

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

**AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGAÇO DE LARANJA
(*CITRUS SINENSIS* L. OSBECK) MEDIANTE OBTENÇÃO DE
EXTRATOS BIOATIVOS ATRAVÉS DE DIFERENTES
TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO**

PATRÍCIA BENELLI
Engenheira de Alimentos (UNISINOS 2005/2)

Orientadora: Prof^ª Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Florianópolis – SC
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B465a Benelli, Patrícia

Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração [dissertação] / Patrícia Benelli ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira. - Florianópolis, SC, 2010.

233 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Tecnologia de alimentos. 2. Engenharia de alimentos. 3. Laranja. 4. Antioxidantes. 5. Atividade antimicrobiana. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU 663

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

**AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGAÇO DE LARANJA
(*CITRUS SINENSIS* L. OSBECK) MEDIANTE OBTENÇÃO DE
EXTRATOS BIOATIVOS ATRAVÉS DE DIFERENTES
TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

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

PATRÍCIA BENELLI
Engenheira de Alimentos (UNISINOS 2005/2)

Orientadora: Prof^{da}. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Florianópolis – SC
2010**

**“AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGACO DE LARANJA
(*CITRUS SINENSIS* L. OSBECK) MEDIANTE OBTENÇÃO DE
EXTRATOS BIOATIVOS ATRAVÉS DE DIFERENTES
TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO”**

Por

Patrícia Benelli

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

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

Prof^ª. Dr^ª. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Carlos Alberto da
Silva Riehl

Dr^ª. Eliane Maria Zandonai
Michielin

Prof^ª. Dr^ª. Alcilene Rodrigues
Monteiro Fritz

Florianópolis, 26 de maio de 2010.

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente e ter me dado forças ao longo do caminho.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira pela orientação, dedicação, paciência e incentivo que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, pelos importantes ensinamentos à minha formação profissional. Em especial, aos professores Dr. Haiqo Hense e Dr. Julian Martínez pelas orientações técnicas e sugestões.

À Prof^ª. Dra. Alcilene R. M. Fritz e à secretária Raquel C. Agostineto, pela competência e apoio fundamentais na Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos.

Aos professores Dra. Alícia de Francisco, Dr. Artur Smânia Júnior, Dra. Edna Regina Amante, Dra. Elza de Fátima Albino Smânia, Dr. Carlos A. S. Riehl e Dra. Rozangela Curi Pedroza pelas gentis colaborações neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À MacroVita Alimentos Ltda. pela doação da matéria-prima e à Duas Rodas Industrial Ltda. pelo fornecimento de amostra.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, Cíntia, Darlene, Gilson, Gustavo, Jana, Jaque, Kátia, Kelin, Léo, Marieli, Sílvia e Thiago, pelos momentos de diversão e estudo compartilhados.

Aos meus colegas do LATESC, Eliane, Luís Carlos, Luís Fernando, Susana e Sibeles, pela troca de experiências,

companheirismo e momentos de descontração. Em especial, às amigas que carrego no coração Dani e Nati, pela grande companhia dentro e fora do laboratório e por me oferecerem a sua amizade e aceitarem a minha verdadeiramente.

À minha aluna de iniciação científica Renata Lazzaris dos Santos pela dedicação fundamental para a realização da parte prática deste trabalho.

Aos encontros gastronômicos do LATESC, onde sempre pudemos compartilhar de bons momentos.

Às minhas “colegas-amigas” de apartamento Morgana, Bárbara e Marta, pela companhia, convivência, paciência no dia-a-dia e por fazerem da nossa casa uma pequena família.

Ao meu cunhado Duda, pelos inúmeros “help desk”.

Aos meus pais, Valdemiro e Maria, e minha irmã, Juliana, pelo carinho, compreensão e apoio incondicionais dados a mim durante toda a vida, principalmente nos momentos mais difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho, mesmo sem saber direito sobre o que se tratava.

À todos a minha eterna e sincera gratidão.

Invictus

*“Do fundo desta noite que persiste
A me envolver em breu - eterno e espesso,
A qualquer deus - se algum acaso existe,
Por mi' alma insubjugável agradeço.*

*Nas garras do destino e seus estragos,
Sob os golpes que o acaso atira e acerta,
Nunca me lamentei - e ainda trago
Minha cabeça - embora em sangue - ereta.*

*Além deste oceano de lamúria,
Somente o Horror das trevas se divisa;
Porém o tempo, a consumir-se em fúria,
Não me amedronta, nem me martiriza.*

*Por ser estreita a senda - eu não declino,
Nem por pesada a mão que o mundo espalma;
Eu sou dono e senhor de meu destino;
Eu sou o comandante de minha alma.”*

*- William Ernest Henley (1849–1903) -
Tradução: André Carlos Salzano Masini*

RESUMO

O interesse das indústrias de alimentos e farmacêutica por compostos com alto grau de pureza e que apresentem propriedades biológicas é crescente nos últimos anos. As exigências governamentais e do mercado consumidor têm sinalizado para a importância do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o reaproveitamento de resíduos, que sejam ambientalmente seguras e garantam a qualidade dos produtos. Diversas pesquisas vêm se desenvolvendo para melhorar a aplicação dos resíduos agroindustriais. A laranja, por exemplo, tem como produto principal o suco. Entretanto, vários subprodutos são gerados durante o seu processamento, como os óleos essenciais, farelo de polpa cítrica e outros produtos com diferentes aplicações nas indústrias de tintas, cosméticos e de ração animal. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a obtenção de óleo de bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) aplicando a tecnologia supercrítica (ESC) com CO₂ puro e com adição de co-solvente com a finalidade de comparar, em termos de rendimento de processo, composição dos extratos e atividade biológica, com extratos obtidos a partir de técnicas de extração a baixa pressão (ultrassom - UE, Soxhlet - SOX, com diferentes solventes orgânicos, e hidrodestilação - HD). Os extratos supercríticos de bagaço de laranja foram obtidos entre pressões de 100 a 300 bar, temperaturas de 40 °C e 50 °C, com vazão de CO₂ de 17 ± 2 g/min, durante 5 h. A cinética de extração da ESC e a modelagem matemática também foram estudadas. Nas extrações a baixa pressão utilizou-se hexano (HX), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc), etanol (EtOH) e água (H₂O). Os rendimentos da ESC alcançaram valores de até $1,9 \pm 0,1$ % (m/m) para extrações com CO₂ puro e $4,2 \pm 0,9$ % (m/m) quando foi adicionado 8 % de co-solvente à extração. As extrações SOX com etanol e água obtiveram rendimentos de 51 ± 2 % (m/m) e $54,4 \pm 0,8$ % (m/m), respectivamente. Quando empregados no ultrassom, os mesmos solventes geraram rendimentos de 23 ± 1 % (m/m) para EtOH e 42 ± 2 % (m/m) para H₂O. Os modelos de transferência de massa de Martínez et al. (2003) e de Goto, Sato e Hirose (1993) foram os que apresentaram os melhores ajustes aos dados experimentais. O potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos por diferentes técnicas foram avaliados pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina), onde os melhores resultados de EC₅₀ foram obtidos para ESC adicionado de co-solvente (481 ± 8 a 403 ± 22 µg/mL) e as extrações

SOX ($347 \pm 6 \mu\text{g/mL}$) e UE ($434 \pm 13 \mu\text{g/mL}$) com acetato de etila. O teor de fenólicos total foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu e o melhor resultado foi obtido para UE-EtOAc ($60 \pm 5 \text{ mg EAG/g}$), enquanto que, para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, o melhor resultado foi obtido para ESC 50 °C/200 bar com CO₂ puro. A atividade antimicrobiana realizada por microdiluição em meio líquido mostrou que o extrato obtido por ESC a 200 bar/ 50°C apresentou-se como forte inibidor, indicando que 500 $\mu\text{g/mL}$ de extrato são suficientes para inibir o crescimento de *S. aureus*. Os principais compostos identificados pelo perfil químico dos extratos em termos de percentual de área relativa foram L-limoneno; ácido hexadecanóico (ácido palmítico); ácido oléico; butil benzenesulfonamida, N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida e β -sitosterol. O uso do bagaço de laranja como matéria-prima para a extração é promissor devido à elevada qualidade dos compostos que permanecem presentes neste resíduo industrial. Os extratos obtidos por ESC apresentaram menores rendimentos quando comparados com SOX e UE, mas os bons resultados de atividade antioxidante pelo método DPPH e método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico justificam este estudo como um importante ponto de partida para outras análises relacionadas com este material vegetal.

ABSTRACT

The interest of pharmaceutical and food industries for compounds with high purity and biological properties has been increased in the last years. The government requirements and the consumer market have indicated the importance of the technologies development that allow the waste reuse while, due to environmentally safe and product quality guarantee. Several investigations have been developed to improve the use of the agroindustrial residues. In spite of juice is the main orange product, several by-products are obtained during the processing, such as essential oils, citrus pulp and other products with different and important applications in paints, comestics, animal feed industries, and others. In this manner, this study aimed to obtain oil from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace using the supercritical fluid extraction (SFE) with pure CO₂ and with or without co-solvent, in order to compare (in terms of yield process, composition and biological activity of the extracts) with extracts obtained from low pressure techniques, as ultrasound (UE), and Soxhlet (SOX), with different organic solvents, and hydrodistillation (HD). The SFE extracts from orange pomace were obtained at pressures from 100 to 300 bar, temperatures of 40 ° C and 50 ° C, with CO₂ flow rate of 17 ± 2 g/min during 5 h. The SFE kinetics and mathematical modeling were also studied. Low pressure extractions were performed with hexane (HX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), ethanol (EtOH) and water (H₂O). The SFE yields reached values up to 1.90 ± 0.1 % (w/w) for extraction with pure CO₂ and 4.2 ± 0.9 % (w/w) when co-solvent at 8 % was added to the extraction at 250 bar/50 °C. SOX extractions with ethanol and water obtained yields of 51 ± 2 % (w/w) and 54.4 ± 0.8 % (w/w), respectively. When EtOH was used in ultrasound, provided $23 \pm 0.7\%$ (w/w) of extraction yield, while H₂O in same technique reached 42 ± 2 % (w/w). The mass transfer models of Martínez et al. (2003) and Goto , Sato e Hirose (1993) presented the best fit to experimental data. The antimicrobial and antioxidant potentials of the extracts obtained by different techniques were evaluated by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazyl) method, where the best EC₅₀ results were obtained for SFE added co-solvent at 8 % (403 ± 22 µg/mL), the SOX extraction (347 ± 6 µg/mL) and the UE extraction (434 ± 13 µg/mL) with ethyl acetate. The total phenolic content was evaluated by Folin-Ciocalteau method and the best result was obtained for UE-EtOAc (60 ± 5 mg

GAE/g), while for the β -carotene/linoleic acid bleaching method the best result was obtained for SFE performed at 50 °C and 200 bar with pure CO₂. The antimicrobial activity was performed by microdilution and presents the SFE extract obtained at 200 bar/50 °C as strong inhibitor, indicating that 500 μ g /mL of extract are sufficient to inhibit the *S. aureus* growth. The main compounds identified by chemical profile of extracts were L-limonene, hexadecanoic acid (palmitic acid), oleic acid, butyl benzenesulfonamide, N-(2-cyano-ethyl)-benzenesulfonamide and β -sitosterol. The use of orange pomace as extraction raw material is promising due to the high quality components present on this industrial residue. SFE extracts presented lowers yields when compared to SOX and UE, but good results of antioxidant activity make this study an important starting point for other analysis related with this plant material.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE QUADROS	25
LISTA DE TABELAS.....	27
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	31
1. INTRODUÇÃO	35
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	43
3.1. A laranja e a produção brasileira	43
3.2. Composição da laranja.....	44
3.3. Processamento da laranja.....	46
3.3.1. Obtenção do suco de laranja concentrado.....	47
3.3.2. Subprodutos do processamento de laranja e o seu aproveitamento	49
3.4. Métodos de extração de óleos essenciais com a utilização de solventes	57
3.4.1. Destilação com água ou hidrodestilação	61
3.4.2. Ultrassom	61
3.4.3. Soxhlet	64
3.4.4. Extração com fluido supercrítico	66
3.4.4.1. Fluido supercrítico	69
3.4.4.2. Dióxido de carbono supercrítico	70
3.4.4.3. Utilização de co-solventes ou modificadores.....	72
3.4.4.4. Princípios da extração com fluido supercrítico....	73

3.4.4.5. Curvas de extração	77
3.5. Modelos matemáticos	78
3.6. Antioxidantes.....	80
3.6.1. Antioxidantes e compostos fenólicos presentes em frutos cítricos	81
3.6.2. Radicais livres.....	85
3.7. Atividade antimicrobiana	87
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
4.1. Obtenção da matéria-prima.....	90
4.1.1. Determinação do teor de umidade e de substâncias voláteis da matéria-prima <i>in natura</i>	90
4.2. Pré-tratamento da matéria-prima	92
4.3. Caracterização da matéria-prima	93
4.3.1. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis ..	93
4.3.2. Determinação do resíduo mineral fixo (cinzas)	93
4.3.3. Determinação do teor de nitrogênio total.....	94
4.3.4. Determinação do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel	95
4.4. Caracterização do leito de partículas da ESC	95
4.4.1. Determinação do diâmetro médio de partícula	95
4.4.2. Determinação da massa específica aparente (ρ_a)	96
4.4.3. Determinação da massa específica real (ρ_r).....	96
4.4.4. Porosidade do leito (ε)	96
4.5. Determinação da massa específica do solvente supercrítico (ρ)..	97
4.6. Extração supercrítica (ESC)	97
4.6.1. Equipamento de extração supercrítica	98
4.6.2. Experimentos cinéticos – Curvas de extração e parâmetros cinéticos.....	100

4.6.3. Determinação do rendimento global de extrato (X_0).....	102
4.6.4. Emprego de co-solvente (CS)	103
4.7. Extrações a baixa pressão	104
4.7.1. Hidrodestilação	104
4.7.2. Extração em Soxhlet	105
4.7.3. Extração com ultrassom	106
4.8. Tratamento dos extratos e eliminação do solvente	107
4.9. Óleo comercial.....	107
4.10. Avaliação da atividade antioxidante	107
4.10.1. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT)	108
4.10.2. Método DPPH.....	109
4.10.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico	110
4.11. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	112
4.11.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	112
4.12. Determinação da composição química dos extratos	112
4.13. Modelagem matemática.....	113
4.13.1. Determinação da solubilidade	113
4.14. Análise estatística	114
4.15. Resumo dos ensaios.....	114
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
5.1. Ensaio prévios	117
5.1.1. Caracterização da matéria-prima.....	117
5.1.2. Testes preliminares	120
5.2. Determinação do rendimento global de extrato (X_0)	123
5.3. Modelagem matemática.....	132

5.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	137
5.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT)	137
5.4.2. Método DPPH.....	140
5.4.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico	144
5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	147
5.5.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	147
5.6. Determinação da composição química dos extratos	149
6. CONCLUSÃO	159
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	161
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
9. APÊNDICES	187
APÊNDICE I: MODELOS MATEMÁTICOS	189
A1. Modelo difusional de Crank (1975).....	189
A2. Modelo de Goto, Sato e Hirose (1993)	189
A3. Modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999).....	190
A4. Modelo de Placa (SSP) proposto por Gaspar et al. (2003)..	191
A5. Modelo de Martínez et al. (2003).....	191
A6. Modelo de Sovová (1994) modificado por Martínez e Martínez (2007)	193
APÊNDICE II: DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO.....	197
APÊNDICE III: CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO.....	199
APÊNDICE IV: CROMATOGRAMAS E COMPOSTOS IDENTIFICADOS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE LARANJA	201
A1. CG-EM ESC 100 bar/ 40°C	202

A2. CG-EM ESC 100 bar/ 50°C	203
A3. CG-EM ESC 150 bar/ 40°C	204
A4. CG-EM ESC 150 bar/ 50°C	205
A5. CG-EM ESC 200 bar/ 40°C	206
A6. CG-EM ESC 200 bar/ 50°C	207
A7. CG-EM ESC 250 bar/ 40°C	208
A8. CG-EM ESC 250 bar/ 50°C	209
A9. CG-EM ESC 250 bar/ 50°C (Recuperado).....	210
A10. CG-EM ESC 300 bar/ 40°C	211
A11. CG-EM ESC 300 bar/ 50°C	212
A12. CG-EM Sox-EtOH.....	213
A13. CG-EM Sox-EtOAc	214
A14. CG-EM Sox-HX.....	215
A15. CG-EM Sox-DCM	216
A16. CG-EM UE-EtOAc	217
A17. CG-EM UE-HX	183
A18. CG-EM UE-DCM	218
A19. CG-EM ESC 250 bar/ 50 °C + 2 % EtOH.....	219
A20. CG-EM ESC 250 bar/ 50 °C + 5 % EtOH.....	220
A21. CG-EM ESC 250 bar/ 50 °C + 8 % EtOH.....	221
A22. CG-EM Óleo Comercial - <i>Cold pressed oil</i>	222
10. ANEXOS	223
ANEXO I: CERTIFICADO DE ENSAIO - DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL	225
ANEXO II : ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DE PRODUTO - ÓLEO NATURAL DE LARANJA DOCE.....	229

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura fisiológica da laranja.....	45
Figura 2: Rendimento teórico dos produtos e subprodutos da laranja, a partir de 100 kg da fruta.....	47
Figura 3: Rendimento dos produtos e subprodutos obtidos da laranja.	51
Figura 4: Estrutura de alguns compostos presentes no óleo de laranja	53
Figura 5: Fluxograma do processo de produção de sucos e subprodutos.....	58
Figura 6: Esquema dos sistemas de ultrassom: (a) banho de ultrassom indireto; (b) sonda de ultrassom; (c) banho de ultrassom direto	63
Figura 7: Representação esquemática do comportamento do CO ₂ puro em um diagrama de fase P-T.....	70
Figura 8: Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas: (R1) regulador de pressão do cilindro; (S1) pistão de compressão; (R2) regulador de pressão; (C1) serpentina; (E1) coluna de extração; (V) válvula abre-fecha; (VM) válvula micrométrica; (RM) medidor de vazão; (TF) Totalizador.....	74
Figura 9: Curva genérica de extrato obtido por ESC em função do tempo de extração, onde <i>I</i> é o período de taxa constante de extração e <i>II</i> é o período de taxa decrescente de extração.....	79
Figura 10: Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides	82
Figura 11: Estrutura genérica das principais classes dos flavonóides..	83
Figura 12: Fluxograma do processamento de laranjas da <i>Macrovida Alimentos Ltda</i>	91
Figura 13: (a) Bagaço de laranja e (b) amostra preparada para determinação do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima <i>in natura</i>	92
Figura 14: (a) Corte em tiras do bagaço da laranja, (b) secagem em estufa de circulação de ar e (c) amostra triturada em moinho de facas.	93
Figura 15: Equipamento de extração supercrítica.....	99

Figura 16: Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.....	100
Figura 17: Curva de extração com fluido supercrítico de bagaço de laranja a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO ₂	122
Figura 18: Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC do bagaço de laranja.....	128
Figura 19: Efeito da concentração do co-solvente no rendimento da ESC de extrato de bagaço de laranja.....	132
Figura 20: Curva de ESC de extrato de bagaço de laranja experimental e modelada a 200 bar, 40°C e vazão de 17 ± 2 g/min de CO ₂	133
Figura 21: Curva de extração com fluido supercrítico de bagaço de laranja a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO ₂	198
Figura 22: Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação do teor de fenólicos total (TFT), a 765 nm	199
Figura 23: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 40°C.....	201
Figura 24: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 50°C.....	202
Figura 25: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 40°C.....	203
Figura 26: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 50°C.....	204
Figura 27: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 40°C.....	205
Figura 28: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 50°C.....	206
Figura 29: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 40°C.....	207
Figura 30: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C.....	208
Figura 31: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C (Recuperado).....	209

Figura 32: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 40°C	210
Figura 33: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 50°C	211
Figura 34: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOH	212
Figura 35: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOAc.....	213
Figura 36: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-HX	214
Figura 37: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-DCM.....	215
Figura 38: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-EtOAc.....	216
Figura 39: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-HX.....	217
Figura 40: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-DCM.....	218
Figura 41: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 2 % EtOH.....	219
Figura 42: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 5 % EtOH.....	220
Figura 43: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 8 % EtOH.....	221
Figura 44: CG-EM do óleo de laranja comercial obtido por prensagem a frio	222

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo dos ensaios realizados para o extrato de bagaço de laranja, BHT e óleo comercial..... 115

Quadro 2: Compostos identificados nos extratos de bagaço de laranja e no óleo comercial com os tempos de retenção (TR) e área relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)..... 151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição nutricional da laranja var. <i>Valência</i> (porção de 100 g)	45
Tabela 2: Composição percentual média do óleo de laranja obtido por prensagem a frio.	52
Tabela 3: Composição média da casca de laranja (em base seca).....	55
Tabela 4: Áreas de aplicação do ultrassom	65
Tabela 5: Comparação das propriedades físicas de líquido, gás e fluidos supercríticos	70
Tabela 6: Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica e valores de temperatura e pressão crítica e densidade.	72
Tabela 7: Comparação do teor total de polifenóis e ácido ascórbico do limão e da laranja	84
Tabela 8: Plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global (X_0).....	102
Tabela 9: Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em Soxhlet	105
Tabela 10: Características físico-químicas da matéria-prima <i>in natura</i> e da matéria-prima utilizada nas extrações (em base seca).....	118
Tabela 11: Caracterização da partícula e do leite de partículas formado para a extração com fluido supercrítico	119
Tabela 12: Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do bagaço de laranja, realizada a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO ₂ . 123	
Tabela 13: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de bagaço de laranja com diferentes solventes e respectivos índices de polaridade (em base seca).....	124
Tabela 14: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de bagaço de laranja com vazão de CO ₂ de 17 ± 2 g/min (em base seca)	126

Tabela 15: ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T), de 40 °C a 50 °C, e pressão (P), de 100 bar a 300 bar, sobre o rendimento da ESC de bagaço de laranja.....	128
Tabela 16: ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T) nas pressões de 100 a 150 bar sobre o rendimento da ESC de bagaço de laranja.....	129
Tabela 17: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para ESC de bagaço de laranja em função de diferentes concentrações de co-solvente na condição de 250 bar, 50°C e vazão de CO ₂ de 17 ± 2 g/min (em base seca)	131
Tabela 18: Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da ESC do bagaço de laranja a 200 bar, 40°C e vazão de 17 ± 2 g/min de CO ₂	134
Tabela 19: Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), para os extratos de bagaço de laranja, óleo comercial e BHT	139
Tabela 20: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de laranja através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (EC ₅₀), e comparação com o BHT e o óleo comercial.	141
Tabela 21: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de laranja, BHT e óleo comercial através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação	145
Tabela 22: Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os extratos de bagaço de laranja e para o óleo comercial determinados pelo método de microdiluição para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	148
Tabela 23: Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos do experimento cinético a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g CO ₂ /min.	197
Tabela 24: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 40°C.....	201

Tabela 25: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 50°C	202
Tabela 26: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 40°C	203
Tabela 27: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 50°C	204
Tabela 28: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 40°C	205
Tabela 29: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 50°C	206
Tabela 30: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 40°C	207
Tabela 31: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C	208
Tabela 32: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C (Recuperado)	209
Tabela 33: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 40°C	210
Tabela 34: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 50°C	211
Tabela 35: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOH	212

Tabela 36: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOAc	213
Tabela 37: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-HX.....	214
Tabela 38: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-DCM	215
Tabela 39: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-EtOAc	216
Tabela 40: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-HX.....	217
Tabela 41: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-DCM	218
Tabela 42: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 2 % EtOH.....	219
Tabela 43: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 5 % EtOH.....	220
Tabela 44: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 8 % EtOH.....	221
Tabela 45: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do óleo de laranja comercial obtido por prensagem a frio.....	222

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA %	Atividade antioxidante (%)
<i>Abs</i>	Absorbância
<i>b</i>	Parâmetro ajustável – Modelo de Esquivel et al. (1999)
<i>b</i>	Parâmetro ajustável (min^{-1}) - Modelo de Martínez et al. (2003)
BHT	Butil-hidroxitolueno
CER	Etapa de taxa constante de extração
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CMI	Concentração mínima inibitória
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Co-solvente
D	Coefficiente de difusão (m^2/min)
DCM	Diclorometano
DCP	Etapa difusional ou etapa de taxa de extração nula
<i>D_{EXT}</i>	Diluição da amostra
<i>d_i</i>	Diâmetro da peneira <i>i</i> (mm)
<i>DO</i>	Densidade óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazina
<i>d_s</i>	Diâmetro médio superficial das partículas (mm)
EAG	Equivalentes de ácido gálico
<i>EC₅₀</i>	Concentração efetiva (mg/mL)
EMQ	Erro médio quadrático
ESC	Extração supercrítica
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol

F	Valor F
FER	Etapa de taxa decrescente de extração
GL	Graus de liberdade
H ₂ O	Água
HD	Hidrodestilação
HX	Hexano
k	Constante de desorção - Modelo de Goto, Sato e Hirose (1993)
k_{xa}	Coefficiente de transferência de massa para a fase sólida (s ⁻¹)
k_{ya}	Coefficiente de transferência de massa para a fase fluida (s ⁻¹)
M	Massa total de amostra (g)
m_c	Massa final de cinzas (g)
M_{CER}	Taxa de extração na etapa CER (g/min)
m_{EXT}	Massa de extrato (kg)
m_f	Massa final de amostra (g)
m_i	Massa inicial de amostra (g) ou massa de amostra retida na peneira i (g)
N	Número total de frações
p	Nível de significância
P	Pressão (bar)
Q_{CO_2}	Vazão de solvente (kg/s)
Sox	Extração em Soxhlet
SQ	Soma dos quadrados
T	Temperatura (°C)
t	Tempo de extração (min)
t_{CER}	Tempo de duração da etapa CER (min)
t_{FER}	Tempo de duração da etapa FER (min)
TFT	Teor de compostos fenólicos total

t_m	Parâmetro ajustável (min^{-1}) - Modelo de Martínez et al. (2003)
UE	Extração com ultrassom
X_0	Rendimento global da extração (%)
Xk	Razão mássica de soluto de difícil acesso ($\text{g}_{\text{soluto}}/\text{g}_{\text{inerte}}$)
$y(t)$	Concentração de soluto na fase solvente (kg/kg)
Y_{CER}	Concentração de soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg/kg)
β	Porosidade da folha – Modelo de Goto, Sato e Hirose (1993)
ε	Porosidade do leito
ρ_a	Massa específica aparente (g/cm^3)
ρ_{CO_2}	Massa específica do solvente supercrítico (g/cm^3)
ρ_r	Massa específica real (g/cm^3)
ϕ	Coefficiente global de transferência de massa - Modelo de Goto, Sato e Hirose (1993)

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado de 350.000 a 550.000 espécies. A diversidade biológica vegetal brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (NODARI; GUERRA, 2000).

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos da indústria. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. Constantes revisões têm ocorrido em resoluções ligadas a resíduos que classificam e propõem tratamentos, forma de manipulação e descarte dos resíduos (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matéria-prima e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

A laranja é um produto de importância para a agricultura e a economia brasileira. O Brasil é responsável por quase 90 % das laranjas produzidas na América do Sul, o que corresponde a 34 % da produção mundial desta fruta (TRIBESS; TADINI, 2001).

Após a extração do suco, os resíduos sólidos da indústria da laranja, representados pelas cascas, sementes e polpa, equivalentes a cerca de 50% do peso de cada fruto e com, aproximadamente, 82% de umidade, são transformados em farelo peletizado. Este farelo é usado principalmente como complemento alimentar de rebanhos bovinos de leite e de corte. Além desta aplicação, a partir do exocarpo, mesocarpo e endocarpo podem ser obtidos produtos como óleos essenciais, doces, celulose, carboidratos solúveis, propectina, pectina, flavonóides, aminoácidos e diversas vitaminas, essências aromáticas e vitamina C. Alguns derivados dos resíduos da laranja entram na composição de vários produtos, como solventes industriais, iscas granuladas para insetos, componentes aromáticos, tintas, adesivos, medicamentos,

gomas de mascar, combustíveis, entre outros produtos (TIENNE; DESCHAMPS; ANDRADE, 2004).

Apesar desta ampla utilização, outra possibilidade de emprego dos resíduos da agroindústria da laranja é para fins energéticos, quer na forma como são gerados *in natura*, depois de submetido ao processo de secagem, ou após a sua transformação em carvão vegetal (TIENNE; DESCHAMPS; ANDRADE, 2004).

Os resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor agregado. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Segundo Pelizer, Pontieri e Moraes (2007), os resíduos de frutos cítricos são uma rica fonte de flavonóides naturais em potencial, considerando a quantidade de resíduo gerado e a alta concentração de compostos fenólicos.

A importância crescente dos óleos essenciais criou a necessidade de desenvolvimento de métodos de extração que proporcionem maior qualidade e produtividade, uma vez que existe atualmente uma tendência do consumidor de preferir produtos naturais (DONELIAN, 2004).

Aspectos como qualidade e composição dos produtos fitoterápicos estão relacionados com a técnica de extração empregada na preparação dos extratos de produtos naturais. Conforme o método empregado para extração de um óleo essencial, suas características químicas podem ser alteradas, fazendo com que seus efeitos terapêuticos, possivelmente, também sejam alterados. Métodos mais rápidos de extração podem reduzir o custo do produto obtido, mas conforme o óleo, isso poderá alterar suas qualidades terapêuticas. A temperatura usada na extração pode interferir na qualidade final do óleo essencial, pois durante a extração moléculas termossensíveis de um princípio ativo podem ser quebradas e oxidadas em produtos de menor eficácia ou, às vezes, gerar subprodutos tóxicos (FLÉGNER, 2010).

O valor terapêutico dos óleos essenciais deve-se à sua complexidade química, por atuarem de diversas maneiras, ao contrário dos produtos sintéticos, que atuam de um único modo, relativo ao composto químico ativo. Além disso, os compostos sintéticos perdem a sinergia específica que os compostos naturais apresentam, pois a fusão molecular dos elementos presentes nos óleos naturais faz com que estes

atuem de maneira específica na cura. Esta é a explicação para a obtenção de propriedades diferentes e mais abrangentes dos óleos naturais (CORAZZA, 2002).

Quimicamente, os óleos essenciais podem ser compostos por hidrocarbonetos, alcoóis, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e vários compostos orgânicos nitrogenados e sulfurados. Os compostos de maior importância são os terpenos (C_nH_{2n-4}), que podem ser incolores, amarelados (quando associados a carotenóides) ou esverdeados (quando associados à clorofila). As principais classes de constituintes dos óleos essenciais de uso terapêutico são os mono e sesquiterpenos, os ésteres, os aldeídos, as cetonas, os alcoóis, os fenóis, os óxidos e os ácidos (CORAZZA, 2002).

Métodos tradicionais de extração, incluindo a extração com solventes orgânicos, a destilação a vapor e a hidrodestilação, são bastante utilizados para a obtenção de extratos e óleos essenciais de diversas matrizes vegetais. Porém, estas técnicas geralmente envolvem altas temperaturas de processo, o que pode ocasionar alterações químicas e destruição de compostos termossensíveis, assim como a perda de qualidade do óleo essencial (BE-JEN; YEN-HUI; ZER-RAN, 2004; POURMORTAZAVI; HAJMIRSADEGUI, 2007). Nas extrações com solventes orgânicos são utilizados diversos tipos de solventes, como alcoóis metílico, etílico e propílico; hexano; clorofórmio; acetato de etila; acetona; entre outros. Esta técnica é comumente aplicada nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos. Porém, o uso de solventes orgânicos pode ser prejudicial à saúde (BE-JEN; YEN-HUI; ZER-RAN, 2004; BISCAIA, 2007).

A extração por ultrassom é uma tecnologia em potencial desenvolvimento devido à simplicidade da técnica e necessidade instrumental baixa. A técnica de ultrassom apresenta tempo de extração reduzido, temperatura de extração baixa e aumento nos rendimentos das extrações. O mecanismo para melhor extração por ultrassom é atribuído ao comportamento das bolhas formadas pela cavitação na propagação das ondas acústicas. O colapso das bolhas pode produzir efeitos físicos, químicos e mecânicos, os quais resultam na ruptura da parede celular, facilitando a liberação de compostos e aumentando a transferência de massa do solvente da fase contínua dentro da célula vegetal (MA et al., 2008).

A extração de compostos dos óleos essenciais utilizando solventes em altas pressões, ou fluidos supercríticos, vem se destacando nos últimos anos, especialmente quando a aplicação do extrato é direcionada às indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Esta metodologia apresenta-se como uma alternativa aos processos convencionais de extração para a obtenção de compostos de alto valor agregado e com elevado grau de pureza, sem a necessidade de uma etapa adicional para a remoção de solventes (RIZVI et al., 1986; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGUI, 2007).

O dióxido de carbono (CO₂) é o fluido supercrítico mais comumente utilizado por apresentar características como inflamabilidade, atoxicidade, facilidade de remoção do extrato na despressurização, custo-benefício vantajoso, além de reduzir a decomposição térmica da amostra, devido a sua baixa temperatura crítica (31,1 °C). Contudo, o CO₂ puro não é o solvente mais apropriado para extração de compostos polares e matrizes com alto poder de retenção, fazendo-se necessário a utilização de modificadores (em pequenas quantidades) para aumentar o poder de solvatação do CO₂ (SCALIA; GIUFREDDA; PALLADO, 1999).

As propriedades dos fluidos supercríticos aumentam as taxas de extração e os rendimentos, uma vez que as altas massas específicas dos fluidos conferem grande poder de solvatação, enquanto os baixos valores de viscosidade combinados com valores de difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida (AGHEL et al., 2004; TSAO; DENG, 2004).

Devido à semelhança na viscosidade dos fluidos supercríticos e dos gases, e por seu coeficiente de difusão ser maior que dos líquidos, a extração das substâncias, mediante este processo, é facilitada. Como uma pequena alteração da pressão e da temperatura provoca uma grande mudança na solubilidade, o uso de um fluido supercrítico permite um isolamento altamente eficiente dos componentes a serem extraídos (VANNOORT et al., 1990).

O conhecimento dos mecanismos de transferência de massa, dos parâmetros cinéticos e das condições termodinâmicas da extração pode ser utilizado para avaliar economicamente o processo. Além disso, é importante conhecer o efeito das variáveis envolvidas e sua correlação com um modelo teórico que descreva a cinética de extração (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGUI, 2007). Na extração

supercrítica os parâmetros importantes são a vazão do solvente, o tamanho de partícula do sólido e a duração do processo. Outros fatores que contribuem para a extração são o poder de solubilização e a seletividade do solvente com relação aos compostos de interesse e a capacidade de difusão destes no fluido. A escolha destes parâmetros é fundamental para a otimização da extração dos compostos desejados em menor tempo (REVERCHON; DE MARCO 2006).

Aliado à técnica de extração, o interesse no potencial antioxidante de produtos naturais vem aumentando desde 1990, quando estudos comprovaram que a influência benéfica de alimentos e bebidas na saúde humana estava associada à atividade antioxidante de polifenóis presentes nos alimentos. A maioria dos casos de atividade antioxidante de frutas e vegetais deve-se a compostos como ácidos fenólicos e flavonóides (TSAO; DENG, 2004; ROGINSKY; LISSI, 2005).

Os antioxidantes são formados por diferentes grupos químicos, apresentando diferentes estruturas e propriedades. Para extrair e manipular essas substâncias complexas, o dióxido de carbono supercrítico parece ser o solvente ideal neste campo, devido às baixas temperaturas empregadas na extração, garantindo a conservação de suas propriedades biológicas (CORTESE et al., 1999; DÍAZ-REINOSO, et al., 2006).

O suco de frutas cítricas contém compostos bioativos como limonóides, flavonóides, pectinas, cumarinas e furanocumarinas e antioxidantes conhecidos, como a vitamina C e carotenóides, os quais apresentam diversos benefícios à saúde. Baseado em estudos laboratoriais, os flavonóides cítricos e limonóides apresentam propriedades de proteção contra uma variedade de doenças crônicas, como arterosclerose e câncer. Os flavonóis, flavanóis, antocianinas e fenilpropanóides podem atuar como antioxidantes e, por diversos mecanismos, atuar como compostos cardioprotetores (JAYAPRAKASHA; GIRENNAVAR; PATIL, 2008).

Apesar de serem bastante conhecidos os benefícios da extração com CO₂ supercrítico para a manutenção das propriedades do óleo essencial, esta técnica é pouco aplicada no aproveitamento de resíduos da agroindústria, como é o caso do bagaço de laranja, não sendo encontrados dados de literatura utilizando esta matéria-prima para a produção de extrato de laranja.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi obter extrato de bagaço de laranja por diferentes métodos de extração com a finalidade de comparar com óleo comercial proveniente da prensagem a frio e identificar os extratos de bagaço de laranja que apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana.

2.2. Objetivos específicos

- a)* Sugerir o aproveitamento do resíduo industrial do processamento de laranja (bagaço de laranja) para a obtenção do extrato de bagaço de laranja;
- b)* Comparar e avaliar, em termos de rendimento e qualidade dos extratos, as técnicas convencionais de extração à baixa pressão e ESC na obtenção do extrato de bagaço de laranja;
- c)* Avaliar o rendimento da ESC para o bagaço de laranja em função das condições de operação (temperatura e pressão);
- d)* Empregar solventes orgânicos com polaridades variadas nas extrações convencionais e, a partir destas, selecionar um co-solvente à extração supercrítica;
- e)* Determinar a curva global de extração do extrato de bagaço de laranja, visando o estudo da cinética de transferência de massa utilizando modelos matemáticos descritos na literatura;
- f)* Analisar o perfil de composição dos diferentes extratos de bagaço de laranja;
- g)* Comparar o óleo do bagaço de laranja com óleo comercial em termos de composição e atividades biológicas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A laranja e a produção brasileira

A laranja é o fruto produzido pela laranjeira (*Citrus sinensis*), uma árvore pertencente à família *Rutaceae*, gênero *Citrus*, espécie *sinensis*. A laranja é um fruto híbrido, criado na antiguidade a partir do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a tangerina (*Citrus reticulata*) (MATTOS JÚNIOR et al., 2005).

De todas as árvores frutíferas, uma das mais conhecidas, cultivadas e estudadas em todo o mundo é a laranjeira. Assim como todas as plantas cítricas, a laranjeira é nativa do Sudeste da Ásia, mas a região de origem ainda é motivo de controvérsia. A mais antiga descrição de cítricos aparece na literatura chinesa, por volta do ano 2000 a.C. Segundo pesquisadores, a laranja foi levada da Ásia para o norte da África e, posteriormente, para o sul da Europa, onde teria chegado na Idade Média. A partir da Europa, foi trazida para as Américas por volta de 1500 (ABECITRUS, 2008).

A laranja espalhou-se pelo mundo sofrendo mutações e dando origem a novas variedades. Durante a maior parte deste período, o cultivo de sementes modificava aleatoriamente o sabor, o aroma, a cor e o tamanho dos frutos. As pesquisas e experimentos para aprimorar as variedades da laranja começaram a ser desenvolvidas a partir do século XIX, na Europa. Todos os estudos sempre estiveram voltados para o melhoramento do aspecto, tamanho e sabor dos frutos, como também o aprimoramento genético para a obtenção de árvores mais resistentes a doenças e variações climáticas (ABECITRUS, 2008).

A partir de 1927, o Brasil começou a se destacar na exportação de cítricos. Na década de 1930, a laranja passou a fazer parte das exportações brasileiras e, em 1939, a laranja se tornou um dos dez produtos mais importantes nas exportações do país. A primeira fábrica de suco concentrado e congelado foi implantada no Brasil nos anos de 1950, mas somente na década de 1960 que a indústria brasileira de sucos e outros subprodutos da laranja ganharam impulso (ABECITRUS, 2008).

Na década de 1980, o Brasil se tornou o maior produtor mundial de laranjas, tornando-se também o líder na produção de suco

desta fruta. Em 1981, as exportações brasileiras de suco de laranja concentrado ultrapassavam 600 mil toneladas anuais. Atualmente, os pomares mais produtivos estão nas regiões de clima tropical e subtropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, Espanha, países do Mediterrâneo, México, China e África do Sul. São Paulo e Flórida são as principais regiões produtoras do mundo (TODA FRUTA, 2005; ABECITRUS, 2008).

