beterraba. Comparando com o resultado obtido por maceração utilizando etanol como solvente, as amostras dos extratos apresentaram o mesmo valor para o potencial antioxidante, embora as técnicas não sejam as mesmas na obtenção do extrato, percebe-se uma semelhança entre essas duas partes da hortaliça.

Ao se comparar com o antioxidante sintético BHT, Cruz (2016), que em seu trabalho apresentou um valor de $5238 \pm 236 \mu\text{M}_{\text{TEAC}}/\text{g}_{\text{extrato}}$, percebe-se que os valores antioxidantes apresentados nos extratos de talo pelo método de captura do radical ABTS (resultados do presente trabalho) são baixos. Deve ser levado em consideração, que os extratos vegetais são instáveis, podendo sofrer degradação pela luz, oxigênio, pH e outros. No caso do extrato obtido por Soxhlet, que apresentou o melhor resultado para o método de ABTS, sua extração foi realizada a alta temperatura, durante um longo período e posteriormente ainda foi submetido a eliminação do solvente, estando exposto a muitas variáveis que influenciaram na diferença se comparado ao BHT.

Ainda assim, o extrato do talo da beterraba apresenta-se como uma alternativa em substituição aos antioxidantes sintéticos, lembrando que, para o teste de DPPH esta mesma amostra apresentou um potencial antioxidante maior que o próprio BHT.

4.2.3.4 Potencial antioxidante pelo método FRAP

O método de FRAP para determinação do potencial antioxidante foi desenvolvido como uma alternativa para fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros, podendo ser aplicado no estudo do potencial antioxidante em extratos de alimentos, bebidas e da eficiência antioxidante de substâncias puras (BEGAMASCHI, 2010). Os antioxidantes presentes no extrato vegetal são avaliados como redutores

do Fe^{+3} a Fe^{+2} , sendo quelados por 2,4,6-Tri (2-Píridil) -s-Triazina (TPTZ), para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ (cor azul) (BENZIE e STRAIN, 1996).

Os resultados obtidos para o potencial antioxidante dos extratos do talo de beterraba a baixa e alta pressão determinados pelo FRAP são apresentados na Tabela 20. Os potenciais antioxidantes variaram de 0 a 633 ± 54 ($\mu\text{Mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$), demonstrando uma grande diferença entre os processos e solventes utilizados. Avaliando a influência do solvente na extração, percebe-se que, com exceção da técnica assistida por ultrassom, para todas as demais, o solvente etanol foi mais eficaz na extração de compostos antioxidantes secundários, que são os que a metodologia FRAP é capaz de medir. O melhor resultado foi obtido utilizando 10 % de etanol como cossolvente na ESC. Já as extrações que utilizaram água ou a mistura etanol e água, apresentaram os menores resultados.

Shaidi e Naczki (1995), destacam que a natureza química dos compostos antioxidantes nos alimentos varia do simples ao altamente polarizado e há grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade da interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos com alto peso molecular são altamente insolúveis em água, explicando os resultados obtidos tanto para a folha quanto que para o talo de beterraba quando se utilizou água na extração.

Tabela 20 - Determinação do potencial antioxidante (PA) pelo método de redução do ferro (FRAP) dos extratos obtidos do talo de beterraba a baixa e alta pressão.

Método	Solvente	PA ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$)	
Extração a baixa pressão			
Soxhlet	Água	5,5 ^f ±0,8	
	Água+EtOH	17 ^{ef} ±3	
	EtOH	63 ^{cdf} ±3	
Maceração	Hexano	156 ^b ±0	
	Água	6,4 ^f ±0	
	Água+EtOH	7 ^f ±4	
	EtOH	163 ^b ±11	
Ultrassom	Hexano	30 ^{def} ±2	
	Água	0 ^f ±0	
	Água+EtOH	1,5 ^f ±0	
	EtOH	30 ^{def} ±2	
Extração a alta pressão	Hexano	87 ^c ±5	
	ESC 250 bar / 40°C / 0,5 Kgh ⁻¹	CO ₂ +10% EtOH	633 ^a ±54
		CO ₂ +10%	70 ^{cd} ±4
		EtOH+Água (90/10)	

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey.

Comparando ao trabalho de Bergamaschi (2010), na extração via ultrassom do talo de beterraba utilizando como solvente etanol (80 %), foi encontrado um valor de 619 $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ e para a água de 398 $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Esses resultados são superiores aos que foram encontrados para os extratos de talo com os diferentes solventes testados. Embora as técnicas utilizadas para ambos os trabalhos seja extração assistida por ultrassom e água como solvente, a diferença nesses resultados pode ser explicada pelas diferenças nas etapas de extração. Bergamaschi não especifica o tipo de ultrassom utilizado, se é sonda ou banho, dificultando a análise dos interferentes como um todo.

Bergamaschi (2010) utilizou um tempo de extração de 15 min, seguido de centrifugação e posterior filtração, sendo o sobrenadante recolhido e armazenado durante no máximo uma semana. Neste trabalho

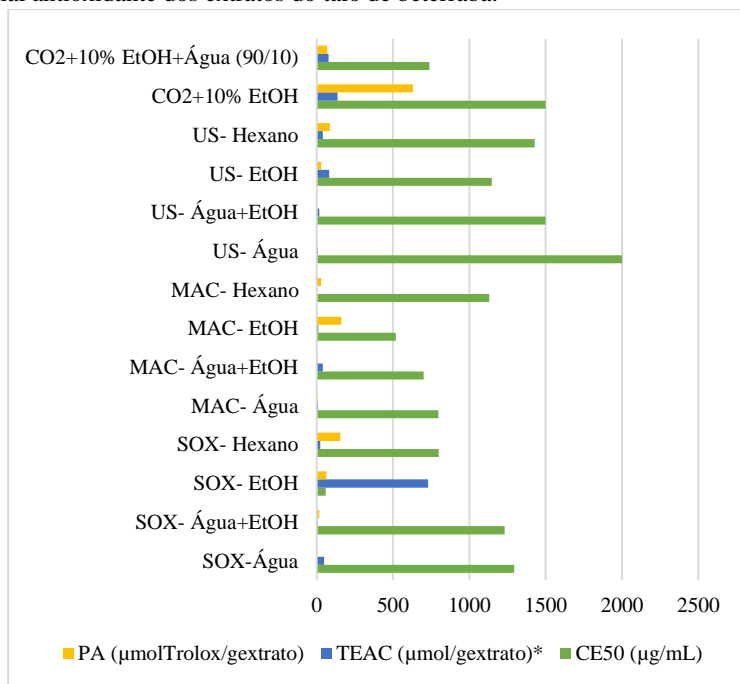
a extração assistida por ultrassom (sonda com microponta) foi conduzida durante 7 min na potência máxima, filtrados e submetidos a rotaevaporação para eliminação do solvente. É importante destacar que a utilização de microponta e alta frequência na extração assistida por ultrassom, segundo Vinatoru (2010), aumenta o rendimento mas aumenta paralelamente a degradação dos constituintes da matéria-prima. Desta forma, uma explicação para a diferença entre os resultados apresentados pela mesma matéria-prima, mesmo solvente estejam nas particularidades do processo e equipamento de ultrassom.

Na Figura 20 são apresentados os valores do potencial antioxidante do talo de beterraba para os testes *in vitro* (DPPH, ABTS e FRAP).

4.2.3.5 Considerações sobre o talo de beterraba

Os extratos obtidos com o talo de beterraba, assim como os provenientes da folha, apresentaram preferência pelo solvente etanol. Levando em consideração os resultados obtidos para as análises do potencial antioxidante, percebeu-se que, embora o extrato advindo da ESC com 10 % de cossolvente etanol tenha apresentado um rendimento (como discutido na seção 4.2.3.1) inferior aos demais, a sua qualidade e potencial antioxidante apresentou-se superior as EBP, com execução do teste *in vitro* DPPH, onde o extrato obtido através do Soxhlet com etanol apresentou um valor de CE_{50} comparável a antioxidantes sintéticos. Sendo este resíduo, também, além de uma fonte de minerais e vitaminas, uma alternativa no que diz respeito ao emprego como antioxidante natural em alimentos ou cosméticos.

Figura 20 – Comparativo entre as três técnicas para determinação *in vitro* do potencial antioxidante dos extratos do talo de beterraba.



Fonte: A autora.

4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A determinação da composição química dos extratos da folha e talo da beterraba (*Beta vulgaris* L.) foi realizada apenas para alguns extratos, selecionados em função dos resultados de rendimento e/ou CFT. Assim, os extratos selecionados para folha de beterraba, obtidos pelas técnicas a baixa e a alta pressão, foram: Soxhlet com etanol, Soxhlet com água, ultrassom com etanol, ESC com 7 % de cossolvente etanol e água (90:10), ELP1 a 100 bar com etanol e ELP2 a 100 bar com etanol. Para o talo de beterraba foram selecionados os extratos: Soxhlet com etanol, Soxhlet com etanol e água, e ESC com 10 % de cossolvente etanol.

A Tabela 21 apresenta a lista dos componentes identificados nos extratos selecionados da folha e talo de beterraba obtidos pelas técnicas

a baixa pressão (Soxhlet e ultrassom) e a alta pressão (ESC e ELP). No total, 71 compostos foram identificados nos extratos, mas apenas 48 apresentaram uma confiabilidade maior ou igual a 70 %.

Analizando os resultados apresentados, percebeu-se que os componentes majoritários dos extratos da folha e talo de beterraba identificados pelo CG-EM, por *headspace* foram o Dimetilsilanodiol, 2-Etil-1-hexanol e 2,2-dimetoxi-1,2-difenil-etanona.

As amostras que possibilitaram a maior quantidade de compostos identificáveis tanto para a folha quanto que para o talo, foi Soxhlet com solvente etanol. Isso pode ser atribuído a falta de seletividade apresentada pelo método, que é devido ao refluxo de solvente puro e ao tempo de extração.

O composto dimetilsilanodiol já é empregado em cosméticos com finalidade no tratamento de acne. Possui ação queratolítica, anti-inflamatória e anti-edema. O Salicilato de Dimetilsilanodiol combate o efeito citodestrutivo dos radicais livres, reestruturando a membrana celular e combatendo a peroxidação lipídica (POLYTECHNO, 2007).

O composto 2-Etil-1-hexanol (nome industrial isoctanol), foi identificado nas nove amostras. De acordo com The Dow Chemical Company (2002), o 2-Etil-1-hexanol tem como aplicações a fabricação de ésteres de baixa volatilidade, herbicidas, entre outros.

Comparando os extratos obtidos com as técnicas a alta pressão para a folha, percebe-se que a ESC em relação a ELP apresentou maior número de compostos identificáveis por CG-EM em *headspace*.

Apesar de os resíduos de beterraba apresentarem bons resultados nas análises anteriores de CFT e antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP), não foi possível a identificação de quantidades significativas de compostos fenólicos na análise de CG-EM. Segundo Bergamaschi (2010), esse fato evidencia a possibilidade de compostos fenólicos estarem unidos a outros grupos e/ou compostos, não sendo possível sua identificação por CG-EM.

Embora a análise realizada por CG-EM ter se mostrado como uma boa ferramenta na identificação dos compostos dos extratos obtidos da folha e talo de beterraba, o uso de outros métodos, como HPLC, poderia detectar a presença de outras substâncias com maior polaridade, como as betalaínas.

Tabela 21 – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

Composição	Área								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Dimetilsilanol	0,50	-	-	-	-	-	-	17,17	-
2 2-Etil-1-Hexanol	5,36	10,28	28,45	2,54	6,28	1,32	18,01	83,83	1,22
3 1,2,4-trimetil-Benzeno	3,70	-	-	-	-	-	-	-	-
4 1,2,3-trimetil-Benzeno	1,43	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Undecano	2,24	-	-	-	-	-	2,20	-	-
6 Hexadecano	-	-	1,09	-	-	-	-	-	-
7 2-metil-deca-hidro-Naftaleno	2,99	-	-	-	-	-	-	-	-
8 Ciclopentano	2,80	-	-	-	-	-	-	-	-
9 1-Metil-deca-hidronaftaleno	0,87	-	-	-	-	-	1,32	-	-
10 2-metil-decano	1,38	-	-	-	-	-	-	-	-
11 2,6-dimetil-deca-hidro-naftaleno	1,34	-	-	-	-	-	-	-	-
12 3-metil-undecano	1,78	-	-	-	-	-	-	-	-
13 2-metil-undecano	-	-	-	-	-	-	1,21	-	-
14 2,3,5-trimetil-Decano	-	-	-	-	-	-	8,79	-	-
15 4,6-dimetil-undecano	7,31	-	-	-	-	-	-	-	-
16 Dodecano	7,90	-	-	-	-	-	-	-	-
17 3,6-dimetil-undecano	3,09	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

Tabela 21 (Continuação) – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

	Composto	Área								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
18	2,6-Bis (1,1-dimetiletil) -4- (1-oxopropil) fenol	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
19	4-octadecil-morfina	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-
20	2,2-dimetoxi-1,2-difenil-etanona	0,79	3,59	0,1	0,10	-	-	-	-	-
21	3- Octanona	-	23,80	-	-	-	-	-	-	-
22	2,6-Bis (1,1-dimetiletil) -4- (1-oxopropil) fenol	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
24	4- (2,6,6-Trimetilciclo-hexa-1,3-dienil) but-3-em-2-ona	-	9,58	-	-	-	-	-	-	-
25	2-Alil-4-metilfenol	-	13,89	-	-	-	-	-	-	-
26	Megastigmatrienona	-	7,65	-	-	-	-	-	-	-
27	2,2-dimetoxi-1,2-difenil	-	3,60	-	-	-	-	-	-	-
28	1-Pentanol	-	-	-	-	-	-	-	-	23,62
29	1-Pentano	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	2-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Heptadecano	-	-	7,01	-	-	-	-	-	-
32	3-metil-nonano	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-
33	1,1,3-trietoxi-propano	-	-	-	0,55	-	-	-	-	-
34	Tetradecano	-	-	4,76	-	-	-	-	-	-
35	(E) -5-Dodecano	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-
36	(E) -4-Tetradecano	-	-	2,04	-	-	-	-	-	-