Atualmente, a produção de cítricos está distribuída por todas as regiões do país, concentrada principalmente na Região Sudeste em decorrência da produção de laranja, lima e tangerina no estado de São Paulo, que responde por cerca de 70% da produção nacional de laranja e 98% da produção de suco. O sistema agroindustrial da laranja é um caso de sucesso no Brasil, onde a fruta atende cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais, trazendo anualmente mais de US\$1 bilhão de dólares em divisas para o Brasil, no centro de uma cadeia produtiva que gera um PIB equivalente a US\$5 bilhões de dólares. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a safra brasileira de laranja em 2009 foi de aproximadamente 18,3 milhões de toneladas. As exportações de suco de laranja se mantêm, desde 1994, entre 1,1 e 1,2 milhões de toneladas. Atualmente, o setor emprega diretamente cerca de 400 mil pessoas e é atividade econômica essencial de 322 municípios paulistas e 11 municípios mineiros (TODA FRUTA, 2005; ABECITRUS, 2008; IBGE, 2010).

3.2. Composição da laranja

A laranja é conhecida como uma rica fonte de vitamina C e pectina, uma das frações solúvel da fibra vegetal. A Tabela 1 apresenta a composição nutricional da laranja (var. *Valência*) por 100 g de parte comestível. A Figura 1 apresenta a estrutura fisiológica da laranja.

Em média, uma laranja contém cerca de 70 mg de vitamina C, quantidade esta maior do que as necessidades diárias de um adulto. A vitamina C é um antioxidante que protege as células contra danos causados pelos radicais livres e ajuda a reduzir o risco de certos tipos de câncer, ataques do coração, derrames cerebrais e outras doenças. A parte fibrosa da laranja é um grande estimulador do funcionamento intestinal (RGNUTRI, 2010).

Tabela 1: Composição nutricional da laranja var. *Valência* (porção de 100 g).

Umidade	86,9 %
Energia	46 kcal (193 kJ)
Carboidratos	11,7 g
Fibra alimentar	1,7 g
Proteínas	0,8 g
Lipídios	0,2 g
Cinzas	0,4 g
Vitamina B1	0,07 mg
Vitamina B2	0,04 mg
Vitamina B3	0,274 mg
Vitamina B5	0,250 mg
Vitamina B6	0,03 mg
Vitamina B9	17 µg
Vitamina C	47,8 mg
Cálcio	34 mg
Potássio	158 mg
Cobre	0,04 mg
Fósforo	20 mg
Magnésio	14 mg
Manganês	0,06 mg
Zinco	0,1 mg
Ferro	0,1 mg
Sódio	1 mg

Fonte: USDA, 2009; TACO, 2006.

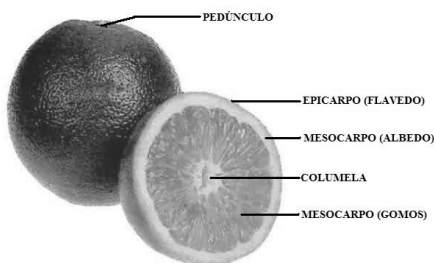


Figura 1: Estrutura fisiológica da laranja.

Fonte: PORTAL SÃO FRANCISCO, 2010.

3.3. Processamento da laranja

A laranja (*Citrus sinensis*) é a fruta industrializada em maior quantidade no Brasil, sendo que aproximadamente 72% dos frutos produzidos são processados na forma de suco (NEVES et al., 2001 apud EMPRABA, 2003). Os principais produtos industrializados obtidos a partir de frutas cítricas são o suco, apresentados em diferentes níveis de concentração, e os subprodutos deste processamento, como óleos, aromas e polpa (EMBRAPA, 2003).

Diversos outros produtos podem ser obtidos a partir das frutas cítricas, embora menos expressivos comercialmente, como pectina, gomos de fruta em calda, casca da fruta em calda, fruto cristalizado, geléias, doces em massa, xaropes, licores, etc. No entanto, a citricultura brasileira destina a maior parte de sua produção para a indústria de suco. Como procedimentos mais utilizados neste processamento têm-se: pré-seleção, limpeza, seleção por tamanho, extração (corte, esmagamento dos frutos e filtragem inicial), centrifugação, concentração ou pasteurização (dependendo do tipo de suco) e embalagem (EMBRAPA, 2003).

No Brasil são produzidos diferentes tipos de sucos para o mercado interno e externo, sendo que o suco de laranja concentrado congelado é o de maior produção. Uma pequena parte é destinada à produção de suco de laranja reconstituído, mas também são produzidos no país suco de laranja natural pasteurizado e suco de laranja fresco (TRIBESS; TADINI, 2001).

Para que o suco de laranja tenha uma vida de prateleira satisfatória é necessário que ele receba algum tipo de tratamento térmico para prevenir a deterioração, devido à presença de microrganismos, e inativar enzimas presentes naturalmente no suco, principalmente a pectinesterase, responsável pela desmetoxilação da pectina e precipitação no suco (EAGERMAN, 1976 apud TRIBESS; TADINI, 2001).

As etapas iniciais do processamento da laranja independem do tipo de suco a ser produzido. Considerando que o suco de laranja concentrado é o produto de maior expressão para a indústria de cítricos, serão descritas as etapas do processamento deste produto.

3.3.1. Obtenção do suco de laranja concentrado

O processo de obtenção do suco de laranja concentrado e congelado, mais conhecido como FCOJ (*Frozen Concentrated Orange Juice*), consiste de uma série de operações industriais em grande escala que geram, além do suco de laranja, vários subprodutos do processo. A Figura 2 ilustra o rendimento teórico de produtos e subprodutos obtidos a partir de 100 kg de laranjas (YAMANAKA, 2005).

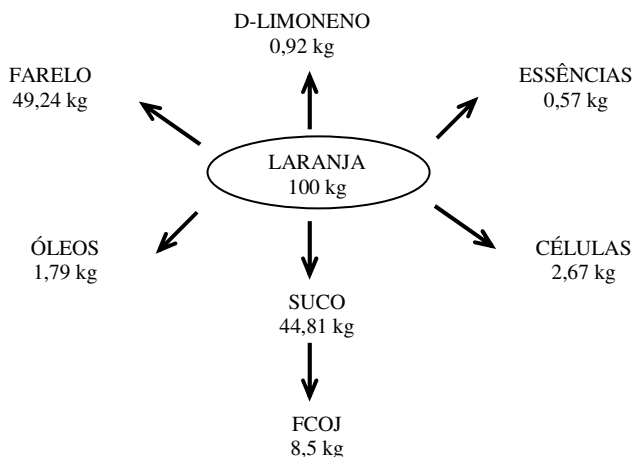


Figura 2: Rendimento teórico dos produtos e subprodutos da laranja, a partir de 100 kg da fruta.

Fonte: YAMANAKA, 2005.

Segundo Yamanaka (2005), no processamento da laranja para a obtenção de suco, as etapas de produção podem ser divididas em:

a) Recebimento e seleção de frutos: os frutos são transportados a granel até as empresas, onde são realizadas análises para determinação de °Brix, índice de acidez total e relação acidez/°Brix. As carretas são posicionadas em rampas hidráulicas que inclinam os caminhões para que o conteúdo seja despejado em esteiras de roletes, sendo as laranjas encaminhadas aos depósitos. No percurso, são rejeitados todos os frutos

que não estão suficientemente maduros, apresentam ferimentos nas cascas, estão excessivamente atacados por ácaros ou sujos, não apresentam as dimensões adequadas ou chegam à fábrica muito após a colheita.

b) Armazenamento: os frutos são levados aos silos de estocagem, denominados *bins*, separados pelas características definidas na análise do recebimento.

c) Limpeza dos frutos: no momento da produção, os pórtilhos dos *bins* são abertos e os frutos caem nas esteiras que os transportarão para a área de extração, sendo feita uma mistura de laranjas de diferentes especificações para se atingir as características desejadas, de acordo com a solicitação do cliente. Os frutos passam por mesas de lavagem, compostas de esguichos na parte superior e escovas na parte inferior, para a limpeza com ou sem auxílio de detergentes, com o objetivo de remover todas as sujidades presentes na casca dos frutos.

d) Seleção e classificação: realizada a lavagem, os frutos são escolhidos, onde os frutos impróprios são retirados e enviados à fábrica de ração. Finalizada esta etapa, as laranjas vão para classificadores, que as separam por tamanho, sendo encaminhadas às linhas de extração.

e) Extração do suco de laranja: nas extratoras ocorre a separação do suco de laranja; da emulsão que dará origem ao *óleo essencial*; do bagaço que se transforma em *farelo de polpa cítrica*; e da polpa, que dará origem ao *pulp-wash*. O extrator do tipo *Brown* corta a laranja em dois hemisférios e a extração é feita pela pressão de um cone, composto de um tubo com filtro, à metade cortada do fruto. Variações deste tipo de extrator prensam o fruto inteiro, separando apenas o suco. O suco de laranja sai das extratoras por meio de tubulações na parte inferior do equipamento, sendo conduzidos aos tanques de armazenamento, onde fica armazenado até a próxima etapa.

f) Ajuste do teor de polpa: o suco armazenado vai para a etapa de ajuste de polpa, realizado por *finishers*, que são cilindros de aço inox que possuem no seu interior armações com telas (filtros). O ajuste é feito em etapas, geralmente ajustando o teor de polpa em 4 %, e de acordo com a especificação do cliente. Com o teor de polpa ajustado, o suco passa por centrífugas para o acerto da cor.

g) Pasteurização e concentração do suco de laranja: o suco com teor de polpa ajustado passa para os evaporadores a vácuo de

múltiplo efeito. Antes do primeiro estágio dos evaporadores, há a pasteurização do suco e início do processo de concentração. A pasteurização inativa os microrganismos responsáveis pela degradação do suco de laranja e a pectinesterase, enzima cuja ação forma ácidos pectínicos que arrastam os sólidos do suco, conferindo turbidez. O suco com teor inicial de sólidos solúveis totais de 10 - 11 °Brix sai ao final com teor de 65° Brix, padrão de qualidade do suco concentrado. Na evaporação, o suco perde sua fração volátil em que estão as essências, sendo recuperadas nos evaporadores por possuírem alto valor comercial. Posteriormente, elas podem ser reincorporadas ao suco ou serem armazenadas separadamente como subproduto. No processo de concentração, há a obtenção de sucos concentrados com teores de sólidos solúveis variáveis. É comum a mistura (*blends*) de sucos de características diferentes para uniformizar o que já foi produzido, também servindo para ajustar o suco às solicitações dos clientes. Nesta etapa, as essências perdidas na concentração são reincorporadas ao suco de laranja.

h) Resfriamento e armazenamento: o suco concentrado chega aos resfriadores do tipo *flash* por meio de bicos injetores, numa atmosfera de baixa pressão absoluta. O líquido evapora instantaneamente diminuindo a temperatura para 18 °C. Em seguida, trocadores de calor diminuem a temperatura do suco para -7 °C. O suco resfriado é encaminhado aos tanques de armazenamento, ficando armazenado até o seu transporte.

O processamento do suco até a etapa de extração é semelhante para todos os tipos de sucos. Após esta etapa, o processamento é realizado de diferentes formas, dependendo do produto desejado ao final do processo (LD CITRUS, 2001 apud TRIBESS; TADINI, 2001).

3.3.2. Subprodutos do processamento de laranja e o seu aproveitamento

O produto, cuja fabricação é intencional, é o propósito da indústria. Entretanto, são gerados outros materiais, de origem não-intencional, chamados de resíduos (TIMOFIECSYK PAWLOWSKY, 2000).

De acordo com a Resolução nº 05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 05 de agosto de 1993, é definido que

os resíduos nos estados sólido e semi-sólido são os resultantes de atividades da comunidade de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis, em face à melhor tecnologia disponível (CONAMA, 2007).

O processamento de frutas e outros vegetais geram dois tipos de resíduos: sólido (pele e/ou casca e sementes) e líquido (águas utilizadas para limpeza). Em algumas frutas, a porção descartada pode ser elevada como na manga (30 - 50 %), banana (20 %), abacaxi (40 - 50 %) e laranja (30 - 50 %). Desta forma, o destino final dos resíduos é um grave problema quando não são adequadamente gerenciados (ITDG, 2006).

O resíduo do processamento de frutos cítricos é o resíduo sólido gerado após a extração comercial do suco das frutas. Aproximadamente 90 % deste resíduo é proveniente do processamento de laranjas, composto de casca, pedaços de membranas e bagaço da polpa, vesículas de suco e sementes, contabilizando de 44 - 50 % do peso total da fruta (WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010).

Existem várias possibilidades para utilização de alguns tipos de resíduos sólidos de frutas. Porém, um dos maiores problemas é assegurar uma qualidade microbiológica razoável do resíduo, impedindo seu armazenamento prolongado. Como exemplo, podem ser citados seis produtos possíveis de serem obtidos a partir dos resíduos de frutas: doces da casca, óleos, pectina, frutas em pedaços, enzimas e vinho ou vinagre (ITDG, 2006).

Os subprodutos obtidos do processamento de laranjas possuem diferentes aplicações no mercado interno e externo, incluindo a fabricação de produtos químicos e solventes, aromas e fragrâncias, substâncias para aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, alimentícia, complemento para ração animal, entre outros (ABECITRUS, 2008). A Figura 3 apresenta os percentuais dos produtos e subprodutos extraídos da laranja.

Como subprodutos obtidos no processamento de laranja, podem ser destacados:

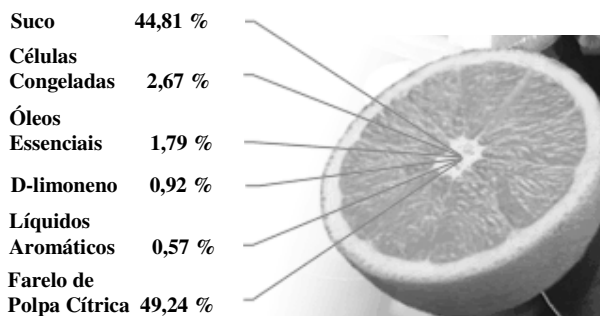


Figura 3: Rendimento dos produtos e subprodutos obtidos da laranja.

Fonte: ABECITRUS, 2008.

a) Óleo essencial: a fabricação do óleo essencial ocorre paralelamente ao processamento de suco. Os óleos essenciais ou voláteis são retirados da casca das frutas cítricas quando o fruto é pressionado na extratora. Durante o processo de extração do suco, as bolsas de óleo da casca se rompem, liberando o produto, e jatos de água removem o óleo presente na casca. A emulsão água-óleo passa pelos *finishers*, que removem os sólidos da emulsão, e pelas centrífugas, onde ocorre a separação do óleo em três etapas: a primeira é a concentração, onde a água separada (água amarela) é encaminhada para a fábrica de ração; na segunda etapa, a água de centrifugação (ou clarificação) é redirecionada para as extratoras (remoção do óleo essencial da casca) e para o processo de ração; na etapa final, ocorre o polimento. Após estas etapas, ocorre a separação de ceras presentes no óleo por resfriamento até que as ceras presentes se cristalizem. Após a separação, as ceras são encaminhadas para a fabricação da ração. Os óleos extraídos durante a extração do suco são chamados de *cold-pressed oils*, sendo utilizados, basicamente, pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (YAMANAKA, 2005; ABECITRUS, 2008). A Tabela 2 apresenta a composição percentual média do óleo de laranja obtido por prensagem a frio.

O percentual identificado como outros componentes inclui substâncias como ácido cítrico, málico, malônico e oxálico, que representam cerca de 1 % (m/m) da casca (CLEMENTS, 1964 apud

RIVAS et al., 2008) e vitaminas, como a vitamina C, pois a maior parte do ácido ascórbico das frutas está presente na casca e somente 25 % no suco, sendo possível encontrar cerca de 10 - 20 mg/kg no albedo e de 15 - 30 mg/kg no flavedo. Mesmo que estes componentes sejam minoritários, eles possuem grande valor nutricional para muitos microrganismos, sugerindo que a casca de laranja pode apresentar grande potencial em processos biotecnológicos, além de apresentar alto conteúdo de cinzas e proteínas (RIVAS et al., 2008).

Tabela 2: Composição percentual média do óleo de laranja obtido por prensagem a frio.

Componente	% (m/m)	Componente	% (m/m)
α -Tujeno	0,01	Acetato de bornila	0,01
α -Pino	0,07	Undecanal	0,01
Canfeno	0,01	Acetato de citronelila	0,01
Sabineno e β -Pino	0,42	Acetato de nerila	0,01
Mirceno	2,49	α -Copaeno	0,02
Octanal	0,10	Acetato de geranila	0,01
α -Felandreno	0,03	β -Cubebeno e β -Elemeno	0,02
δ -3-Careno	0,31	Dodecanal	0,01
α -Terpineno	0,01	β -Cariofileno	0,01
<i>p</i> -Cimeno	Traços	γ -Cadineno	0,02
Limono	94,69	α -Umuleno	0,02
(E)- β -Ocimeno	0,03	D-Germacreno	0,02
γ -Terpineno	0,04	α -Farneseno	0,11
Hidrato de <i>cis</i> -Sabineno	0,01	δ -Cadineno	0,03
Octanol	0,01	(Z)-Nerolidol	0,01
Terpinoleno	0,05	β -Sinensal	0,02
Linalol	0,32	Nootkatona	0,01
Nonanal	0,02	Outros	Traços
Óxido de <i>cis</i> -Limono	0,01	Hidrocarbonetos	99,05
Óxido de <i>trans</i> -Limono	0,02	Monoterpenos	98,80
Citronelal	0,04	Sesquiterpenos	0,25
α -Terpineol	0,05	Compostos oxigenados	0,83
Decanal	0,08	Compostos carbonílicos	0,37
<i>cis</i> -Carveol	0,01	Alcoóis	0,42
Nerol e citronelol	0,01	Ésteres	0,04
Neral	0,02	Aldeídos alifáticos	0,22
Geranial	0,05	Aldeídos terpênicos	0,14
Perilaldeído	0,01		

Fonte: VERZERA et al., 2004.

A Figura 4 apresenta a estrutura de alguns compostos presentes no óleo de laranja.

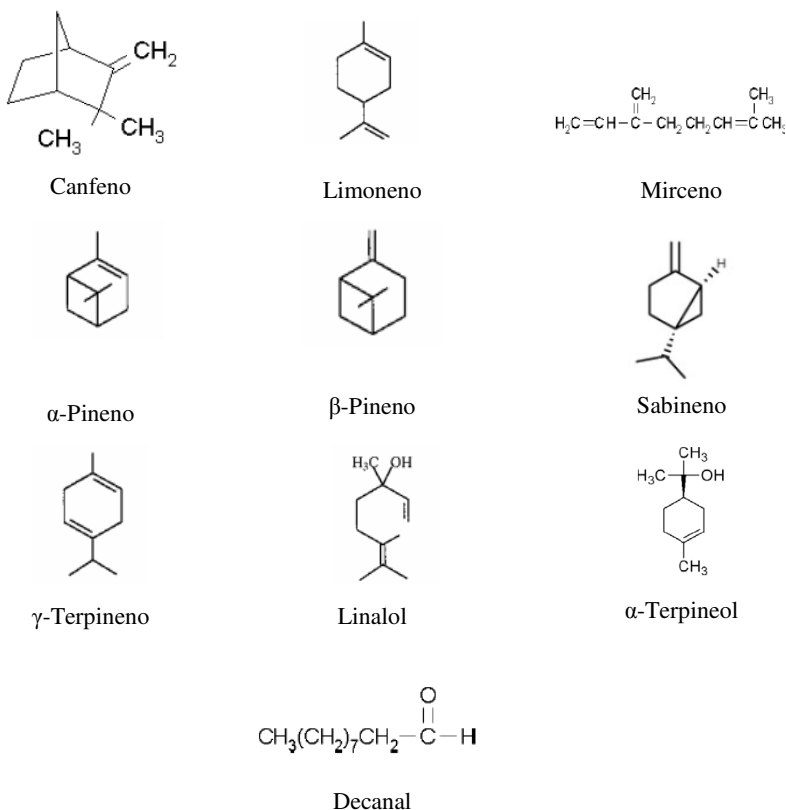


Figura 4: Estrutura de alguns compostos presentes no óleo de laranja.

Fonte: NUNES; PEREIRA; ANDRADE, 2000; DANIELSKI, 2007.

b) Farelo de polpa cítrica e melaço: as cascas de laranja, sementes, polpas e demais resíduos, que equivalem a aproximadamente 50 % do peso de cada fruta, são enviados para a fábrica de ração, onde cal é incorporada ao bagaço para liberação de água e acerto do pH. A umidade inicial do bagaço é de aproximadamente 82 %, que a seguir este passa por moinhos para a redução do tamanho do resíduo.

Posteriormente, a massa é prensada para remover a umidade presente, gerando o *licor de prensagem*. Este passa por peneiras estáticas e vibratórias para separação de sólidos, que são incorporados à massa moída e, posteriormente, passa por um evaporador de múltiplos efeitos, onde é concentrado, dando origem ao melaço cítrico. A torta obtida na prensagem é submetida à secagem e comercializada como suplemento para alimentação de bovino, evitando o custo de disposição do resíduo em aterros sanitários (WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010). A massa é encaminhada para secadores rotativos para a redução da umidade, entre 7 e 12 %, processada nas peletizadoras e enviada aos resfriadores antes de serem armazenados em silos metálicos (YAMANAKA, 2005; ABECITRUS, 2008).

O farelo de polpa cítrica peletizado possui boa aceitação como insumo na ração de rebanhos bovinos (leite e corte). Sua utilização deve restringir-se a no máximo 30% da matéria seca para cada animal adulto. Por tratar-se de um produto que adsorve umidade, é importante que o farelo seja transportado e armazenado em locais secos, ventilados e cobertos. Do contrário, podem surgir microrganismos causadores de fermentação e bolor e, neste caso, o produto não poderá ser utilizado na composição da ração. É recomendado não armazenar este produto por mais de 60 dias (ABECITRUS, 2008).

Como a secagem do resíduo sólido consome uma grande quantidade de energia, o lucro gerado pela produção e comercialização do suplemento para alimentação de bovinos é marginal ou negativo, particularmente quando o custo da energia é elevado (WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010). A Tabela 3 apresenta a composição média da casca de laranja que é transformada em farelo cítrico.

O resíduo do processamento de frutos cítricos também é rico em carboidratos solúveis e insolúveis, sendo uma fonte potencial para a conversão biológica em produtos de valor agregado. Os açúcares solúveis da casca da laranja são a glicose, frutose e sacarose. Os polissacarídeos insolúveis que compõem a parede celular da casca de laranja são compostos de pectina, celulose e hemiceluloses. Pectina e hemiceluloses são ricas em ácido galacturônico, arabinose, galactose e pequenas quantidades de xilose, ramnose e, possivelmente, glicose, não apresentando lignina como componente. A casca e membrana da laranja e outras frutas cítricas são altamente suscetíveis à hidrólise pela mistura de enzimas (GROHMANN; CAMERON; BUSLIG, 1995).

Tabela 3: Composição média da casca de laranja (em base seca).

Componente	%
Carboidratos	16,9
Amido	3,75
Fibras	
Celulose	9,21
Hemicelulose	10,5
Lignina	0,84
Pectina	42,5
Cinzas	3,50
Lipídios	1,95
Proteínas	6,50
Outros componentes	4,35

Fonte: RIVAS et al., 2008.

A pectina é um importante subproduto cítrico, sendo já conhecidas sua manufatura e propriedades. Devido à qualidade, rendimento e dinâmica global, a pectina é geralmente recuperada de casca de limão e lima, havendo algumas limitações no uso da laranja como matéria-prima. Um dos maiores problemas na manufatura da pectina é a geração de novos resíduos, com alto custo para disposição final. Comumente, o rendimento da pectina é cerca de $\frac{1}{4}$ da massa seca da casca de cítricos após a extração de açúcares (BRADDOCK, 2004).

O resíduo pode ser utilizado, ainda, como fonte alternativa para a produção de etanol, D-limoneno e outros subprodutos. Pesquisas nessas áreas aplicam, por exemplo, a hidrólise enzimática para quebrar a estrutura do resíduo e aumentar o conteúdo de açúcares monoméricos (sacarificação). Estes açúcares podem ser convertidos, simultaneamente, em etanol por fermentação (WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010).

c) Pulp-wash: na etapa de ajuste do teor de polpa do suco, realizada pelos *finishers*, a polpa retirada é lavada para remoção do suco residual contido nesta. O suco obtido (que possui °Brix inferior ao suco concentrado) é encaminhado para a concentração em evaporadores e, posteriormente, é incorporado ao suco já concentrado. A polpa exaurida (*pulp-wash*) é encaminhada para a fábrica de ração (YAMANAKA, 2005).

d) D-limoneno: o D-limoneno é o componente mais expressivo presente na casca da laranja, representando até 95 % (m/m) do óleo

total, responsável pelo odor liberado pela fruta *in natura* e durante o processamento do suco. Na etapa de prensagem para a fabricação do farelo cítrico é obtido o *licor de prensagem*. Este líquido passa por peneiras para a remoção de sólidos e, então, é enviado para o evaporador para concentração. O D-limoneno é extraído no segundo estágio do evaporador de múltiplo efeito e o condensado recuperado, composto de água e D-limoneno, sofre separação de fases por decantação (YAMANAKA, 2005).

O D-limoneno é a fração oleosa e é considerada uma das mais puras fontes de terpeno monocíclico, utilizado em solventes de resinas, borracha, pigmentos, tintas, fabricação de adesivos, etc. Além disso, é usado pela indústria farmacêutica e alimentícia como componente aromático e para dar sabor, sendo largamente utilizado na obtenção de sabores artificiais de menta e hortelã na fabricação de doces, balas e gomas de mascar (ABECITRUS, 2008).

O resíduo contém, em média, 0,8 % (m/m) de óleo, podendo variar entre 0,4 e 1,6 % (m/m) dependendo da variedade da fruta cítrica e da técnica de recuperação do óleo empregada. Parte deste óleo é recuperada por evaporação do licor resultante da prensagem da casca, mas a maior fração é volatilizada como compostos orgânicos para a atmosfera, durante o processo de secagem do resíduo prensado. Antes do pré-tratamento de secagem, o resíduo do processamento de frutos cítricos apresenta pH entre 4,2 e 4,3, conteúdo de D-limoneno de $0,45 \pm 0,06$ % (m/m) e $23,3 \pm 0,5$ % de matéria seca (WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010).

Significativas quantidades de D-limoneno são volatilizadas na atmosfera durante a secagem do farelo, tornando-se um tema de preocupação ambiental. Nos Estados Unidos é necessária uma autorização especial da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA - *United States Environmental Protection Agency*), regulamentada pela Lei Americana do Ar Limpo (CAA - *Clean Air Act*) para produtores de sucos que excedam o limite de emissão de 100 toneladas/ano de D-limoneno na atmosfera. A destilação a vapor é considerada um efetivo pré-tratamento de remoção e recuperação do D-limoneno do resíduo, devido ao fato deste ser um composto com uma pressão de vapor alta em temperaturas acima de 100 °C (ponto de ebulição de 178 °C) e não ser miscível em água. (RIVAS et al., 2008; WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010).

O D-limoneno é um inibidor de leveduras e a remoção deste é uma etapa crítica na produção de etanol a partir do resíduo de frutos cítricos. A inibição de leveduras por D-limoneno ocorre em concentrações de 0,08 - 0,15 % (m/m). Contudo, os sólidos insolúveis do resíduo retêm significantes quantidades de D-limoneno e, devido a isto, consegue-se uma boa conversão de açúcares em etanol para conteúdos de D-limoneno de até 0,28 % (WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010).

A Figura 5 apresenta um fluxograma simplificado de processo de produção da indústria cítrica, com seus produtos e subprodutos. Cabe salientar que nem todas as empresas processadoras de sucos possuem todas as etapas apresentadas, bem como os processos aqui descritos podem sofrer modificações de acordo com a empresa e com o tipo de produto desejado.

3.4. Métodos de extração de óleos essenciais com a utilização de solventes

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (LEAL, 2008).

A Organização Internacional para Padronização (ISO - *International Organization for Standardization*) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor de água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de suas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes) (AROMALANDIA, 2008).

As tecnologias clássicas de extração são baseadas no uso de um solvente apropriado para remover compostos lipofílicos do interior do tecido celular. Os métodos de extração de óleos essenciais e compostos bioativos variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. De forma geral, a extração destes compostos pode ser realizada através de técnicas convencionais como a enfleuragem, a prensagem a frio, a maceração, o ultrassom e a extração em Soxhlet, a destilação direta e a destilação por arraste a vapor de água. Os principais solventes utilizados para a extração de óleos são o hexano, o benzeno, os alcoóis metílico, etílico e propílico, a acetona, o pentano e diversos solventes clorados. Após a extração, o solvente é removido por evaporação ou destilação à pressão reduzida, obtendo-se um extrato denso e resinoso (KITZBERGER, 2005; BISCAIA, 2007; AROMALANDIA, 2008).

Estes procedimentos clássicos possuem desvantagens como tempos de operação longos, operações laboratoriais intensas, manuseio de grandes volumes de solventes perigosos e subsequente etapa de concentração do extrato, o que pode resultar em degradação térmica do composto alvo. Além disso, o solvente pode provocar alterações químicas nas moléculas e causar efeitos tóxicos nos consumidores (SCALIA; GIUFREDDA; PALLADO, 1999).

A solubilidade das substâncias se dá em função da afinidade química existente entre as espécies do sistema. A escolha por um solvente adequado em combinação com uma agitação mecânica suficiente influencia o processo de transferência de massa e, conseqüentemente, a extração. O solvente mais utilizado na indústria para extração de óleos é o hexano, um solvente derivado do petróleo de baixo custo, que possibilita altos rendimentos de extração. Isso ocorre pelo elevado poder de solubilização deste solvente, por apresentar característica apolar, por ser de fácil separação do óleo no processo de recuperação do solvente. A etapa de recuperação do solvente é crucial no processamento de óleo comestível devido aos problemas de segurança ambiental e econômicos, além da possibilidade de resíduo do solvente no produto final. Na maioria das situações, tanto para fins sensoriais quanto para fins farmacológicos, o solvente residual pode ser indesejável em um produto devido à sua toxicidade, à sua capacidade reagente ou mesmo pela interferência no aroma e no extrato obtido (DONELIAN, 2004; LI; PORDESIMO; WEISS, 2004; FALKENBERG et al., 2003 apud KITZBERGER, 2005).

Nos últimos anos surgiram novas técnicas de extração, como a micro-extração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*), extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*), extração assistida por microondas (MAE - *Microwave Assisted Extraction*), extração com fluido supercrítico (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*) e extração com líquidos pressurizados (PLE - *Pressure Liquid Extraction*), conhecida também como extração por fluido pressurizado (PFE - *Pressurized Fluid Extraction*) ou extração acelerada com solvente (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*). Estas técnicas são mais rápidas que a extração com Soxhlet, utilizam menos solventes, diminuem a degradação da amostra, podem eliminar a etapa de limpeza ou *clean up* da amostra, eliminam etapas de concentração antes das análises cromatográficas, melhoram a eficiência de extração, seletividade e/ou cinética e são de fácil automação (JACQUES, 2005).

Recentemente, o uso de solventes alternativos como alcoóis (isopropanol e etanol) e dióxido de carbono supercrítico tem aumentado devido a estes problemas. De maneira geral, os solventes alternativos são menos eficientes, devido à menor afinidade molecular entre solvente e soluto (DONELIAN, 2004; LI; PORDESIMO; WEISS, 2004; MEZZOMO, 2008)

Os fluidos supercríticos apresentam muitas vantagens na extração de produtos naturais. A combinação de propriedades de líquido e gás dos fluidos supercríticos torna estes particularmente adequados para a extração por difusão em matrizes vegetais (SCALIA, GIUFREDDA; PALLADO, 1999). Por outro lado, a extração com CO₂ supercrítico exige um investimento maior devido aos custos de aquisição de equipamentos de alta pressão, mas é extremamente específica em sua atuação (IMISON; UNTHANK, 2000 apud DONELIAN, 2004).

Cada um dos processos aqui citados pode produzir extratos de qualidade, entretanto, a temperatura elevada e o uso de solventes orgânicos podem fazê-los divergir da qualidade original. Associado com as elevadas temperaturas empregadas no processo estão os danos causados aos componentes, altamente sensíveis, de aromas, fragrâncias e princípios ativos farmacêuticos e a perda de componentes altamente voláteis, de baixo peso molecular, que não podem ser recuperados e reincorporados ao extrato (KITZBERGER, 2005).

3.4.1. Destilação com água ou hidrodestilação

Este é o mais antigo método de destilação, sendo comumente empregado em unidades onde a destilação é um processo artesanal. Neste método, a matéria-prima é completamente imersa em água (solvente) e então destiladas, com a temperatura de operação não excedendo os 100 °C (LEAL, 2008).

A hidrodestilação é apropriada para a extração de óleo essencial de vários tipos de matrizes vegetais: flores, frutos, folhas, rizomas, raízes, sementes, casca de caule, castanhas, galhos ou pó. Embora não seja o método mais eficiente, a hidrodestilação apresenta o sistema para destilação mais versátil, sendo uma técnica bastante utilizada em laboratório. Porém, a literatura cita a hidrodestilação como possível promotora de reações de hidrólise, nas quais a água reage com ésteres, formando álcool e ácidos carboxílicos. A qualidade e o valor dos óleos que normalmente contém altos percentuais de ésteres podem ser afetados pela hidrodestilação (LEAL, 2008).

Nos processos de destilação, dois produtos são obtidos: o óleo volátil e o hidrolato (água não-alcoólica condensada), separados um do outro por decantação. Pequenas quantidades de compostos aromatizantes estão presentes no hidrolato, conferindo a ele agradável fragrância. Alguns hidrolatos possuem grande potencial de uso como fragrância nas indústrias de cosméticos, alimentos e farmacêuticas. No entanto, é muito comum o descarte dos hidrolatos pelas destilarias (LEAL, 2008).

3.4.2. Ultrassom

O ultrassom é um processo que utiliza a energia das ondas sonoras (mecânicas) que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. As ondas sonoras se propagam na matéria, em frequências de 20,0 - 100,0 kHz, criando no meio que se propagam ciclos de expansão e compressão. Em um líquido, estes ciclos produzem uma pressão negativa, podendo gerar bolhas ou cavitação, causando mudanças físicas e químicas permanentes, como ruptura dos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás (LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2003; MELECCHI, 2005).

Os principais efeitos do ultrassom na extração de matrizes vegetais são o aumento do estresse mecânico das células (ou fricção interfacial), aumento da permeabilidade das paredes celulares, o que facilita a dilatação e hidratação do material através do aumento do tamanho dos poros da parede celular, melhorando o processo de difusão e de transferência de massa. O aumento no tecido celular pode, em alguns casos, quebrar a parede celular, causando a saída dos compostos aromáticos da célula, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração, e aumentar a área de contato entre o sólido e a fase líquida. Contudo, o efeito do ultrassom no processo de extração depende da frequência e da potência do aparelho (VINATORU, 2001; JACQUES, 2005; YANG; ZHANG, 2008).

O ultrassom é utilizado para a extração de compostos voláteis de plantas com solventes orgânicos, em temperatura ambiente. Nesta técnica, a amostra triturada é misturada ao solvente e colocada em um recipiente, que é imerso em um banho de ultrassom, por um tempo determinado (menor que na extração Soxhlet) e a uma frequência própria do banho. Transcorrido esse tempo, o extrato é filtrado e concentrado (ALISSANDRAKIS et al., 2003; JACQUES, 2005).

A extração com ultrassom é utilizada em diversas áreas de pesquisa, incluindo a extração de compostos naturais como as vitaminas A, D e E e compostos antioxidantes e fitoquímicos, como hidrocarbonetos, flavonóides, alcalóides, polissacarídios, óleos, fenóis, ésteres de ácidos graxos, esteróides e antraquinonas de diferentes partes da planta e das sementes. Contudo, existem poucos relatos de aplicação do ultrassom para o isolamento de compostos fenólicos de frutas cítricas (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003; MA et al., 2008; YANG; ZHANG, 2008).

Ma et al. (2008) avaliaram o tempo, a temperatura e o poder do ultrassom em diferentes tratamentos para casca de frutos cítricos. Estas variáveis provocaram efeito significativo no teor de compostos fenólicos total e este aumentou de 41,45 % quando o tempo de extração foi ampliado de 10 para 60 minutos, à temperatura de 40 °C.

Existem dois tipos comuns de aparelhos de ultrassom, denominados de banho de ultrassom (direto ou indireto) e sonda, apresentados na Figura 6.

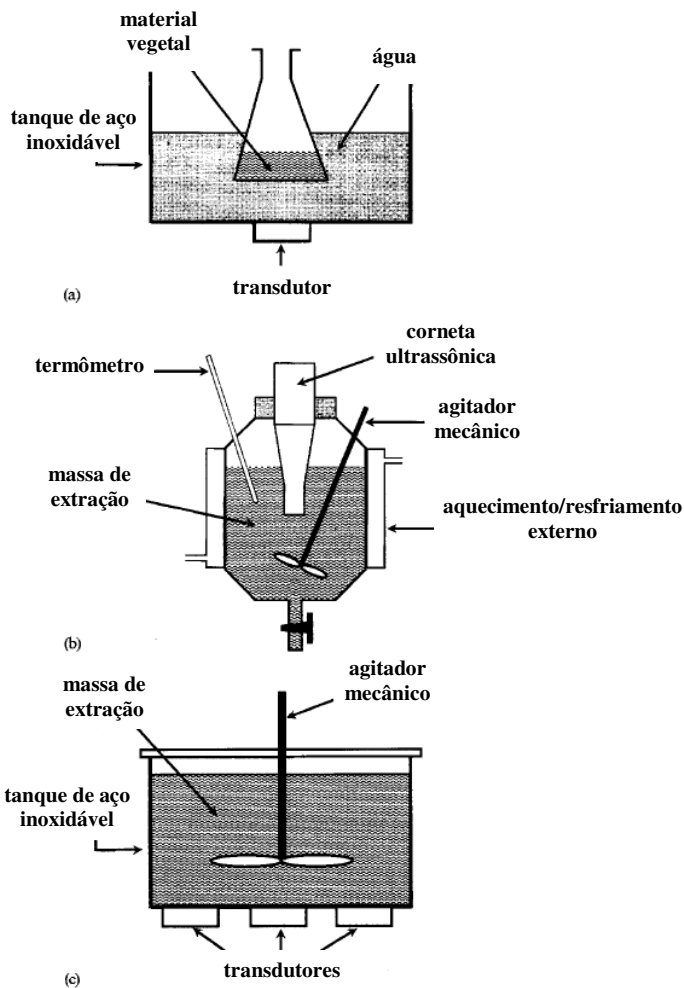


Figura 6: Esquema dos sistemas de ultrassom: (a) banho de ultrassom indireto; (b) sonda de ultrassom; (c) banho de ultrassom direto.

Fonte: VINATORU et al., 1997.

Embora os banhos sejam o tipo de aparelho mais utilizado, eles apresentam como desvantagem a perda de uniformidade na distribuição da energia ultrassônica, onde apenas uma pequena fração do volume

total líquido nas imediações da fonte de ultrassom cavitata. As sondas de ultrassom apresentam como vantagem a localização da energia na zona da amostra, garantindo uma cavitação mais eficiente no líquido (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003).

A extração com ultrassom, quando comparada à extração em Soxhlet, apresenta como vantagens o aumento da polaridade do sistema devido à cavitação, o que aumenta a eficiência da extração; permite a adição de um co-solvente para aumentar a polaridade da fase líquida; permite a extração de compostos que sofrem degradação nas condições de operação da extração com Soxhlet e o tempo de operação é reduzido em relação a esta técnica. Com relação à extração com CO₂ supercrítico, o ultrassom tem como vantagens a simplicidade de equipamento utilizado, onde o custo do processo é muito inferior; permite a extração de uma grande variedade de compostos, pois pode ser realizada com qualquer solvente, enquanto a extração supercrítica utiliza CO₂, restringindo a extração a compostos apolares (LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2003).

Como aplicações industriais, a limpeza de superfícies com ultrassom é a melhor estabelecida, especialmente na descontaminação, pois consegue deslocar as sujidades e as bactérias das superfícies, alcançando partes de difícil acesso aos métodos convencionais de limpeza. O ultrassom, ainda, é utilizado industrialmente para estimular a atividade celular, destruição celular (pasteurização, esterilização e descontaminação de materiais médicos, cirúrgicos, dentários e de indústrias processadoras de alimentos), processamento de carnes, processos de cristalização e congelamento, clarificação de bebidas, produção de emulsões, filtração, secagem e melhoria de processos dependentes da difusão (MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996; VALERO et al., 2007). A Tabela 4 apresenta as principais aplicações do ultrassom em diversas áreas.