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

Tabela 21 (Continuação) – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

	Área								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
37		2-metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	0,97
38		Tetrametil-Pirazina	-	-	-	-	4,65	-	-
39		2-butil-1,1,3-trimetil-ciclohexano	-	-	-	-	0,85	-	-
40		4-metilpentil-ciclohexano	-	-	-	-	0,91	-	-
41		Ciclotetradecano	-	-	-	-	0,56	-	-
42		2,10-dimetil-undecano	-	-	-	-	0,47	-	-
43		2,6-dimetil-octano	-	-	-	-	0,78	-	-
44		[IR- (IR*:4Z,9S*)]-4,11,11-Trimetil-8- metileno-Biciclo[7.2.0] undec-4-eno	-	-	-	-	-	-	0,15
45		2-Heptanona	-	-	-	-	-	-	0,21

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliou-se o potencial antioxidante dos extratos obtidos através de técnicas a alta e baixa pressão de resíduos provenientes da produção agrícola da beterraba de mesa. As folhas e talos da beterraba, assim como sua raiz, são fonte de carboidratos, proteínas e fibras, mostrando-se como um alimento nutritivo e de qualidade para ser inserido na dieta alimentar.

Os extratos obtidos por extrações à baixa pressão para a folha apresentaram rendimentos superiores aos das extrações da ESC e LP. Os melhores resultados de rendimento para as extrações à baixa pressão foram obtidos por Soxhlet com água, enquanto que para a ESC, o maior rendimento obtido foi com o emprego de 10 % de cossolvente etanol e água (90:10) e para a ELP, a mistura etanol e água (70:30) a 100 bar apresentou o maior resultado. O incremento do percentual de água na extração proporcionou os melhores rendimentos, em relação aos demais solventes. Já para as extrações realizadas com o talo da beterraba, a mistura de solventes etanol e água foi mais eficiente nas EBP, sendo que o rendimento foi superior nas extrações da folha em relação ao talo.

Embora para a folha as extrações a alta pressão tenham apresentado baixos rendimentos, seus resultados para o ensaio de CFT foram superiores aos das EBP. O solvente mais eficiente, tanto nos extratos obtidos a EBP quanto na ELP, foi o etanol, enquanto que para ESC, o cossolvente a 4 % e a 7 % de etanol e água (90:10) apresentaram resultados superiores ao etanol puro. Para os ensaios de captura de radical DPPH e ABTS, o solvente que melhor extraiu compostos com potencial antioxidante foi o etanol, tanto nas EBP quanto as em alta pressão. As ELP1 apresentaram os melhores resultados para os métodos de avaliação do potencial antioxidante utilizados neste estudo, para o DPPH as ELP a 75 e 100 bar apresentaram resultados superiores ao antioxidante sintético BHT. As ELP1 a 75 e 100 bar também demonstraram os maiores valores para o teste *in vitro* FRAP. Na análise de ABTS as ELP a 125 bar e no extrator em escala menor (ELP2) apresentaram os maiores valores de potencial antioxidante.

Percebe-se que, embora os solventes e misturas com água tenham apresentado os melhores rendimentos, a água não foi tão eficiente na extração de compostos com potencial antioxidante, sendo o etanol uma melhor opção. A nova tecnologia de ELP mostrou-se como uma ótima alternativa na extração de compostos bioativos da folha de beterraba, sendo que este é o primeiro trabalho do grupo a utilizar essa técnica e equipamento.

Nas extrações realizadas com o talo de beterraba percebeu-se a inclinação, no que diz respeito ao rendimento, pela mistura etanol e água. Os rendimentos das EBP foram extremamente superiores aos ensaios realizados para ESC, sendo que, o método que apresentou o melhor rendimento foi o assistido por ultrassom com etanol e água. Mas esta técnica não se apresentou como eficiente na extração de compostos que apresentassem potencial antioxidante. A técnica ESC com 10 % de cossolvente etanol apresentou o maior valor para CFT, embora seu rendimento tenha sido o menor, para as EBP, o solvente etanol foi mais eficiente na extração de CFT, o que se repetiu para as análises de captura do radical DPPH e ABTS e para metodologia de redução FRAP.

Analisando a composição por CG-EM realizada em alguns extratos da folha e talo de beterraba, percebeu-se que os principais compostos voláteis obtidos nos diferentes extratos foram o Dimetilsilanodiol e o 2-Etil-1-hexanol. Outros componentes importantes também foram identificados nas amostras com polaridades semelhantes às dos solventes utilizados na extração.

Percebeu-se que, mesmo existindo uma variação para cada técnica de análise do valor biológico presente no extrato, o solvente que se apresentou como melhor opção na extração de compostos com valor biológico foi o etanol, isso se deve, principalmente a sua polaridade intermediária, tendo em vista que compostos fenólicos podem ser tanto polares como apolares, dependendo da sua classe. Embora a água e sua mistura com etanol tenham apresentado bons rendimentos, seu potencial antioxidante pode ter sido comprometido pela presença de carboidratos e proteínas, muitas vezes extraídos juntamente aos demais compostos, pela falta de seletividade que a água proporciona.

Por fim, as partes comestíveis não convencionais da beterraba, tanto a folha como o talo, são uma fonte alternativa de nutrientes, minerais. Estas apresentam um alto potencial biológico para serem

utilizadas na obtenção de extratos antioxidantes, podendo ser reaproveitados na indústria alimentícia ou farmacêutica, assim como a raiz da beterraba que já é empregada largamente como pigmento.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Realizar a desidratação dos extratos em liofilizador a vácuo;
- b) Testar diferentes temperaturas na ELP para folha e realizar ensaios também para o talo de beterraba.
- c) Trabalhar com extrações estáticas na ELP.
- d) Analisar o perfil de compostos fenólicos e betalainas nos extratos por cromatografia líquida.
- e) Avaliar o efeito antioxidante dos compostos que apresentaram melhor potencial em matrizes alimentícias como conservantes.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. 2011. Acesso em: 12/10/2016, Disponível em: www.abcsem.com.br
- AGUIAR, A.C.; VISENTAINER, J. V.; MARTINEZ, J. Extraction from striped weakfish (*Cynoscion striatus*) wastes with pressurized CO₂: Global yield, composition, kinetics and cost estimation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 1-10, 2012.
- AGUIAR, M. C. S.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. 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 Res. Int.** v. 62, p. 1095-1099, 2014.
- ALMEIDA, P.P. Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2006.
- ALMEIDA, P.P.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S.R.S. Extraction of *Mentha spicata* L. volatile compounds: Evaluation of process parameters and extract composition. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 548-559, 2012.
- ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spend coffee groups and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, n. 0, p. 544-552, 2012.
- ANDRADE, K. S. Extração e microencapsulamento de extratos de interesse biológico provenientes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* R.). (Tese de doutorado). Universidade Federal de Sana Catarina, Florianópolis, 2015.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Phenolic compounds in food – A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p.1-9, 2007.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. International Thermodynamic Tables of Fluid State, Carbon Dioxide. Pergamon Press, Oxford. 1976.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Compêndio da legislação brasileira de aditivos alimentares. 2014.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria N° 540 – SVS/MS de 27 de outubro de 1997. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad>

AOAC Method 963.15, **Association of Official Analytical Chemists**, USA, 1990.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBAUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H. DEBBACHE, N. Antioxidant capacity and phenol content of selected algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 303-309, 2009.

BARWICK, V.J. Strategies for solvent selection: a literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16(6), p. 293–309, 1997.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. *Osbeck*) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

BENZIE, F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal. Biochem.** v. 239, p. 70-76, 1996.

BERGAMASCHI, K.B. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2010.

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.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. Editora Appris. Curitiba-PR. ed. 1, 2015.

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

BYERS, J. A., Catálogo Phenomenex, 2009. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>.

CAMARGO FILHO, W. P., MAZZEI, A.R. **O mercado de beterraba em São Paulo**. Informações Econômicas, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 56-58, 2002.

CAMEL, V., "Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls", **Analyst**, vol.126, no.7, pp.1182-1193, 2001.

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

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p. 2288-2294. 2003.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization 5. and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends Food Sci. Technol.**, n.16, p.370-376, 2005.

COELHO, M.I.de S. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca do Umbu (*Spondias tuberosa* arruda) obtidos por diferentes técnicas. (Tese Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de alimentos. UFSC. Florianópolis. 2015

CONSTANT, P. B.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

CRUZ, P.N. da. Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. UFSC. Florianópolis, 2016.

DAVIS, S. *Plant pigments and their manipulation*. Oxford: CRC Press/Blackwell Publ., p.248-274, 2014.

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

ESCRIBANO, J., PEDREÑO, M. A., GARCÍA-CARMONA, F., MUÑOZ, R. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 124-12, 1998.

ESCLAPEZ, M.D., GARCÍA-PÉREZ, J.V., MULET, A., CÁRCCEL, J.A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Eng. Rev.** 3, p. 108–120, 2011.

FABICHAK, IRINEU. **Horticultura ao alcance de todos**. 4 ed. São Paulo. Nobel, p. 40-42, 1977.

FERREIRA, N.A. Aproveitamento de resíduos do processamento mínimo de beterraba: elaboração de produtos tecnológicos, avaliação sensorial, físico-química e de compostos funcionais. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana. Universidade de Brasília. DF, Brasil. 2010.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.263-269, 2002.

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. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p. 235-45, 1999.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S.I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in

popular antioxidante-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043-1048, 2011.

FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R.; BATAGLIA, O.C.; HIROCHE, R.; GALLO, J.R. Composição mineral de diversas hortaliças. BRAGANTIA: **Revista Científica do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo**. Campinas, v. 37, n. 5, p. 33-44, 1978.

GENENA, A.K. Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. UFSC. Florianópolis. 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K.M. Composição Centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J.M. Comparison of chromatic properties stability and antioxidante capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from diferente vinification methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 97, n. 1, p. 87-94. 2006.

GONÇALVES, L. C. P.; MARCATO, A. C.; RODRIGUES, A. C. B.; PAGANO, A. P. E.; FREITAS, B. C.; MACHADO, C. O.; NAKASHIMA, K. K.; ESTEVES, L. C.; LOPES, N. B.; BASTOS, E. L. Betalaínas: das cores das beterrabas à fluorescência das flores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 293-309. 2015.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Catalogação na Publicação Câmara Brasileira do Livro, v.1. 1983.

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.

HALVORSEN, B.L.; HOLTE, K.; MYHRSTAD, M. C. W.; BARIKMO, I.; HVATTUM, E.; REMBERG, S. F.; WOLD, A. N.; HAFFNER, K.; BAUGEROD, H.; ANDERSEN, L. F.; MOSKKAUG, J.; JACOBS, D. V. R.; BLOMHOFF, R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **The Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 132, n. 3, p. 461-471, 2009.

HERNANDES, N. K., CONEGLIAN, R. C. C., GODOY, R. L. O., VITAL, H. C., FREIRE JUNIOR, M. Testes sensoriais de aceitação da Beterraba Vermelha (*Beta vulgaris ssp Vulgaris L.*), cv. *Early Wonder*, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 64-68, ago, 2007.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑES, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from diferente natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, v. 98, p. 136-148, 2006.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495-2511, 2010.

IAL. ZNormas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed. Brasília: Editora MS, p. 1018, 2008.

IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3 ed. São Paulo: IMESP, p. 533,1985

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. CENSO AGROPECUÁRIO 1995/96 e 2006 - Brasil. 2009a. disponível em: <www.ibge.gov.br>

ISO 659-1998 (E),International Organization for Standardization, 1988.

ISO 14502-1. International Standard. Determination of substances characteristic of green and black tea. 2005.

JACQUES, R. S. Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 421–426, 2009.

JIANG, Y.; LI, P.; LI, S. P.; WANG, Y. T.; PY TU, "Optimization of pressurized liquid extraction of five major flavanoids from *Lysimachia clethroides*", **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol.43, no.1, pp.341-345, 2007.

JU, Z.Y.; HOWARD, L.R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of agricultural and food chemistry**. v, 51. p, 5207-5213, 2003.

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.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4761-4767, 2001.

KANNER, K.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains – A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 11, p. 5178-5185, 2001.

KHAN, M.I.; GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. **Phytochemistry**. v. 177, p. 267-295, 2015.

KHAN, M.I. Stabilization of betalains: A review. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1280-1285, 2016.

KOSAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R.. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, p. 525-533, 2005.

KUJAWSKA, M.; IGNATOWICZ, E.; MURIAS, M.; EWERTOWSKA, K.; JODYNIS-LIEBERT, J. Protective effect of red beetroot against carbon tetrachloride- and N-Nitrosodiethylamine-Induced oxidative stress in rats. **Journal Agric. Food Chemistry**, v. 57, p. 2570-2575, 2009.

KUJALA, T.S., LOPENA, J.M., KLIKA, K.D. Phenolics and betacyanins in Red Beetroot (*Beta Vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5338-5342, 2000.

LANGE, W.; BRANDENBURG, W.A.; DE BOCK, TSM. Taxonomy and cultivation of beet (*Beta vulgaris* L.). **Bot J Linn Soc**, v. 130, p. 86-96, 1999.