3.4.3. Soxhlet

Os óleos vegetais de sementes são obtidos tradicionalmente através de extração com Soxhlet. O processo em geral produz altos rendimentos, porém há necessidade de uma etapa posterior de eliminação do solvente após a extração, exigindo elevados gastos energéticos. Como principais desvantagens deste processo estão a baixa

seletividade e a lentidão de processo (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Na maioria dos casos, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução do soluto (VALE, 1997).

Tabela 4: Áreas de aplicação do ultrassom.

Área	Aplicação
Biologia	Homogeneização, rompimento de células, esterilização, extração de componentes em tecidos de plantas ou animais.
Engenharia	Limpeza de metal, solda, refinamento de metal em pedaços, perfuração.
Geologia	Localização de minerais e depósitos de óleos, estabelecimento de profundidade.
Industrial	Filtração, cristalização, dispersão de sólidos, crescimento de cristais, degaseificação, emulsificação.
Médica	Esterilização, fisioterapia, inalações.
Física	Cavitação, fenômenos das ondas acústicas, velocidade do som.
Materiais	Polimerização, despolimerização, degradação de peso molecular.

Fonte: BARBOZA et al., 1992 apud MELECCHI, 2005.

A extração com Soxhlet é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação. Ainda que seja um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos, ele apresenta restrições ligadas ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (MIGUEL; ANDRADE, 1989). Neste processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra e o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento e, em algumas ocasiões, isto pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos (MELECCHI, 2005).

Como vantagens da extração com Soxhlet, em relação ao processo por ultrassom, ocorre a renovação do solvente durante o processo, o que aumenta o coeficiente de partição e a eficiência da extração; não há necessidade de filtração, o que simplifica o tempo de manuseio do extrato após a extração e os riscos de perda e/ou contaminação do extrato, além de apresentar maior reprodutibilidade do que o processo por ultrassom (LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2003).

3.4.4. Extração com fluido supercrítico

O aumento da demanda por antioxidantes naturais e a necessidade de novos compostos com atividade antimicrobiana tem estimulado pesquisas relacionadas à extração de substâncias biologicamente ativas de diversos materiais. A técnica empregada na extração destes compostos de alto valor agregado é de fundamental importância para a definição da qualidade do produto. A extração supercrítica pode ser considerada um dos novos métodos de extração potencialmente útil na obtenção destes compostos com atividade biológica a partir de matrizes naturais (AGHEL et al., 2004; DÍAZ-REINOSO, 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Em 1879, Hannay e Hogarth observaram experimentalmente o aumento da solubilidade de substâncias químicas com o aumento simultâneo de pressão e da temperatura, obtendo um importante avanço científico e tecnológico: o uso de fluidos supercríticos. Até o início da década de 1980 o uso de fluidos supercríticos era limitado devido às dificuldades em se operar, com segurança, em temperaturas e pressões elevadas. Mais recentemente, atividades de desenvolvimento comercial, de pesquisa e acadêmicas envolvendo a extração com fluidos supercríticos têm crescido continuamente, direcionando a sua utilização para extração de produtos com atividade biológica (MELECCHI, 2005).

O conhecimento das propriedades termodinâmicas, como solubilidade e seletividade e propriedades de transporte, como taxa de transferência de massa, é fundamental para o projeto e ampliação da escala de processos a alta pressão. A solubilidade é um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação enquanto que a seletividade permite a obtenção de informações sobre qualidade e composição dos extratos (FERREIRA et al., 1999).

A seletividade na extração supercrítica pode ser determinada pela escolha do fluido supercrítico ou pelo ajuste de parâmetros como temperatura e pressão do processo dentro da região supercrítica, ou seja, controlando a densidade do solvente. A definição das condições de extração (temperatura e pressão) indica o poder de solvatação do solvente. Assim, quanto maior o poder de solvatação, maior a solubilidade de um determinado composto e maior o número de compostos solubilizáveis de uma mistura. Desta forma, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa. Em processos com solventes supercríticos, o grande potencial para a transferência de massa é

determinado pela diferença no estado de equilíbrio (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000; AGHEL *et al.*, 2004).

A extração supercrítica possui vantagens sobre as técnicas convencionais de extração por ser um processo flexível devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e seletividade do solvente; não utilizar solventes orgânicos poluentes e não necessitar da etapa de evaporação dos extratos para a eliminação do solvente. A degradação térmica e decomposição de compostos voláteis podem ser evitadas através do emprego de baixas temperaturas e a ausência de luz e oxigênio previnem reações de oxidação (REVERCHON; DE MARCO, 2006; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

A maioria dos danos causados pelos métodos convencionais de extração podem ser evitados pelo uso de um fluido supercrítico como solvente de extração. Dentre as vantagens da extração supercrítica, podemos citar:

- a)* Os solventes empregados são gasosos à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, permitindo que após a extração eles sejam facilmente eliminados dos extratos e recuperados;
- b)* A maioria dos gases supercríticos utilizados é fisiologicamente seguro e inerte;
- c)* As propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser variadas, tanto pelo ajuste da temperatura e da pressão, quanto pela introdução de agentes aditivos que mudem a polaridade dos gases, possibilitando extrações multifase e fracionamento do extrato nos compostos desejados;
- d)* A separação de materiais é feita a baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando são extraídas substâncias naturais que são termicamente degradadas;
- e)* A força solvente é ajustada via compressão mecânica;
- f)* A adição de solventes modificadores permite a extração diferencial de solutos não polares até solutos de alta polaridade;
- g)* A adição de solventes modificadores orgânicos aumenta a solubilidade do material a ser extraído;

- h)** Os solventes podem ser reusados, possibilitando baixo custo operacional (MAUL, 1999; MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005).

Como desvantagens da extração supercrítica deve ser considerado:

- a)** O processo é de custo elevado devido ao custo dos equipamentos;
- b)** Compostos muito polares dificilmente são extraídos sem adição de um solvente modificador adequado (MELECCHI, 2005).

Um extrato obtido com CO₂ supercrítico pode ser considerado como natural e os produtos obtidos podem ser aplicados na indústria alimentícia ou farmacêutica por possuir *status* de substância geralmente reconhecida como segura (GRAS - *Generally recognized as safe*). O elevado gradiente de pressão pode produzir extratos livres de microrganismos e seus esporos, com uma maior vida útil que extratos obtidos com solventes orgânicos (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

A extração supercrítica a partir de matrizes sólidas é uma aplicação bastante difundida pelo mundo, especialmente nas áreas de extração de princípios aromáticos de especiarias (óleos e oleoresinas), remoção de nicotina do tabaco, óleos essenciais de frutas e sementes, a extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo na indústria cervejeira, a produção de bases para cosméticos a partir do resíduo da cervejaria; a descafeinização do café e do mate, obtenção de carotenos da cenoura, a extração de óleos essenciais de plantas, a retificação e desodorização de óleos comestíveis em geral, a remoção de colesterol de ovos e tecidos animais, entre várias outras aplicações. Para fins farmacêuticos, a tecnologia supercrítica é voltada principalmente para a extração de compostos das plantas medicinais. Na área química, as aplicações estão relacionadas à formulação, onde a dissolução em CO₂ supercrítico reduz a viscosidade da tinta, permitindo uma redução de 30 a 60 % na concentração de solvente orgânico. Outras aplicações em desenvolvimento estão na área têxtil (tingimento de fibras têxteis), extração de lanolina de lã e na extração de contaminantes do solo (metais pesados e pesticidas) (MUKHOPADHYAY, 2000; PERRUT, 2001; MELECCHI, 2005).

Depois de extraídos os compostos de interesse, a matriz pode ser usada em outras aplicações como alimentação animal, por exemplo, por não possuir resíduo de solvente (MEZZOMO, 2008).

3.4.4.1. Fluido supercrítico

Os fluidos supercríticos são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão críticas, onde as propriedades de líquido e de gás se tornam idênticas. A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. Na zona próxima a do ponto crítico é onde se produzem, com pequenas alterações de pressão e temperatura, as maiores variações da densidade do fluido supercrítico e, por conseqüência, do seu poder solvente. Caso uma destas propriedades (pressão ou temperatura) se encontre abaixo do ponto crítico, diz-se que a substância está no estado subcrítico (BRUNNER, 1994; ARAÚJO, 1999; BERNARDO-GIL; RIBEIRO; ESQUÍVEL, 2002).

A Figura 7 mostra um diagrama de fases, onde as regiões de gás, líquido, sólido e fluido supercrítico são apresentadas para o CO_2 puro.

Os fluidos supercríticos apresentam viscosidade baixa semelhante à de um gás, alta densidade como os líquidos e difusão intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade. As características de gás ajudam na difusão do fluido na matriz e o acesso aos compostos de interesse, enquanto que as características de líquido proporcionam um melhor poder de solvatação (TSAO; DENG, 2004). Adaptam-se facilmente a separações difíceis, não somente por permitir a separação de materiais instáveis termicamente, mas devido à alta compressibilidade e solubilidade, além de efetuar separações com pequenas variações de pressão (SILVA; LIBERAL; PESSOA; 1997). Todas estas características fazem com que os fluidos supercríticos tenham maiores taxas de transferência de massa, no processo de extração de um soluto do que as operações que empregam solventes orgânicos (MAUL, 1999).

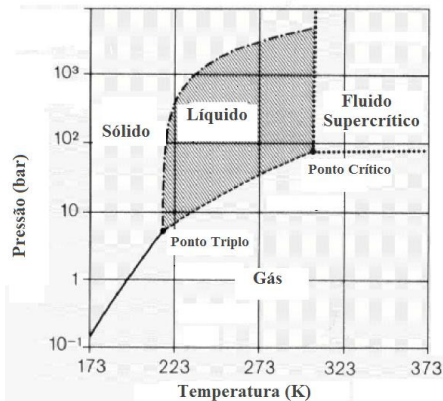


Figura 7: Representação esquemática do comportamento do CO₂ puro em um diagrama de fase P-T.

Fonte: MAXIMATOR, 2010.

A Tabela 5 apresenta as propriedades de densidade, viscosidade e difusividade dos fluidos supercríticos comparadas às propriedades dos líquidos e gases.

Tabela 5: Comparação das propriedades físicas de líquido, gás e fluidos supercríticos.

Estado físico	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade (g/cm.s)	Difusividade (cm ² /s)
Líquido	0,6 - 1,6	0,2 - 0,3 · 10 ⁻²	0,2 - 2,0 · 10 ⁻³
Gás	0,6 - 2,0 · 10 ⁻³	1 - 3 · 10 ⁻⁴	0,1 - 0,4
Fluido supercrítico			
P _c , T _c	0,2 - 0,5	1 - 3 · 10 ⁻⁴	0,7 · 10 ⁻³
4P _c , T _c	0,4 - 0,9	3 - 9 · 10 ⁻⁴	0,2 · 10 ⁻³

Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000.

3.4.4.2. Dióxido de carbono supercrítico

O CO₂ é o fluido mais utilizado como solvente seja como fluido supercrítico ou líquido subcrítico, uma vez que suas características se assemelham a de um solvente ideal, sendo indicado para uma grande

faixa de substratos naturais (FERREIRA, 1996). O CO₂ supercrítico é um solvente não-polar e sua seletividade de extração pode ser ajustada para cada substrato, mudando-se a temperatura e a pressão dentro da região supercrítica (ARAÚJO, 1999; MELECCHI, 2005).

De forma geral, a extração com CO₂ supercrítico apresenta algumas particularidades:

- a)* Compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos, são facilmente extraídos;
- b)* Substâncias polares como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídios, glicosídeos e sais orgânicos, não são solúveis;
- c)* O CO₂ apresenta baixa temperatura crítica (31,04 °C), conduzindo a extração em temperaturas suficientemente baixas para não alterar as propriedades sensoriais e químicas dos extratos, e baixa pressão crítica (73,8 bar), sendo de fácil obtenção e trabalho em processos de produção industrial;
- d)* É um gás inerte, não oferecendo riscos de reações secundárias como oxidação, redução, hidrólise e degradação química;
- e)* É um gás seguro, pois o CO₂ é inofensivo, não-explosivo, não-poluente, não-tóxico e de uso significativo na gaseificação de bebidas;
- f)* A polaridade do CO₂ é próxima à do pentano e do hexano, solventes comumente usados em extrações tradicionais;
- g)* É um gás versátil, pois os parâmetros de extração com CO₂ supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de modificadores ou pela seleção das condições de temperatura e pressão (MICHIELIN, 2002; MELECCHI, 2005).

Existem outros gases que também apresentam, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades. Porém, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos deles são usados comercialmente (MAUL, 1999; MELECCHI, 2005).

O CO₂ supercrítico é utilizado principalmente como solvente na extração de compostos de alto valor agregado oriundos de produtos naturais, sendo bastante apropriado para a extração de antioxidantes como carotenóides e outros antioxidantes lipofílicos. Compostos polares, como flavonóides e ácidos fenólicos, são menos solúveis no CO₂ supercrítico, necessitando a utilização de um co-solvente para modificar a extração destes compostos (TSAO; DENG, 2004; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

A Tabela 6 apresenta uma lista dos fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica, e os valores de temperatura e pressão críticas e densidade.

Tabela 6: Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica e valores de temperatura e pressão críticas e densidade.

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

T_c: Temperatura crítica; P_c: pressão crítica; ρ: densidade.

Fonte: HIERRO; SANTA-MARIA, 1991.

3.4.4.3. Utilização de co-solventes ou modificadores

O uso de co-solventes ou modificadores é proposto como forma de melhorar a solubilidade dos compostos desejados e/ou aumentar a

seletividade da extração (pela mudança de polaridade do fluido supercrítico), aumentando o rendimento da extração (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Os co-solventes são solventes orgânicos que apresentam volatilidade intermediária entre o solvente supercrítico e o soluto a ser extraído, sendo adicionados em pequenas quantidades para alterar as características da mistura co-solvente/solvente, tais como polaridade e interações específicas com o soluto (pontes de hidrogênio), podendo interagir com sítios ativos da matriz sólida e favorecer a difusão do CO₂ para extrair os compostos desejados, sem mudar de forma significativa a densidade e compressibilidade do solvente supercrítico original (MUKHOPADHYAY, 2000; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Diversos solventes orgânicos podem ser utilizados como co-solventes na extração supercrítica. O etanol é o solvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos (MICHIELIN, 2009).

3.4.4.4. Princípios da extração com fluido supercrítico

A extração supercrítica de uma matriz sólida com o emprego de gases pressurizados consiste de duas etapas de processo: a solubilização e a separação da mistura soluto/solvente. Durante o processo de extração, o solvente supercrítico flui através de um extrator com o leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os componentes passíveis de extração do sólido. O esgotamento do sólido ocorre na direção do escoamento, enquanto a massa de extrato na fase solvente aumenta na mesma direção. O solvente sai do extrator, carregando os compostos solubilizados, e passa através de uma válvula de expansão, onde o extrato é liberado do meio gasoso devido à menor pressão e coletado (PELLERIN, 1991; BRUNNER, 1994; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Como vantagem da extração supercrítica tem-se a fácil recuperação do solvente supercrítico após o processo de extração, podendo o mesmo ser continuamente reciclado (MICHIELIN, 2002).

A Figura 8 representa esquematicamente a extração supercrítica de matrizes sólidas, consistindo de duas etapas de extração: extração e separação da mistura soluto-solvente.

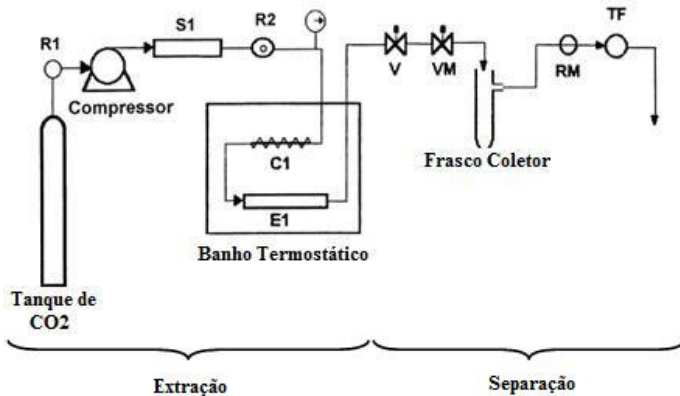


Figura 8: Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas: (R1) regulador de pressão do cilindro; (S1) pistão de compressão; (R2) regulador de pressão; (C1) serpentina; (E1) coluna de extração; (V) válvula abrefecha; (VM) válvula micrométrica; (RM) medidor de vazão; (TF) Totalizador.

Fonte: FERREIRA et al., 1999 adaptado por MEZZOMO, 2008.

O princípio de extração com fluido supercrítico utiliza as propriedades físicas destes fluidos no estado supercrítico e suas interações moleculares que podem ser fortes, permitindo diminuir suas distâncias intermoleculares e aumentar sua capacidade de dissolução para várias substâncias químicas (KNOWLES et al., 1988).

Os fatores determinantes do processo de extração são o poder de solubilização e a seletividade do solvente com relação aos componentes de interesse, a capacidade de difusão destes no fluido e a distribuição dos compostos a serem extraídos no substrato. Cada uma destas distribuições tem alguma influência sobre a extração. Além disso, o material sólido pode ser constituído de partículas de variadas formas e tamanhos, formando uma matéria-prima heterogênea. O leito de partículas pode formar diferentes geometrias e ainda podem ocorrer alterações nesta durante o processo (BRUNNER, 1994).

A resistência à transferência de massa no interior das partículas sólidas, na maior parte das vezes, é dominante no processo. Para reduzir esta resistência e aumentar o rendimento de extração pode-se reduzir o tamanho das partículas, com a finalidade de aumentar a área de contato entre o sólido e o solvente, diminuindo, desta forma, a distância que o

soluto percorre no interior da partícula porosa. Partículas grandes fornecem espaços para que o solvente percorra as diferentes capas de partículas. As partículas pequenas são, aproximadamente, lâminas achatadas, formando capas densas, as quais não permitem a formação de canais para o escoamento de fluidos. A redução da granulometria do sólido não pode ser realizada de forma indefinida, pois partículas muito pequenas tendem a formar aglomerados e interromper a passagem do solvente pelo leito, além de proporcionar perda de compostos voláteis (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ, 2005).

Sovová, Kucera e Jez (1994) estudaram o efeito da moagem de sementes de uva sobre a taxa de extração do óleo. Demonstraram que a redução do tamanho de partícula aumenta a área superficial e libera o soluto do interior das sementes, implicando em um aumento da taxa de extração. Ao final da extração, partículas menores atingiram maiores rendimentos.

Mira et al. (1999) avaliaram os efeitos das condições de operação na composição do óleo essencial da casca de laranja. O tamanho das partículas variou de 0,1 a 10 mm, sendo verificado que, para partículas menores que 2 mm, a extração ocorre mais rapidamente. A taxa de extração diminui com o aumento da granulometria da amostra devido à resistência ao processo difusivo no interior da partícula.

Segundo Brunner (1994), a extração de compostos solúveis de um material vegetal consiste de cinco etapas:

- a)* A matriz vegetal adsorve o solvente supercrítico, inchando a estrutura das células, as membranas celulares e os canais intercelulares são dilatados, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua;
- b)* Ocorre a dissolução dos compostos do extrato que podem ser extraídos pelo solvente;
- c)* Acontece a transferência por difusão dos compostos solubilizados de dentro do sólido até a sua superfície;
- d)* Os compostos solubilizados atingem a superfície externa;
- e)* Os compostos solubilizados são transportados convectivamente da superfície para o solvente supercrítico e são removidos com o solvente.

A transição entre o período de taxa constante e decrescente de extração é influenciado pelo tamanho de partícula, pelo conteúdo inicial de óleo no sólido e pela estrutura celular do material. Partículas grandes causam um aumento no período difusional e o período de taxa decrescente de extração ocorre antes do que em partículas de menor tamanho. Quando o material possui alto conteúdo de óleo, a transferência de massa ocorre predominantemente em taxa constante, sendo a taxa de extração controlada pela solubilidade do substrato no solvente. A cinética de transferência de massa depende de quanto, onde e como o soluto é liberado da matriz celular, do mecanismo de separação do soluto, do tipo de transporte do soluto, dentre outros parâmetros como pressão, temperatura, fluxo de solvente e tamanho de partícula (MUKHOPADHYAY, 2000).

Brunner (1994) cita que a razão de solvente, definida como a razão entre a vazão mássica de solvente e a massa de sólidos, é um dos fatores mais relevantes para o processo de extração. O aumento da vazão mássica de solvente para uma quantidade fixa de sólidos pode resultar em uma redução da carga do solvente, devido a um menor tempo de residência. No entanto, devido à maior vazão, a velocidade de extração tende a aumentar até um valor máximo a partir do qual pode sofrer um declínio.

Quando um leito fixo de sólidos é colocado em contato com um fluxo de CO₂ os mecanismos de transporte de massa envolvem a difusão e adsorção do fluido supercrítico seguido pela desorção do soluto, difusão através dos poros e transporte convectivo, juntamente com o fluido supercrítico através do leito. O principal fator é a distribuição inicial das substâncias passíveis de extração no interior da matriz sólida, que podem estar adsorvidas na superfície da partícula, na superfície dos poros ou dissolvidas no citoplasma ou no interior das células das plantas. Cada uma destas diferentes distribuições tem alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

A etapa de desorção e difusão do soluto no fluido supercrítico através dos poros é a mais longa, pois quando há um filme líquido de óleo presente na superfície externa das partículas sólidas a transferência de massa ocorre a uma taxa constante, dependendo da solubilidade do óleo no solvente, enquanto a taxa de transferência de massa é controlada pela resistência ao filme externo. No entanto, se não existir um filme líquido presente na superfície externa das partículas não ocorrerá um

período de taxa constante de extração e a transferência de massa ocorrerá em taxa decrescente, sendo este período controlado pela resistência interna à difusão (MUKHOPADHYAY, 2000).

3.4.4.5. Curvas de extração

O estudo da curva de extração supercrítica pode ajudar a definir o volume do extrator e a vazão necessária de solvente para a taxa de extração desejada (CARVALHO JÚNIOR, 2004). Isto é possível pelo conhecimento termodinâmico do sistema (solubilidade e seletividade) bem como a cinética do processo (taxa de transferência de massa) (FERREIRA; MEIRELES, 2002).

A solubilidade de um soluto em um fluido supercrítico é um dado de equilíbrio que representa a máxima concentração de soluto na fase solvente, sendo obtida experimentalmente pelo método dinâmico, a partir da inclinação da etapa de taxa constante de extração. Assim, para a obtenção da solubilidade em processos de extração em leito fixo a vazão de solvente deve ser baixa de tal forma que permita a saturação do solvente com o soluto de interesse, e o extrator relativamente longo para que, durante o tempo de contato entre o soluto e solvente, o equilíbrio entre as fases seja alcançado (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999).

De acordo com a literatura, as curvas de extração são geralmente divididas em três etapas e são determinadas pela massa total de óleo extraído em função do tempo de extração:

1) Etapa de taxa constante de extração (CER - *Constant extraction rate*), onde a superfície externa das partículas está completamente coberta de óleo e há o predomínio da transferência de massa devido à convecção na fase fluida;

2) Etapa de taxa de extração decrescente (FER - *Falling extraction rate*), onde a velocidade do processo é determinada pelos efeitos convectivos na fase fluida e difusionais na fase sólida;

3) Etapa difusional ou etapa de taxa de extração nula (DCP - *Diffusion-controlled period*), onde a taxa de transferência de massa é controlada principalmente pelo fenômeno difusivo no sólido (remoção do soluto da parte interna da partícula sólida) (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA; MEIRELES, 2002).

As curvas de extração são obtidas através da relação apresentada na Equação 1, onde a concentração de soluto na fase solvente varia com o tempo de extração. A maioria dos modelos matemáticos que descrevem o mecanismo de transferência de massa emprega parâmetros como a vazão do solvente, o teor de óleo extraível e as características das partículas sólidas, como diâmetro e porosidade do leito (KITZBERGER, 2005).

$$m_{EXT} = Q_{CO_2} \int_0^{t_{Total}} y(t) dt \quad (1)$$

onde m_{EXT} é a massa de extrato obtida (kg); Q é a vazão de solvente (kg/s); t é o tempo (s) e $y(t)$ é a concentração de soluto na fase solvente (kg/kg) (BRUNNER, 1994).

A representação da curva de extração supercrítica pode ser utilizada na determinação de parâmetros como tempo de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica; determinação da solubilidade e modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004). A modelagem destas curvas permite a obtenção de informações relacionadas com a pressão, temperatura e vazão de solvente, o que possibilita o delineamento e ampliação de escala dos processos de extração supercrítica (PERRUT, 2000).

A curva de extração supercrítica é ilustrada na Figura 9, onde a etapa I (CER) é o período de taxa de extração constante e a etapa II (FER) é o período de taxa decrescente de extração (MEZZOMO, 2008).

3.5. Modelos matemáticos

A modelagem matemática de curvas experimentais de extração supercrítica serve para ajuste das curvas e para compreender os fenômenos que controlam o processo supercrítico. O principal objetivo da modelagem é determinar os parâmetros ajustáveis dos modelos a partir de dados experimentais, a fim de que estes sejam mantidos constantes no aumento de escala, como dimensão de equipamentos, vazão de solvente e tamanho de partícula, podendo ser aplicados a novas condições de trabalho e/ou a outros materiais diferentes daqueles inicialmente pesquisados (RUIZ, 1999; MARTÍNEZ et al., 2003).

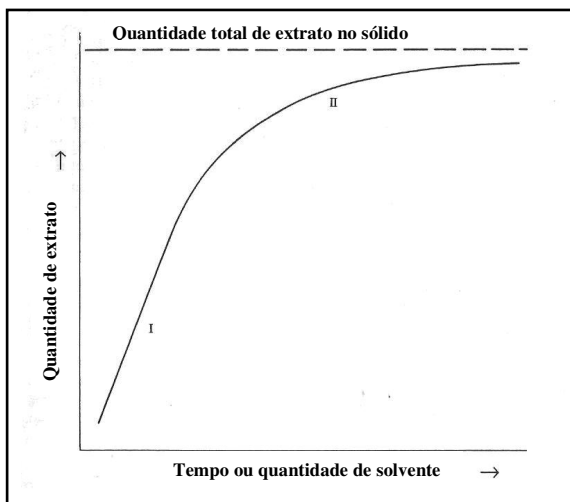


Figura 9: Curva genérica de extrato obtido por ESC em função do tempo de extração, onde *I* é o período de taxa constante de extração e *II* é o período de taxa decrescente de extração.

Fonte: BRUNNER, 1994.

Um modelo matemático deve refletir a visão física da estrutura sólida e das observações experimentais. Dentre os modelos descritos na literatura, podem ser citados os modelos empíricos; modelos baseados na analogia à transferência de calor na partícula, como o de Crank (1975) e o de Gaspar et al. (2003); modelos baseados na equação diferencial de transferência de massa no leito, como o de Sovová (1994) e o de Martínez et al. (2003); modelos análogos à equação cinética de crescimento de microrganismos de Monod, como o modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) e modelos que descrevem o processo de extração pelo mecanismo de desorção, como o proposto por Goto, Sato e Hirose (1993). A partir da integração das equações diferenciais de balanço de massa, os perfis de concentração em função do tempo são obtidos para as fases fluida e sólida, sendo a curva de extração calculada a partir da concentração na fase fluida na saída do extrator (REVERCHON; DE MARCO, 2006; MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009).

O processo de extração com fluido supercrítico pode ser analisado e modelado de forma simples, considerando-se valores médios dos parâmetros de extração e ajustando-se o modelo a dados experimentais para determinar os coeficientes. Para uma modelagem mais completa, é necessário realizar uma análise aprofundada do mecanismo de extração, considerando fatores como difusão intraparticular, dispersão axial e radial, transferência de massa através da interface sólido-fluido, resistência à transferência de massa devido a reações químicas e transição de fases (BRUNNER, 1994).

A explicação detalhada sobre os modelos de transferência de massa citados encontra-se no Apêndice I, que apresenta as equações de cada modelo, bem como as suas considerações.

3.6. Antioxidantes

Os antioxidantes estão presentes de forma natural ou são adicionados intencionalmente nos alimentos para retardar o aparecimento dos fenômenos de oxidação, mantendo intactas suas características sensoriais. Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos não devem causar efeitos fisiológicos negativos, produzir cores, odores nem sabores anômalos, devem ser solúveis na substância, resistentes aos tratamentos que o alimento é submetido, ativos em baixas temperaturas e econômicos (ORDÓÑEZ et al., 2005 apud ANDREO; JORGE, 2006).

A atividade antioxidante de compostos naturais como flavonóides e ácidos fenólicos é predominantemente determinada por suas estruturas e, em particular, pelo deslocamento de elétron sobre um núcleo aromático. Quando estes compostos reagem com um radical livre, é o deslocamento do elétron ganho sobre o antioxidante fenólico e a estabilização pelo efeito da ressonância do núcleo aromático que previnem a continuação da reação em cadeia do radical livre (TSAO; DENG, 2004). Assim, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar radicais livres antes do ataque às células e aos alvos biológicos, sendo definidos como substâncias capazes de quelar ou estabilizar radicais livres (KAUR; KAPOOR, 2001; ATOUI et al., 2005).

A origem das substâncias antioxidantes pode ser sintética ou natural. Os antioxidantes sintéticos como, o butil-hidroxianisol (BHA),

o butil-hidroxitolueno (BHT), o terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (GP) são utilizados para diminuir a fase de propagação da reação de oxidação. Entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis e facilmente decompostos em altas temperaturas. Os riscos à saúde associados ao consumo crônico dessas substâncias continuam a ser estudados (MARTINEZ-TOME et al., 2001 apud ANDREO; JORGE, 2006). Embora sejam efetivos, o uso destes antioxidantes é restrito em muitos países, devido aos possíveis efeitos indesejáveis à saúde humana. Os antioxidantes sintéticos como o BHA e o BHT tendem a ter somente um modo de ação, via seqüestro de radical livre, não sendo capazes de seqüestrar íons metálicos através da rota catalisada por um metal (ZHENG; WANG, 2001; TSAO; DENG, 2004).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de muitas espécies de plantas, normalmente daquelas utilizadas como condimentos, por serem excelentes fontes de compostos fenólicos. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser utilizadas como conservantes naturais em alimentos (RICE-EVANS et al., 1996 apud ANDREO; JORGE, 2006; ZHENG; WANG, 2001).

3.6.1. Antioxidantes e compostos fenólicos presentes em frutos cítricos

As frutas cítricas representam uma importante parte da dieta humana. Estudos de Rouseff, Martin e Youtsey (1987) e Belajová e Suhaj (2004) investigaram a importância das frutas cítricas como fonte de compostos fenólicos e atividade antioxidante. A casca dos frutos cítricos, um resíduo das indústrias processadoras de sucos, doces, compotas, etc., é uma rica fonte de numerosos compostos biologicamente ativos como a vitamina C, ácidos fenólicos e flavonóides. Os compostos fenólicos possuem propriedade antialérgica, antiarterogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora. Estes compostos estão diretamente associados com a saúde humana, uma vez que lhes são atribuídas propriedades antioxidante e anti-radicais livres (MA et al., 2008).

Os flavonóides pertencem ao grupo dos compostos polifenólicos, caracterizados por possuírem em comum a estrutura do benzo- γ -pirano, responsável por atuar como antioxidante em sistemas

biológicos. Os flavonóides estão presentes em uma grande variedade de plantas comestíveis, especialmente em espécies cítricas, sendo que estas acumulam quantidades consideráveis de flavonóides durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Os flavonóides presentes em frutas cítricas pertencem a seis classes de acordo com suas estruturas. Estas classes são: flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas e flavanóis (SENEVIRATHNE et al., 2009). As flavanonas são o tipo mais abundante, mas as flavonas de alta taxa de metoxilação e os flavonóis exibem maior atividade biológica embora ocorram em concentrações baixas (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997).

A Figura 10 representa a estrutura genérica de um composto fenólico, constituído essencialmente de dois anéis aromáticos A e B ligados por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico. O anel aromático A é derivado da via metabólica do acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina através da via metabólica do *shikimato*. Variações nas configurações de substituição do anel C resultam na maioria das subclasses dos flavonóides, representados na Figura 11 (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

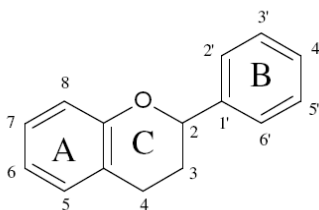


Figura 10: Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides.

Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

Mesmo que os flavonóides sejam abundantes no reino vegetal, alguns compostos como flavanonas, flavanonas glicosiladas e flavonas polimetoxiladas, são substâncias de ocorrência única em frutos cítricos, sendo relativamente rara a presença em outras plantas (LI; PORDESIMO; WEISS, 2004).

Os resíduos do processamento de frutos cítricos são a polpa desidratada, melaço, fibras, óleos de prensagem a frio, essências, D-limoneno, polpa de suco e celulose, etanol, óleo de sementes, pectina, ácido ascórbico, limonóides e flavonóides. A maior parte dos produtos obtidos a partir de resíduos da indústria de cítricos pode ser utilizada como ingrediente funcional em alimentos, especialmente as fibras dietéticas e os compostos bioativos (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2004).

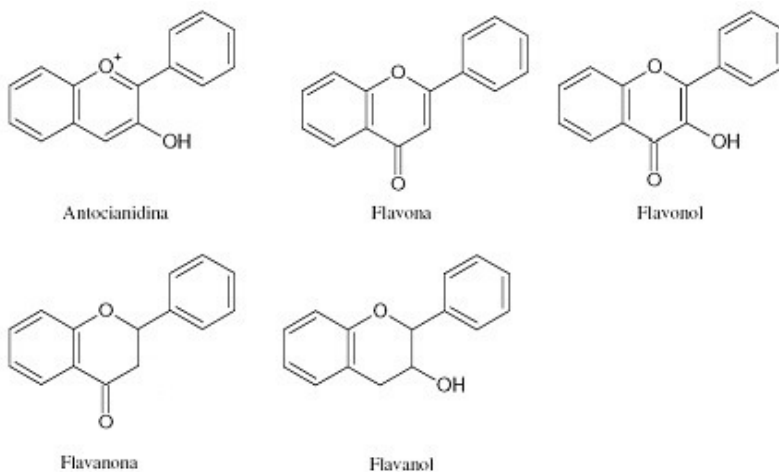


Figura 11: Estrutura genérica das principais classes dos flavonóides.

Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

O conteúdo total de polifenóis é maior na casca dos frutos cítricos do que na fruta sem casca. A Tabela 7 compara os valores do teor total de polifenóis e ácido ascórbico para o limão e a laranja.

Os flavonóides são encontrados na polpa, pele e membranas da polpa. Os principais flavonóides encontrados nas espécies cítricas são a hesperidina, narirutina, naringina e eriocitrina. A casca e outros resíduos sólidos do resíduo de limão contêm principalmente hesperidina e eriocitrina, enquanto naringina e eriocitrina estão predominantemente no resíduo líquido. O conteúdo de ácido ascórbico nos frutos cítricos pode ser de considerável importância. O conteúdo de ácido ascórbico, assim

como o de flavonóides, é maior na casca do que na fruta sem casca (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2004).

Tabela 7: Comparação do teor total de polifenóis e ácido ascórbico do limão e da laranja.

Parte da fruta	Total de polifenóis (mg/100 g)	Ácido ascórbico (mg/100 g)
Limão sem casca	164 ± 10,3	47,9 ± 4,7
Casca de limão	190 ± 10,6	59,8 ± 5,4
Laranja sem casca	154 ± 10,2	47,7 ± 4,9
Casca de laranja	179 ± 10,5	59,6 ± 5,2

Fonte: FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2004.

Bocco et al. (1998) relataram que extratos metanólicos de casca de frutos cítricos são ricos em flavonas e flavonas glicosiladas, enquanto que extratos resultantes de hidrólise contêm principalmente ácidos fenólicos e flavonóis. Nos trabalhos de Jeong et al. (2004) e Xu et al. (2007) foi descrito que o tratamento térmico na amostra pode contribuir para liberar alguns compostos fenólicos de baixo peso molecular e, portanto, aumentar a capacidade antioxidante dos extratos de casca de cítricos. Também foi observado que o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de casca de cítricos dependem do método de extração. Além disso, as condições da casca dos cítricos, a temperatura de extração, a concentração do solvente e a espécie da fruta influenciam no rendimento dos compostos fenólicos e do potencial antioxidante (MA et al., 2008).

A técnica de isolamento de flavonóides das plantas, incluindo o tipo de solvente, depende, geralmente, do tipo de compostos flavonóides e da quantidade disponível na planta. Solventes de menores polaridades são usados para a extração de agliconas, enquanto solventes de maior polaridade são usados para extrair flavonóides glicosilados. Os isoflavonóides são extraídos com uma mistura de água e metanol, etanol ou acetoneitrila (VELICKOVIC et al., 2007).

A eficiência medicinal de um extrato vegetal não depende apenas de um único componente bioativo, mas no efeito sinérgico entre um composto principal e outros compostos secundários. Dessa forma, para se obter um extrato com excelente atividade biológica, é

necessário considerar a qualidade do vegetal que será submetido à extração, o tipo de solvente utilizado e o procedimento de extração empregado (VINATORU et al., 1997).

3.6.2. Radicais livres

Existe uma grande variedade de técnicas disponíveis com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante de compostos e misturas complexas. Os métodos mais comuns para determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível envolvem um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio (EROS) e, com a presença de antioxidantes, ocorre o desaparecimento de cor destes radicais (ARNAO, 2000). O oxigênio está relacionado às condições de vida aeróbia e como molécula que mantém o metabolismo e viabilidade celular. É responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas existentes no sistema biológico. Do oxigênio disponível para a célula, 95 % se transforma em energia e 5 % em espécies de oxigênio reativas e tóxicas (DAVIES, 1994). Os radicais mais utilizados são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o hidroxil ($\cdot OH$), o óxido nítrico ($\cdot NO$), o alquilperoxil ($ROO\cdot$), o N,N-dimetil-p-fenilenodiamina ($DMDP^{\cdot+}$) e o 2,2-difenil-1-picrilidrazina ($DPPH^{\cdot}$) (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para determinação de compostos fenólicos total (SALUNKE; CHAVAN; KADAM, 1989). O ensaio de Folin-Ciocalteu é utilizado para medir o teor de compostos fenólicos total em produtos naturais, tendo como mecanismos a reação de oxirredução, sendo um dos melhores métodos para estimar a atividade antioxidante de amostras de alimentos (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Os radicais livres são responsabilizados como mediadores de várias doenças como diabetes, doenças vasculares, hipertensão, câncer, declínio do sistema imunológico, doenças neurodegenerativas, entre outras (TSAO; DENG, 2004). No corpo humano, os danos oxidativos causados pelos radicais livres no DNA, lipídios, proteínas e em outras moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de doenças degenerativas e câncer. Aproximadamente 90 % de todos os casos de câncer estão correlacionados com fatores ambientais e hábitos alimentares (ROGINSKY; LISSI, 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Em sistemas alimentícios, os radicais livres podem atacar ligações insaturadas de moléculas lipídicas, proteínas, carboidratos e nucleotídeos, causando o desenvolvimento de rancidez, *off-flavors*, e perda de valor nutritivo e de vida de prateleira dos produtos (LOULI RAGOISSIS; MAGOULAS, 2004).

Os flavonóides apresentam atividade antioxidante de diversas formas: atividades antiradical (-OH), antilipoperoxidação (R-, ROO-, RO-) e quelante de metais. Os flavonóides são potenciais antioxidantes contra a ação de radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio. A natureza química dos flavonóides depende da classe estrutural, grau de hidroxilação, substituição e conjugação e grau de polimerização (SENEVIRATHNE et al., 2009).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de seqüestro de radicais livres, tal como DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilidrazina) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. O radical livre formado a partir do ácido linoléico, pela retirada de um átomo de hidrogênio de um de seus grupos metileno, ataca as moléculas de β -caroteno, o qual perde uma ligação dupla, característica da coloração laranja. Este método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação (MATTHÄUS, 2002; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH \cdot de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

3.7. Atividade antimicrobiana

As bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, sendo necessário encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas que possam ser utilizadas no combate a esses microrganismos. Das 400.000 a 500.000 espécies de plantas existentes no mundo, somente um pequeno percentual é estudado em suas propriedades fitoquímicas e, menor ainda, é a parcela destinada à investigação da atividade antimicrobiana (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997; MICHIELIN, 2009).

Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1929, deu-se início às pesquisas com a finalidade de descobrir novas substâncias com atividade antimicrobiana, contra diversas bactérias, fungos e parasitas. Posteriormente, foi verificado que tanto os microrganismos como os vegetais seriam capazes de elaborar e produzir substâncias com potencial antimicrobiano, com capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos (LIMA, 2001; VALGAS, 2002).

O componente mais crítico dessa definição é a *seletividade* ou a *toxicidade seletiva*, significando que o composto deve inibir ou matar o microrganismo sem inibir ou matar o organismo hospedeiro. Os agentes antimicrobianos podem ser classificados segundo a sua origem (naturais, sintéticos ou semi-sintéticos), o seu efeito antimicrobiano (bacteriostáticos ou bactericidas), o seu espectro de atividade (amplo, intermediário e reduzido) e o seu mecanismo de ação (inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade celular, inibição da síntese protéica ou inibição da síntese de DNA ou RNA), sendo comum a classificação dos antimicrobianos pela estrutura química (LIMA, 2001; VALGAS, 2002; JOHANN, 2003).

Embora os antibióticos de origem microbiana sejam utilizados desde os anos de 1940, o uso de antimicrobianos derivados de plantas ainda é uma metodologia nova (COWAN, 1999; LIMA, 2001). A atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais pode ser determinada através de várias metodologias disponíveis na literatura. Os diferentes métodos possuem sensibilidades distintas e, desta forma, os resultados passam a ser influenciados pelo método selecionado, pelos microrganismos utilizados e pelas características de solubilidade dos extratos. Para os testes de atividade antimicrobiana devem ser utilizadas

cepas provenientes de coleções de cultura, como o ATCC (*American Type Culture Collection*), para que seja possível a comparação com outras pesquisas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

O método de difusão em ágar é um método qualitativo, amplamente utilizado na seleção dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Através deste método verifica-se a capacidade do extrato de inibir ou não o crescimento do microrganismo de interesse. As vantagens deste método são a pequena quantidade de amostra utilizada e a utilização de uma placa de *Petri* para testar até cinco extratos diferentes (VIEIRA, 2005).

Os extratos que apresentam atividade contra os microrganismos no método de difusão em ágar são, em geral, submetidos a testes quantitativos de atividade antimicrobiana. A concentração mínima inibitória (CMI) consiste na concentração mínima da substância testada capaz de inibir o crescimento do microrganismo de interesse. A CMI pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo de cultivo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo (SMÂNIA, 2003).

A técnica de microdiluição em caldo de cultivo é a mais empregada e utiliza diferentes concentrações do extrato em placas de microdiluição contendo uma suspensão padronizada do microrganismo a ser testado. A partir das diluições do extrato, que não apresentam crescimento, pode-se repicar para placa de ágar e verificar a concentração mínima bactericida (CMB) que é a concentração de extrato que inibe o crescimento e inativa o microrganismo (VIEIRA, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados e descritos o material e os métodos utilizados para a determinação dos parâmetros de processo da operação de extração supercrítica do extrato de bagaço de laranja, bem como as análises realizadas a fim de validar as condições de extração estudadas. Foram realizados testes preliminares para estabelecer as condições de operação e determinação do rendimento global de extrato (X_0).

Para o estudo da cinética do processo de extração foi obtida uma curva de extração do extrato de bagaço de laranja, que juntamente com o resultado de X_0 , fornece os parâmetros de processo necessários para a aplicação de modelos matemáticos de transferência de massa.

Com o objetivo de comparar as técnicas de extração, foram realizadas operações de extração com solventes orgânicos do bagaço de laranja para verificar a influência do método no rendimento, na composição química e na atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos.

Para a caracterização dos extratos foram desenvolvidas análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) nos diferentes extratos obtidos por diferentes técnicas, tanto extração supercrítica quanto extração com solventes orgânicos, com a finalidade de identificar e quantificar os compostos presentes nas diferentes frações do extrato de bagaço de laranja.

Neste trabalho, foi feita a comparação, em termos de atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e composição em CG-EM, entre os extratos obtidos a partir do bagaço da laranja, com um óleo comercial de laranja obtido por prensagem a frio.

Também, foram realizadas análises de caracterização da matéria-prima (bagaço de laranja) como teor de umidade e de substâncias voláteis, resíduo mineral fixo (cinzas), determinação de fibras e proteínas e avaliação do diâmetro médio de partícula.

Com exceção das análises de resíduo mineral fixo (cinzas), determinação de fibras e proteínas, atividade antimicrobiana e perfil químico dos extratos, todos os experimentos anteriormente citados foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica - LATESC, do Departamento de Engenharia Química e

Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - EQA/UFSC.

4.1. Obtenção da matéria-prima

O resíduo do processamento do suco de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) da variedade *Valência*, denominado bagaço de laranja, foi fornecido pela empresa *Macrovida Alimentos Ltda.*, localizada no município de Braço do Norte/SC. O resíduo composto de casca, pedaços de membranas e bagaço da polpa, vesículas de suco e sementes foi coletado na empresa durante o processamento do suco, acondicionado em recipientes plásticos com tampa, de aproximadamente 20,0 kg, e mantidos sob refrigeração na empresa, até o momento da entrega no LATESC. A matéria-prima foi coletada em dois dias de produção diferentes, Outubro/2008 (Lote 1) e Janeiro/2009 (Lote 2), sendo estes misturados com a finalidade de obter uma amostragem representativa e que abrangesse a composição média do resíduo de processo de suco de laranja, uma vez que ocorrem variações na composição dos frutos colhidos em função da época do ano e da região de plantio. Quando recebida no LATESC, a matéria-prima foi separada e acondicionada em embalagens de polietileno, contendo aproximadamente 1,0 kg, e mantida congelada em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a -18 °C até o momento do pré-tratamento.

A Figura 12 mostra um fluxograma do processamento de laranjas e o ponto de coleta da matéria-prima. Após passar pela limpeza e higienização (1) as frutas são encaminhadas para câmaras refrigeradas (2), ficando armazenadas até serem encaminhadas para as extratoras de suco (3). Neste ponto, o bagaço de laranja é coletado, o suco extraído é encaminhado para a pasteurização (4) e envase (5), sendo armazenado em câmaras refrigeradas (6) até a distribuição.

4.1.1. Determinação do teor de umidade e de substâncias voláteis da matéria-prima *in natura*

A determinação do teor de umidade e substâncias voláteis presentes na matéria-prima (bagaço de laranja), antes do seu pré-tratamento (ver item 4.2), foi realizada pelo método 925.09 da AOAC (2005), cujo procedimento fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis quando a amostra é submetida a 105°C.

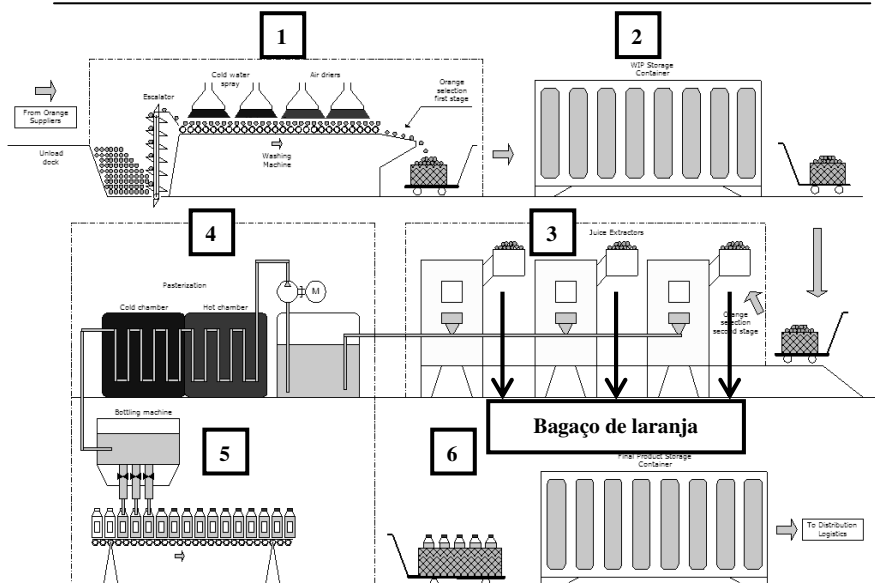


Figura 12: Fluxograma do processamento de laranjas da *Macrovida Alimentos Ltda.*

Fonte: MACROVITA, 2008.

Brevemente, cápsulas de alumínio foram previamente aquecidas em estufa (E.L. 003, Odontobrás, Ribeirão Preto/SP, Brasil) a 105°C por 1 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Após, cerca de 5 g de amostra foram pesadas em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, nas cápsulas de alumínio (previamente taradas), aquecidas em estufa a 105°C por 3 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi utilizada a Equação 2.

$$\text{Teor de umidade e voláteis (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

onde m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa final da amostra (g).

A determinação de umidade e substâncias voláteis do bagaço de laranja foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

A Figura 13 apresenta a matéria-prima proveniente do processamento da laranja fornecido pela *Macrovida Alimentos Ltda.* e a redução granulométrica, realizada com auxílio de faca, para a determinação do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima *in natura*.

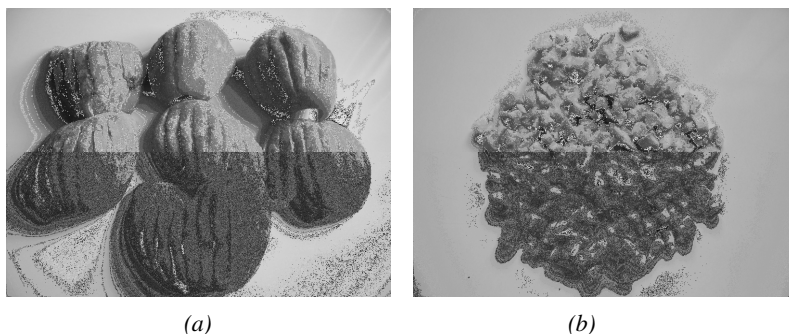


Figura 13: (a) Bagaço de laranja e (b) amostra preparada para determinação do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima *in natura*.

4.2. Pré-tratamento da matéria-prima

Os dois lotes de bagaço de laranja recebidos, previamente misturados, foram cortados em tiras com o auxílio de uma faca e submetidos à secagem em estufa com circulação de ar (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) por 24 horas a 30°C.

Após a secagem, a matéria-prima foi triturada em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) e submetida à separação e classificação granulométrica em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras/SP, Brasil), com a finalidade de fracionar a matéria-prima em diferentes tamanhos de partícula e determinar o diâmetro médio das partículas. Pesaram-se cerca de 100 g de amostra em balança semi-analítica (BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão de duas casas decimais de grama, para cada batelada e, utilizando as peneiras da série

Tyler de *mesh* 20, 25, 32, 48, 65, 80 e fundo, o conjunto foi agitado por 30 minutos.

Para a realização dos experimentos, utilizou-se a fração da matéria-prima compreendida entre as peneiras de tamanho -20/+48 *mesh* por ser o grupo de peneiras com maior quantidade de amostra retida. As outras frações foram desprezadas, com exceção da fração +20 *mesh*, que foi reprocessada no moinho e reclassificada granulometricamente. A Figura 14 mostra as etapas do processamento da matéria-prima.

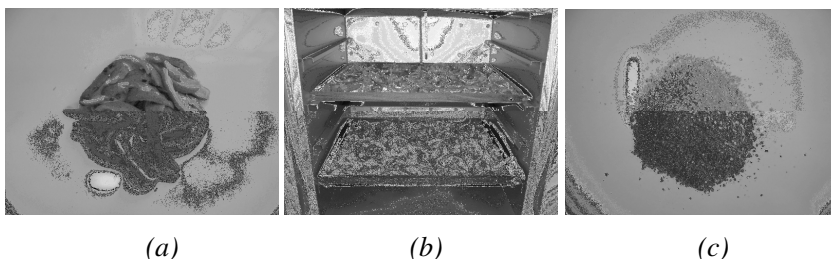


Figura 14: (a) Corte em tiras do bagaço da laranja, (b) secagem em estufa de circulação de ar e (c) amostra triturada em moinho de facas.

Após a separação granulométrica, a matéria-prima foi acondicionada em embalagens plásticas identificadas, e mantida congelada, em *freezer* doméstico (*Freezer* 250, Brastemp, São Paulo/SP), à -18°C até a realização dos experimentos.

4.3. Caracterização da matéria-prima

4.3.1. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis

A determinação do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima, após receber o pré-tratamento, foi realizada pelo método 925.09 da AOAC (2005), conforme descrito no item 4.1.1.

4.3.2. Determinação do resíduo mineral fixo (cinzas)

A determinação do resíduo mineral fixo foi realizada no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos - PROFI, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da

UFSC, em mufla (EDG Equipamentos e Controles Ltda., São Carlos/SP, Brasil) a 550 °C, de acordo com o método 923.03 da AOAC (2005), durante 6h ou até que fossem obtidas cinzas brancas ou branco cinzentas. Cápsulas de porcelana foram previamente aquecidas em estufa a 550 °C por 1 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Na seqüência, cerca 5 g de amostra foram pesadas em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, dispostas nas cápsulas de porcelana, previamente taradas, depois carbonizadas completamente em bico de *Bunsen* e incineradas em mufla a 550 °C por 6 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Estas operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até que se obtivesse peso constante. Para o cálculo de cinzas, foi empregada a Equação 3.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_c}{m_i} \cdot 100 \quad (3)$$

onde m_c é a massa final de cinzas (g) e m_i é massa inicial de amostra (g).

A determinação de cinzas da matéria-prima foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.3.3. Determinação do teor de nitrogênio total

A avaliação do teor de nitrogênio total das amostras foi realizada no Laboratório de Análises - LABCAL, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, através da determinação do nitrogênio total pelo método de *Kjedahl*, descrito pela metodologia 991.20 da AOAC (2005).

De forma geral, o método é constituído de três etapas, onde na primeira delas a amostra passa por um processo de digestão com ácido sulfúrico concentrado para a conversão dos compostos orgânicos. Posteriormente, a amônia é separada por destilação e recolhida em uma solução de ácido bórico e, em seguida, é realizada a titulação da solução com ácido clorídrico para a determinação quantitativa da amônia, utilizando-se fator de conversão 5,75. Os resultados foram expressos como g de nitrogênio total /100 g de amostra.

4.3.4. Determinação do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel

A determinação do teor fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel foi realizado no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Cereais - CERES, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, pelo método 991.43 da AOAC (2005).

Esta metodologia é baseada na combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos, onde a amostra é submetida à digestão seqüencial com as enzimas termoestáveis α -amilase, protease e amiloglicosidase. A fibra dietética insolúvel (IDF - *Insoluble Dietary Fiber*) é filtrada e o resíduo é lavado com água destilada morna. O filtrado e a água utilizada na lavagem são adicionados de etanol para a precipitação da fibra dietética solúvel (SDF - *Soluble Dietary Fiber*). O precipitado é então filtrado e seco. Ambos os resíduos (IDF e SDF) são corrigidos descontando-se o valor de proteínas, cinzas e branco para o cálculo final de IDF e SDF. Para a determinação da fibra dietética total (TDF - *Total Dietary Fiber*) é realizado um experimento adicional, onde ocorre precipitação da fibra com etanol e a filtração do resíduo, sendo este seco e pesado, e o valor corrigido com os valores de teor de cinzas e proteínas.

O resultado foi expresso em g de fibras dietética total, solúvel e insolúvel/100 g de amostra.

4.4. Caracterização do leito de partículas da ESC

4.4.1. Determinação do diâmetro médio de partícula

A determinação do diâmetro médio de partícula foi efetuada através do cálculo proposto por Gomide et al. (1983). Pesaram-se 100 g de amostra em balança semi-analítica (BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão de duas casas decimais de grama, para cada batelada e, utilizando as peneiras da série *Tyler* de *mesh* -20/+48 o conjunto foi agitado por 30 minutos. Após, as massas retidas sobre cada peneira foram pesadas para o cálculo do diâmetro médio de partícula, conforme as Equações 4 e 5.

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta \ell_i}{\bar{d}_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta \ell_i}{\bar{d}_i^3}}} \quad (4)$$

$$\Delta \ell_i = \frac{m_i}{M} \quad (5)$$

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

4.4.2. Determinação da massa específica aparente (ρ_a)

A massa específica aparente (ρ_a) das partículas de bagaço de laranja foi obtida através da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações pelo volume do leito, incluindo assim apenas os poros do leito e não os poros do interior das partículas.

A massa de amostra foi medida em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e o volume determinado através das medidas de altura e diâmetro do extrator com o uso de um paquímetro, com precisão de 0,02 mm.

4.4.3. Determinação da massa específica real (ρ_r)

A massa específica real (ρ_r) das partículas de bagaço de laranja foi assumida como sendo igual a 1,514 g/cm³ para o cálculo da porosidade do leito, conforme o descrito por Santana e Gasparetto (2009).

4.4.4. Porosidade do leito (ε)

A porosidade do leito (ε) de extração foi determinada através da massa específica real e aparente da amostra de bagaço de laranja, incluindo os poros do leito e do interior das partículas. Para formar o leito fixo de partículas foram utilizadas cerca de 15 g de amostra seca e

moída (-20/+48 *mesh*), pesada em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e a porosidade foi calculada através da Equação 6.

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

onde ρ_r é a densidade real das partículas e ρ_a é a densidade aparente do leite em (kg/m^3).

4.5. Determinação da massa específica do solvente supercrítico (ρ)

A massa específica do CO_2 supercrítico (ρ) nas condições de operação foi determinada através da equação de Angus, Armstrong e De Reuck (1976). Estes valores são utilizados na avaliação da influência da pressão e da temperatura na variação da massa específica do solvente e, conseqüentemente, na solubilização do soluto, e na aplicação do modelo de transferência de massa descrito por Sovová (1994).

4.6. Extração supercrítica (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no LATESC, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, onde se encontra disponível uma unidade de experimentação que opera até uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,67 g/min a 36,67 g/min.

Os experimentos de extração supercrítica realizados visaram determinar as condições de temperatura, pressão e adição de co-solvente nas quais o maior rendimento global e os melhores parâmetros de qualidade pudessem ser obtidos. As condições operacionais utilizadas na ESC do extrato de bagaço de laranja foram selecionadas de forma que abrangessem uma ampla faixa de condições de massa específica de solvente, buscando evitar a degradação de compostos termossensíveis, como ocorre na hidrodestilação e extração em Soxhlet, levando em consideração os limites de operação do equipamento utilizado.

A unidade de extração supercrítica foi empregada para a determinação do rendimento global de extração (X_0) com CO_2 puro e com co-solvente, para a obtenção da curva de extração necessária para a

modelagem matemática e para o estudo das condições ótimas de operação para a obtenção de extratos de bagaço de laranja ricos nos compostos de interesse.

Os experimentos de cinética (curva de extração) e de determinação de X_0 foram realizados através do método dinâmico de extração. O método dinâmico de ESC caracteriza-se pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999). A partir deste método pode-se determinar X_0 , definido como a quantidade percentual de soluto extraível do material sólido para determinadas condições de processo como temperatura, pressão, vazão do solvente, tempo e quantidade de matéria-prima utilizada na extração. Ainda, podem ser obtidas as curvas de extração que são utilizadas para definir parâmetros de extração como as condições operacionais, a quantidade de matéria-prima para a formação do leito de partículas e o tempo total de extração. Neste caso, o extrato é coletado em diferentes frascos por períodos pré-determinados do processo de ESC.

Os experimentos de rendimento global foram efetuados em duplicata e os extratos obtidos nestas operações foram empregados para as análises de atividade biológica e atividade antimicrobiana, bem como na determinação do perfil químico dos referidos extratos.

4.6.1. Equipamento de extração supercrítica

As Figuras 15 e 16 apresentam o equipamento de extração supercrítica utilizado e o esquema de funcionamento, respectivamente.

A unidade de extração supercrítica (ZETZL; LOZANO; BRUNNER, 2007), apresentada na Figura 15, foi desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha.

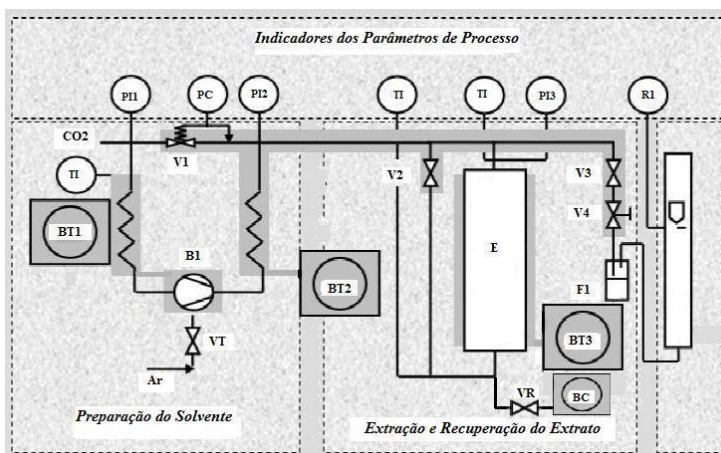
Conforme o esquema apresentado na Figura 16, a unidade supercrítica consiste de um cilindro de CO_2 com tubo pescador e 99,9 % de pureza (White Martins Ltda., Joinville/SC, Brasil), que alimenta diretamente a linha de extração. A linha de solvente é imersa em um banho termostático (BT1) (C10 - K10, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o solvente (CO_2) esteja no estado líquido antes de



Figura 15: Equipamento de extração supercrítica.

sua entrada na bomba (B1) (M111, Maximator, Niedersachsen, Alemanha). A bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido, filtrado e mantido na pressão mínima de 5 bar. A pressão de operação desejada da unidade supercrítica é regulada através da válvula globo (V1) (Tescom Cat nº 26-1761-24-161, Alemanha). Durante o funcionamento, a bomba encaminha o CO₂ pressurizado (a uma pressão pré-estabelecida em V1) à linha de extração, passando pelo extrator (E), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 32,9 cm de comprimento, 2,042 cm de diâmetro interno e volume de 100 mL, com extremidades rosqueadas. A linha que liga a bomba ao extrator, bem como a linha após o extrator, é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (BT2) (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e da válvula micrométrica durante a despressurização da mistura soluto/solvente (V4) (Sitec Microvalve 710.3012, Zúrique, Alemanha). A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (BT3) (DC30-B30, Thermo

Haake, Alemanha). No início do processo de extração a válvula (V2) (Cat n° 3710.0104, Maximator) é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A válvula (V3) (Shutoff valve 710.3010, Sitec, Zurique, Alemanha) também conectada na saída do extrator auxilia a V4 na despressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o soluto é conectado em frascos âmbar (F1) e o fluxo de CO₂ é medido no rotômetro (R1) (10A61ABB, Automation Products), regulado por V3 e V4.



E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas de entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); PI2: Manômetro de controle da bomba (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); PI3: Manômetro de controle do extrator (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); TI: Controladores de temperatura; BC: Bomba de co-solvente; VR: Válvula de retenção da bomba de co-solvente.

Figura 16: Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.

Fonte: ZETZL et al., 2003 apud KITZBERGER, 2005.

4.6.2. Experimentos cinéticos – Curvas de extração e parâmetros cinéticos

Os experimentos cinéticos para a obtenção da curva de extração de bagaço de laranja consistiram na determinação da massa de extrato

acumulado em função do tempo de extração. Estes experimentos foram realizados no equipamento descrito em 4.6.1, utilizando para a determinação da curva de extração cerca de 15 g de bagaço de laranja, pesada em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama. Esta massa de matéria-prima foi empregada para formar um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com esta relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial pode ser desprezada. Os frascos de coleta foram previamente pesados em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados, sendo o extrato pesado de forma a determinar a massa de extrato obtida em função do tempo de experimento. Após a coleta, os frascos foram novamente pesados para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração.

As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa de CO₂ consumido, ou ainda pelo rendimento de extração *versus* a razão massa de solvente por massa de amostra (MICHIELIN et al., 2005; KITZBERGER et al., 2009; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009). Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro na condição de pressão de 200 bar; temperatura de 40 °C, vazão de solvente de 17 ± 2 g/min e diâmetro de partícula de bagaço de laranja de -20/+48 *mesh*. Os valores experimentais de massa de extrato *versus* tempo de extração obtidos na curva da ESC bagaço de laranja são apresentados na Tabela 23 (Apêndice II).

Os parâmetros cinéticos foram considerados para avaliar a cinética das extrações e calculados conforme Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009). Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir da curva de extração, apresentado em 5.1.2. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente. A taxa de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com auxílio de planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} .

4.6.3. Determinação do rendimento global de extrato (X_0)

O valor de X_0 é definido como a quantidade de soluto extraível presente na matriz sólida (bagaço de laranja) referente a uma dada temperatura e pressão de extração. A verificação da influência da pressão e da temperatura no rendimento global da ESC foi avaliada utilizando-se como condições de operação as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar, temperaturas de 40 °C e 50 °C e vazão fixa de solvente (17 ± 2 g/min).

O tempo de extração foi definido (ensaio preliminar) através da observação da curva de extração obtida com 200 bar, 40 °C e vazão de solvente de 17 ± 2 g/min, conforme explicado no item 5.1.2, sendo fixado em 5 horas o tempo total de extração, totalizando um consumo de 5,0 kg de CO₂. Como pode ser observado na Figura 17 (ver seção 5.1.2), após 5 horas, a curva de extração se encontra na etapa de taxa decrescente de extração (FER).

A Tabela 8 apresenta o plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global.

Tabela 8: Plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global (X_0).

Variáveis	Níveis	
T (°C)	40	50
	100	100
	150	150
P (bar)	200	200
	250	250
	300	300

Cada experimento foi realizado em duplicata e organizado conforme a Tabela 8, com altura de leito constante ao utilizar-se cerca de 15 g de matéria-prima, fracionada nas peneiras -20/+48 *mesh*, pesada em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro.

A massa de extrato obtida nos frascos foi pesada em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e armazenada em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios de avaliação da qualidade dos extratos.

O valor de X_0 foi calculado através da razão entre a massa de extrato (m_{EXT}) obtida e a massa de bagaço de laranja (M) utilizada para formar o leite, conforme a Equação 7.

$$X_0 = \frac{m_{EXT}}{M} \cdot 100 \quad (7)$$

A determinação de rendimento global foi realizada em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.6.4. Emprego de co-solvente (CS)

A partir da melhor condição de rendimento obtida, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 13 (item 5.2), testou-se a aplicação de co-solvente adicionado ao solvente (CO_2), em quantidade definida em relação à massa total de CO_2 empregada na extração supercrítica. Para a adição de co-solvente junto à extração supercrítica, uma bomba de co-solvente (BC) (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) foi acoplada ao equipamento de extração supercrítica. Após a bomba de co-solvente foi colocada uma válvula de retenção (VR) para evitar que o solvente orgânico retornasse para BC se houvesse um aumento na pressão da bomba de CO_2 durante o experimento. A bomba de co-solvente trabalha numa faixa de vazão de 0,1 a 10 mL/min. Utilizou-se como co-solvente o álcool etílico (P.A.) (Merck S.A., Brasil) em concentrações de 2, 5 e 8 % (m/m). Este solvente foi selecionado com base nos resultados de rendimento das extrações em Soxhlet e ultrassom (item 5.2), e em dados da literatura que relatam o uso deste solvente como co-solvente (CASAS et al., 2007; SALGIN, 2007). Os experimentos com co-solvente foram realizados na condição de 250 bar, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, vazão de CO_2 de $17 \pm 2\text{ g/min}$ e 5 horas de extração, a fim de se avaliar a influência no rendimento da ESC provocada pela sua adição, em diferentes concentrações.

Os extratos obtidos ao final da extração foram submetidos à etapa de eliminação do solvente orgânico empregando-se o mesmo método utilizado nas extrações a baixa pressão (conforme item 4.8). As extrações com emprego de co-solvente foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.7. Extrações a baixa pressão

Os processos de extração a baixa pressão, como hidrodestilação e extração com solventes orgânicos, foram efetuados com o objetivo de comparar com a extração supercrítica os resultados obtidos em termos de rendimento, atividade biológica e atividade antimicrobiana dos extratos de bagaço de laranja. Estas extrações foram realizadas, também, para a seleção do co-solvente a ser empregado na extração supercrítica.

4.7.1. Hidrodestilação

A hidrodestilação é uma operação de extração a baixa pressão realizada em circuito fechado utilizando o sistema de *Clevenger*, que apresenta mínima perda de voláteis. Neste sistema, a matriz vegetal é imersa em água, cujo aquecimento é feito até o ponto de ebulição da água, provocando a formação de vapor que arrasta os compostos voláteis. Após a condensação, estes compostos separam-se da água por decantação (SANTOS et al., 2004).

A hidrodestilação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Santos et al. (2004), utilizando-se 50 g de bagaço de laranja seco, pesado em balança semi-analítica (BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão de duas casas decimais de grama, triturado e separado granulometricamente na fração de -20/+48 *mesh*. A amostra foi colocada em um balão de destilação de 2 L, imersa em 700 mL de água destilada. No setor de recuperação do óleo foram adicionados 2 mL de hexano (Merck S.A., Brasil) para dissolver o óleo e facilitar a sua separação da água condensada. O balão de destilação foi aquecido em manta elétrica (Mod. 102, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) e mantido em ebulição por 6 horas, apresentando também um sistema de arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) para condensar o soluto extraído e os vapores de água. Os extratos obtidos passaram pela etapa posterior de eliminação do solvente (hexano), sendo

o extrato obtido caracterizado como óleo essencial volátil. As extrações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão e os extratos obtidos foram mantidos em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a -18°C .

4.7.2. Extração em Soxhlet

A extração em Soxhlet foi realizada de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando-se nesta técnica, para a obtenção do extrato de bagaço de laranja, os seguintes solventes: hexano (Merck S.A., Brasil), diclorometano (Merck S.A., Brasil), acetato de etila (Merck S.A., Brasil), etanol (Merck S.A., Brasil) e água destilada, trocados a cada extração. A Tabela 9 apresenta os valores de polaridade dos solventes empregados.

Tabela 9: Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em Soxhlet.

Solvente	Índice de polaridade
Hexano	0
Diclorometano	3,1
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2
Água	9,0

Fonte: BYERS, 2009.

Para cada extração, cerca de 5 g de amostra foram pesadas em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e acondicionadas em um cartucho de papel-filtro, o qual foi inserido no extrator Soxhlet. O sistema Soxhlet consiste de um extrator de 150 mL que é acoplado na extremidade inferior a um balão de 250 mL e na extremidade superior a um condensador, arrefecido por um banho (MQBMP-01, Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil). Foram adicionados 150 mL de solvente no balão, sendo este aquecido por uma manta de aquecimento (Mod. 52 - Classe 300, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) na temperatura de ebulição do solvente utilizado. Em todas as extrações com Soxhlet manteve-se a proporção amostra-solvente igual à 1:30, utilizando-se novo solvente a cada procedimento. Com a evaporação do

solvente, este entra no condensador e volta à forma líquida, entrando em contato com a amostra e ocorrendo a extração dos compostos solúveis. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido continuamente durante 6 horas de extração.

Os extratos obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (conforme item 4.8) e armazenados em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a -18°C . As extrações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.7.3. Extração com ultrassom

A extração com ultrassom consiste em utilizar solventes, em temperatura ambiente, para a extração de compostos mediante o uso de ondas de ultrassom. A extração pelo uso de ultrassom foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jacques (2005) e Vinatoru (2001), onde 7 g de amostra, pesada em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, foi adicionada de 210 mL de solvente em balão de 250 mL, mantendo-se a proporção amostra-solvente igual à utilizada na extração em Soxhlet (1:30). Os solventes utilizados foram os mesmos empregados na extração com Soxhlet (seção 4.7.2). O balão foi conectado a um condensador de bolas conectado a um banho refrigerado (MQBMP-01, Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil), de acordo com o trabalho de Freitas (2007), e submetido ao tratamento em banho indireto em ultrassom com o uso de uma lavadora ultrassônica (USC-700/55 kHz, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba/SP, Brasil) pelo tempo de extração de 1 hora. Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (DVR 1400, Dosivac, Buenos Aires, Argentina) em funil de Büchner com papel-filtro, sendo o filtrado recolhido em *Kitasato*.

Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (conforme item 4.8) e armazenados em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a -18°C . As extrações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.8. Tratamento dos extratos e eliminação do solvente

Os extratos obtidos através das extrações a baixa pressão (hidrodestilação, Soxhlet e ultrassom) e supercrítica adicionada de co-solvente passaram pela fase de evaporação do solvente em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a fim de eliminar o solvente contido na amostra. As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes utilizados, para evitar alterações do extrato devido à aplicação de calor, e o vácuo ajustado em 650 mmHg.

4.9. Óleo comercial

Para efeito comparativo, utilizou-se um óleo comercial obtido por prensagem a frio nas análises de avaliação da atividade antioxidante, avaliação da atividade antimicrobiana e perfil químico fracionado. O óleo comercial utilizado foi o óleo natural de laranja doce (88-454-01-4/Lote:09036937, Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul/SC, Brasil). A especificação técnica do produto encontra-se no Anexo II.

4.10. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante, realizada pelas metodologias a seguir descritas, foi utilizada para avaliar a qualidade dos extratos obtidos pelas extrações a baixa pressão e extração supercrítica, bem como comparar os resultados obtidos com o BHT (composto sintético de reconhecida atividade antioxidante) e o óleo comercial. Devido ao acúmulo de extrato formado na tubulação do equipamento de ESC, observado durante os ensaios, realizou-se a coleta deste com etanol (Merck S.A., Brasil), em grau analítico, e posterior evaporação, com a finalidade comparar sua atividade antioxidante com os demais ensaios realizados. A condição de ESC selecionada foi de 250 bar e 50 °C, sendo este extrato também avaliado quanto à atividade antimicrobiana (ver item 4.11) e composição química (ver item 4.12).

4.10.1. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT)

A determinação do teor de compostos fenólicos total presente nos extratos de bagaço de laranja foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006). A reação com o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstícos e fosfomolibdídicos, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorvância na faixa visível do espectro a 765 nm.

Para análise dos resultados é necessário preparar uma curva padrão de ácido gálico, com o objetivo de representar a absorvância da amostra frente à concentração da curva padrão. Desta forma, dissolve-se cerca de 5,0 g de ácido gálico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. Ltda., Brasil), pesados em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, em H₂O destilada de modo a obter uma solução de concentração 5g/L (50 ppm) de ácido gálico. A partir desta solução estoque, são diluídas alíquotas em balões volumétricos de 100 mL para a obtenção de soluções de concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferido para estes 10 µL de cada uma das diluições, aos quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA). Após 30 segundos e antes de 8 minutos após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Nuclear, CAQ Ind. e Com. Ltda., Brasil) a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 2 horas para que a reação ocorresse. A absorvância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (8500II-UV/VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong) e o branco realizado com todos os reagentes, substituindo-se a amostra por água destilada. A curva padrão de ácido gálico é apresentada através do gráfico de absorvância (ABS) versus concentração de ácido gálico (mg/L), no Apêndice III.

Cada um dos extratos testados foi diluído em etanol P.A. (Merck S.A., Brasil) na concentração final de 1.667 mg/L, seguindo-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva

padrão. O branco foi realizado com todos os reagentes, substituindo-se a amostra por água destilada. Os valores de absorvância obtidos para cada um dos extratos foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico e o teor de compostos fenólicos total (TFT) foi determinado através da Equação 8. A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em mg EAG/g de extrato, como média \pm desvio padrão.

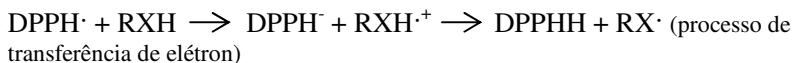
$$TFT (mg \text{ EAG/g}_{EXT}) = \left\{ \frac{[EAG \cdot 1000]}{D_{EXT}} \right\} \quad (8)$$

onde *EAG*: Equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg EAG/L), *D*: diluição das amostras (mg_{EXT}/L).

4.10.2. Método DPPH

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Este processo pode ocorrer de duas maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron:



No processo direto o antioxidante (RXH) doa um radical hidrogênio para o radical DPPH \cdot tornando-o estável. O radical RX \cdot é relativamente estável e não reage com os lipídios. No processo de transferência de elétron, primeiramente um elétron é cedido para o radical DPPH \cdot pela molécula do antioxidante e, em seguida, é cedido o hidrogênio estabilizando o radical DPPH \cdot e formando o radical estável RX \cdot .

A metodologia descrita por Mensor et al. (2001) constitui na reação por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, do

composto em análise em uma solução etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 0,3 mmol/L e com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL) do extratos de bagaço de laranja (obtidos neste trabalho), em etanol P.A. (Merck S.A., Brasil), com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (8500II-UV/VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong). Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH pode ser calculado convertendo-se a absorbância em percentual de atividade antioxidante (AA %), conforme a Equação 9.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{AMOSTRA} - Abs_{BRANCO}) \cdot 100}{Abs_{CONTROLE}} \right] \quad (9)$$

A concentração das amostras necessárias para captar 50% do radical livre DPPH (EC_{50} - *Effective concentration*) é calculada por análise de regressão exponencial e linear (MENSOR et al., 2001). Os valores de atividade antioxidante calculados (EC_{50}) são referentes à maior concentração de extrato testado (500 mg/mL). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC_{50}) e atividade antioxidante (AA %) para os extratos analisados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.10.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico

O método de determinação da atividade antioxidante pela descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico é fundamentado em medidas espectrofotométricas da perda de coloração (oxidação) do β -caroteno induzida por produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. A metodologia utilizada é descrita por Matthäus (2002) e Kang et al. (2006), na qual o sistema formado por β -caroteno e ácido linoléico é induzido a uma rápida descoloração na ausência de um composto antioxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoléico e por um átomo de hidrogênio retirado de um dos grupos metila da molécula de β -caroteno. A taxa de descoloração da solução de β -

caroteno é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm e após 120 minutos.

A metodologia consiste, inicialmente, na preparação de duas emulsões, uma com adição de β -caroteno e outra sem (branco). Para a emulsão de β -caroteno, foi transferido para um balão de 250 mL, 40 mg de ácido linoléico (Vetec Química Fina Ltda., RJ, Brasil), 400 mg de Tween-20 (Vetec Química Fina Ltda., RJ, Brasil) e 3,4 mg de β -caroteno (Fluka Analytical, USA). A este balão adicionou-se 1 mL de clorofórmio (Merck S.A., Brasil) e agitou-se até a completa solubilização das partículas de β -caroteno. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a 40 °C e à mistura foram adicionados 100 mL de água destilada, sendo manualmente agitada para formar uma solução estável. A emulsão de branco foi preparada com 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween-20 e 100 mL de água destilada, sendo também agitada manualmente. As duas emulsões foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até a realização das análises.

Uma alíquota de 5 mL da solução de β -caroteno foi adicionada à 200 μ L do extrato, sendo que cada um dos extratos a ser testado foi diluído em etanol P.A. (Merck S.A., Brasil) na concentração final de 1.667 mg/L. Imediatamente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (8500II-UV/VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong) em comprimento de onda de 470 nm com respectivas soluções de branco, constituídas de 5 mL emulsão de branco e 200 μ L do extrato. Os tubos foram imediatamente imersos em banho termostatzado (Biomatic Aparelhos Científicos Ltda., Porto Alegre/RS, Brasil) a 50 °C durante 2 horas de reação, realizando-se leituras nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Em paralelo, foi realizado também o controle do teste, onde a amostra foi substituída por etanol. Os resultados de atividade antioxidante (AA %) foram calculados pela Equação 10 e expressos como média \pm desvio padrão.

$$AA\% = I - \left\{ \left[\frac{(Abs_{t:120} - Abs_{t:0})}{(Abs_{Controle:t:120} - Abs_{Controle:t:0})} \right] \cdot 100 \right\} \quad (10)$$

4.11. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.11.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

As análises de determinação da concentração mínima inibitória foram realizadas no Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Biotecnologia da UFSC. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por Ávila et al. (2008). Os extratos testados (5 mg) foram dissolvidos em 250 μ L de DMSO a 25%, previamente esterilizado em autoclave. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas desses, no mesmo solvente, as quais foram distribuídas (10 μ L), em orifícios distintos, de uma placa de microdiluição de 96 poços. Em cada orifício-teste ainda foi adicionado 85 μ L de caldo de Mueller-Hinton. Como controles de crescimento e esterilidade foram usados apenas as misturas do meio de cultura e DMSO sem a adição de extrato. Nos orifícios-teste e de controle de crescimento foram adicionados 5 μ L de inóculo bacteriano, o qual consistiu de uma suspensão contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL de *Escherichia coli* (ATCC 25922) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As concentrações finais dos extratos variaram de 2.000 a 1,95 μ g/mL. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24 horas a 36 °C. A leitura dos experimentos foi realizada através de densidade óptica (DO), com uso de leitora de microplacas (CLX800, BioTek Instrumentos, Inc., EUA) e nos casos em que a turvação e/ou a coloração do extrato interferiram na leitura da DO, foi utilizada uma solução reveladora de crescimento bacteriano (cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium). A CMI foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano, sendo os resultados expressos em μ g/mL.