LEMES, G. F. Estabilidade da cor e teor de vitamina C do iogurte elaborado com corantes de betalaína microencapsuladas em spray dryer. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão. 2013.

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

LUQUE DE CASTRO, M.D.; VALCÁRCEL, M.T.; TENA, M.T. Analytical Supercritical fluid Extraction, Springer Verlag, Heidelberg, 1994.

MACHADO, A. P. F.; REÁTEGUI, J. L. P.; BARBERO, G. F.; REZENDE, C. A.; MARTINEZ, J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus sp.*) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 223-233, 2014.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 63, p. 1-19, 2008.

MAIA, Juliana Dias. **Avaliação de extratos bioativos de mangaba (*Hancornia speciosa*) utilizando processos a baixas e altas pressões**. 2016. 180 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2016.

MARTÍNEZ, J.; DA FONSECA MACHADO, A. P.; PASQUEL-REÁTEGUI, J.L.; BARBERO, G.F. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus L.*) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**. v. 77, p. 675-683, 2015.

MATÍNEZ, J.; PAES, J.; DOTTA, R. Extraction of phenolic compounds from blueberry (*Vaccinium myrtillus L.*) residues using supercritical CO₂ and pressurized water. **Iberoamerican Conference On Supercritical Fluids**, 2013.

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

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JÚNIOR, M.. O Efeito Do Ultra-Som Em Reações Químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MATTOS, I. A.F.; MACEDO, D. C.; CIABOTTI, S.; PEREIRA, L.A.; ALVARENGA, C.A. Avaliação da composição centesimal de folhas de beterraba comparadas com espinafre. **II Seminário de Iniciação Científica – IFTM**, Campus Uberaba, p. 1-5, 2009.

MATSURA, F. C. A. U. Estudo do albedo de maracujá e seu aproveitamento em barra de cereais. 2005. 138 f. Tese (Doutor em

Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. 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.

MAZZUTTI, S. Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2016.

MAZZUTI, S.; RIEHL, C.A.S.; IBAÑEZ, E.; FERREIRA, S.R.S. Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 119, p. 211-220, 2017.

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.

MELO, C.M.T.; FARIA, J.V. Composição centesimal, compostos fenólicos e atividade antioxidante em partes comestíveis não convencionais de seis olerícolas. **Biosci.J.** Uberlândia, v.30, n.1, p.93-100, 2014.

MEZZOMO, N.; OLIVEIRA, D. A.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant potential of extracts from processing residues from Brazilian food industries. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 211-218, 2013.

MICHIELIN, E.M.Z.; SALVADOR, A.A.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA JR., A.; SMÂNIA, E.F.A.; FERREIRA, S.R.S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenácea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615 – 6623, 2009.

MIKOLAJCZYK-BATOR, K.; BLASZCZYK, A.; CZYZNIEJEWSKI, M.; KACHLICKI, P. Characterisation and identification of triterpene

saponins in the roots of red beets (*Beta vulgaris* L.) using two HPLC-MS systems. **Food Chemistry**, v. 192, p. 979-990, 2016.

MONTEIRO, B. A. Valor nutricional de partes convencionais e não convencionais de frutas e hortaliças. 2009. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agronômicas. Botucatu – SP, 2009.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p 8-18, 2011.

NETZEL, M.; STINTZING, F. C.; QUAAS, D.; STRAB, G.; CARLE, R.; BITSCH, R.; BITSCH, I.; FRANK, T. Renal excretion of antioxidative. constituents from red beet in humans. **Food Res. Int.**, v.38, p.1051-1058, 2005.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ R.M. "Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge", **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol.29, no.7, pp.752-764, 2010.

OLIVEIRA, Daniela Alves de. Aplicação das tecnologias supercrítica e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2015.

OSÓRIO-TOBÓN, J.F.; MEIRELES, M.A.A. Recent application of pressurized fluid extraction: Curcuminoids extraction with pressurized liquids. **Food and Public Health**, n. 6, v.3, p. 289-303, 2013.

PAES, J.; DOTTA, R. ; BARBERO, G. F. ; MARTÍNEZ, J. . Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8-16, 2014.

PAULA JÚNIOR, T. J. de; VENZON, M. **101 Culturas: Manual de tecnologias agrícolas**. EPAMIG. Belo Horizonte, p. 155-160, 2007.

PEDRENO, M. A., ESCRIBANO, J. Studying the oxidation and antiradical activity of betalain from beetroot. **Journal of Biological Education**, v. 35, p. 49-59, 2000.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; RIO, D. D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGUENTI, F. Total antioxidante capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three diferente in vitro assays. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 2812-2819, 2003.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvente and certain food constituents on different antioxidante capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidante capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PRIM, M. B. S. Quantificação do desperdício de partes vegetais consumíveis: considerando a redução da fome e de geração de resíduos orgânicos. 2003. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

POLYTECHNO, Indústrias Químicas. Acnebiol: Complexo Bio-normalizador. 2007. Disponível em: <www.abcdef.com.ua/fotky27371/RWR_1/Bj_101/Acnebiol_lit.pdf>. Aesso em: 03/02/2017.

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.

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

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. *Ethnobotany Research & Applications*, v. 3, p 24-36, 2008.

RIZVI, S. Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries, Woodhead Pub Ltd, Cambridge, U.K.; Philadelphia, PA, 2010.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p, 444-452, 2012.

SHAIJI, F; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic Publishing**, p. 281-319,1995.

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), Departamento de Engenharia de Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

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

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.. Analisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOUZA, A.D.; MAIA, A.I.V.; RODRIGUES, T.H.S.; CANUTO, K.M.; RIBEIRO, P.R.V.; PEREIRA, R.C.A.; VIEIRA, R.F.; BRITO, E.S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**. v. 79, p. 91-103, 2016.

SOUZA, M. E. A. O. Potencial antioxidante de extratos de casca de manga (*Mangifera indica* L.) da variedade Tommy Atkins obtidos por baixa e alta ressonância e dimensionamento de uma coluna para extração supercrítica. 2015. 191 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2015.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v.9, n. 3, p. 415-420, 1994.

SOXHLET, F. *Dinglers' Polyt.* 232 – 461, 1879.

STORCK, C. R.; NUNES, G. L.; OLIVEIRA, B. B.; BASSO, C. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 3, p. 537-543, mar, 2013.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends Food Sci. Technol.**, v.5, p.19-38, 2004.

SUVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, p. 938-953, 2007.

UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos. Versão II. Ed. 2, Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H.T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos

em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, n.5, p. 1189-1194, 2009.

TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; BUTERA, D.; LIVREA, M. A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** n.80, p.941-945, 2004.

The Dow Chemical Company. Producty information, 2002. Disponível em: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0119/0901b8038011946a.pdf?filepath=oxysolvents/pdfs/noreg/327-00037.pdf&fromPage=GetDoc> Acesso em: 03/02/2017.

TRENTINI, C.P.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, C. Obtenção do óleo da polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) a partir da extração com líquido pressurizado. **Anais COBEQ 2015**.

TIVERON, A.P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP. 2010.

TIVELI, S.W.; FACTOR, T.L.; TERAMOTO, J.R.S.; FABRI, E.G.; MORAES, A.R.A. de; TRANI, P.E.; MAY, A. Beterraba: do plantio à comercialização. **Boletim Técnico Instituto Agronomico (IAC)**. Campinas, 2011.

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

VIGANÓ, J. Trends for the application of Passion Fruit Industrial By-Products: A review on the Chemical and extraction Techniques of Phytochemicals. **Food and Public Health**. v, 5, n. 5, p. 164-173, 2015.

VITTI, M.C.D.; KLUGE, R.A.; YAMAMOTTO, L.K.; JACOMINO, A.P. Comportamento da beterraba minimamente processada em diferentes espessuras de corte. **Horticultura Brasileira**. v. 21, n. 4, p. 623-626, 2003.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimento e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

ZAKHAROVA, N. S.; PETROVA, T. A. Relationship between the structure and antioxidante activity of various betalains. **Prikl Biochim Mikrobiol.** v. 9, p. 199-202, 1998.

ZITNANOVÁ, I.; RANOSTAJOVÁ, S.; SOBOTOVÁ, H.; DEMELOVÁ, D.; PECHÁN, I. DURACKOVÁ, D. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. **Versita**, Bratislava, v. 61, n. 3, p. 279-284, 2006.

ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: a critical review os its analytical usefulness. **Analytical Chemistry**, v. 23, n.5, p. 399-405, 2004.

YANG, Y.; ZHANG, F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 308-13, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curvas dos padrões das análises de atividade antioxidante

Figura 21 – Curva de calibração do ácido gálico

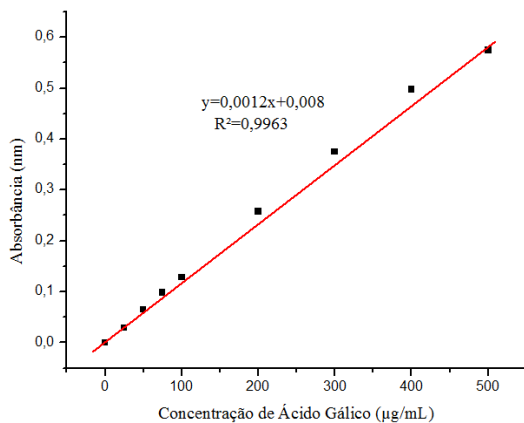


Figura 22 – Curva de calibração: inibição do radical ABTS versus concentração do padrão trolox

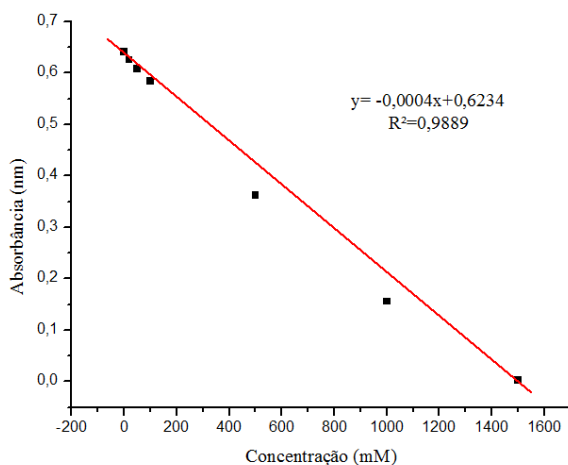
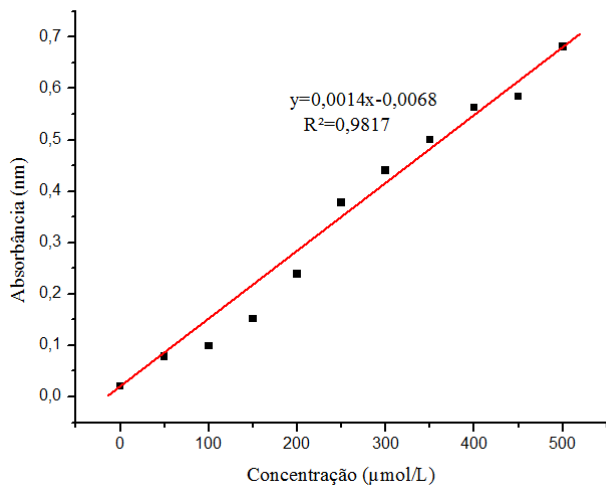


Figura 23 – Curva de calibração do padrão trolox para metodologia FRAP



APÊNDICE B – Dados experimentais da curva de extração ESC

Tabela 22 – Dados experimentais da curva cinética de ESC

ESC CO₂ puro	
Tempo (min)	Massa acumulada (g)
5	0
10	0,0002
15	0,0002
20	0,0004
25	0,0004
30	0,0008
40	0,0026
50	0,0049
60	0,0049
70	0,0103
80	0,0109
90	0,0151
100	0,0252
110	0,0284
120	0,0367
150	0,0428
180	0,0478
210	0,0583
240	0,0603
270	0,0694
300	0,07
330	0,0705

APÊNDICE C – Dados experimentais das curvas cinéticas de extração ELP

Tabela 23 – Dados experimentais da curva cinética de ELP com etanol.

Tempo (min)	Massa acumulada (g)		
	75 (bar)	100 (bar)	125 (bar)
0	0	0	0
3	0,0685	0,1821	0,2515
6	0,092	0,225	0,4596
9	0,1107	0,2516	0,5246
12	0,1271	0,2789	0,5658
17	0,156	0,3065	0,6156
22	0,1832	0,3345	0,656
27	0,2214	0,3526	0,6817
32	0,2561	0,3726	0,7178
37	0,2861	0,3921	0,7344
42	0,3081	0,413	0,7486
47	0,3245	0,4358	0,7628
52	0,3356	0,4541	0,8252
57	0,3459	0,4712	0,8362
62	0,3566	0,4944	0,8362
67	0,3679	0,5155	0,847
72	0,376	0,5325	0,857
77	0,3846	0,5496	0,8686
82	0,3935	0,5664	0,8791
87	0,4011	0,5804	0,8887
92	0,4057	0,5928	0,8997
97	0,416	0,6071	0,9536
102	0,4235	0,624	0,9651
107	0,4314	0,6403	0,9754
112	0,4402	0,6581	0,9754
117	0,4477	0,6695	0,9754
122	0,4545	0,6847	0,9754