4.12. Determinação da composição química dos extratos

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos foi realizada no Departamento de Química Analítica, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Para a referida análise foi empregado um cromatógrafo CG-EM (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200L, Varian, Inc., CA, USA), coluna VF5-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m, Varian, Inc., CA, USA). Os

ensaios foram realizados empregando-se o modo de injeção por *split* a uma taxa de 1:20. A temperatura do injetor foi de 300 °C. O gás de arraste foi o hélio usado a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, mantendo por 1 minuto, aquecendo a uma taxa de 9 °C/min até 300 °C, mantendo por 20 minutos. Os compostos majoritários foram identificados usando uma base de dados para produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology/NIST - Mass-Spectral Library with Windows Search Program - Version 2*), onde os espectros de massa foram comparados.

4.13. Modelagem matemática

A modelagem da curva de dados experimentais de ESC foi realizada com o objetivo de avaliar a influência dos parâmetros de operação e da abordagem fenomenológica de cada modelo no ajuste às curvas experimentais de ESC de extrato de bagaço de laranja. A modelagem das curvas de extração (massa de extrato acumulada *versus* tempo de extração) foi realizada utilizando os modelos de Crank (1975), de Gaspar et al. (2003), de Sovová (1994), de Martínez et al. (2003), de Esquivel, Bernardo-Gil e King (1999) e de Goto, Sato e Hirose (1993), sendo aplicados através do *software* Mass Transfer, desenvolvido por Correia, Michielin e Ferreira (2006) no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica - LATESC/EQA-UFSC, que utiliza o método da máxima verossimilhança para minimizar a soma dos quadrados dos desvios calculados (KITZBERGER et al., 2009).

A aplicação de cada modelo exige uma série de parâmetros de processo que devem ser obtidos experimentalmente ou estimados. Todos os parâmetros foram medidos diretamente ou calculados a partir de dados experimentais, com exceção da densidade real das partículas do bagaço de laranja (ver item 4.4.3) e da solubilidade (ver item 4.13.1) do extrato de bagaço de laranja em CO₂ supercrítico, valores estes obtidos da literatura para matérias-primas semelhantes à estudada neste trabalho.

4.13.1. Determinação da solubilidade

Para a aplicação do modelo de transferência de massa de Sovová (1994), a solubilidade é um parâmetro termodinâmico essencial.

A solubilidade do extrato de bagaço de laranja em CO₂ supercrítico foi assumida como sendo igual a 3,6 mg/g de CO₂, calculada por Cardozo, Wolff e Meireles (1997). Estes autores se basearam na determinação experimental da solubilidade do óleo de laranja realizada por Santana (1996) na condição de 35°C e 70 bar e na composição química do óleo de laranja, determinada por Marques (1997) e Santana (1996).

4.14. Análise estatística

Os resultados de rendimento e de atividade antioxidante obtidos para os diferentes extratos de bagaço de laranja foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), com o auxílio do *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA). O plano de experimentos de ESC com CO₂ puro foi organizado com duas variáveis, temperatura (T) e pressão (P), nos níveis 40 e 50 °C e 100, 150, 200, 250 e 300 bar, com uma replicação. A ANOVA dos rendimentos obtidos através de ESC com diferentes concentrações de co-solvente foi realizada considerando estes como experimentos de fator único (concentração de co-solvente) com uma replicação. Para os rendimentos obtidos através das extrações a baixa pressão a ANOVA foi realizada considerando o tipo de extração como fator único. Se, segundo a ANOVA existe diferença significativa ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos (tipo ou condição de extração) pode-se dar continuidade à análise aplicando o teste de *Tukey* o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos. Sendo assim, o teste de *Tukey* foi aplicado para verificar quais tratamentos diferem entre si, através da avaliação de pares das médias dos rendimentos obtidos (MONTGOMERY, 2005).

4.15. Resumo dos ensaios

O Quadro 1 apresenta o resumo dos ensaios realizados para os extratos de bagaço de laranja obtidos, incluindo as diversas técnicas de extração empregadas, rendimento, análises de atividade biológica e de perfil químico, bem como as análises para o óleo comercial.

250/50/CO ₂	x	x	x	x	x	x		x
300/50/CO ₂	x	x	x	x	x	x		x
250/50/CO ₂ + 2 % EtOH	x	x	x	x	x	x		x
250/50/CO ₂ + 5 % EtOH	x	x	x	x	x	x		x
250/50/CO ₂ + 8 % EtOH	x	x	x	x	x	x		x
250/50/CO ₂ + EtOH (Recuperado)	x	x	x	x	x	x		x
Óleo comercial								
<i>Cold pressed oil</i>	x	x	x	x	x			x
Antioxidante comercial								
BHT		x	x	x	x			x

EtOH: etanol; EtOAc: acetato de etila; DCM: diclorometano; Hx: hexano; H₂O: água; BHT: butil-hidroxitolueno.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaios prévios

Os ensaios prévios foram realizados com a finalidade de caracterizar o bagaço de laranja utilizado como matéria-prima neste estudo, além de definir os parâmetros de processo da extração supercrítica como quantidade de amostra a ser utilizada para a formação do leito de extração, tempo de extração e vazão de solvente.

5.1.1. Caracterização da matéria-prima

A Tabela 10 apresenta os valores do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima *in natura*, do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima utilizada nas extrações (após secagem), do resíduo mineral fixo (cinzas), do teor de proteínas e do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel e carboidratos. Os dados apresentados na Tabela 10 foram obtidos a partir de ensaios em triplicata, com exceção dos resultados de teor de nitrogênio total e teor de fibra dietética total, solúvel e insolúvel, conforme descrito nos itens 4.3.3 e 4.3.4, e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

O bagaço de laranja, resíduo da indústria de cítricos, é normalmente empregado como complemento na alimentação animal devido a seu alto valor nutricional. Porém, este resíduo poderia ser melhor aproveitado na indústria de alimentos a partir do conhecimento de suas características físico-químicas, apresentadas na Tabela 10 que, apesar do baixo teor protéico, indica altos teores de fibras dietéticas.

Assim, o objetivo principal deste estudo foi a obtenção do extrato de bagaço de laranja mediante o emprego de diferentes técnicas. Após o processo de extração, a matriz vegetal, ainda rica em fibras dietéticas, pode ser utilizada como ingrediente funcional em alimentos. O resíduo da extração com CO₂ supercrítico apresenta ainda a vantagem de ser isento de solvente. Como exemplo, o trabalho desenvolvido por Fernández-López et al. (2004) investigou a inclusão de diferentes concentrações de fibras provenientes de frutos cítricos em produtos cárneos embutidos. O resultado mais expressivo foi observado na redução dos níveis de nitrito residual, provavelmente devido a reações

do nitrito com os biocompostos ativos presentes nas fibras e conseqüente diminuição da formação de nitrosaminas.

Tabela 10: Características físico-químicas da matéria-prima *in natura* e da matéria-prima utilizada nas extrações (em base seca).

Análise	Resultado (g/100 g)
Matéria-prima <i>in natura</i>	
Umidade	76,4 ± 0,1
Matéria-prima (após secagem)	
Umidade	27 ± 1
Cinzas	3,70 ± 0,02
Nitrogênio total*	0,79
Lipídios ⁽¹⁾	1,53 ± 0,06
Fibra dietética total*	52,23
Solúvel	11,33
Insolúvel	40,90
Carboidratos ⁽²⁾	41,47

*Análises realizadas no LABCAL (CCA-CAL/UFSC).

⁽¹⁾ Lipídios determinados por extração Soxhlet utilizando hexano como solvente, conforme o item 4.7.2.

⁽²⁾ Carboidratos determinados por diferença.

De acordo com Eastwood (1987) e Spiller (1986), o consumo de fibras deve ser balanceado, devendo a fração solúvel representar de 30 a 50 % do total de fibras dietéticas ingeridas. Pelos dados obtidos através da Tabela 10, o percentual de fibras solúveis do bagaço de laranja foi de aproximadamente 22 %, estando próximo ao recomendado pelos autores citados. Como benefícios do consumo de fibras dietéticas podem ser destacados o retardo na absorção de carboidratos e redução da concentração de triacilgliceróis no organismo, ambos compostos considerados como fatores de risco para doenças coronarianas (HALLFRISCH; SCHOLFIELD; BEHALL, 1995; RIVELLESE et al., 1980), além de reduzir a possibilidade de desenvolvimento de câncer de colo de útero (FUCHS et al., 1999; PLATZ et al., 1997).

O conteúdo de cinzas (3,70 ± 0,02 %, m/m) e de proteínas (0,79 %, m/m) encontrados neste trabalho diferentes dos valores relatados por Grohmann, Cameron e Buslig (1995) para laranjas cultivadas na Flórida (3,41 % para cinzas e 6,06 % para proteínas) e por Ma et al. (1993) (3,59 % (m/m) para cinzas e 5,25 % (m/m) para proteínas) em laranjas

cultivadas no México. Porém, o valor de proteínas está de acordo com os valores publicados pelo USDA (2009) e TACO (2006), sendo este igual a 0,8 % (m/m). As diferenças entre os valores encontrados neste trabalho com os apresentados na literatura podem estar relacionadas às diferenças de cultivar, local e época de cultivo e colheita (ABEROUMAND; DEOKULE, 2008).

O resultado encontrado para o teor de lipídios obtido por extração com hexano neste trabalho ($1,53 \pm 0,06$ %, m/m) foi próximo ao encontrado por Fernández-Lopéz et al. (2004) (1,95 %, m/m) e ambos são inferiores a 3,1 e 4,9 % (m/m) encontrados por Kesterson e Braddock (1976) e Braddock (1980), respectivamente. O limoneno é o principal composto encontrado no óleo, representando, aproximadamente, 95 % do conteúdo total de lipídios, de acordo com a Tabela 2, apresentada no item 3.3.2.

Além das características físico-químicas apresentadas, a caracterização das partículas utilizadas na formação do leite da ESC é de importância para a aplicação de modelos de transferência de massa descrito por Sovová (1994) e Goto, Sato e Hirose (1993). A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para o diâmetro médio de partícula, calculado de acordo com as Equações 4 e 5; a massa específica aparente e real do sólido, de acordo com os itens 4.4.2 e 4.4.3, respectivamente; e a porosidade do leite, calculada conforme a Equação 6.

Tabela 11: Caracterização da partícula e do leite de partículas formado para a extração com fluido supercrítico.

Diâmetro médio de partícula (mm)	Massa específica aparente ρ_a (g/cm ³)	Massa específica real ρ_r (g/cm ³) ⁽¹⁾	Porosidade do leite (ϵ)
$0,596 \pm 0,006$	$0,57 \pm 0,02$	1,514	0,624

⁽¹⁾ Santana e Gasparetto (2009).

Santana e Gasparetto (2009) determinaram a densidade real do albedo de laranja desidratado por picnometria com gás hélio e obtiveram um valor igual a $1,514$ g/cm³. Os autores submeteram o albedo à secagem, redução granulométrica e posterior classificação em agitador mecânico, utilizando para a determinação da massa específica real a fração de amostra retida nas peneiras de $-40/+50$ mesh (0,425 a 0,300

mm). Desta forma, neste trabalho optou-se em utilizar para o cálculo da porosidade do leito de partículas o valor de densidade real do albedo, obtido no estudo de Santana e Gasparetto (2009), devido à semelhança entre as matérias-primas, à metodologia empregada no pré-tratamento da mesma e ao tamanho de partícula empregada, conforme pode ser visto na Tabela 11.

5.1.2. Testes preliminares

Os testes preliminares foram realizados para serem definidas as condições de operação adequadas para a extração de óleo de bagaço de laranja com CO₂ supercrítico e extrações à baixa pressão. Os parâmetros de processo determinados nos ensaios preliminares foram: tamanho de partícula, massa de sólidos para formação do leito fixo de partículas e tempo de extração. Também foi avaliada a extração com amostra úmida e a amostra submetida à secagem, com a finalidade de verificar qual destas se apresentava mais adequada às extrações subseqüentes.

Inicialmente, foram realizados os testes com a amostra úmida e amostra seca, de mesma granulometria. Os rendimentos obtidos com a utilização da amostra seca para a extração com CO₂ supercrítico foram aproximadamente 124 % maiores do que com a amostra úmida, enquanto que para a extração com Soxhlet a diferença nos rendimentos foi 11 vezes maior. A partir destes resultados, selecionou-se a amostra submetida à secagem para os procedimentos de extração posteriores.

Após definida a condição da matéria-prima (seca ou úmida), realizou-se a determinação do diâmetro médio de partícula da fração da matéria-prima compreendida entre as peneiras de tamanho -20/+48 *mesh*, com base no rendimento da moagem da amostra, ou seja, por serem as peneiras que retiveram a maior quantidade de matéria-prima. O diâmetro médio de partícula foi calculado de acordo com as Equações 4 e 5, resultando em $596 \pm 6 \mu\text{m}$. A matriz sólida foi avaliada visualmente após a extração com fluido supercrítico, onde observou-se a compactação adequada e coloração homogênea tanto na direção radial quanto na direção longitudinal, indicando a não formação de caminhos preferenciais de extração (MARTÍNEZ, 2005).

Nos testes preliminares, bem como nos experimentos cinéticos e experimentos de rendimento global subseqüentes, utilizaram-se 15 g de amostra para a formação do leito. Esta quantidade de amostra foi

escolhida por dois motivos: (a) quantidades de amostra de bagaço de laranja inferiores a esta forneceram massas de extrato insuficientes para quantificação e análises posteriores e (b) formação de um leito de partículas com altura de, pelo menos, o dobro do diâmetro do extrator, a fim de se desprezar a dispersão axial no leito durante a extração. O volume ocupado pela massa de matéria-prima no extrator foi calculado através da altura preenchida pelas partículas de sólidas dentro do leito, sendo esta altura igual a $26,5 \pm 0,8$ mL. O restante do volume do leito foi preenchido com esferas de vidro separadas da matéria-prima pela adição de algodão, evitando sua mistura e mantendo constante a altura do leito durante a extração.

As vazões de solvente testadas foram 5; 8; 12 e 17 ± 2 g/min, visando verificar qual destas seria a mais adequada para as extrações. Devido à característica resinosa do extrato de bagaço de laranja e ao maior rendimento obtido, selecionou-se a vazão de 17 ± 2 g/min para as extrações de rendimento e estudo da cinética para evitar que ocorresse acúmulo de extrato de bagaço de laranja nas tubulações do equipamento de extração supercrítica.

Para a determinação do rendimento global de extração (X_0) com fluido supercrítico é necessário fixar um tempo de extração para verificar a influência das condições de temperatura e pressão empregadas. Este tempo é definido com base nas etapas da curva de extração, conforme descrito no item 3.4.4.5. Na etapa de taxa constante de extração (CER) as partículas se encontram completamente envoltas por uma camada superficial de soluto, fazendo com que o processo seja caracterizado pela transferência de massa por convecção entre a superfície do sólido e o solvente. Após a etapa CER, ocorre a etapa decrescente de extração (FER), causada pela exaustão da camada de soluto na superfície das partículas. A partir deste momento, o processo difusional começa a controlar a transferência de massa, pois o solvente encontra espaços livres para penetração na matriz sólida, solubilização do soluto e posterior difusão da mistura soluto-solvente para a superfície da partícula. A última etapa é a de taxa quase nula ou difusional de extração, onde a inclinação da curva diminui e a curva se aproxima do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível (X_0) (FERREIRA, 1991; FERREIRA; MEIRELES, 2002).

Desta forma, para a determinação de X_0 , o tempo de extração deve assegurar que a etapa de extração quase nula seja alcançada. A

Figura 17 apresenta a curva de extração a 200 bar, 40 °C e vazão de 17 ± 2 g/min obtida no equipamento apresentado no item 4.6.1.

Pela análise do comportamento da curva de extração do soluto com o tempo, pode-se observar que o tempo necessário para que a etapa difusiva seja alcançada é de aproximadamente 4 horas. A partir disto, padronizou-se que um tempo de extração de 5 horas garante que a etapa difusiva seja alcançada, sendo este tempo fixado para todos os experimentos de determinação de X_0 devido à extração da maior parte de soluto disponível. Este tempo e vazão de solvente implicam em um consumo de 5.100 g de CO_2 por extração ($m_{\text{solvente}}/M= 340$). O Apêndice II apresenta os dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do tempo para a curva de extração com fluido supercrítico de bagaço de laranja a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO_2 .

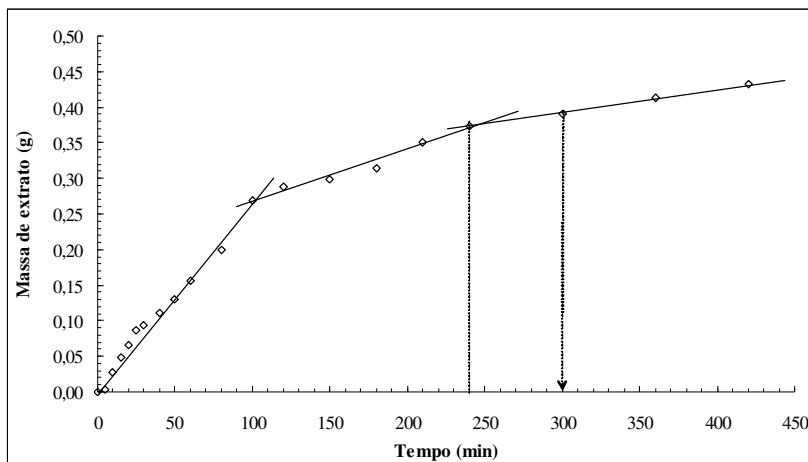


Figura 17: Curva de extração com fluido supercrítico de bagaço de laranja a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO_2 .

De acordo com a Figura 17, o período CER ocorre entre 0 e 100 minutos, o período FER está compreendido entre 100 e 240 minutos e a etapa controlada pela difusão inicia-se após 240 minutos. A Tabela 12 apresenta os parâmetros cinéticos de cada um dos períodos, descritos em 4.6.2, e obtidos a partir da Figura 17.

Tabela 12: Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do bagaço de laranja, realizada a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO₂.

Período de Extração	CER⁽⁶⁾	FER⁽⁷⁾	DCP⁽⁸⁾
Parâmetro			
t⁽¹⁾ (min)	0 - 100	100 - 240	>240
m⁽²⁾ (g)	0,2683	0,1057	0,0588
X₀⁽³⁾ (%)	1,78	0,70	0,39
M⁽⁴⁾ (g/min)	0,0027	0,0007	0,0003
Y⁽⁵⁾ (kg/kg)	$1,5882 \cdot 10^{-4}$	-	-

⁽¹⁾t: duração da etapa de extração; ⁽²⁾m: massa de extrato aproximada; ⁽³⁾X₀: rendimento da etapa; ⁽⁴⁾M: taxa de extração; ⁽⁵⁾Y: concentração de soluto na fase solvente (kg/kg); ⁽⁶⁾CER: etapa de extração constante; ⁽⁷⁾FER: etapa de extração decrescente; ⁽⁸⁾DCP: etapa difusional.

Os parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER) e M_{CER} (taxa de extração da etapa CER), apresentados na Tabela 12, e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) foram determinados pela regressão linear dos dados obtidos na curva de extração (Figura 17) e estão apresentados no Apêndice II, sendo posteriormente empregados na modelagem matemática (item 5.3).

5.2. Determinação do rendimento global de extrato (X₀)

Os rendimentos dos extratos de bagaço de laranja obtidos através das técnicas de extração a baixa pressão, como Soxhlet e ultrassom, com diferentes solventes, e hidrodestilação, estão apresentados na Tabela 13. O índice de polaridade dos diferentes solventes empregados nas extrações e a análise estatística pelo Teste de *Tukey* para os resultados de rendimento também são mostrados na Tabela 13.

Os resultados apresentados na Tabela 13 indicam que os maiores rendimentos foram obtidos para as extrações em Soxhlet com água e com etanol e para ultrassom com água, alcançando valores de 51 ± 2 % (m/m), $54,4 \pm 0,8$ % (m/m) e 42 ± 2 % (m/m), respectivamente. De acordo com a ANOVA não existe diferença significativa entre a extração Sox-EtOH e Sox-H₂O, porém ambos diferem significativamente de UE-H₂O, ao nível de significância de 5 %. 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.

Tabela 13: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de bagaço de laranja com diferentes solventes e respectivos índices de polaridade (em base seca).

Técnica de Extração	Solvente	IP do Solvente ⁽¹⁾	X_0 (%) ⁽²⁾
Sox	Hx	0	1,53 ^e ± 0,06
Sox	DCM	3,1	2,4 ^e ± 0,2
Sox	EtOAc	4,4	14 ^d ± 1
Sox	EtOH	5,2	51 ^a ± 2
Sox	H ₂ O	9,0	54,4 ^a ± 0,8
UE	Hx	0	1,16 ^e ± 0,09
UE	DCM	3,1	2,6 ^e ± 0,4
UE	EtOAc	4,4	2,6 ^e ± 0,4
UE	EtOH	5,2	23 ^c ± 1
UE	H ₂ O	9,0	42 ^b ± 2
HD	H ₂ O	9,0	0,03 ^e ± 0,01

Sox: Soxhlet; UE: ultrassom; HD: hidrodestilação; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; EtOH: etanol; H₂O: água.

⁽¹⁾ Índice de polaridade do solvente (BYERS, 2009).

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

De acordo com a Tabela 13, os rendimentos das extrações Sox-Hx, Sox-DCM, UE-Hx, UE-DCM, UE-EtOAc e HD não diferiram significativamente, ao nível de significância de 5 %. Pela ANOVA, as extrações que apresentaram diferença significativa em relação às demais foram Sox-EtOAc, UE-EtOH e UE-H₂O com valores de rendimento de 14 ± 1 % (m/m), 23 ± 1 % (m/m) e 42 ± 2 % (m/m), respectivamente.

Ao se comparar os métodos de extração aqui empregados para um mesmo solvente, nota-se que a extração Sox-EtOH (51 ± 2 %, m/m) apresentou um rendimento maior e estatisticamente diferente do rendimento de UE-EtOH (23 ± 1 %, m/m). De acordo com Barwick (1997), 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. Neste caso, a temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações solvente-

componentes do bagaço de laranja podem ter contribuído para a maior dissolução e rendimento. Na extração em Soxhlet, realizada na temperatura de ebulição do solvente, a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas quando comparadas a extrações em temperatura inferior, como é o caso do ultrassom. Assim, com uma maior temperatura de processo, o solvente pode alcançar os espaços da matriz que contém solutos com maior facilidade, solubilizando uma maior quantidade e diferentes tipos de solutos (MARKON et al., 2007).

Avaliando a polaridade dos solventes, o extrato de bagaço de laranja apresentou rendimentos mais elevados com solventes de maiores índices de polaridade como o acetato de etila, etanol e água, sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade de intermediária a alta. Em contrapartida, as extrações com solventes de baixa polaridade, como hexano, diclorometano e CO₂ (Tabela 14), apresentaram os menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos apolares presentes na matriz vegetal do bagaço de laranja. No caso da hidrodestilação, a ebulição da água provoca a formação de vapor e conseqüente arraste dos compostos voláteis presentes na amostra. O extrato obtido nestas condições é caracterizado como óleo essencial, enquanto que nos demais processos de extração são obtidas misturas de compostos de diferentes classes (MICHIELIN, 2009). Neste trabalho, a fração designada como óleo essencial, obtida por hidrodestilação, foi igual a 0,03 %.

De acordo com os resultados obtidos nas técnicas à baixa pressão com diferentes solventes, o etanol mostra ser um solvente adequado para ser utilizado como co-solvente para a ESC por apresentar altos rendimento tanto na extração com Soxhlet quanto na extração com ultrassom (Tabela 13).

Segundo Martínez et al. (2003), o rendimento global da extração para o processo ESC em leito fixo de partícula e método dinâmico de extração, é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado. A Tabela 14 apresenta os resultados médios de rendimento global de extração (X_0) dos experimentos realizados por ESC com bagaço de laranja e as condições de temperatura (T) e pressão (P) utilizadas nos ensaios. Os dados correspondentes de massa específica (ρ) do CO₂ também são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de bagaço de laranja com vazão de CO_2 de 17 ± 2 g/min (em base seca).

T (°C)	P (bar)	$\rho \text{ CO}_2$ (g/cm ³) ⁽¹⁾	X_0 (%) ⁽²⁾
40	100	0,629	1,16 ^{bc} ± 0,06
50	100	0,385	0,84 ^c ± 0,06
40	150	0,781	1,6 ^{ab} ± 0,2
50	150	0,701	1,60 ^{ab} ± 0,06
40	200	0,840	1,6 ^{ab} ± 0,2
50	200	0,785	1,6 ^{ab} ± 0,2
40	250	0,880	1,7 ^{ab} ± 0,2
50	250	0,835	1,7 ^a ± 0,1
40	300	0,911	1,9 ^a ± 0,1
50	300	0,871	1,9 ^a ± 0,1

⁽¹⁾ ANGUS; ARMSTRONG; DE REUCK, 1976.

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

De acordo com a Tabela 14 o maior rendimento de ESC obtido para o bagaço de laranja foi de $1,9 \pm 0,1$ % (m/m) para as condições de 300 bar e 40 °C e de 300 bar e 50 °C, não diferindo estatisticamente dos resultados de X_0 obtidos de 150 a 300 bar, nas temperaturas de 40 °C e 50 °C ($p < 0,05$). O menor valor de X_0 foi de $0,84 \pm 0,06$ % (m/m) para a condição de 100 bar e 50 °C.

Ainda de acordo com a Tabela 14, os resultados demonstram que o rendimento da extração aumenta com o aumento da pressão a temperatura constante. Para a condição isotérmica de 40 °C, o rendimento aumenta de $1,16 \pm 0,06$ % (m/m) para $1,9 \pm 0,1$ % (m/m) quando a pressão de operação é elevada de 100 para 300 bar, respectivamente. O mesmo comportamento também é observado na temperatura de 50 °C. Este desempenho é justificado pela elevação da massa específica do solvente supercrítico com a pressão, ou seja, ocorre um aumento do poder de solvatação do CO_2 com a densidade (BRUNNER, 1994).

O efeito da temperatura é mais adverso. Enquanto a densidade do solvente aumenta com a diminuição da temperatura, aumentando o poder de solvatação, a pressão de vapor do soluto diminui com a temperatura, reduzindo o poder de solvatação (BRUNNER, 1994). Assim, a partir dos dados apresentados na Tabela 14, por exemplo, na condição de 100 bar, o rendimento diminui de $1,16 \pm 0,06$ % (m/m) para

0,84 ± 0,06 % (m/m) com a elevação da temperatura de 40 °C para 50 °C, devido a redução na massa específica do CO₂ supercrítico. Porém, um efeito contrário ocorre para pressões acima de 150 bar. O aumento da temperatura de 40 °C para 50 °C aumenta o rendimento, mesmo que os dados apresentados na Tabela 14 não sejam diferentes estatisticamente. Este aumento no rendimento pode ser melhor visualizado na Figura 18. Desta forma, acima de 150 bar, o efeito da pressão de vapor é dominante, enquanto que abaixo de 150 bar o efeito da densidade do solvente é mais importante. Esta oposição de efeitos resulta na inversão das isotermas de rendimento, conhecido como fenômeno de retrogradação (MICHIELIN et al., 2005).

A Figura 18 apresenta as isotermas de rendimento do extrato de bagaço de laranja em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação, de acordo com os resultados da Tabela 14, para as temperaturas de 40 °C e 50 °C.

Na Figura 18 percebe-se que as isotermas mostram uma inversão na região entre 140 e 150 bar, representando a possível região de retrogradação. Este fenômeno representa a influência da pressão de vapor do soluto e do poder de solvatação do solvente, no valor da solubilidade e, conseqüentemente, no rendimento de processo (MICHIELIN et al., 2005; CASAS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007).

Kizberger et al. (2009) relataram que a faixa de inversão das isotermas para o extrato de cogumelo *Shiitake* é próxima a 170 bar. Segundo Mezzomo et al. (2010), a faixa de inversão das isotermas de 30 °C, 40 °C e 50 °C para o óleo de amêndoa de pêssego ocorre entre 260 bar e 280 bar. Michielin et al. (2009) identificaram o fenômeno da retrogradação para *Cordia verbenacea* na faixa de pressão compreendida entre 140 bar e 150 bar, para todas as isotermas testadas. Este resultado é semelhante ao comportamento encontrado neste estudo, onde se sugere que para pressões abaixo da inversão a densidade do solvente é o efeito dominante, enquanto que para pressões acima desta inversão, a pressão de vapor do soluto é o principal mecanismo que afeta o processo de extração (MICHIELIN et al., 2005), conforme já mencionado anteriormente. A discrepância entre as faixas de inversão mencionadas ocorre devido a diferenças nas matrizes vegetais utilizadas, estando relacionada à composição dos extratos, ou seja, pela influência dos grupos funcionais e da estrutura dos ácidos graxos presentes no

soluto sobre a pressão de vapor dos diferentes extratos e, portanto, na solubilidade destes no solvente supercrítico (MEZZOMO et al., 2010).

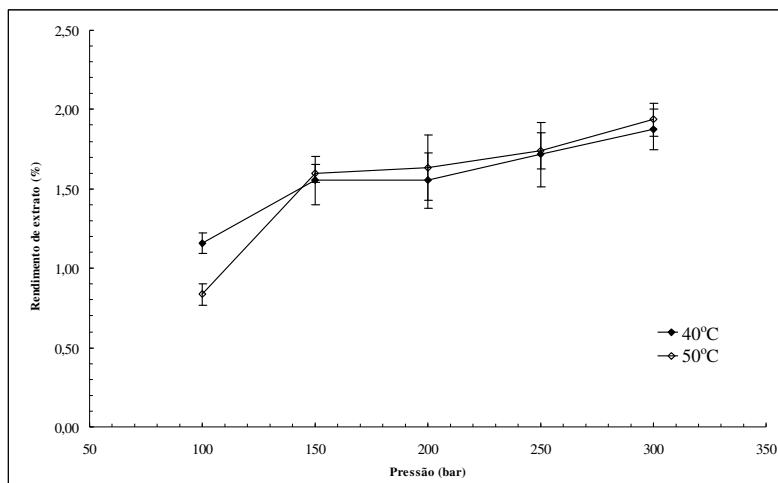


Figura 18: Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC do bagaço de laranja.

A Tabela 15 apresenta a ANOVA para os resultados de rendimento da extração supercrítica do bagaço de laranja em função dos efeitos das variáveis temperatura (T) e pressão (P) de operação.

Tabela 15: ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T), de 40 °C a 50 °C, e pressão (P), de 100 bar a 300 bar, sobre o rendimento da ESC de bagaço de laranja.

Efeito	SQ ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	F ⁽³⁾	p ⁽⁴⁾
T (°C)	0,00093	1	0,082	0,779656
P (bar)	0,99438	4	21,981	0,000033
Interação T x P	0,06234	4	1,378	0,303719
Erro	0,12440	11	-	-

⁽¹⁾ SQ: Soma dos Quadrados; ⁽²⁾ GL: Graus de liberdade; ⁽³⁾ F: Valor F (estatística do teste); ⁽⁴⁾ p: Probabilidade.

Segundo a ANOVA, a pressão ($p= 0,000033$) apresentou efeito significativo sobre o valor de X_0 . No entanto, a temperatura ($p= 0,779656$) e a interação entre pressão e temperatura ($p= 0,303719$) não apresentaram efeito significativo no rendimento global do bagaço de laranja ao nível de 5 % de significância, indicando que o efeito da pressão independe da temperatura.

O fato da temperatura não apresentar influência significativa sobre o rendimento global de 100 a 300 bar é devido ao efeito contrário que esta apresenta na região de inversão das isotermas (entre 140 e 150 bar). Para pressões menores que a pressão de inversão a menor temperatura (40 °C) implica em maior rendimento e para pressões maiores que a de inversão ocorre o contrário e, desta forma, na análise estatística o efeito da temperatura não se mostra significativo.

Para avaliar a influência da temperatura e da pressão sobre o rendimento global da ESC para a região próxima ao ponto de inversão das isotermas (100 bar a 150 bar) foi realizada a análise estatística dos valores de X_0 . Os resultados obtidos pela ANOVA são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T) nas pressões de 100 a 150 bar sobre o rendimento da ESC de bagaço de laranja.

Efeito	SQ ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	F ⁽³⁾	p ⁽⁴⁾
T (°C)	0,20901	1	4,470	0,102009
P (bar)	0,357562	1	76,465	0,000943
Interação T x P	0,035767	1	7,649	0,050556
Erro	0,18705	4	0,004676	

⁽¹⁾ SQ: Soma dos Quadrados; ⁽²⁾ GL: Graus de liberdade; ⁽³⁾ F: Valor F (estatística do teste); ⁽⁴⁾ p: Probabilidade.

Segundo a ANOVA, a temperatura ($p= 0,102009$) e a interação entre pressão e temperatura ($p= 0,050556$) não apresentaram efeito significativo no rendimento global do bagaço de laranja ao nível de 5 % de significância. No entanto, o efeito da pressão ($p= 0,000943$) é significativo estatisticamente, sendo considerado como fator de influência no rendimento da extração na faixa de pressão de 100 bar a 150 bar.

De acordo com os resultados da ANOVA apresentados nas Tabelas 15 e 16, o efeito da pressão sobre o rendimento é encontrado quando os resultados X_0 são avaliados de 100 a 300 bar e na faixa que inclui a inversão (100 a 150 bar). Isto confirma que o efeito da pressão é dominante em todo o processo de ESC para o bagaço de laranja. O efeito da temperatura, apresentado como não significativo estatisticamente, pode estar relacionado à pequena faixa de temperatura avaliada ($\Delta T=10\text{ }^\circ\text{C}$) e às diferenças não significativas entre a maioria dos rendimentos (Tabela 14).

De acordo com os resultados obtidos para as extrações a baixa pressão (Tabela 13), os rendimentos obtidos com Soxhlet e ultrassom foram superiores aos rendimentos da ESC (Tabela 14), exceto para uso de hexano (apolar) como solvente. Os rendimentos de Soxhlet que foram mais expressivos foram obtidos com, acetato de etila ($14 \pm 1\%$), etanol ($51 \pm 2\%$) e água ($54,4 \pm 0,8\%$), enquanto que para o ultrassom foram com etanol ($23 \pm 1\%$) e água ($42 \pm 2\%$). Já nas extrações com fluido supercrítico, os melhores rendimentos foram obtidos a 300 bar e $40\text{ }^\circ\text{C}$ ($1,9 \pm 0,1\%$) e 300 bar e $50\text{ }^\circ\text{C}$ ($1,9 \pm 0,1\%$).

Com a finalidade de melhorar o rendimento da extração e ampliar a quantidade de compostos solubilizados pela mistura solvente/co-solvente, pode-se considerar o emprego de um solvente orgânico, exceto o hexano, como co-solvente na ESC para obtenção do extrato de bagaço de laranja. Como o CO_2 é um solvente de caráter apolar, ele extrai preferencialmente compostos apolares. Assim, a adição de um co-solvente com característica polar faz com que compostos polares, não extraídos inicialmente pelo CO_2 puro, possam ser solubilizados pela mistura deste com o co-solvente. Nas extrações a baixa pressão, os solventes que apresentaram melhor rendimento foram o etanol e a água, ambos de natureza polar.

De acordo com os resultados de rendimentos das extrações a baixa pressão, os solventes água e etanol apresentaram os melhores resultados (Tabela 13). O etanol pode ser utilizado como co-solvente ao CO_2 na ESC devido a sua não-toxicidade, sendo comumente utilizado na indústria de alimentos, sua fácil evaporação do extrato, sendo amplamente relatada na literatura a sua utilização na tecnologia supercrítica (CASAS et al., 2007; SALGIN, 2007; MEZZOMO et al., 2010). Apesar da água também ter apresentado bons rendimentos na extração com Soxhlet e ultrassom, esta possui características que

normalmente não são desejadas em processos de separação, como viscosidade e tensão superficial altas, o que dificulta a absorção do solvente nos poros da matriz (MARKON et al., 2007). Assim, com o objetivo de aumentar o rendimento e a quantidade de compostos no extrato de bagaço de laranja obtidos pela ESC, utilizou-se etanol como co-solvente ao CO₂, em concentrações de 2 %, 5 % e 8 % em relação à massa de CO₂ empregada, na condição de 250 bar, 50 °C e vazão de CO₂ de 17 ± 2 g/min. A influência da utilização do etanol como co-solvente no rendimento da ESC pode ser observada na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de rendimento global (X₀) obtidos para ESC de bagaço de laranja em função de diferentes concentrações de co-solvente na condição de 250 bar, 50°C e vazão de CO₂ de 17 ± 2 g/min (em base seca).

T (°C)	P (bar)	Co-solvente (%) ⁽¹⁾	X ₀ (%) ⁽²⁾
50	250	0	1,7 ^b ± 0,1
50	250	2	2,33 ^b ± 0,07
50	250	5	2,7 ^{ab} ± 0,2
50	250	8	4,2 ^a ± 0,9

⁽¹⁾ Co-solvente utilizado: etanol.

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

A partir dos dados da Tabela 17, as ESC de extrato de bagaço de laranja a 250 bar e 50 °C tiveram seus rendimentos aumentados para todas as concentrações de etanol testadas, aumentando de 1,7 ± 0,1 % (m/m) para 4,2 ± 0,9 % (m/m), quando foi utilizado 0% e 8 % (m/m) de etanol como co-solvente, respectivamente. Este comportamento deve-se a maior solubilização de compostos polares pela mistura etanol/CO₂, não ocorrendo quando se utiliza CO₂ puro, reduzindo a seletividade e aumentando o rendimento.

Pelos resultados do Teste de Tukey, os rendimentos obtidos com a utilização de 2 % e 5 % de etanol não diferiram significativamente, ao nível de 5 % de significância, do rendimento obtido sem a utilização de co-solvente. Em contrapartida, a utilização de 8 % de etanol apresentou um rendimento estatisticamente maior (4,2 ± 0,9 %, m/m) do que a condição sem uso de modificador. Isto se deve ao maior número de compostos solúveis na mistura, reduzindo a seletividade e aumentando o rendimento. Um alto rendimento também

foi obtido quando foi utilizado etanol nas extrações a baixa pressão, apresentando valores de rendimento de $51 \pm 2 \%$ para Soxhlet e $23 \pm 1 \%$ para ultrassom.

O efeito da concentração de co-solvente no rendimento de extração é melhor observado na Figura 19, para as concentrações de 0 %, 2 %, 5 % e 8 % (m/m) de etanol.

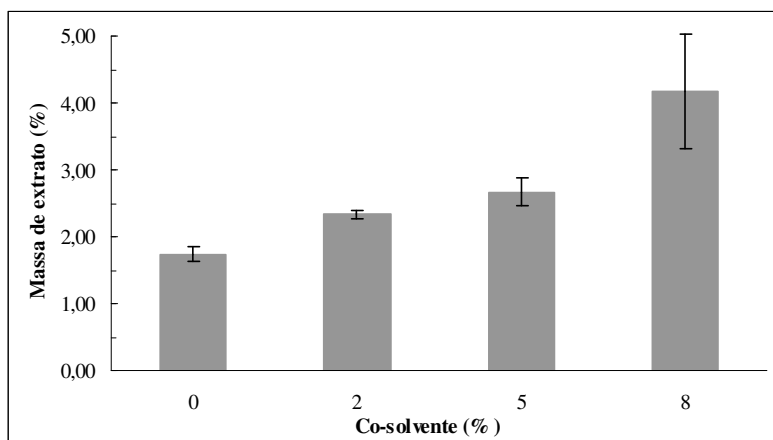


Figura 19: Efeito da concentração do co-solvente no rendimento da ESC de extrato de bagaço de laranja.

A maior quantidade de co-solvente favorece as interações soluto/co-solvente, aumentando o rendimento (HOLLENDER et al., 1997). Geralmente, o tipo de co-solvente tem maior impacto na eficiência da extração do que sua concentração devido ao tipo de interação matriz-compostos e aos parâmetros físico-químicos do co-solvente. A maioria deles alcança melhores resultados em altas concentrações, enquanto outros reagem ao contrário (LUTERMANN et al., 1998).

5.3. Modelagem matemática

A Figura 20 apresenta os dados experimentais e modelados obtidos para a ESC de extrato de bagaço de laranja na condição 200 bar,

40 °C e vazão de CO₂ igual a 17 ± 2 g/min. A Tabela 18, apresenta os coeficientes, parâmetros ajustáveis e os erros médios quadráticos (EMQ) obtidos para os modelos empregados: Crank (1975), Goto, Sato e Hirose (1993), Sovová (1994), Esquível, Bernardo-Gil e King (1999), Gaspar et al. (2003) e Martínez et al. (2003). Os dados utilizados para a modelagem matemática encontram-se no Apêndice II.

Para a modelagem do processo de extração é necessário o conhecimento de variáveis do processo. Para a aplicação do modelo de Sovová (1994) necessita-se de dados como a densidade do solvente e solubilidade do extrato no solvente empregado, dados específicos da matéria-prima e do leito de partículas, como densidade do sólido e porosidade do leito (Tabela 11), e ainda dados da curva de extração a ser modelada, como X_0 , t_{CER} , M_{CER} , Y_{CER} (Tabela 12).

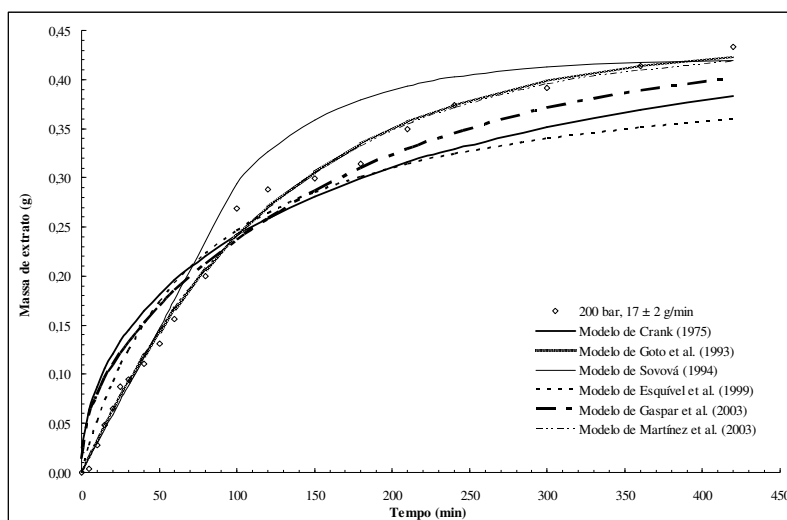


Figura 20: Curva de ESC de extrato de bagaço de laranja experimental e modelada a 200 bar, 40°C e vazão de 17 ± 2 g/min de CO₂.

Para a aplicação do modelo de Goto, Sato e Hirose (1993), além da densidade do solvente e dados do leito de partícula como porosidade do leito e densidade do sólido, é necessário conhecer a porosidade das partículas da matéria-prima (β), onde adotou-se para β o valor 0,54

definido por estes autores. Para a solubilidade do extrato de bagaço de laranja em CO_2 , utilizou-se o valor 3,6 mg/g de CO_2 , calculado por Cardozo, Wolff e Meireles (1997). Para o cálculo da solubilidade, os autores se basearam nas formulações propostas por Asselineau, Bogdanic e Vidal (1979), utilizando as equações cúbicas de estado de Peng-Robinson e Soave-Redlich-Kwong e regras de mistura de van der Waals com dois parâmetros de interação.

Tabela 18: Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da ESC do bagaço de laranja a 200 bar, 40 °C e vazão de 17 ± 2 g/min de CO_2 .

Modelo	Parâmetros	
Crank (1975)	D (m^2/min)	1,4259E-10
	EMQ	0,0019
Goto et al. (1993)	k	0,75
	ϕ	0,008
	EMQ	0,0001
Sovová (1994)	t_{CER} (min)	100
	M_{CER} (g/min)	0,0026
	Y_{CER}	0,0002
	X_k	0,0082
	k_{xa} (min^{-1})	0,0053
	k_{ya} (min^{-1})	0,0387
	EMQ	0,0008
Esquível et al. (1999)	b	70,8716
	EMQ	0,0013
Gaspar et al. (2003)	D_m (m^2/min)	2,0646E-10
	EMQ	0,0011
Martínez et al. (2003)	b (min^{-1})	0,0081
	t_m (min^{-1})	-554,60
	EMQ	0,0001

Parâmetros ajustáveis: D ; b ; t_m ; k ; ϕ .

t_{CER} : tempo da etapa CER; M_{CER} : taxa de extração na etapa CER; Y_{CER} : concentração de soluto na fase solvente na etapa CER; k_{xa} : coeficiente de transferência de massa para a fase sólida; k_{ya} : coeficiente de transferência de massa para a fase fluida; X_k : razão mássica de soluto de difícil acesso; EMQ: erro médio quadrático.

Os modelos de Crank (1975) e Martínez et al. (2003) necessitam para a modelagem matemática apenas a massa de soluto

inicial e o raio da partícula sólida, enquanto que o modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) requer apenas o valor de X_0 e da massa de inertes, ou seja, a massa de matéria-prima isenta de óleo utilizada na extração.

A partir da curva visualizada na Figura 20 e dos EMQ apresentados na Tabela 18, percebe-se que os modelos que melhor se ajustaram aos dados experimentais foram os modelos de Goto, Sato e Hirose (1993) e Martínez et al. (2003). O parâmetro ajustável t_m corresponde ao tempo em que a taxa de extração é máxima, porém este parâmetro apresentou valor negativo para a curva modelada, perdendo seu significado físico. Neste caso, a taxa de extração é decrescente, ou seja, apresenta o valor máximo apenas no instante inicial da extração (MARTÍNEZ et al., 2003).

O modelo de Goto, Sato e Hirose (1993) considera que a transferência de massa é controlada pelo mecanismo de dessorção da partícula para os poros, seguido de difusão do soluto nos poros da partícula através do ajuste do parâmetro relativo ao coeficiente global de transferência de massa (ϕ) e da constante de dessorção (k). Peker et al. (1992), mostraram que quando $k \ll 1$ o extrato é totalmente removido do interior dos poros das partículas e, conseqüentemente, pode ser facilmente absorvido pelo solvente. No presente estudo, o valor de k é igual a 0,75, indicando facilidade na recuperação do extrato de bagaço de laranja contido no interior dos poros, porém não em sua totalidade.

Para o ajuste do modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) é necessário conhecer apenas o valor de X_0 e da massa de material inerte, sendo um modelo de fácil aplicação. Os efeitos termodinâmicos e de transferência de massa são representados por um único parâmetro ajustável (b) e, desta forma, não é possível verificar a influência dos diferentes mecanismos de transferência de massa na descrição da curva de extração. O bom ajuste deste modelo aos dados experimentais é devido à equação hiperbólica, característica de sistemas onde o soluto tem fácil contato com o solvente (SOUSA et al., 2005).

Os modelos de Crank (1975) e de Gaspar et al. (2003) consideram que o processo de extração é controlado unicamente pela difusão. Estes modelos apresentaram os valores mais elevados para os EMQ, quando comparados aos outros modelos avaliados, possivelmente por desconsiderarem o mecanismo de transferência de massa por convecção (CAMPOS et al., 2005).

O modelo de Sovová (1994) apresenta bons resultados quando as curvas experimentais possuem um período de taxa constante de extração bem definido, ou seja, a transição do período CER para o período FER bem delimitada. A principal vantagem deste modelo é a adequada descrição dos fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo de ESC, apresentando um claro significado físico dos parâmetros ajustáveis. Por outro lado, o uso deste modelo é limitado aos sistemas onde a solubilidade do soluto no solvente supercrítico é conhecida para a condição de temperatura e pressão do processo (SOUZA et al., 2004). A diferença encontrada entre os dados experimentais e a curva modelada, em especial na etapa FER de extração, pode estar relacionada com a adoção do valor de solubilidade obtido na literatura, especialmente por ter sido obtido em uma condição de pressão muito inferior da utilizada na obtenção da curva de ESC deste trabalho. Ainda, embora os dados de literatura sejam referentes a um produto semelhante ao deste estudo, algumas características da amostra e das condições de processamento diferem das condições aplicadas nos experimentos realizados neste trabalho. Este procedimento foi adotado pela impossibilidade operacional de realizar uma análise de determinação de solubilidade mais adequada.

O parâmetro k_{ya} é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, sendo diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido, que por sua vez aumenta com o aumento da vazão de solvente (SOVOVÁ; KUCERA; JEZ, 1994; MICHIELIN et al., 2005; CAMPOS et al., 2008; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009). Já o valor de k_{xa} é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase sólida e não sofre a influência da vazão do solvente, pois é representado pela difusão do CO₂ e da mistura de CO₂+soluto no interior das partículas de matéria-prima.

Para o ensaio de ESC descrito pelos dados da Tabela 18 e pela Figura 20, o valor do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{ya}) foi superior ao valor do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{xa}). Desta forma, um baixo valor de k_{xa} indica que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção (MARTÍNEZ et al., 2003) na ESC de bagaço de laranja, pois o soluto localizado no interior das partículas de sólido (matéria-prima) tem maior dificuldade de ser dissolvido, levando mais tempo para vencer a interface sólido-fluido que o soluto localizado na superfície das partículas (WEINHOLD et al., 2008). Este efeito também foi observado

por Michielin (2009) para a erva baleeira e por Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009) para a amêndoa de pêssego.

Neste trabalho, este efeito pode ter ocorrido devido a diversos fatores, tais como: (a) o diâmetro de partícula do bagaço de laranja ser muito alto; (b) o conteúdo de óleo presente nas partículas de bagaço de laranja ser muito baixo, diminuindo o gradiente de concentração e, portanto, a taxa de transferência de massa intraparticular; (c) a solubilidade dos componentes presentes no bagaço de laranja ser muito baixa, dificultando a solubilização do extrato e posterior difusão.

A modelagem da curva de ESC dos dados experimentais é importante para a otimização de projetos e aumento de escala, como a definição do volume do extrator, rendimento e a predição do comportamento da extração ao longo do processo, como tempo total da extração para uma condição de operação específica. Além disso, a modelagem fornece informações a respeito do sistema estudado e sobre o comportamento da extração dependendo do fenômeno predominante na transferência de massa do sistema (fenômenos convectivos e difusivos) (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

5.4. Avaliação da atividade antioxidante

5.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT)

Os valores encontrados de teor de compostos fenólicos total (TFT) para os extratos de bagaço de laranja obtidos por ESC, Soxhlet e ultrassom, bem como para o BHT (amostra padrão) e para o óleo comercial de laranja (ver item 4.9), são apresentados na Tabela 19. Embora os compostos fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante de produtos naturais, a determinação destes pelo método de Folin-Ciocalteu, expressa em termos de teor de ácido gálico presente na amostra, não caracteriza completamente a atividade antioxidante, representando apenas uma boa estimativa desta propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005).

A curva padrão de ácido gálico, para as diferentes concentrações testadas e as suas respectivas absorbâncias, está apresentada no Anexo III, sendo utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos total.

A quantidade de compostos fenólicos obtida nos extratos ESC não apresentou tendência de variação linear com o aumento ou a diminuição da temperatura e da pressão. A condição que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos foi 300 bar e 40 °C (36 mg GAE/g) a qual se mostrou estatisticamente semelhante, de acordo com o Teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância, aos extratos obtidos a 300 bar e 50 °C (30 ± 4 mg GAE/g) e aos extratos ESC com co-solvente a 250 bar e 50 °C, com 2 %, 5 % e 8 % de EtOH, cujos valores foram de 35 ± 4 , 35 ± 1 e 30 ± 2 mg GAE/g, respectivamente. O emprego de diferentes concentrações de etanol como co-solvente não teve influência sobre o conteúdo de compostos fenólicos quando comparados ao CO₂ puro.

De acordo com a Tabela 19, o teor de compostos fenólicos para os extratos de ESC, obtidos a 300 bar e 40 °C, 300 bar e 50 °C e 250 bar e 50 °C adicionados de co-solvente, foram comparáveis com extratos Sox-DCM, Sox-EtOAc, Sox-EtOH, UE-DCM e UE-EtOH, obtidos a baixa pressão. Estes extratos apresentaram valores que não diferiram significativamente entre si, analisados pelo Teste de *Tukey*. Junto a este grupo de extratos bioativos encontra-se o óleo comercial, que apresentou um valor para compostos fenólicos total igual a 28 ± 4 mg GAE/g. O extrato que apresentou diferença significativa com relação aos demais extratos foi o UE-EtOAc, fornecendo um valor de 60 ± 5 mg GAE/g pelo método de Folin-Ciocalteu, apresentando o melhor resultado entre todos os valores obtidos. Isto demonstra que os compostos fenólicos possuem maior afinidade por solventes de polaridade entre intermediária e alta (3,1 a 5,2). Este comportamento também pode ser observado nos resultados obtidos para as extrações supercríticas adicionadas de co-solvente, onde ocorreu aumento do teor de compostos fenólicos associado com a elevação da polaridade da mistura de solvente (CO₂ e etanol).

Apesar da fração UE-EtOAc ter apresentado o maior conteúdo de compostos fenólicos, os resultados de rendimento global ($X_0 = 2,6 \pm 0,4$ %, m/m), apresentados na Tabela 13, podem inviabilizar o processo de extração. Anagnostopoulou et al. (2006), Chung et al. (1999) e Parejo et al. (2002) também relataram a eficiência do acetato de etila para a obtenção de frações ricas em compostos fenólicos, concentrando compostos de polaridade intermediária.

Tabela 19: Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), para os extratos de bagaço de laranja, óleo comercial e BHT.

Extração	Solvente	Teor de Compostos Fenólicos Total (mg EAG/g) ⁽¹⁾
Sox	Hx	25,0 ^{gghj} ± 0,7
Sox	DCM	45 ^{cd} ± 2
Sox	EtOAc	42,2 ^{cd} ± 0,6
Sox	EtOH	40 ^{cde} ± 3
Sox	H ₂ O	6 ^m ± 2
UE	Hx	19 ^{ghij} ± 3
UE	DCM	37 ^{cdef} ± 1
UE	EtOAc	60 ^b ± 5
UE	EtOH	46 ^c ± 4
UE	H ₂ O	12 ^{lm} ± 1
HD	H ₂ O	NT
ESC 40 °C/100 bar	CO ₂	13 ^{ijlm} ± 1
ESC 50 °C/100 bar	CO ₂	26 ^{fghi} ± 2
ESC 40 °C/150 bar	CO ₂	9 ^{lm} ± 2
ESC 50 °C/150 bar	CO ₂	21 ^{ghij} ± 2
ESC 40 °C/200 bar	CO ₂	14 ^{ijlm} ± 1
ESC 50 °C/200 bar	CO ₂	22 ^{ghij} ± 2
ESC 40 °C/250 bar	CO ₂	17 ^{hijlm} ± 4
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂	14,0 ^{ijlm} ± 0,2
ESC 40 °C/300 bar	CO ₂	36 ^{cdef} ± 2
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂	30 ^{defg} ± 4
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 2 % EtOH	35 ^{cdef} ± 4
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 5 % EtOH	35 ^{cdef} ± 1
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 8 % EtOH	30 ^{defgh} ± 2
ESC 50 °C/250 bar (Recuperado)	CO ₂ + EtOH	5,5 ^m ± 0,7
Óleo comercial	-	28 ^{efgh} ± 4
BHT	-	268 ^a ± 13

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).
NT: Não testado.

O teor de compostos fenólicos total do BHT foi bastante superior (268 ± 13 mg EAG/g) aos obtidos pelos extratos de bagaço de laranja por qualquer umas das técnicas empregadas, sendo estatisticamente diferente dos demais pelo Teste de *Tukey*.

Anagnostopoulou et al. (2006) estudaram o TFT para extratos de casca de laranja obtidos com solventes orgânicos e encontraram uma faixa de valores de 3 mg EAG/g a 105 mg GAE/g. Os valores

encontrados neste trabalho encontram-se dentro da faixa de abrangência relatada pelos autores.

Kang et al. (2006) determinaram o TFT de soluções aquosas de pó da casca de laranja. O valor de TFT obtido por estes autores foi de $3,5 \pm 0,05$ mg EAG/g, inferior aos dados deste trabalho (6 ± 2 mg EAG/g para Sox-H₂O e 12 ± 1 mg EAG/g para UE-H₂O).

De forma geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares. Contudo, alguns destes apresentam uma ampla faixa de polaridade, podendo também ser solubilizados por hexano e CO₂ supercrítico (ZIAKOVA; BRANDSTETEROVA, 2002), conforme os resultados apresentados na Tabela 19. Porém, a quantidade de compostos fenólicos detectados nos extratos Soxhlet e ultrassom utilizando etanol e acetato de etila, sugerem que estes são eficientes na solubilização de compostos com atividade antioxidante de misturas complexas presente nas matrizes vegetais, confirmando a sua indicação como co-solventes junto a ESC.

Bravo (1998) e Kalt et al. (2001) relatam que existe uma grande variação entre o conteúdo de compostos fenólicos total presente nas frutas e vegetais. As diferenças estão relacionadas à complexidade dos grupos constituintes e à variabilidade das matérias-primas. Além disso, as diferenças encontradas para TFT na literatura para uma mesma fruta ou vegetal dependem, principalmente, das diferentes técnicas empregadas na extração e quantificação destes compostos. Os compostos fenólicos presentes nas frutas são encontrados na forma livre e ligada, porém esta última geralmente é excluída das análises, sendo o TFT subestimado (Sun et al., 2002). Ao mesmo tempo, a quantidade de compostos fenólicos das plantas também depende de fatores como o gênero, espécie e cultivar da planta e de condições de cultivo, colheita e armazenamento (TOMAS-BARBERAN; ESPIN, 2001; RAPISARDA et al., 1999).

5.4.2. Método DPPH

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante dos extratos de bagaço de laranja obtidos por Soxhlet e ultrassom com solventes de diferentes polaridades e por ESC obtidos em diferentes condições de processo. Utilizou-se o BHT, um composto

Tabela 20: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de laranja através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (EC₅₀), e comparação com o BHT e o óleo comercial.

Extração	Solvente	EC ₅₀ (µg/mL) ⁽¹⁾	% AA (500 µg/mL) ⁽¹⁾
Sox	Hx	648 ^{defg} ± 19	37 ^g ± 2
Sox	DCM	505 ^{bcde} ± 11	48 ^f ± 1
Sox	EtOAc	347 ^{ab} ± 6	72,6 ^b ± 0,7
Sox	EtOH	850 ^{ghij} ± 61	29 ^{ijk} ± 1
Sox	H ₂ O	879 ^{hijk} ± 6	28,4 ^{jkl} ± 0,7
UE	Hx	1549 ^m ± 210	15 ⁿ ± 2
UE	DCM	445 ^{abcd} ± 14	55 ^{de} ± 2
UE	EtOAc	434 ^{abcd} ± 13	55,1 ^{cde} ± 0,9
UE	EtOH	713 ^{efgh} ± 54	34 ^{ghi} ± 3
UE	H ₂ O	603 ^{cdef} ± 55	39 ^g ± 1
HD	H ₂ O	NT	NT
ESC 40 °C/100 bar	CO ₂	638 ^{defg} ± 44	38 ^g ± 3
ESC 50 °C/100 bar	CO ₂	1142 ^l ± 55	24 ^{lm} ± 1
ESC 40 °C/150 bar	CO ₂	879 ^{hijk} ± 68	27 ^{jkl} ± 2
ESC 50 °C/150 bar	CO ₂	783 ^{fghi} ± 25	31,5 ^{hij} ± 0,5
ESC 40 °C/200 bar	CO ₂	1492 ^m ± 125	18 ⁿ ± 2
ESC 50 °C/200 bar	CO ₂	717 ^{efgh} ± 30	35 ^{gh} ± 2
ESC 40 °C/250 bar	CO ₂	968 ^{jkl} ± 62	29,5 ^{hijk} ± 0,3
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂	1412 ^m ± 134	20 ^{mn} ± 1
ESC 40 °C/300 bar	CO ₂	1090 ^{kl} ± 43	25 ^{kl} ± 1
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂	1046 ^{jkl} ± 92	24 ^{klm} ± 2
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 2 % EtOH	481 ^{abcd} ± 8	51,2 ^{ef} ± 0,6
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 5 % EtOH	414 ^{abc} ± 6	58,5 ^{cd} ± 2
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 8 % EtOH	403 ^{abc} ± 22	61 ^c ± 1
ESC 50 °C/250 bar (Recuperado)	CO ₂ + EtOH	1159 ^l ± 117	20 ^{mn} ± 2
Óleo comercial ⁽²⁾	-	266 ^a ± 4	77 ^b ± 1
BHT	-	261 ^a ± 12	89,7 ^a ± 0,5

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

⁽²⁾ Óleo utilizado sem diluição para a análise, não correspondendo à concentração de 500 µg/mL.

NT: Não testado.

sintético de reconhecida atividade antioxidante, e o óleo comercial obtido por prensagem a frio (*cold pressed oil*), como comparativos do ensaio. A atividade antioxidante é apresentada em AA % e EC₅₀, ou seja, a concentração onde o composto apresenta 50 % da sua atividade

máxima. A atividade antioxidante é referente à maior concentração de extrato testada (500 mg/mL).

A respeito do apresentado na Tabela 20, os resultados para o óleo comercial foram obtidos para o óleo puro, ou seja, sem efetuar as diluições para a obtenção das concentrações declaradas no item 4.10.2. Quando as análises foram realizadas com o óleo comercial diluído, este, possivelmente, ficou fora da faixa de abrangência das concentrações avaliadas pelo método DPPH, impossibilitando a leitura espectrofotométrica.

Os extratos obtidos a baixa pressão que apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante pelo método DPPH foram as frações Sox-EtOAc, UE-DCM e UE-EtOAc, com $72,6 \pm 0,7 \%$; $55 \pm 2 \%$ e $55,1 \pm 0,9 \%$, respectivamente. Os valores de concentração efetiva (EC_{50}) destes extratos, conforme a Tabela 20, são comparáveis estatisticamente ao valor obtido para o BHT ($261 \pm 12 \mu\text{g/mL}$), ao nível de 5 % de significância. Isto quer dizer que, para inibir em 50 % a atividade dos radicais livres, uma quantidade de 261 μg de BHT/mL é suficiente. A partir destes dados, pode-se perceber que alguns compostos com atividade antioxidante possuem afinidade por solventes de polaridade intermediária (entre 3,1 e 4,4). Para os outros solventes utilizados nas extrações a baixa pressão, os resultados não mostraram atividade antioxidante significativa quando comparados aos resultados anteriormente citados.

A literatura indica 50 °C como temperatura ótima de extração para compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais devido a sua sensibilidade térmica (PINELO SINEIRO; NÚNEZ, 2006). Nos processos de extração em Soxhlet, percebe-se que a utilização de aquecimento do solvente até a ebulição diminui a % AA e aumenta o EC_{50} dos extratos quando estes são comparados com a extração por ultrassom com os mesmos solventes, exceto para acetato de etila e hexano. Possivelmente, o emprego de altas temperaturas na extração com Soxhlet pode ter degradado compostos responsáveis pela atividade antioxidante.

Os extratos obtidos por tecnologia supercrítica que apresentaram destacada atividade antioxidante e, conseqüentemente, bons valores de EC_{50} foram aqueles provenientes da ESC a 250 bar e 50 °C, adicionados de co-solvente (2 %, 5 % e 8%), sendo todos eles iguais estatisticamente, ao nível de significância de 5 %, ao poder antioxidante

promovido pelo BHT. Os extratos de bagaço de laranja obtidos por ESC a 250 bar e 50 °C apresentaram EC_{50} igual a $481 \pm 8 \%$, $414 \pm 6 \%$ e $403 \pm 22 \%$, para adição de 2 %, 5 % e 8 % de etanol, respectivamente. Observando-se os resultados da Tabela 20, nota-se que existe uma tendência ao aumento significativo da atividade antioxidante com o aumento da quantidade de co-solvente utilizada, passando de $51,2 \pm 0,6 \%$ (2 % de etanol) para $61 \pm 1 \%$ (8 % de etanol). Quando comparados às extrações convencionais, estes valores se equiparam aos extratos obtidos por Soxhlet e ultrassom, com diclorometano e acetato de etila em ambas as técnicas. Este comportamento evidencia que as técnicas que mais favoreceram a solubilização de compostos com atividade antioxidante, detectados pelo método DPPH, foram as que utilizaram solventes de polaridade intermediária na extração.

Quando os valores de atividade antioxidante e EC_{50} são relacionados com temperatura e pressão, não é encontrada uma tendência definida para aumento ou redução destes valores, ocorrendo variações aleatórias. Por exemplo, para 40 °C, quando se aumenta a pressão de 100 bar para 300 bar, a atividade antioxidante é reduzida e o EC_{50} é aumentado. Já para o mesmo aumento de pressão à temperatura de 50 °C, o % AA aumenta até 200 bar e reduz a partir desta até 300 bar. Este comportamento pode estar relacionado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, fazendo com que, também, ocorram variações no potencial antioxidante. Este resultado indica que o aumento da pressão, para a temperatura de 40 °C e, conseqüentemente, da densidade do fluido supercrítico, diminuiu a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante presentes nos extratos de bagaço de laranja. A utilização de etanol como co-solvente forneceu melhores resultados de concentração eficaz quando comparado ao CO₂ puro na mesma condição (Tabela 20).

Quando ocorre a diminuição desta atividade com o aumento da temperatura, há indícios de que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante podem ter sofrido degradação térmica com o aumento da temperatura (HU; HU; XU, 2005).

Jayaprakasha, Girenavar e Patil (2008) estudaram a atividade antioxidante pelo método DDPH para laranja e pomelo. Os autores relataram que os resultados encontrados para os extratos de Soxhlet com casca de laranja liofilizada, utilizando hexano e acetato de etila como solventes, foram 65 % e 79 %, respectivamente. Comparando estes

resultados com o presente trabalho, o valor obtido para o Sox-EtOAc está de acordo com os autores, enquanto o extrato Sox-Hx difere do valor da literatura.

No trabalho de Kang et al. (2006) os valores encontrados para atividade antioxidante frente ao radical DPPH para extratos aquosos de pó de casca de laranja foram de $41,5 \pm 2,82 \%$ a $44,3 \pm 3,67 \%$, resultados estes ligeiramente maiores que o obtido neste trabalho para UE-H₂O ($39 \pm 1 \%$).

5.4.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico

A Tabela 21 apresenta os valores obtidos para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos em percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação, para os extratos de bagaço de laranja, BHT e óleo comercial.

No método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, o β -caroteno sofre descoloração na ausência de um composto antioxidante, resultando na redução da leitura espectrofotométrica da absorbância da solução, num dado tempo de reação. Isto ocorre devido à formação de radicais livres a partir da oxidação do β -caroteno e do ácido linoléico. Para as técnicas a baixa pressão os melhores resultados de % AA pelo método do β -caroteno/ácido linoléico foram obtidos para as extrações com Soxhlet e ultrassom utilizando hexano e diclorometano, conforme a Tabela 21. Visto que esta técnica é adequada a sistemas de polaridade baixa, estes resultados indicam que os compostos antioxidantes detectados nos extratos citados são preferencialmente apolares devido à baixa polaridade dos solventes utilizados nas extrações.

A mesma relação entre alta atividade antioxidante detectada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e baixa polaridade dos extratos pode ser observada na tecnologia supercrítica utilizando CO₂ puro. Como pode ser observado na Tabela 21, quase todas as condições empregadas apresentaram atividade antioxidante elevada, com destaque à condição de ESC a 200 bar e 50 °C ($110 \pm 3 \%$) que não difere estatisticamente, pelo Teste de *Tukey*, do BHT ($113 \pm 7 \%$). A segunda melhor condição encontrada para ESC foi a de 150 bar e 50 °C, com valor igual a $95 \pm 4 \%$. Para as outras condições de temperatura e

pressão empregadas, a atividade antioxidante variou de $22 \pm 5 \%$ a $92,5 \pm 0,2 \%$.

Tabela 21: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de laranja, BHT e óleo comercial através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação.

Extração	Solvente	% AA (120 min) ⁽¹⁾
Sox	Hx	66 ^{jk} \pm 1
Sox	DCM	70,4 ^{hijk} \pm 0,8
Sox	EtOAc	63 ^{jk} \pm 2
Sox	EtOH	28 ^{mn} \pm 2
Sox	H ₂ O	16 ⁿ \pm 2
UE	Hx	78 ^{defgh} \pm 1
UE	DCM	62 ^k \pm 1
UE	EtOAc	31 ^m \pm 4
UE	EtOH	48 ^l \pm 2
UE	H ₂ O	26 ^{mn} \pm 2
HD	H ₂ O	NT
ESC 40 °C/100 bar	CO ₂	84,4 ^{bedefg} \pm 0,3
ESC 50 °C/100 bar	CO ₂	22 ^{mn} \pm 5
ESC 40 °C/150 bar	CO ₂	71,6 ^{ghijk} \pm 0,8
ESC 50 °C/150 bar	CO ₂	95 ^b \pm 4
ESC 40 °C/200 bar	CO ₂	82 ^{cdefgh} \pm 4
ESC 50 °C/200 bar	CO ₂	110 ^a \pm 3
ESC 40 °C/250 bar	CO ₂	77 ^{efghi} \pm 2
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂	90 ^{bcd} \pm 3
ESC 40 °C/300 bar	CO ₂	88 ^{bcdef} \pm 3
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂	88 ^{bcde} \pm 2
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 2 % EtOH	70 ^{hijk} \pm 5
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 5 % EtOH	75 ^{fghij} \pm 2
ESC 50 °C/250 bar	CO ₂ + 8 % EtOH	63 ^k \pm 3
ESC 50 °C/250 bar (Recuperado)	CO ₂ + EtOH	92,5 ^{bc} \pm 0,2
Óleo comercial	-	17 ⁿ \pm 4
BHT	-	113 ^a \pm 7

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).
NT: Não testado.

Quando é analisada a variação da atividade antioxidante em função da pressão de ESC para uma mesma temperatura, nota-se que não ocorrem grandes mudanças com o aumento da pressão, uma vez que os resultados foram bastante semelhantes entre si, exceto para a

condição de 100 bar e 50 °C. Porém quando se considera a variação de temperatura, em uma condição isobárica, o aumento da temperatura de 40 °C para 50 °C melhora atividade antioxidante do extrato. Este resultado sugere que o aquecimento da solução, durante a realização do ensaio de atividade antioxidante ou a elevação da temperatura durante o processo de extração, não causa a redução da atividade antioxidante, o que é bastante útil no processamento de alimentos (KANG et al., 2006). As propriedades antioxidantes dos alimentos durante seu processamento com aplicação de temperaturas brandas podem permanecer inalteradas ou até mesmo aumentar devido à formação de compostos com maior potencial antioxidante ou pró-oxidante. Ainda, no processamento térmico, a redução das propriedades antioxidantes dos compostos naturalmente presentes no alimento são minimizadas pela formação de produtos da reação de Maillard, que exibem forte atividade antioxidante (NICOLI; ANESE; PARPINAL, 1999).

Nas extrações supercríticas adicionadas de co-solvente (etanol) ocorre um aumento no potencial antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico de $70 \pm 5 \%$, quando é utilizado 2 % de etanol, para $75 \pm 2 \%$, com 5 % de etanol, embora essa elevação não seja diferente estatisticamente, ao nível de 5 % de significância. Porém, quando a quantidade do co-solvente é aumentada para 8 %, a atividade antioxidante diminui para $63 \pm 3 \%$. Isto significa que em concentrações acima de 5 % de EtOH a extração de compostos polares diminui devido à redução do efeito do etanol como co-solvente na mistura supercrítica (CAMPOS et al., 2008).

Os resultados obtidos quando foram utilizados diferentes concentrações de EtOH como co-solvente (0 %, 2 %, 5 % e 8 %) apresentaram um aumento no rendimento da ESC com o aumento da concentração aplicada (Tabela 21) devido a modificações nas características da mistura supercrítica (CO₂ + etanol). A concentração de co-solvente afeta o processo supercrítico, provavelmente baseado em dois principais fatores (MORRISON; BOYD, 1996; CAMPOS et al., 2008): (1) o aumento na concentração de etanol pode induzir a saturação do CO₂ com conseqüente formação de duas fases, para uma mesma condição específica de pressão e temperatura do sistema; (2) ao efeito do etanol, isto é, as pontes de hidrogênio são formadas entre moléculas de etanol e entre as moléculas polares do soluto. Para a solubilização do soluto, as pontes de hidrogênio precisam ser formadas entre o etanol e o soluto. Quando o etanol está presente em excesso na mistura, não há

energia suficiente para separar as moléculas de etanol, causando a uma menor solubilização de algumas moléculas do soluto com atividade antioxidante, reduzindo sua extração.

O óleo comercial testado apresentou atividade antioxidante pouco significativa ($17 \pm 4 \%$) sendo apenas comparável aos resultados obtido por Sox-H₂O ($16 \pm 2 \%$); Sox-EtOH ($28 \pm 2 \%$); UE-H₂O ($26 \pm 2 \%$) e ESC a 100 bar e 50 °C ($22 \pm 5 \%$), indicando que possivelmente apresenta em sua composição baixa incidência de compostos apolares.

De acordo com Duarte-Almeida et al. (2006), em estudo realizado com extratos metanólicos de açaí, acerola, morango e amora verificaram que amora e açaí possuíam atividade antioxidante determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico de 55 % e 65 %, respectivamente. Porém, quando estes mesmo extratos foram avaliados frente ao radical DPPH, a acerola apresentou o melhor resultado. Da mesma forma, quando os extratos de bagaço de laranja foram avaliados pelos métodos DPPH e β -caroteno/ácido linoléico neste trabalho, percebe-se que os compostos que apresentaram melhor atividade antioxidante por uma metodologia não foram os mesmos na outra, indicando que os extratos de bagaço de laranja apresentam antioxidantes de diferentes polaridades e grupos químicos.

5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

5.5.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A atividade antibacteriana dos extratos de bagaço de laranja obtidos por diferentes técnicas de extração foi determinada pela técnica da microdiluição em meio líquido (ÁVILA et al., 2008), frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e os resultados estão apresentados na Tabela 22.

De forma geral, não há um consenso sobre o nível aceitável de inibição de extratos quando comparado com padrões. De acordo com Sartoratto et al. (2004), Duarte et al. (2007) e Wang et al. (2008) é possível classificar os materiais como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de CMI apresentado pelos seus extratos. Comumente, a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 $\mu\text{g/mL}$; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e fraco inibidor para CMI acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$ (MICHELIN et al., 2009).

Observando os resultados da Tabela 22, os extratos testados contra *S. aureus* que apresentaram as concentrações mais baixas para

Tabela 22: Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os extratos de bagaço de laranja e para o óleo comercial determinados pelo método de microdiluição para *S. aureus* e *E. coli*.

Extrato/Condição	CMI ($\mu\text{g/mL}$) ⁽¹⁾	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
100 bar/ 40°C	>2.000	>2.000
100 bar/ 50°C	>2.000	>2.000
150 bar/ 40°C	>2.000	>2.000
150 bar/ 50°C	2.000	2.000
200 bar/ 40°C	1.000	2.000
200 bar/ 50°C	500	>2.000
250 bar/ 40°C	2.000	>2.000
250 bar/ 50°C	2.000	>2.000
250 bar/50°C (Recuperado)	1.500	>2.000
300 bar/ 40°C	2.000	>2.000
300 bar/ 50°C	>2.000	>2.000
HD	NT	NT
Sox-EtOH	1.000	2.000
Sox-H ₂ O	>2.000	>2.000
Sox-EtOAc	2.000	2.000
Sox-Hx	1.000	2.000
Sox-DCM	2.000	>2.000
UE-EtOH	2.000	2.000
UE-H ₂ O	>2.000	>2.000
UE-EtOAc	2.000	>2.000
UE-Hx	2.000	>2.000
UE-DCM	1.000	2.000
250 bar/ 50°C + 2 % EtOH	2.000	2.000
250 bar/ 50°C + 5 % EtOH	2000	>2.000
250 bar/ 50°C + 8 % EtOH	2.000	2.000
Óleo comercial	>2.000	>2.000

⁽¹⁾ Os experimentos foram realizados em duplicata, obtidas da mesma diluição testada (resultados coincidentes) e por isso os resultados estão apresentados sem desvio padrão.

NT: Não testado.

CMI foram os obtidos para ESC nas condições de 200 bar e 40 °C (1.000 $\mu\text{g/mL}$); 200 bar e 50 °C (500 $\mu\text{g/mL}$); 250 bar e 50 °C (Recuperado) (1.500 $\mu\text{g/mL}$); e os obtidos pelas extrações a baixa pressão com Soxhlet, com etanol (1.000 $\mu\text{g/mL}$) e hexano (1.000

$\mu\text{g/mL}$), e por ultrassom, empregando diclorometano ($1.000 \mu\text{g/mL}$) como solvente. Classificando estes extratos de acordo com o poder de inibição, todos estes citados pertencem a categoria de moderado inibidor, exceto o extrato obtido por ESC a 200 bar e 50°C , classificado como forte inibidor. Os outros extratos obtidos por ESC e técnicas a baixa pressão apresentados na Tabela 22 recebem a denominação de fraco inibidor.

Os testes com *E. coli* demonstraram que todos os extratos obtidos pelas diferentes técnicas de extração produziram efeitos inibitórios classificados como fracos, uma vez que a CMI apresentou valores iguais ou maiores que $2.000 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 22).

Segundo Boussaada et al. (2008) as propriedades antibacterianas de extratos obtidos a partir de plantas podem estar relacionadas ao conteúdo de sesquiterpenos oxigenados, como por exemplo para a *Rhaponticum acaule*. Alguns destes compostos sesquiterpênicos foram identificados por CG-EM nos extratos de bagaço de laranja (Tabela 22). A atividade bacteriostática dos compostos é relacionada à configuração química destes, à proporção em que estão presentes e às interações entre eles. Gill et al. (2002) e Murrey e Canillac (2002) sugerem que as frações voláteis dos extratos possuem atividade antibacteriana maior do que os compostos majoritários.

Porém, como a maioria dos extratos obtidos neste trabalho apresentaram valores de CMI elevados, ou seja, possuem atividade antimicrobiana baixa, não há justificativa para testá-los contra outras espécies de microrganismos. De acordo com os estudos realizados por Smânia et al. (2003), Johann et al. (2007) e Michielin et al. (2009) a continuidade dos testes com outras espécies de microrganismos é indicada quando o extrato apresenta uma forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, com valores CMI de até $500 \mu\text{g/mL}$.

5.6. Determinação da composição química dos extratos

O Quadro 2 apresenta o percentual relativo dos compostos identificados nos diferentes extratos de bagaço de laranja obtidos pelas técnicas a baixa pressão e com fluido supercrítico. Os extratos foram analisados através de CG-EM conforme procedimento descrito na seção 4.12. A amostra do óleo de laranja comercial (ver item 4.9) também foi analisada pela mesma metodologia e os resultados são comparados no

Quadro 2. Os compostos majoritários presentes em cada amostra foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização das áreas. Os critérios adotados para a escolha dos compostos a serem identificados foram o percentual de área e a confiabilidade na comparação dos CG-EM com os padrões, conforme o item 4.12.

No Apêndice IV, são apresentados os espectros de massas de todos os extratos de bagaço de laranja e do óleo de laranja comercial, os tempos de retenção e os percentuais relativos de cada composto majoritário, correspondentes aos dados de CG-EM.

Os extratos codificados como 6B (Sox-H₂O), 7A (UE-EtOH) e 7B (UE-H₂O) não foram analisados porque não foi possível a solubilização destes em diclorometano (solvente utilizado para a preparação das amostras).

A partir dos dados do Quadro 2 observa-se que foram identificados cinquenta e sete compostos presentes nos diferentes extratos de bagaço de laranja e no óleo comercial analisados. Os principais componentes identificados em termos de percentual de área relativa foram L-limoneno; ácido hexadecanóico (ácido palmítico); ácido oléico; butil benzenesulfonamida, N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida e β -sitosterol. Outros compostos importantes também foram detectados nas amostras analisadas, como *m*-xileno; *p*-xileno; decano; α -aromadendreno; esqualeno; campesterol; sabineno; α -pineno; β -mirceno; linalol; α -sinensal; Z,E- α -farneseno; aromadendreno; L-limoneno e D-limoneno.