APÊNDICE D – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

Tabela 24 – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

	Área								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	6,74	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,50	13,42	14,74	-	39,15	-	7,69	17,17	-
3	1,33	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2,72	10,28	-	2,54	-	1,32	18,01	83,83	1,22
5	2,4-di-hidro-2,4-dimetil-3H-pirazol-3-ona	5,79	-	-	-	-	-	-	-
6	2,5-dimetil-2-Hexeno	8,22	-	1,45	-	-	16,75	-	-
7	2-Etil-1-Hexanol	3,85	-	-	6,29	-	-	-	-
8	1,2,4-trimetil-Benzeno	3,70	-	-	-	-	-	-	-
9	1,2,3-trimetil-Benzeno	1,43	-	-	-	-	-	-	-
10	2-etil-1-Hexanol	5,36	-	28,45	-	-	-	-	-
11	Undecano	1,51	-	-	-	-	2,20	-	-
12	Hecadecano	-	-	1,09	-	-	-	-	-
13	2-metil-deca-hidro-Naftaleno	3,00	-	-	-	-	-	-	-
14	Ciclopentano	2,80	-	-	18,08	-	-	-	-
15	Pentil-Ciclo-hexano	1,14	-	-	-	-	-	-	-
16	1-Metil-deca-hidronaftaleno	0,87	-	-	-	-	1,32	-	-

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

Tabela 24 (Continuação) – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

	Área								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
17	1,38	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1,24	-	-	-	-	-	-	-	-
19	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0,81	-	-	-	-	-	-	-	-
21	1,34	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	0,46	-	-
23	0,85	-	-	-	-	-	-	-	-
24	1,05	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	1,21	-	-
26	-	-	-	-	-	12,28	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	8,79	-	-
28	7,31	-	-	-	-	-	-	-	-
29	1,06	-	-	-	-	-	-	-	-
30	2,81	-	-	-	-	-	-	-	-
31	7,90	-	-	-	-	-	-	-	-
32	3,09	-	-	-	-	-	-	-	-
33	4,24	-	-	-	-	-	3,99	-	-
34	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

Tabela 24 (Continuação) – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

	Composto								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
35	2,6-Bis (1,1-dimetiletil)-4-(1-oxopropil)fenol	0,25	-	-	-	-	-	-	-
36	10-hidroxi-11-morpholin-4-yl-ácido propil ester undecanoico	0,46	-	-	-	-	-	-	-
37	4-octadecil-morfina	0,38	-	-	-	-	-	-	-
38	2,2-dimetoxi-1,2-difenil-etanona	0,79	-	0,10	-	-	-	-	-
39	3- Octanona	-	23,80	-	-	-	-	-	-
40	Tioguanina	-	4,36	-	-	-	-	-	-
41	(+) - Borneol	-	13,43	-	-	-	-	-	-
42	4- (2,6,6-Trimetilciclo-hexa-1,3-dienil) but-3-em-2-ona	-	9,58	-	-	-	-	-	-
43	2-Alil-4-metilfenol	-	13,89	-	-	-	-	-	-
44	Megastigmatrienona	-	7,65	-	-	-	-	-	-
45	2,2-dimetoxi-1,2-difenil	-	3,60	-	-	-	-	-	-
46	1-Pentanol	-	-	26,46	-	85,31	-	-	23,62
47	1-Pentano	-	-	2,32	73,77	26,26	-	5,34	-
48	2-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano	-	-	6,06	-	-	-	-	-
49	Heptadecano	-	-	7,01	-	-	-	-	-

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

Tabela 24 (Continuação) – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

Composição	Área								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50 (Z)-6-Octen-2-one	-	-	-	0,46	-	-	0,41	-	0,23
51 7-Octen-2-one	-	-	-	1,12	5,92	0,84	-	-	-
52 1,1,3-trietoxi-Propano	-	-	-	0,55	-	-	-	-	-
53 Metil vinil cetona	-	-	-	-	21,12	-	-	-	-
54 1-butil-2(2-metilpropil)-ciclopropano	-	-	-	-	1,26	-	-	-	-
55 Tetradecano	-	-	4,76	-	-	-	-	-	-
56 1-ciclopentil-etanona	-	-	-	1,44	-	-	15,27	-	-
57 (E)-5-Dodecano	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-
58 (E)-4-Tetradecano	-	-	2,04	-	-	-	-	-	-
59 2-metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97
60 2-Heptanona	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21
61 S, S-dióxido cis-2,4-Dimetiltiano	-	-	-	-	-	-	4,59	-	-
62 2-metil-hexil ester-ácido butanóico	-	-	-	-	-	-	1,79	-	-

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

Tabela 24 (Continuação) – Compostos identificados nos extratos de folha e talo de beterraba por CG-EM.

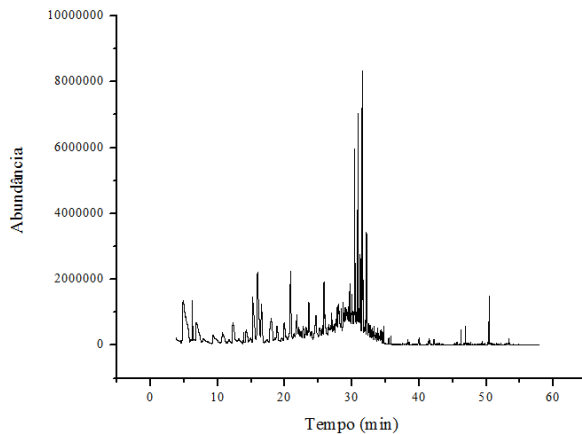
	Área								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
63									
64							4,65		
65							1,16		
66							1,26		
67							0,85		
68							0,91		
69							0,56		
70							0,47		
71							0,78		
							1,53		

Onde: 1-Folha Soxhlet com etanol, 2- Folha Soxhlet com água, 3- Folha Ultrassom com etanol, 4- ELP1 a 100 bar com etanol, 5- ELP2 a 100 bar com etanol, 6- ESC com 7% de etanol e água (90:10), 7- Talo Soxhlet etanol, 8- Talo Soxhlet etanol e água, 9- Talo ESC com 10% de etanol.

APÊNDICE E – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

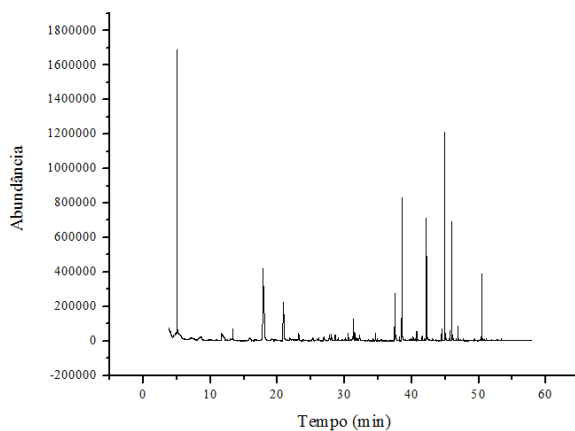
A1. CG-EM Folha Soxhlet etanol

Figura 24- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Soxhlet com etanol.