No estudo de Mira et al. (1996) foi realizada a extração de óleo de casca de laranja com CO₂ supercrítico, sendo identificados compostos como α -pineno, *p*-mirceno, octanal, linalol, α -terpineol, decanal, valenceno, cariofileno, cardineno, citronelal e D-limoneno. Além disso, os autores relatam a coloração amarela intensa do extrato, indicando a possível presença de compostos flavonóides e/ou carotenóides. Os pigmentos carotenóides encontrados nos extratos, possuem um importante papel para a saúde, não somente pelo valor nutricional como precursor da vitamina A, mas também devido ao potencial antioxidante (HAWTHORNE et al., 1993), sendo também utilizados como corantes em alimentos. A coloração amarela intensa também foi verificada nos extratos obtidos pela ESC neste trabalho, indicando a presença de compostos fenólicos.

Neste estudo, alguns dos compostos encontrados pertencem à classe dos terpenos. Os terpenos são classificados quanto ao número de unidades de isopreno (C_5H_8) presentes em sua estrutura, podendo receber a denominação de monoterpenos (L-limoneno, D-limoneno, sabineno, α -pineno, β -mirceno e linalol), sesquiterpenos (α -sinensal, Z,E- α -farneseno, aromadendreno e α - aromadendreno), diterpenos, sesterpenos, triterpenos (esqualeno) e carotenóides ou tetraterpenos.

Assim, a partir dos resultados apresentados no Quadro 2 observou-se que os extratos de bagaço de laranja contêm diferentes monoterpenos e sesquiterpenos, sendo estes os principais responsáveis pela atividade antibacteriana (KOTAN; KORDALI; CAKIR, 2007). Porém, o extrato de bagaço de laranja obtido a 200 bar e 50 °C, de acordo com a Tabela 22 apresentou forte inibição no crescimento dos microrganismos testados. Dentre os compostos que foram identificados nesta amostra, encontra-se o N-(2-ciano-etil)-benzeno sulfonamida, possivelmente o principal responsável pela atividade antimicrobiana (MORAVIA, 2007). Já na condição a 200 bar e 40 °C, o composto que parece estar relacionado à atividade antibacteriana é o N-butil benzeno sulfonamida, assim como na condição de 250 bar e 50 °C (Recuperado).

Outros extratos que apresentaram atividade inibitória (CMI) para o crescimento microbiano são Sox-EtOH (1.000 μ g/mL), Sox-HX (1.000 μ g/mL) e UE-DCM (1.000 μ g/mL) e, de acordo com os resultados da Tabela 22, estes extratos apresentaram o L-limoneno em sua composição, indicando que este pode ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana detectada. Por outro lado, a atividade biológica de um extrato, como a atividade antibacteriana, não pode ser atribuída à ação de um único componente porque possíveis efeitos de sinergismo entre os componentes podem ter um papel importante na atividade do extrato (ALVAREZ-CASTELLANOS; BISHOP; PASCUAL-VILLALOBOS, 2001).

O estudo de Subba, Soumithri e Rao (1967), Uribe e Pena (1990) e Wilkins, Widmer e Grohmann (2007) avaliou o potencial inibitório do limoneno no crescimento de leveduras. Eles relataram que uma concentração de limoneno de 0,08 a 0,15 % (m/m) em meio líquido é suficiente para que ocorra a inibição. Neste caso, em se tratando do aproveitamento de resíduos industriais, a remoção deste composto é uma importante etapa para a produção de bicompostíveis (etanol) a partir de resíduos de cítricos.

O limoneno é o principal composto extraído do óleo de laranja. De acordo com Mira et al. (1999), a condição ótima de extração com CO₂ supercrítico ocorre a 125 bar e 35 °C, com este composto representando 99,5 % do óleo essencial. Dentre os compostos apresentados na Tabela 23, o L-limoneno foi encontrado em dez das vinte e duas amostras analisadas, com áreas relativas variando de 0,26 % a 73,63 % para a condição de 200 bar e 40°C e extração em Soxhlet com diclorometano, respectivamente. Quando o solvente na extração em Soxhlet foi trocado de etanol para hexano a área relativa aumentou de 5,59 % para 53,36 %. Através destes resultados nota-se uma afinidade do L-limoneno a solventes apolares ou de polaridade intermediária. Quando foi utilizado diclorometano o percentual de área relativa obtido foi de 73,36 %. O mesmo ocorreu para a extração utilizando ultrassom.

Quando a temperatura é avaliada nas extrações a baixa pressão, o rendimento de L-limoneno é maior quando o processo ocorre em uma temperatura mais elevada, como na extração em Soxhlet. Isto pode ser percebido, por exemplo, no aumento da área relativa de 51,92 % (ultrassom) para 73,36 % (Soxhlet), utilizando diclorometano como solvente. O mesmo ocorre quando é utilizado hexano como solvente. Isso pode indicar que a utilização de temperaturas mais elevadas das extrações em Soxhlet diminui a tensão superficial e a viscosidade de solvente, quando comparadas às extrações com ultrassom. Dessa forma, o solvente alcança todos os pontos da matriz sólida, promovendo a solubilização (MARKON et al., 2007).

Para as extrações supercríticas onde o L-limoneno foi identificado, possivelmente o aumento da pressão é inversamente proporcional ao rendimento. Isto é verificado na redução de 1,50 % para 0,26 % na área relativa, quando a pressão foi aumentada de 150 bar para 200 bar, na temperatura de 40° C. Este resultado está de acordo com o observado por Mira et al. (1999), onde na extração de óleo da casca de laranja com CO₂ supercrítico, a quantidade de limoneno extraída aumentou com o aumento da pressão até 150 bar, em uma temperatura de 35°C, e para maiores valores de pressão, a quantidade de limoneno extraída foi reduzida. Já, para o linalol, foi observado um efeito contrário, ou seja, com o aumento da pressão aplicada no processo, a quantidade de linalol diminui até 150 bar e aumentou a partir deste valor, na temperatura de 35°C. Neste estudo, não foi possível verificar a influência da temperatura e da pressão aplicadas nas extrações destes

compostos, já que eles não foram identificados em todas as condições de extração.

O isômero ótico do L-limoneno, conhecido como D-limoneno, foi identificado apenas na condição supercrítica de 300 bar e 50 °C e na amostra de óleo comercial. A nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) correta é R-limoneno e S-limoneno, porém se emprega com mais frequência os prefixos D e L ou α e β . Industrialmente é utilizado para produzir *p*-cimeno por desidrogenação catalítica, principalmente para utilização como solvente industrial de tintas e vernizes, produção de resinas sintéticas e orto-cresol, sendo também utilizado na perfumaria e como fluido térmico (PAKDELA; PANTEAA; ROY, 2001). Nos últimos anos a demanda de D-limoneno tem aumentado muito devido ao seu uso em solventes biodegradáveis, além de ser usado amplamente como componente aromático.

Uma patente americana usa o limoneno, nas formas D e L, via oral no tratamento da Doença ou Síndrome de *Crohn*. A Doença de *Crohn* é uma inflamação crônica do intestino grosso e/ou delgado o que geralmente ocorre em adultos jovens. A dosagem recomendada de limoneno para adultos é de cerca de 400 mg a 1.000 mg, uma vez ao dia, normalmente por um período de 10 a 30 dias, podendo ocorrer variações na dosagem e frequência de acordo com o paciente. Para que o limoneno seja utilizado com esta finalidade, é necessário que este esteja presente na formulação com 98 % a 99 % de pureza (WILKINS, 2006).

Por outro lado, o linalol, importante composto presente nos óleos cítricos, foi encontrado apenas no óleo comercial, obtido por prensagem a frio, indicando que a aplicação de temperatura na extração do óleo favorece a sua volatilização. De acordo com Mira et al. (1999), as condições ótimas de extração do linalol, com CO₂ supercrítico, são 80 bar e 35 °C. Nas extrações realizadas neste trabalho, as condições supercríticas ensaiadas foram em pressões (100 a 300 bar) e temperaturas (40 °C e 50 °C) superiores à relatada na literatura. Outro fator que pode ter contribuído para a não detecção deste composto nas amostras obtidas no LATESC pode estar relacionado ao longo tempo de armazenamento da amostra até a realização da análise por CG-EM

Assim como o linalol, os compostos sabineno; α -pineno e β -mirceno também foram detectados somente na amostra de óleo comercial, indicando que a temperatura e o tipo de processo pode

influenciar na obtenção destes. O β -mirceno é um importante intermediário utilizado na perfumaria para a obtenção de fragrâncias como mentol, citral, citronelol, citronelal, geraniol, nerol e linalol, sendo raramente utilizado de forma direta. Além disto, é um composto instável sob a presença de oxigênio, tendendo à polimerização (FAHLBUSCH et al., 2002).

De acordo com o Quadro 2, os compostos N-(2-ciano-etil)-benzene sulfonamida e N-butil benzeno sulfonamida, pertencentes ao grupo benzeno sulfonamida, foram encontrados apenas nas condições de ESC, podendo ser produtos de degradação de flavonóides que apresentam importante atividade biológica no tratamento de câncer (KIM; GEISSEN; VOLGELPOHL, 1997). Acredita-se que estes compostos orgânicos cíclicos nitrogenados possam atribuir toxicidade aos microrganismos (MORAVIA, 2007). O N-butil benzeno sulfonamida, também é conhecido como Plasthall BSA ou Uniplex 214, um líquido plastificante utilizado na medicina, em tintas para tingimento e de impressão e em plásticos, resinas (*nylon*, poliacetatos e policarbonatos) e na extrusão de poliamidas. Este plastificante contribui para propriedades como a facilidade de usinagem, melhor acabamento, boa estabilidade ao calor a 80 °C, redução na absorção de água e melhor estabilidade (KUMAR et al., 2007).

O ácido hexadecanóico, ou ácido palmítico, possui um tempo de retenção na coluna cromatográfica, de 21,094 minutos e é formado por uma cadeia apolar de 16 carbonos com ligações simples, o que confere maior polaridade a sua molécula quando comparado com outros ácidos graxos, principalmente os insaturados. Esta afirmação justifica a maior extração deste quando são utilizados solventes com maior polaridade, como pode ser verificado na Tabela 13, onde os maiores rendimentos nas extrações a baixa pressão foram obtidos com acetato de etila, tanto por Soxhlet (21,40 %) quanto por ultrassom (22,95 %). A obtenção do ácido palmítico com fluido supercrítico apresenta uma tendência à diminuição do percentual relativo de área com o aumento da temperatura, enquanto que a pressão aparentemente não tem influência. Quando o CO₂ é adicionado de etanol, nota-se que o aumento da quantidade de co-solvente aumenta o rendimento, mais uma vez indicando a afinidade do ácido palmítico por solventes de polaridade intermediária.

Um componente importante encontrado em algumas amostras analisadas foi o β -sitosterol, um composto indicado para o tratamento de muitas doenças como aterosclerose, hiperplasia benigna de próstata e câncer de cólon (NAIR; KANFER; HOOGMARTENS, 2006; YOKOTA et al., 2006). O β -sitosterol é um fitoesterol (esterol de plantas) com 29 átomos de carbono em sua estrutura, proveniente do estigmasterol, um composto triterpênico. Sozinho ou em combinações com outros fitoesteróis semelhantes, o β -sitosterol reduz os níveis de colesterol do sangue e inibe sua absorção no intestino (MATSUOKA, 2008). No presente estudo, este composto foi encontrado em amostras obtidas por ESC nas condições de 100 bar e 50 °C (5,89 %), 250 bar e 50 °C (1,20 %), 300 bar e 50 °C (2,01 %) e 250 bar, 50 °C e 8 % de EtOH (5,97 %), além de Sox-EtOAc (6,74 %) e UE-DCM (12,91 %). A partir destes resultados observa-se que o β -sitosterol apresenta afinidade por solventes de polaridade intermediária.

Outros compostos de importância como o α -sinensal e o Z,E- α -farneseno foram encontrados na amostra obtida a 200 bar e 40 °C. O Z,E- α -farneseno é uma das formas isoméricas do α -farneseno, encontrado no revestimento de maçãs e outras frutas, sendo responsável pelo odor característico de maçã verde, além de possuir efeito bacteriostático em microrganismos (SOBOTNÍK et al., 2008).

O linolato de etila e o esqualeno foram obtidos a 100 bar e 50 °C. O primeiro é um composto utilizado na indústria de cosméticos, para melhorar a estabilidade e absorção de produtos pela pele, e em produtos de higiene pessoal. O segundo é importante na síntese do colesterol, hormônios e vitamina D, sendo também utilizado em cosméticos e produtos de higiene pessoal e, mais recentemente, em vacinas (POLLACK, 2009).

A análise por CG-EM mostrou ser uma forte ferramenta na identificação dos compostos de extrato de bagaço de laranja obtidos em diferentes condições. Entretanto, o uso de outros métodos, como HPLC, poderia detectar a presença de outras substâncias com maior polaridade, não verificadas aqui pela análise de CG realizada.

6. CONCLUSÃO

O uso do bagaço de laranja como matéria-prima para a obtenção de extratos é promissor devido à elevada qualidade dos compostos que permanecem presentes neste resíduo industrial. Os diferentes métodos de extração empregados para obtenção do extrato de bagaço de laranja mostraram que, em termos de rendimento, os extratos obtidos por ESC apresentaram valores inferiores aos das extrações com Soxhlet e ultrassom. Os melhores resultados de rendimento para ESC foram obtidos nas condições a 300 bar/40 °C, 300 bar/50 °C e para a condição adicionada de 8 % de etanol como co-solvente, onde o rendimento da extração aumentou aproximadamente 2 vezes, enquanto que para as extrações a baixa pressão foram obtidos por Soxhlet com água e etanol e por ultrassom com água.

O uso de co-solvente na extração supercrítica não favoreceu a melhoria do potencial antimicrobiano dos extratos, uma vez que este estudo mostrou que o extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 50 °C apresentou-se como o mais efetivo contra *S. aureus*, sendo classificado como forte inibidor, em concentração mínima inibitória igual a 500 µg/mL.

Os diferentes mecanismos de ação antioxidante mostraram a importância da ESC na obtenção de extratos bioativos. Nos ensaios realizados para a determinação do teor de fenólicos total do extrato de bagaço de laranja, os melhores extratos foram obtidos por ESC a 300 bar/40 °C, seguidos das extrações a 300 bar/50 °C e 250 bar/50 °C, com 2 %, 5 % e 8 % de etanol como co-solvente. As extrações a baixa pressão que tiveram os resultados mais expressivos para compostos fenólicos foram as que utilizaram etanol, diclorometano e acetato de etila como solvente, tanto para Soxhlet quanto para ultrassom. No ensaio do radical DPPH as frações obtidas nas extrações em Soxhlet com acetato de etila e ultrassom com acetato de etila e diclorometano apresentaram bom poder antioxidante, assim como as extrações supercríticas adicionadas de co-solvente. Quando o potencial antioxidante foi avaliado pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico os melhores resultados foram encontrados para a maioria das condições de ESC, sem adição de co-solvente, com destaque para a condição de 200 bar/50 °C.

É importante salientar que cada método de extração tem uma especificidade e, como apresentado neste trabalho, a ESC mostrou-se como uma técnica de destaque para obtenção de compostos com atividade antioxidante, obtendo valores comparáveis ao padrão BHT e superiores ao óleo comercial obtido por prensagem a frio. Dentre os compostos presentes nos extratos de bagaço de laranja, os principais componentes identificados em termos de percentual de área relativa foram L-limoneno, ácido hexadecanóico (ácido palmítico), ácido oléico; butil benzenesulfonamida, N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida e β -sitosterol. Maiores avaliações são necessárias para a identificação e quantificação de outros compostos com atividade biológica presentes nos extratos, assim como verificar a contribuição de cada composto individual na atividade antioxidante total. Também, é importante salientar que a atividade biológica de um extrato pode ser atribuída a possíveis efeitos de sinergismo entre os componentes. Estes aspectos aqui relatados colocam este estudo como um importante ponto inicial para análise deste material vegetal.

O estudo da cinética e modelagem matemática do processo de ESC é uma importante ferramenta para o ajuste do comportamento da extração, como o tempo total da extração para uma condição específica de temperatura, pressão e vazão de solvente. Neste trabalho os modelos que obtiveram os melhores ajustes aos dados experimentais (menores erros médios quadráticos), dentre os modelos avaliados, foram os modelos de Martínez et al. (2003) e de Goto, Sato, Hirose (1993). A partir deste último modelo, foi observado que o valor obtido para o coeficiente de dessorção (k) indicou a facilidade de recuperar o extrato do interior das partículas do bagaço de laranja, porém não em sua totalidade. Dentre os outros modelos aplicados, o modelo de Sovová (1994) apresentou um bom ajuste somente na etapa CER. Contudo, pode-se verificar pelos dados obtidos por este modelo que o processo de extração do bagaço de laranja apresentou maior influência da convecção em relação ao processo difusivo (maior valor de k_{ya} em relação ao k_{xa}). Estes coeficientes são importantes para o conhecimento dos mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de extração e qual deles apresenta maior influência para um futuro estudo de ampliação de escala.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões relevantes para a continuidade deste trabalho podem ser destacados os seguintes itens:

- a)* Obtenção de extratos de bagaço de laranja empregando matérias-primas com diferentes teores de umidade;
- b)* Determinar a solubilidade experimental do óleo de bagaço de laranja;
- c)* Estudar outras condições de cinética, investigando a influência de parâmetros operacionais, como vazão de solvente, pressão e diâmetro de partícula;
- d)* Avaliar propostas de aumento de escala e viabilidade econômica do processo de ESC para a obtenção de óleo de bagaço de laranja;
- e)* Analisar a influência da adsorção e dessorção no fracionamento do óleo de bagaço de laranja, visando à concentração do óleo;
- f)* Desenvolvimento de um produto alimentício com a aplicação do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC e posterior análise sensorial.

Cabe ressaltar que para o último item mencionado já foi realizado um teste triangular de preferência com extratos de bagaço de laranja obtidos por extração Soxhlet com etanol e ultrassom com água. Foram aplicadas concentrações de 1,5 % e 5 % de extrato em sorvete. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras de sorvete escolhidas foram as que continham 1,5 % de extrato, para os dois tipos de extração. Realizaram-se ainda testes de aceitabilidade e intenção de compra dos produtos e ambos os resultados foram bastante expressivos para as duas amostras, com valores próximos a 89 % para aceitabilidade e 80 % para intenção de compra.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. *Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos*. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: dez. 2008.

ABEROUMAND, A.; DEOKULE, S. S. Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 7(4), p. 582-5, 2008.

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*, v. 62, p. 407-11, 2004.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A.; KEFALA, P.; PAPAGEROGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, v. 94, p. 19-25, 2006.

ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P. C. Ultrasound- assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, v. 82, p. 575-82, 2003

ALMEIDA, P. P. DE; FERREIRA, S. R. S. *Crossover pressure for supercritical fluid extraction of spearmint (Mentha spicata L.) essential oil with pure CO₂ and CO₂ plus ethanol*. In: Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA). Foz do Iguaçu, Caderno de Resumos do PROSCIBA, 2007.

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

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *CEPPA*, v.24(2), p. 319-36, 2006.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. *International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide*. Oxford: Pergamon Press, 1976.

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

ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: teoria e prática*. 2.ed. Viçosa: UFV, 1999. 416p.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 419-21, 2000.

AROMALANDIA. *Óleos essenciais: Métodos de extração*. Disponível em: <<http://www.aromalandia1.hpg.ig.com.br/extracao.htm>>. Acesso em: set. 2008.

ASSELINEAU, L.; BOGDANIC, G.; VIDAL, J. A Versatile Algorithm for Calculating Vapor-Liquid Equilibria. *Fluid Phase Equilibria*, v. 3, p. 273-90, 1979.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v. 89(1), p. 27-36, 2005.

ÁVILA, H.; SMÂNIA, E., MONACHE, F.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Structure activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 9790- 9794, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99(1), p. 191-203, 2006.

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

BE-JEN, W.; YEN-HUI, L.; ZER-RAN, Y. Supercritical fluid extractive fractionation: study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chemistry*, v.86 (2), p. 237-43, 2004.

BELAJOVÁ, E.; SUHAJ, M. Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography. *Food Chem.*, v. 86, p. 339-43, 2004.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 45(12), p. 4505-15, 1997.

BERNARDO-GIL, M. G.; RIBEIRO, M. A.; ESQUÍVEL, M. M. Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, v. 73, p.14-21, 2002.

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.

BOCCO, A.; CUVELIER, M.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46(6), p. 2123-9, 1998.

BOUSSAADA, O., AMMAR, S., SAIDANA, D., CHRIAA, J., CHRAIF, I., DAAMI, M., HELAL, A. N., MIGHRI, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiological Research*, v. 163, p. 87-95, 2008.

BRADDOCK, R. J. Quality of citrus specialty products: dried pulp, peel oils, pulp-wash solids, dried juice sacs. *Citrus Nutrition Quality*, v. 143, p 273-88, 1980.

BRADDOCK, R.J. Importance of byproducts to citrus juice processing. *Fruit Processing*, v. 14(5), p. 310-3, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, v. 28, p. 25-30, 1995

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, v. 56(11), p. 317-33, 1998.

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

BYERS, J. A. *Phenomex catalogue*. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>. Acesso em: dez. 2009.

CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 163-70, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. , V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8413-20, 2008.

CARDOZO-FILHO, L.; WOLFF, F.; MEIRELES, M. A. A. High pressure phase equilibrium: prediction of essential oil solubility. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 17(4), 1997.

CARVALHO JÚNIOR, R. *Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo*. Campinas: UNICAMP, 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; MARTÍNEZ, E. DE LA OSSA. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *J. of Supercritical Fluids*, v. 41, p.43-9, 2007.

CHUNG, H. S.; CHANG, L. C.; LEE, S. K.; SHAMON, L. A.; VAN BREEMEN, R. B.; MEHTA, R. G.; FARNSWORTH, N.R.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Flavonoid constituents of

chorizantho diffusa with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 47, p. 36-41, 1999.

CONAMA. Ministério do Meio Ambiente. *Conferência das Nações Unidas sobre meio-ambiente e desenvolvimento*. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/agenda21/_arquivos/cap21.pdf>. Acesso em: dez. 2007.

CORAZZA, S. R. *Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros*. SENAC: São Paulo, 2002.

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

CORTESI, A.; KIKIC, I.; ALESSI, P.; TURTOI, G.; GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. *J. of Supercritical Fluids*, v. 14 (2), p. 139-44, 1999.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*, v. 12, p. 564-82, 1999.

CRANK, J. *The mathematics of diffusion*. Oxford: Clarendon Press, 1975. 85p.

DANIELSKI, L. Extraction and fractionation of natural organic compounds from plant materials with supercritical carbon dioxide. Hamburgo: TUHH, 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Institut für Thermische Verfahrenstechnik, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2007.

DAVIES, K. J., A. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochemistry Society Symposium*, v. 61, p.1-31, 1994.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 2441-69, 2006.

DONELIAN, A. *Extração do óleo essencial de Patchouli Pogostmon cablin (blanco) benth utilizando dióxido de carbono supercrítico*. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

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

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 26(2), p. 446-52, 2006.

EASTWOOD, M. A. Dietary fibre and risk of cancer. *Nutrition Reviews*, v. 45(7), p. 193-8, 1987.

EMBRAPA. *Embrapa mandioca e fruticultura: Sistema de produção de citros para o Nordeste - Sistema de Produção 16*. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/processamento.htm>>. Acesso em: fev. 2010.

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *Journal of Supercritical Fluids*. v.16, p. 43-58, 1999.

FAHLBUSCH, K.; HAMMERSCHMIDT, F.; PANTEN, J.; PICKENHAGEN, W.; SCHATKOWSKI, D.; BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. *Flavors and Fragrances*. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; FERNÁNDEZ-GINÉS, J. M.; SENDRA, L.A. E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 176-85, 2004.

FERREIRA, S. R. S. *Extração com dióxido de carbono líquido subcrítico de óleo essencial de pimenta-do-reino*. Campinas: UNICAMP, 1991. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1991.

FERREIRA, S. R. S. *Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino*. Campinas: UNICAMP, 1996. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

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

FERREIRA, 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. 263-9, 2002.

FLÉGNER, F. L. Aromaterapia para iniciantes. Disponível em: <<http://www.laszlo.ind.br/>> Acesso em: fev. 2010.

FUCHS, C. S.; GIOVANNUCCI, E. L.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J.; STAMPFER, M. J.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; WILLET, W. C. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *England Journal Medical*, v. 340, p. 169-76, 1999.

GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 25(3), p. 247-60, 2003.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int J Food Microbiol.*, v. 73, p. 83-92, 2002.

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

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T.; Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. n. 26, p. 401-407, 1993.

GROHMANN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 54, p. 129-41, 1995.

HALLFRISCH, J.; SCHOLFIELD, D. J.; BEHALL, K. M. Diets containing soluble oat extracts improve glucose and insulin responses of moderately hypercholesterolemic men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, p. 379-84, 1995.

HAWTHORNE, S. B.; RIEKKOLA, M. L.; SERENIUS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R.; HARTONEN, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *J. of Chromatography A*, v. 634, 297-308, 1993.

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

HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GOTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. *Journal of Chromatography*, v. 776, p. 233-43, 1997.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*, v.63, p. 2-10, 1997.

HU, Q.; HU, Y.; XU, J. Free radical-scavenging activity of Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*. v. 91, p. 85-90, 2005.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201001_5.sht>. Acesso em: fev. 2010.

ITDG. Intermediate Technology Development Group. *Fruits Wastes Utilization*. 2006. Disponível em: <http://www.itdg.org/docs/technical_information_service/fruit_waste_utilisation.pdf#search=%22wastes%20fruits%22>. Acesso em: fev. 2010.

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 em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

JAYAPRAKASHA, G. K.; GIRENNAVAR, B.; PATIL, B. S. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT*, v. 41, p. 376-84, 2008.

JEONG, S.; KIM, S.; KIM, D.; JO, S.; NAM, K.; AHN, D.; LEE, S. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peel. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52(11), p. 3389-93, 2004.

JOHANN, S. Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. Florianópolis: UFSC, 2003. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, V. L.; PIZZOLATTI, M. G.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Antimicrobiana activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102(6), p. 681-5, 2007.

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.

KANG, H. J.; CHAWLA, S. P.; JO, C.; KWON, J. H.; BYUN, M. W. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 614-20, 2006.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 36(7), p. 703-25, 2001.

KESTERSON, J. W.; BRADDOCK, R. J. By-products and specialty products of Florida citrus. *Bull. Agric. Exp. Stn. (Florida)*, v. 784, 119. 1976.

KIM, S. M.; GEISSEN, S. U.; VOLGELPOHL, A. Landfill leachate treatment by a photoassisted Fenton reaction. *Water Science and Technology*, v. 35 (4), p. 239-49, 1997.

KITZBERGER, C. S. G. *Obtenção de extrato de cogulemo Shiitake (Lentinula edodes) com CO₂ a alta pressão*. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

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

KNOWLES, D. E.; RICHTER, B. E.; WYGANT, M. B.; NIXON, L.; ANDERSEN, M. R. Supercritical fluid chromatography: A new technique for Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). *Journal AOAC*, v. 71(3), p.451-7, 1988.

KOTAN, R.; KORDALI, S.; CAKIR, A. Screening of antibacterial activities of twenty one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch.C* , v.62, p. 507-514, 2007.

KUMAR, G.; SMITH, Q. R.; HOKARI, M.; PAREPALLY, J.; DUNCAN, M. W. Brain uptake, pharmacokinetics an tissue distribution in the rat of neurotoxic N-butylbenzenesulfonamide. *Toxicological Sciences*, v. 97(2), p. 253-64, 2007.

LEAL, P. A. *Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais do óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste de vapor*. Campinas: UNICAMP,

2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, v. 37, p. 731-8, 2004.

LIMA, E. O. *Plantas e suas propriedades antimicrobianas: Uma breve análise histórica*. In: Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó, p. 481-502, 2001.

LOULI, V.; RAGOUSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology*, v. 92(2), p. 201-8, 2004.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22(1), p. 41-7, 2003.

LUTERMANN, C.; WILLEMS, E.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Effects on various binary and ternary supercritical phases on the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, v. 816, p. 201-11, 1998.

MA, E.; CERVERA, G.; MEIJÁ SÁNCHEZ, J. M. Integrated utilization of orange peel. *Bioresource Technolgy*, v. 44, p. 61-3, 1993.

MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 5682-90, 2008.

MARKON, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, v. 52, p. 487-96, 2007.

MARQUES, D. S. *Desterpenação de Óleo Essencial de Laranja por Cromatografia Preparativa de Fluido* Campinas: UNICAMP, 1997.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Industrial Engineering of Chemistry Research*, v. 42, p. 1057-63, 2003.

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

MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros: principais informações e recomendações de cultivo*. 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>. Acesso em: fev. 2010.

MASON, T. J.; PANIWNKYK, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 3, p. S253-60, 1996.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50(12), p. 3444-52, 2002.

MATSUOKA, K.; NAKAZAWA, T.; NAKAMURA, A.; HONDA, C.; ENDO, K.; TSUKADA, M. Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. *Chem. Phys. Lipids*, v. 154, p. 87-93, 2008.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos, situação atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 2(11), p.42-6, 1999.

MAXIMATOR. High pressure technology, hydraulics, pneumatics and testing equipment. Disponível em: <<http://www.maximator.de/flycms/en/screen/23/-/Documents.html>>. Acesso em: fev. 2010.

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

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

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

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *J. of Supercritical Fluids*, v. 51, p. 10-6, 2009.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresource Technology*, v.101(14), p. 5622-32, 2010.

MICHIELIN, E. M. Z. *Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (Equisetum arvense)*. Florianópolis: UFSC, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

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

MICHIELIN, E. M. Z. *Obtenção de extrato de erva baleeira (Cordia verbenacea D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade*

biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases. Florianópolis: UFSC, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresourse Technology*, v. 100, p. 6615-23, 2009.

MIGUEL, A.; ANDRADE, J. B.; Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 35, p. 35-41, 1989.

MIRA, B.; BLASCO, M.; SUBIRATS, S.; BERNA, A. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. *J. of Supercritical Fluids*, v. 9(4), p. 238-243, 1996.

MIRA, B.; BLASCO, M.; BERNA, A.; SUBIRATS, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, v.14, p. 95-104, 1999.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. 6. ed. USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 643p.

MORAVIA, W. G. *Estudos de caracterização, tratabilidade e condicionamento de lixiviados visando tratamento por lagoas*. Belo Horizonte, UFMG, 2007. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

MORRISON, R.; BOYD, R. *Química orgânica*. 7. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. 1510p.

MOURREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, v. 13, p. 289-92, 2002.

MUKHOPADHYAY, M. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Flórida: CRC Press LLC, 2000. 339p.

NAIR, V. D. P.; KANFER, I.; HOOGMARTENS, J. Determination of stigmaterol \square -Sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 731-7, 2006.

NICOLI, M.C., ANESE, M., PARPINAL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 10, 94–100, 1999.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 5.ed., 2003, Porto Alegre/Florianópolis, Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 29-43.

NUNES, F. M. N.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa. *Química Nova*, v. 23(6), p. 794-804, 2000.

PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., ROSAS-ROMERO, A., FLERLAGE, N., BURILLO, J., CODINA, C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6882–90, 2002.

PAKDELA, H., PANTEAA, D.; ROY, C. Production of dl-limonene by vacuum pyrolysis of used tires. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 57(1), p. 91-107, 2001.

PEKER, H.; SRINIVASAN, M. P.; SMITH, J. M.; MCCOY, B. J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. *AIChE J.*, v. 38, p. 761-70, 1992.

PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw material for the flavor and perfume industry. *Perfumer and Flavorist*, v.16, p. 37-9, 1991.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Technol. Manag. Innov.*, v. 2 (1), p. 118-27, mar. 2007.

PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications: Industrial development and economic issues. In: *Proceedings of the 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering*, 2001, Hamburg, Germany, CD-ROM, 2001.

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

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering.*, v. 77, p. 57-63, 2006.

PLATZ, E. A.; GIOVANNUCCI, E.; RIMM, E. B.; ROCKETT, H. R. H.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C. Dietary fiber and distal colorectal adenoma in men. *Cancer Epidemiological Biomarkers Prevention*, v. 6, p. 661-70, 1997.

POLLACK, A. Benefit and Doubt in Vaccine Additive, *The New York Times*, 21 set. 2009.

PORTAL SÃO FRANCISCO. Disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/laranja/laranja-3.php>>. Acesso em: fev. 2010.

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

RAPISARDA, P., TOMAINO, A.; LO CASCIO R.; BONINA, F.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 4718-4723, 1999.

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

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

RGNUTRI. *Identidade e nutrição*. Disponível em: <<http://www.rgnutri.com.br/alimentos/propriedades/laranja.php>>. Acesso em: fev. 2010.

RIVAS, B.; TORRADO, A., TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 2380-7, 2008.

RIVELLESE, A.; RICCARDI, G.; GIACCO, A.; PACIONI, D.; GENOVESE, S.; MATTIOLI, P. L.; MANCINI, M. Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet*, v. 2, p. 447-50, 1980.

RIZVI, S. S. H.; DANIELS, J. A.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. *Food Technology*, v. 40(7), p. 57-64, 1986.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enol. Vitic.* v. 16, p. 144-58, 1965.

ROUSEFF, R. L.; MARTIN, S. F.; YOUTSEY, C. O. Quantitative survey of narirutin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J. Agric. Food Chem.*, v. 35, p. 1027-30, 1987.

RUIZ, A. P. *Extração de glicosídeos da estévia com fluidos pressurizados*. Campinas: UNICAMP, 1999. Tese (Doutorado em

Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. *J. of Supercritical Fluids*. v. 39, p.330-7, 2007.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. *Dietary Tannins: Consequences and Remedies*, CRC Press: Boca Raton, 1989. 200p.

SANTANA, H. B. *Desenvolvimento de uma Metodologia para a Determinação da Solubilidade de Componentes de Óleo Essencial em Dióxido de Carbono*. Campinas: UNICAMP, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

SANTANA, M. F. S.; GASPARETTO, C. A. Microestrutura da fibra alimentar do albedo de laranja: um estudo por técnicas físicas e análises de imagens. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 29(1), p. 124-34, 2009.

SANTOS, A. B.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. *Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - EMBRAPA. Comunicado Técnico, n. 99, ISSN 1517- 2244, Belém, 2004.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35(4), 2004.

SCALIA, S.; GIUFREDDA, L.; PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamolile flowers and its comparison with conventional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 21, p. 549-58, 1999.

SENEVIRATHNE, M.; JEON, Y.; HA, J.; KIM, S. Effective drying of citrus by-product by high speed drying: A novel drying technique and their antioxidant activity. *Journal of Food Engineering*, v.92, p. 157-63, 2009.

SILVA, F. P. T.; LIBERAL, E. M.; PESSOA, F. L. P. Uso do fluido supercrítico na extração de produtos naturais. *SBCTA*, v.31, p.48-61, 1997.

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

SMÂNIA, E. F. A. Esteróis e triterpenos isolados de espécies de *Ganoderma karsten* e sua atividade antimicrobiana. Florianópolis: UFSC, 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SMÂNIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; YUNES, R. A.; CUNEO, R. S. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 375-7, 2003.

SPILLER, G. A. *Suggestions for a basis on which to determine a desirable intake of dietary-fibre*. In: SPILLER, G. A. (Ed.) Handbook of dietary fibre in human nutrition. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 281–283, 1986.

SOBOTNÍK, J.; HANUS, R.; KALINOVÁ, B.; PISKORSKI, R.; CVACKA, J.; BOURGUIGNON, T.; ROISIN, Y. (*E,E*)- α -farnesene, an alarm pheromone of the termite *Prorethra canalifrons*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 478-86, 2008.

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

SOVOVÁ, H.; KUCERA, J.; JEZ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: II. Extraction of grape oil. *Chemical Engineering Science*. v. 49(3), p.415-20, 1994.

SOUSA, E. M. B. D.; MARTÍNEZ, J.; CHIAVONE-FILHO, O.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of volatile oil from *Croton zehntneri* Pax et Hoff with pressurized CO₂: solubility, composition and kinetics. *Journal of Food Engineering*, v. 69 (3), p. 325-33, 2005.

SOUZA, A. T.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L.; GUIRARDELLO, R.; MEIRELES, M. A. A. Phase Equilibrium Measurements for the System Clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂. *J. Chem. Eng. Data*, v. 49, p. 352-6, 2004.

SUBBA, M. S.; SOUMITHRI, T. C.; RAO, R. S. Antimicrobial action of citrus oils. *J. Food Sci.*, v. 32, p. 225-7, 1967.

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

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - Versão II. 2. Ed. Campinas: NEPA-UNICAMP- NEPA-UNICAMP, 2006. 113p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf>. Acesso em: fev. 2010.

TIENNE L.; DESCHAMPS, M. C.; ANDRADE, A.M. Produção de carvão e subprodutos da pirólise da casca e do bagaço de laranja (*Citrus sinensis*). *Biomassa & Energia*, v.1 (2), p.191-7, 2004.

TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U.; Minimização de resíduo na indústria de alimentos. *CEPPA*, v. 18 (2), p. 221-36, 2000.

TODA FRUTA. *Agronegócio citrícola no Brasil*. 2005. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=8600>. Acesso em: dez. 2008.

TOMAS-BARBERAN, F.; ESPIN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food and Agric.*, v. 81, p. 853-876, 2001.

TRIBESS, T.B.; TADINI, C.C. *Suco de laranja natural minimamente processado*: uma alternativa para ampliar o mercado de suco de laranja

no Brasil. 2001. Disponível em: <<http://pq1.poli.usp.br/lea/docs/egna2001.pdf>>. Acesso em: fev. 2010.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatog. B*, v. 812, p. 85-99, 2004.

URIBE, S.; PENA, A. Toxicity of allelopathic monoterpene suspensions on yeast. *J. Chem. Ecol.*, v. 16, p. 1399-1408, 1990.

USDA. United States Department of Agricultur. *National Nutrient Database for Standard Reference – Nutrient Data Laboratory*, Release 22. 2009. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: fev. 2010.

VALE, M. G. R. *Extração de hidrocarbonetos em carvão mineral usando SFE, US e Soxhlet*. Porto Alegre: UFRGS, 1997. Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais), Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

VALERO, M.; RECROSIO, N.; SAURA, D.; MUÑOZ, N.; MARTÍ, N.; LIZAMA, V. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 509-16, 2007.

VALGAS, C. *Avaliação de métodos de triagem para a determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais*. Florianópolis: UFSC, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

VANNOORT, R. W.; CHERVET, J. P.; LINGEMAN, H.; DEJONG, G.; BRINKMAN, U.A. Coupling of supercritical fluid extraction with chromatographic techniques. *J. Chromatog. A*, v. 505, p. 45-77, 1990.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods Plant Biochemistry*, v.6, p. 47-69, 1991.

VELICKOVIC, D. T.; NIKOLOVA, M. T.; IVANCHEVA, S. V.; STOJANOVIC, J. B.; VELIJKOVIC, V. B.; Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinallis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.)

sage by ultrasonic and classical maceration. *J. Serb. Chem. Soc.*, v. 72(1), p. 73-80, 2007.

VERZERA, A.; TROZZI, A.; DUGO, G.; DI BELLA, G.; COTRONEO, A. Biological lemon and sweet orange essential oil composition. *Flavour Frag. J.*, v.19, p. 544-8, 2004.

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

VINATORU, M.; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P. I.; LAZURCA, D.; MASON, T. J. The ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.4, p. 135-9, 1997.

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

XU, G. H.; YE, X. Q.; CHEN, J. C.; LIU, D. H. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 330-5, 2007.

WANG, Y.; HE, H.; YANG, J.; DI, Y.; HAO, X. New Monoterpenoid coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules*, v. 13, p. 931-7, 2008

WEINHOLD, T. S.; BRESCIANI, L. F. V.; TRIDAPALLI, C. W.; YUNES, R. A., HENSE, H., FERREIRA, S. R. S. Polygala cyparissias oleoresin: comparing CO₂ and classical organic solvent extractions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p.109-17, 2008.

WIDMER, W.; ZHOU, W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5242-49, 2010.

WILKINS, J. S. *Method for treating Crohn's disease*. US 7.041.706 B2, 09 mai. 2006.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochem.*, v. 42, p. 1614-19, 2007.

YAMANAKA, H. T. *Sucos cítricos*. Série P+L, São Paulo: CETESB, 2005. 45p. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: fev. 2010.