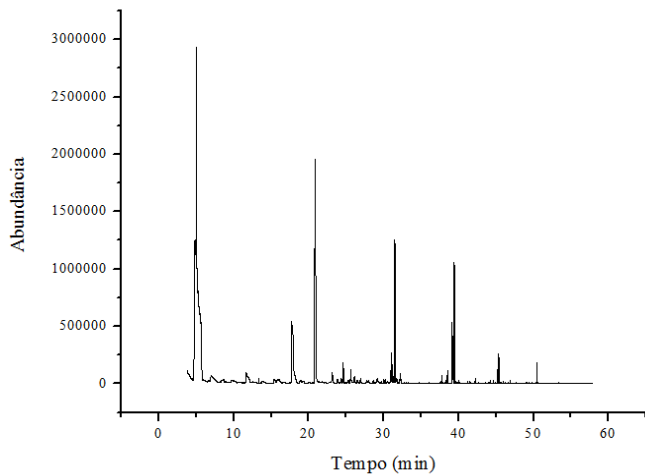
A2. CG-EM Folha Soxhlet água

Figura 25- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Soxhlet com água.



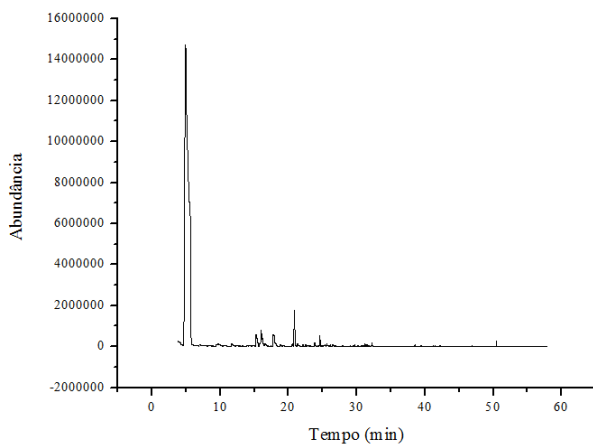
A3. CG-EM Folha Ultrassom etanol

Figura 26- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Ultrassom com etanol.



A4. CG-EM Folha ELP1 100 bar etanol

Figura 27 - CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Líquido Pressurizado (1) com etanol a 100 bar.



A5.

CG-EM Folha ELP2 100 bar etanol

Figura 28- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Líquido Pressurizado (2) com etanol a 100 bar.

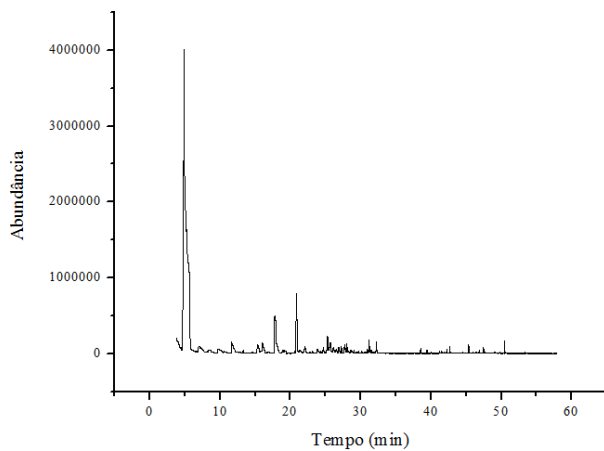
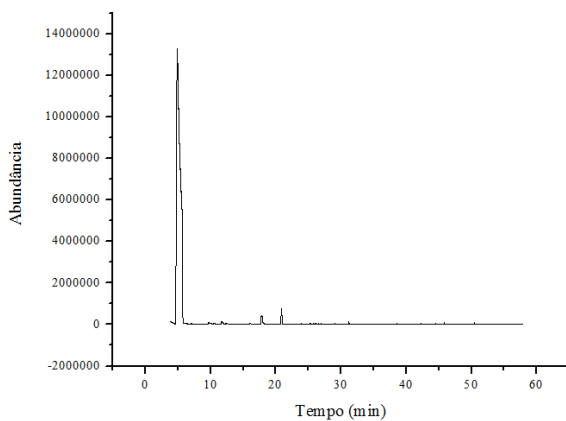
**A6. CG-EM Folha ESC 7% etanol e água (90/10)**

Figura 29- CG-EM do extrato de folha de beterraba obtido por Extração Supercrítica com 7% de etanol e água (90/10).



A7. CG-EM Talo Soxhlet etanol

Figura 30- CG-EM do extrato de talo de beterraba obtido por Soxhlet com etanol.

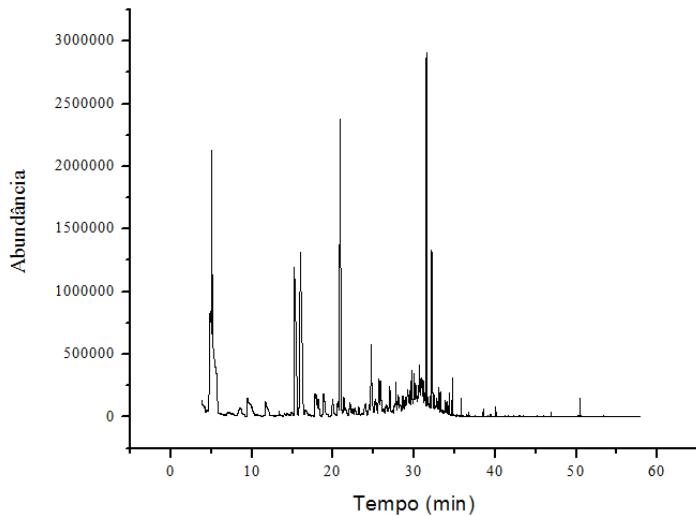
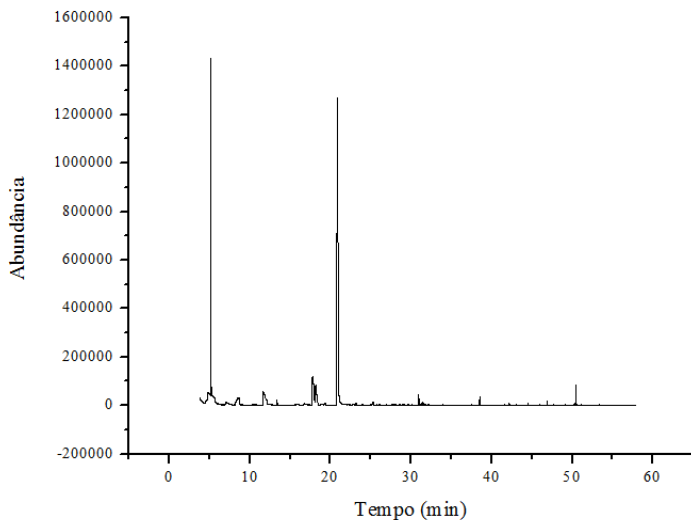
**A8. CG-EM Talo Soxhlet água e etanol**

Figura 31- CG-EM do extrato de talo de beterraba obtido por Soxhlet com água e etanol.



A9. CG-EM Talo ESC 10% etanol

Figura 32- CG-EM do extrato de talo de beterraba obtido por Extração Supercrítica com 10 % de etanol.