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

YOKOTA, J.; TAKUMA, D.; HAMADA, A.; ONAGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 467-71, 2006.

ZETZEL, C., MEIRELES, M. A. A., BRUNNER, G. Standardized Lowcost batch SFE-Units for University Education and Comparative Research. Versailles, France, *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, 2003.

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

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 5165-70, 2001.

ZIAKOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, v. 25, p. 3017-32, 2002.

9. APÊNDICES

APÊNDICE I: MODELOS MATEMÁTICOS

APÊNDICE II: DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

APÊNDICE III: CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

APÊNDICE IV: CROMATOGRAMAS E COMPOSTOS IDENTIFICADOS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE LARANJA

APÊNDICE I: MODELOS MATEMÁTICOS

A1. Modelo difusional de Crank (1975)

O modelo de Crank (1975) apresentado por Reverchon (1997) considera a transferência de massa para cada partícula sólida descrita como um corpo quente que perde calor com o tempo para o meio, supondo que as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas na partícula sólida. Neste caso, a partícula sólida esférica é o sólido que contém o óleo a ser extraído e o meio é o solvente supercrítico (REVERCHON, 1997; MEZZOMO, 2008).

Baseado na segunda Lei de Fick para difusão, e resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula, a Equação 11 representa a massa de uma substância que se difunde através de uma partícula (MEZZOMO, 2008).

$$m_{ext} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D t}{r^2}\right) \right] \quad (11)$$

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

A2. Modelo de Goto, Sato e Hirose (1993)

O modelo apresentado por Goto, Sato e Hirose (1993) considera que o leito de extração é formado por partículas com geometria de uma placa plana, com espessura desprezível em relação às demais dimensões. O processo de transferência de massa é controlado pelo mecanismo de dessorção (da partícula para os poros, seguido de difusão do soluto nos poros da partícula) com dois parâmetros ajustáveis: ϕ , relativo ao coeficiente global de transferência de massa e k , constante de equilíbrio de dessorção (MICHIELIN, 2009)

Considerando a solução das equações de balanço de massa na placa, nos poros e na fase fluida, Goto, Sato e Hirose (1993) resolveram o sistema de equações diferenciais analiticamente e obtiveram uma equação para a curva de extração apresentada pela Equação 12.

$$m_{EXT}(h = H_{b,i}) = \frac{A l \frac{\beta}{k} + (1-\beta) l x_0 \rho_s Q_{CO_2}}{\rho} \left\{ \frac{\tau}{a_1} \left[\exp\left(a_1 \frac{t}{\tau}\right) - 1 \right] + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - \exp\left(a_2 \frac{t}{\tau}\right) \right] \right\} \quad (12)$$

$$a_1 = \frac{l}{2} \left(-b + \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (13)$$

$$a_2 = \frac{l}{2} \left(-b - \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (14)$$

$$A = \frac{(1-\varepsilon)\phi}{[\beta + (1-\beta)k] \varepsilon (a_1 - a_2)} \quad (15)$$

$$b = \frac{\phi}{\beta + (1-\beta)k} + \frac{l}{\varepsilon} + \frac{\phi(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (16)$$

$$c = \frac{\phi}{[\beta + (1-\beta)k] \varepsilon} \quad (17)$$

$$\phi = k_p a_p \tau \quad (18)$$

onde b é a porosidade da placa; k é a constante de equilíbrio de dessorção; t é o tempo de residência do solvente no leito (min); $k_f a_p$ é o coeficiente volumétrico de transferência de massa; e é a meia espessura da folha (m); a_p é a área específica de transferência de massa e ε é a porosidade do leito. (MICHIELIN, 2009).

A3. Modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999)

Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) avaliaram três modelos matemáticos para a simulação das curvas de extração de cascas de azeitonas, dois deles baseados no balanço diferencial de massa e um baseado na cinética do crescimento de microrganismos de Monod. A equação empírica que representa a curva de extração aplicada para ajustar o óleo de casca de azeitona está apresentada na Equação 19.

$$m_{ext}(t) = x_0 M \left(\frac{t}{b+t} \right) \quad (19)$$

onde $m_{ext}(t)$, é a massa de extrato em função do tempo (kg); t , é o tempo de extração (min); M , massa de matéria-prima (kg); x_0 razão mássica de

extrato na matéria-prima (kg/kg) e b , um parâmetro ajustável (min) (MEZZOMO, 2008).

A4. Modelo de Placa (SSP) proposto por Gaspar et al. (2003)

O modelo de placa, proposto por Gaspar et al. (2003), considera a transferência de massa na partícula sólida, assim como o modelo proposto por Crank (1975). A diferença entre estes dois modelos está na geometria considerada em cada modelo, ou seja, no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placas, enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas (MEZZOMO, 2008).

O modelo SSP ainda assume que a concentração de soluto na fase fluida é desprezível quando comparada à concentração na fase sólida; a resistência à transferência de massa na fase fluida é desprezada e o balanço de massa na fase fluida é negligenciado (BISCAIA, 2007).

Aplicando a segunda Lei de Fick para a difusão e resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula, a massa de extrato obtida com o tempo é representada pela Equação 20 proposta por Gaspar et al., (2003), com modificação apresentada por Campos et al. (2005) (MEZZOMO, 2008).

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \sum_0^{\infty} \frac{0.8}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-D_m(2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad (20)$$

onde m_{ext} é a massa de extrato (kg); m_0 , é a massa inicial de soluto (kg); D_m , é a difusividade na matriz sólida (m^2/min); t , é o tempo (min); δ , é a meia espessura das partículas (placas) (m) e n é um número inteiro (MEZZOMO, 2008).

A5. Modelo de Martínez et al. (2003)

Os extratos obtidos com tecnologia supercrítica são misturas de vários compostos, tais como terpenos, flavonóides, fenóis, entre outros. Em alguns processos de extração, a meta é a obtenção de um único composto, ou de um grupo específico de compostos presente na matriz. A modelagem destes processos de extração deve levar em conta a

variação da composição do extrato ao longo da extração, de forma que possa ser otimizado o processo para a obtenção dos compostos de interesse (MARTÍNEZ et al., 2003).

O modelo logístico de Martínez et al. (2003) é um modelo aplicado a sistemas multicomponentes, considerando o extrato como um pseudocomponente ou uma mistura de substâncias ou grupos de componentes com estrutura química similar. O modelo é baseado no balanço de massa do leito de extração, e despreza o acúmulo e a dispersão na fase fluida por estes fenômenos não apresentarem influência significativa no processo quando comparado ao efeito de convecção (KITZBERGER, 2005; MEZZOMO, 2008).

Para o balanço de massa, o modelo logístico considera o leito como um cilindro de comprimento H muito maior que o diâmetro, no qual o solvente escoar na direção axial com velocidade U , por uma matéria-prima que está distribuída uniformemente ao longo do leito e a temperatura, a pressão e as propriedades físicas de ambas as fases são mantidas constantes durante toda a extração (MICHIELIN, 2009).

Em princípio, o modelo logístico possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis: A_i , b_i e t_{mi} . Se a composição do óleo tiver sido determinada experimentalmente, é possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos, conforme apresentado na Equação 21:

$$m_{Totali} = \frac{\%m_i}{100} = x_{0i}m_i \quad (21)$$

onde m_i é a massa total de sólidos na coluna de extração (kg); x_0 é a razão mássica inicial de soluto extraível (kg/kg) e m_{Totali} é a massa total de cada grupo de composto (kg) (MICHIELIN, 2009).

Desta forma, o modelo pode ser reduzido a dois parâmetros ajustáveis, b e t_m , e a massa de cada grupo de compostos representada pela Equação 22:

$$m_i(h = H, t) = \frac{x_{0i}m_i}{\exp(b_it_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_it_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad (22)$$

A Equação 23 representa a curva de extração obtida pelo modelo de Martínez et al. (2003) para um único grupo de componentes.

$$m_{\text{Ext}}(h = H, t) = \frac{m_i}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (23)$$

onde h , é uma coordenada axial (m); H , é o comprimento total do leito (m); m_{Ext} , é a massa de óleo extraído (kg); m_i , é a massa total inicial de sólido no leito (kg); t , é o tempo de extração (min), b e t_m , são parâmetros ajustáveis do modelo (min^{-1} e min, respectivamente) (MEZZOMO, 2008).

O parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou o máximo (MICHIELIN, 2009).

A6. Modelo de Sovová (1994) modificado por Martínez e Martínez (2007)

O modelo de Sovová (1994) baseia-se em balanços de massa que consideram o escoamento axial do solvente com velocidade superficial através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. Considera-se que na entrada do extrator o solvente está livre de soluto e a temperatura e pressão de operação são mantidas constantes. O tamanho das partículas e a distribuição do soluto no interior do sólido são consideradas homogêneas e o soluto encontra-se nas células do sólido protegido pela parede celular. Devido à moagem, algumas células apresentam sua parede celular rompida, tornando parte do soluto exposto ao solvente (MEZZOMO, 2008).

O modelo de Sovová (1994) emprega o coeficiente de transferência de massa na fase fluida para descrever o período de taxa de extração constante (CER) e o coeficiente de transferência de massa na fase sólida para descrever a etapa na qual a resistência à transferência de massa é dominada pela difusão. Neste modelo o perfil da concentração do soluto na fase fluida é dividido em três etapas: (a) a primeira etapa considera que o soluto de fácil acesso (x_p), disponível na superfície das partículas sólidas, vai se esgotando ao longo do leito, chamada etapa CER, onde t_{CER} é o final da etapa de taxa de extração constante (min); (b) na segunda etapa, o soluto de fácil acesso se esgota ao longo do leito

inicia-se a extração do soluto de difícil acesso, chamado etapa FER, onde t_{FER} é o final da etapa de taxa de extração decrescente (min); (c) na terceira etapa são retirados os solutos de difícil acesso (x_k) presentes no interior das partículas sólidas, sendo esta etapa denominada etapa difusional e controlada pela resistência interna à transferência de massa (MEZZOMO, 2008).

A curva de extração obtida pelo modelo de Sovová (1994) é representada pelas Equações 24, 25 e 26, com a massa total de extrato obtida na saída do extrator, em função do tempo.

Para $t < t_{CER}$ (período CER):

$$m_{EXT} = Y^* [1 - \exp(-Z)Q_{CO_2} \cdot t] \quad (24)$$

Para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$ (período FER):

$$m_{EXT} = Y^* [t - t_{CER} \cdot \exp(z_w - Z)Q_{CO_2}] \quad (25)$$

Para $t \geq t_{FER}$ (período difusional):

$$m_{EXT} = N \left\langle X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_{CO_2}}{N}\right)(t_{CER} - t)\right] \frac{x_k}{x_0} \right\} \right\rangle \quad (26)$$

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

O valor de Z é dado pela Equação 27:

$$Z = \frac{N \cdot k_{ya} \cdot \rho}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s} \quad (27)$$

onde ρ é a densidade do solvente (kg/m^3) e ρ_s é a densidade das partículas sólidas (kg/m^3).

Nas equações do modelo de Sovová (1994) pode-se dizer que a quantidade Z é um parâmetro para o período CER porque esta quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER (MICHIELIN, 2009).

Para a resolução do modelo de Sovová (1994), é necessário conhecer alguns parâmetros: M_{CER} , taxa de extração na etapa CER (kg/min); Y_{CER} , razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg_{EXTRATO}/kg_{CO2}); t_{CER} , duração da etapa CER (min) (MICHIELIN, 2002; CAMPOS et al., 2002).

O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e, a partir do mesmo, obtêm-se o valor de Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) através da Equação 28:

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad (28)$$

onde Q_{CO_2} é a vazão de solvente (kg/min).

As demais restrições e definições são definidas a pelas Equações 29 a 34:

$$t_{CER} = \frac{x_0 - x_k}{Y^* Z} \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad (29)$$

$$x_p = x_0 - x_k \quad (30)$$

$$x_k = x_0 - x_p \quad (31)$$

$$W = \frac{N \cdot k_{sa}}{Q_{CO_2}(1-\varepsilon)} = k \frac{ZY^*}{x_k} \quad (32)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{W \cdot x_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \cdot \exp[(W \cdot Q_{CO_2}/N)(t - t_{CER}) - x_k]}{x_0 - x_k} \right\} \quad (33)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2}} \ln \left[\frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(Wx_0/Y^*)}{x_0} \right] \quad (34)$$

Os parâmetros k_{xa} e k_{ya} são, respectivamente, os coeficientes de transferência de massa na fase fluida e fase sólida (min^{-1}), sendo definidos pelas Equações 35 e 36:

$$k_{ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} SH \overline{\Delta Y}} \quad (35)$$

$$k_{ya} = \frac{k_{ya} \rho_{CO_2} \overline{\Delta Y}}{\rho_s \Delta X} \quad (36)$$

$$\Delta X = \frac{(x_p + x_k)}{2} \quad (37)$$

$$\overline{\Delta Y} = \frac{Y_{CER}}{\ln \left[\frac{Y^*}{Y^* - Y_{CER}} \right]} \quad (38)$$

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

APÊNDICE II: DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

Tabela 23: Tempos de extração, massas de extrato, massas de extrato acumuladas e rendimentos (X_0) do experimento cinético a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g CO₂/min.

Tempo (min)	Massa (g)	Massa acumulada (g)	X_0 (%)
0	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0036	0,0036	0,0240
10	0,0238	0,0274	0,1822
15	0,0212	0,0487	0,3232
20	0,0165	0,0651	0,4325
25	0,0224	0,0875	0,5812
30	0,0071	0,0946	0,6282
40	0,0160	0,1106	0,7346
50	0,0204	0,1310	0,8699
60	0,0251	0,1561	1,0367
80	0,0442	0,2003	1,3302
100	0,0680	0,2683	1,7819
120	0,0202	0,2885	1,9162
150	0,0105	0,2991	1,9862
180	0,0156	0,3147	2,0898
210	0,0352	0,3499	2,3238
240	0,0241	0,3740	2,4839
300	0,0170	0,3911	2,5971
360	0,0227	0,4137	2,7477
420	0,0191	0,4328	2,8743

A partir da Figura 21, podem ser obtidas as Equações 39 a 41 que apresentam as taxas de extração para cada um dos períodos de extração.

Para $t < t_{CER}$ (período CER):

$$m_{EXT} = 0,0027t \quad (39)$$

$$r^2 = 0,9837$$

Para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$ (período FER):

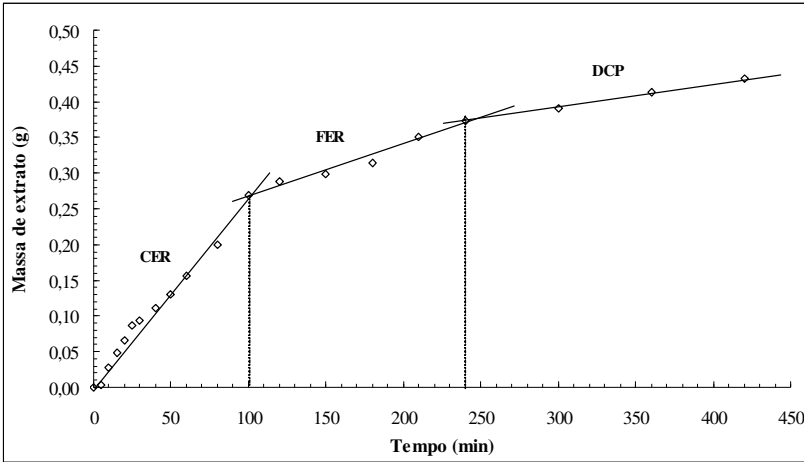
$$m_{EXT} = 0,0007t + 0,1942 \quad (40)$$

$$r^2 = 0,9726$$

Para $t \geq t_{FER}$ (período difusional):

$$m_{EXT} = 0,0003t + 0,2935 \tag{41}$$

$$r^2 = 0,9973$$



CER: Etapa de taxa de extração constante CER (0 - 100 min); FER: Etapa de taxa de extração decrescente (100 - 240 min); DCP: Etapa difusional (> 240 min).

Figura 21: Curva de extração com fluido supercrítico de bagaço de laranja a 200 bar, 40 °C e 17 ± 2 g/min de CO₂.

De acordo com a Equação 28, o valor de Y_{CER} pode ser definido utilizando-se o parâmetro M_{CER} (valor da tangente ao período CER), obtido a partir da Equação 39.

Assim,

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} = \frac{0,0027}{17} = 1,5882 \cdot 10^{-4}$$

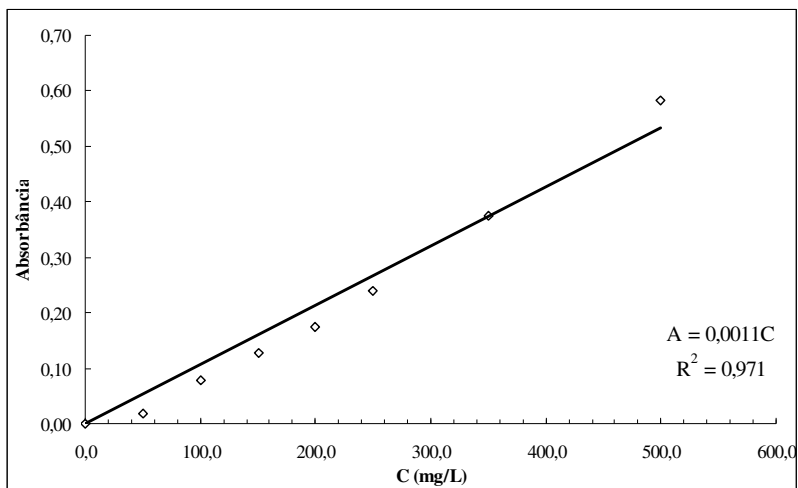
APÊNDICE III: CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Figura 22: Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação do teor de fenólicos total (TFT), a 765 nm.

APÊNDICE IV: CROMATOGRAMAS E COMPOSTOS IDENTIFICADOS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE LARANJA

A1. CG-EM ESC 100 bar/ 40°C

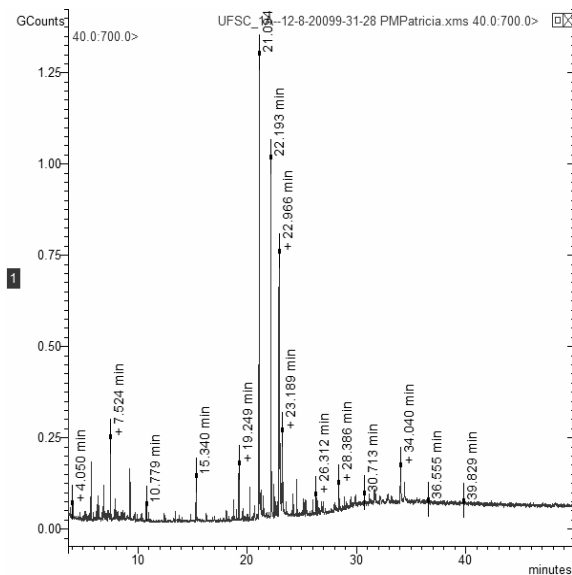


Figura 23: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 40°C.

Tabela 24: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 40°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2,4- dimetil heptano	4,056	0,62
Nonano	5,729	2,31
Decano	7,524	4,29
2,6,8- trimetil decano	9,290	2,12
3-metil-1,6-heptadien-3-ol	15,340	2,43
Ácido n-hexadecanóico (ácido palmítico)	21,094	22,91
Z-9-Hexadecenol	22,192	15,44
Z,Z-9,12-Octadecadien-1-ol	22,908	10,95
Acetato E-9-Tetradecen-1-ol	22,966	13,75
Ácido oléico	23,189	4,40
Outros	-	20,79

A2. CG-EM ESC 100 bar/ 50°C

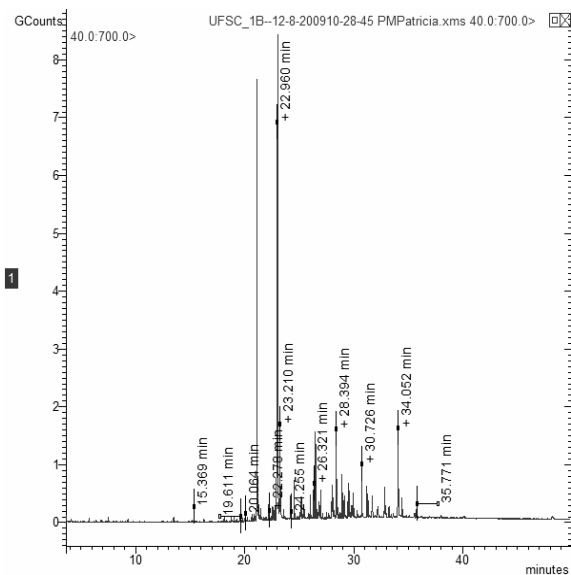


Figura 24: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 50°C.

Tabela 25: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 100 bar e 50°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
3-metil-1,6-heptadien-3-ol	15,364	0,28
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,147	21,24
Ácido 11,14-Eicosadienóico metil éster	22,960	21,80
2-metil-Z,Z-3,13-octadecadienol	23,022	20,77
Ácido oléico	23,210	2,78
2-monopalmitoilglicerol	26,492	3,15
Linolato de etila	28,394	3,46
Esqualeno	28,921	1,44
β-sitosterol	34,052	5,89
Outros	-	19,18

A3. CG-EM ESC 150 bar/ 40°C

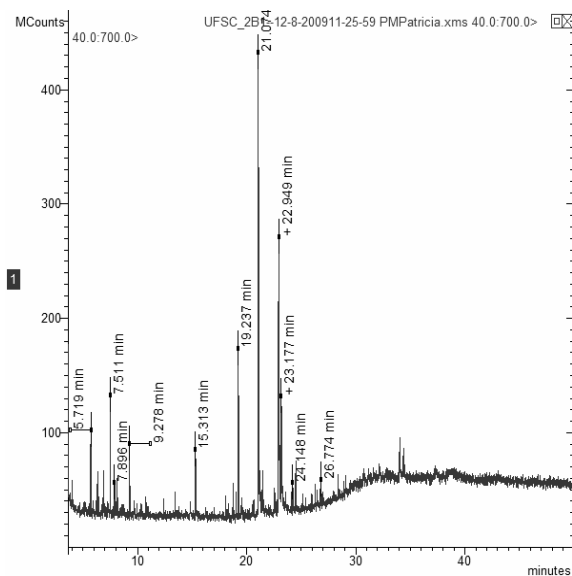


Figura 25: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 40°C.

Tabela 26: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 40°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,719	4,03
Decano	7,511	5,63
L-Limoneno	7,896	1,50
Decano	9,278	3,53
3-metil-1,6-heptadien-3-ol	15,313	3,37
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,237	9,18
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,074	25,79
Outros	-	46,97

A4. CG-EM ESC 150 bar/ 50°C

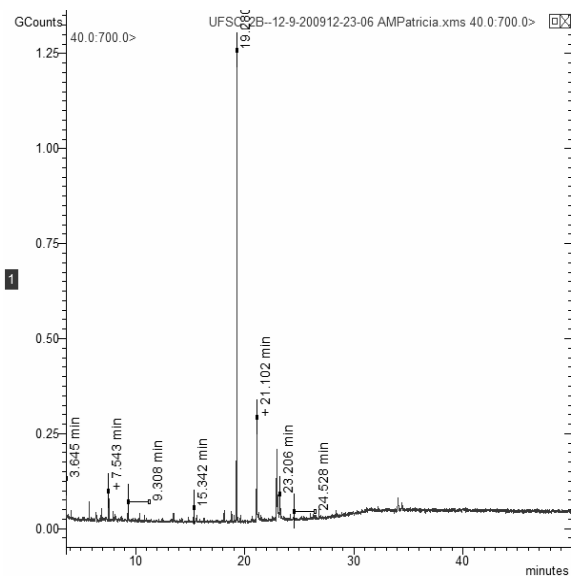


Figura 26: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 50°C.

Tabela 27: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 150 bar e 50°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,747	2,06
2,5,6-trimetil decano	7,543	2,41
Decano	9,308	1,75
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,280	60,14
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,102	16,26
9-Octadecenal	22,977	7,33
Outros	-	10,05

A5. CG-EM ESC 200 bar/ 40°C

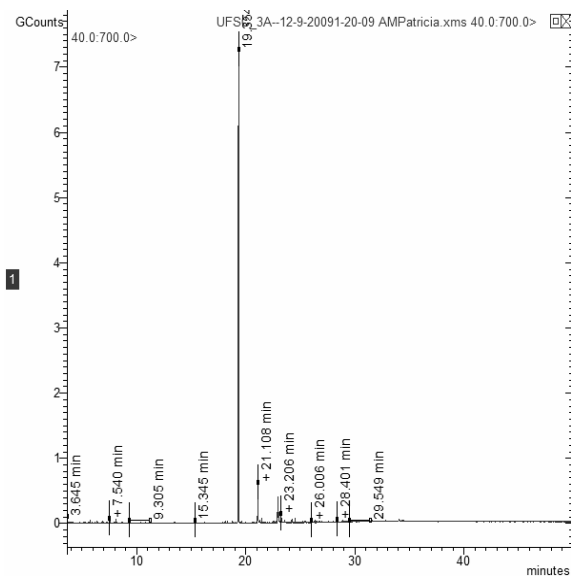


Figura 27: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 40°C.

Tabela 28: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 40°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
L-Limoneno	8,145	0,26
Decano	9,293	0,09
N-butil benzenesulfonamida	19,354	88,88
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,108	3,34
Ácido E,E-9,12-Octadecadienóico metil éster	22,924	1,74
Outros	28,401	5,71

A6. CG-EM ESC 200 bar/ 50°C

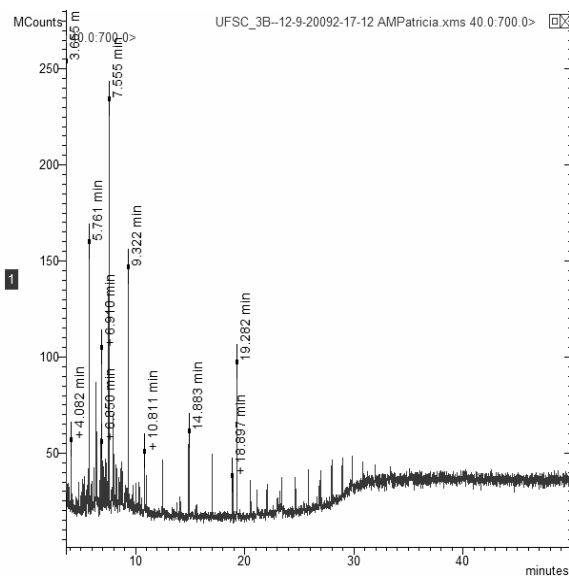


Figura 28: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 50°C.

Tabela 29: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 200 bar e 50°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Octano	4,082	1,97
2,3,7-trimetil octano	6,383	5,73
2,3-dimetil octano	6,469	1,67
Decano	7,555	15,21
2,6-dimetil nonano	7,941	2,73
Decano	9,322	6,88
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,282	5,28
Outros	-	60,56

A7. CG-EM ESC 250 bar/ 40°C

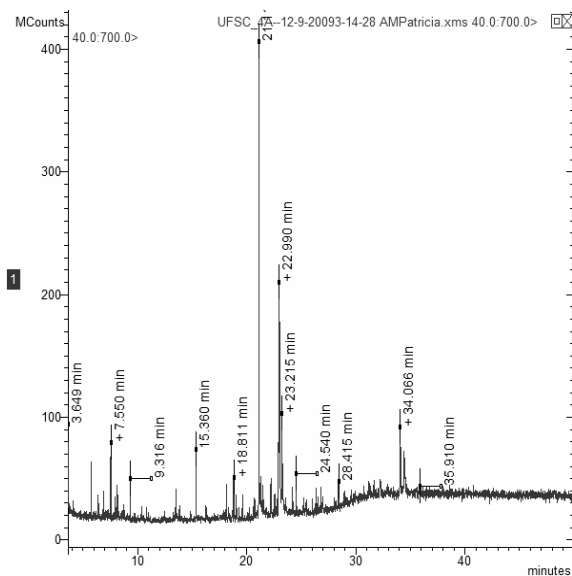


Figura 29: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 40°C.

Tabela 30: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 40°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,757	2,15
4-metil tridecano	7,550	2,71
Decano	9,316	1,85
3-metil-1,6-heptadien-3-ol	15,360	3,61
α -sinensal	18,134	1,68
Z,E- α -farneseno	18,811	2,22
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,117	22,77
Ácido E,E-9,12-Octadecadienóico metil éster	22,933	9,01
9-metil-Z, Z-10, 12-hexadecadien-1-ol acetato	23,215	5,65
2-metil heptadecano	24,186	1,31
2,6-dimetil heptadecano	24,540	2,03
Outros	-	45,03

A8. CG-EM ESC 250 bar/ 50°C

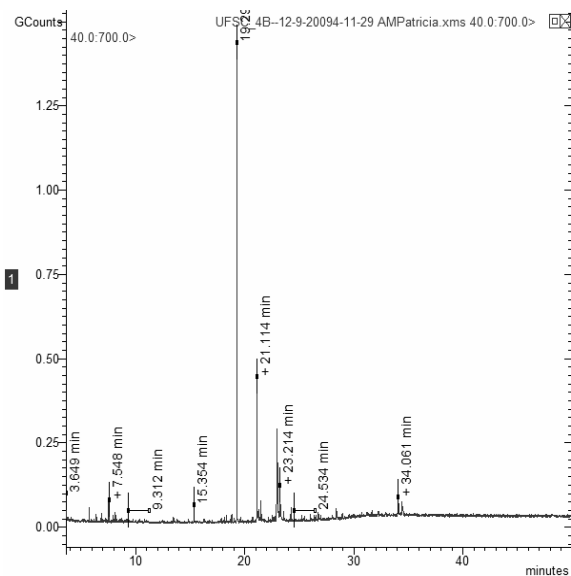


Figura 30: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C.

Tabela 31: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2,4- dimetil heptano	5,754	1,14
Decano	7,548	1,50
L-Limoneno	8,144	0,60
Decano	9,310	0,83
Linalol etil éter	15,354	0,97
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,294	47,72
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,114	14,46
β-sitosterol	34,060	1,20
Outros	-	31,58

A9. CG-EM ESC 250 bar/ 50°C (Recuperado)

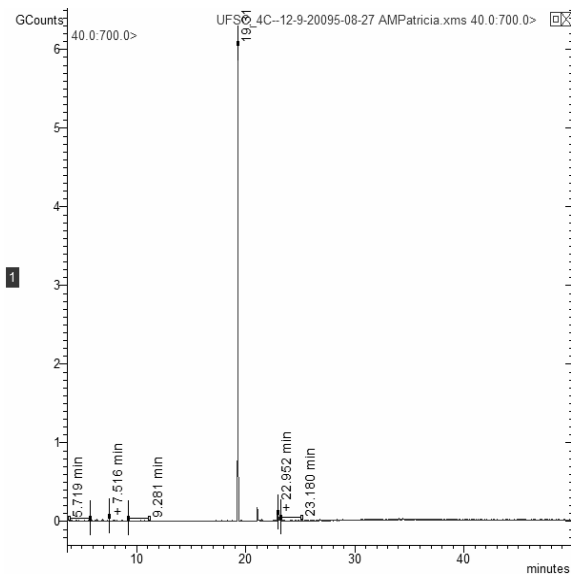


Figura 31: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C (Recuperado).

Tabela 32: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar e 50°C (Recuperado).

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,719	0,30
N-butil benzenesulfonamida	19,317	95,29
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,077	1,25
Z,Z-9,12-Octadecadien-1-ol	22,895	0,60
Outros	-	2,57

A10. CG-EM ESC 300 bar/ 40°C

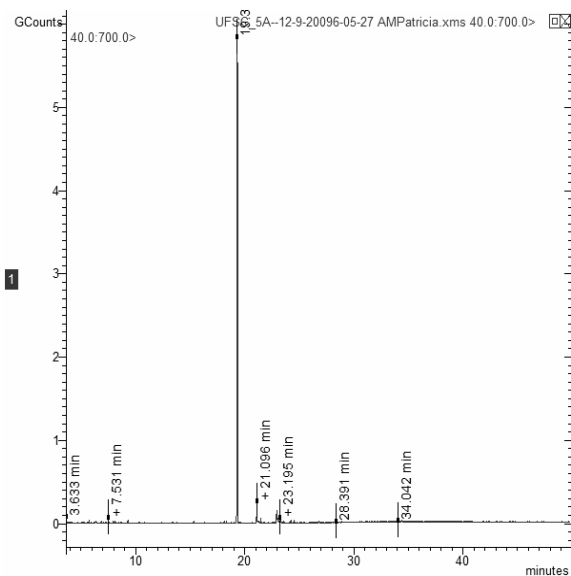


Figura 32: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 40°C.

Tabela 33: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 40°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,737	0,33
Decano	7,531	0,62
N-butil benzenesulfonamida	19,327	91,49
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,096	2,48
Outros	-	5,11

A11. CG-EM ESC 300 bar/ 50°C

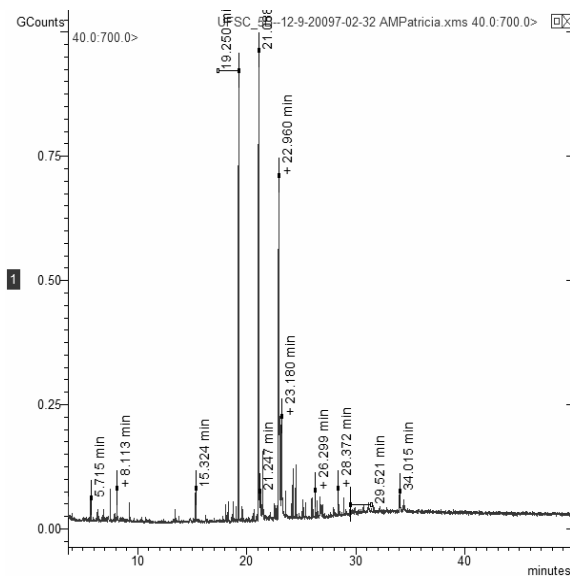


Figura 33: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 50°C.

Tabela 34: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 300 bar e 50°C.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,715	0,82
2-metil nonano	7,510	0,89
Limoneno	8,113	1,16
2-etil-3-(isobutiriloxi) hexil 2-metilpropanoato	15,324	1,22
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,250	17,45
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,088	21,42
Ácido E,E-9,12-Octadecadienóico metil éster	22,904	10,89
2-metil heptadecano	24,146	1,16
Heptacosano	24,500	1,99
β-sitosterol	34,015	2,01
Outros	-	41,01

A12. CG-EM Sox-EtOH

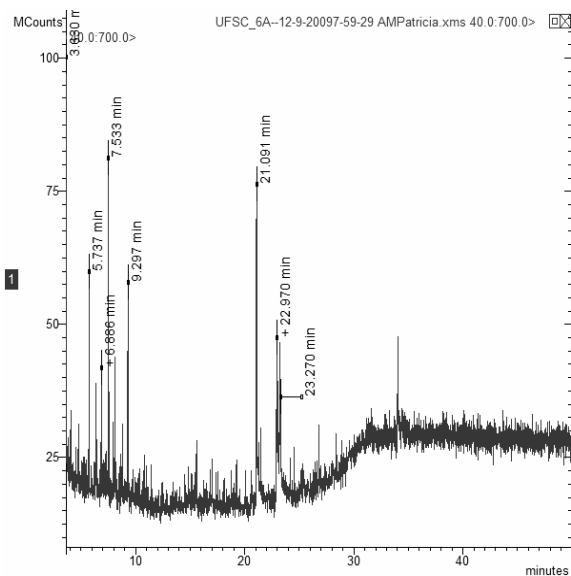


Figura 34: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOH.

Tabela 35: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOH.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2,5,6-trimetil decano	5,737	11,29
Decano	7,533	22,40
L-Limoneno	8,134	5,59
6-etil-2-metil decano	9,297	11,06
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,091	17,15
Outros	-	32,50

A13. CG-EM Sox-EtOAc

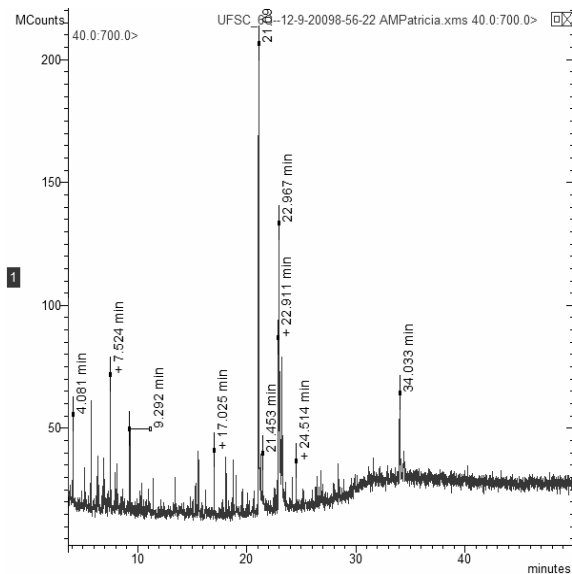


Figura 35: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOAc.

Tabela 36: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-EtOAc.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Butanoato de etila	4,081	2,61
Nonano	5,729	3,68
Decano	7,524	4,75
L-Limoneno	8,127	1,68
Aromadendreno	15,576	2,10
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,093	21,40
Palmitato de etila	21,453	2,15
13-Tetradec-11-in-1-ol	22,911	8,75
Acetato E-9-Tetradecen-1-ol	22,967	16,53
β -sitosterol	34,033	6,74
Outros	-	29,62

A14. CG-EM Sox-HX

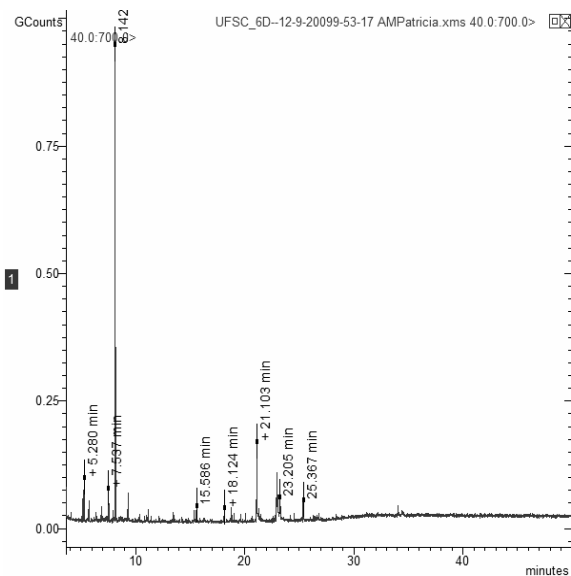


Figura 36: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-HX.

Tabela 37: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-HX.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Etilbenzeno	5,129	2,20
1,3-dimetil benzeno (<i>m</i> -xileno)	5,286	3,90
1,4-dimetil benzeno (<i>p</i> -xileno)	5,690	1,27
Nonano	5,739	1,82
Decano	7,535	3,25
L-Limoneno	8,142	53,36
Decano	9,304	4,41
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,103	13,76
Outros	-	16,04

A15. CG-EM Sox-DCM

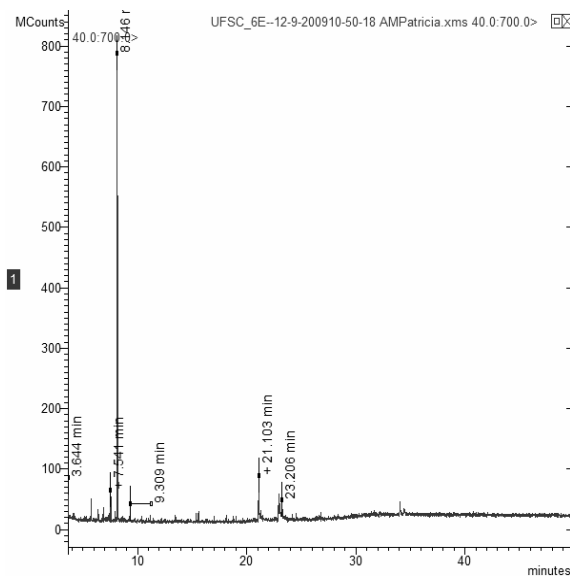


Figura 37: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-DCM.

Tabela 38: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por Sox-DCM.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2,5,6-trimetil decano	5,741	2,36
2,5,6-trimetil decano	7,542	3,80
L-Limoneno	8,146	73,63
Decano	9,304	2,32
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,103	7,74
Outros	-	10,14

A16. CG-EM UE-EtOAc

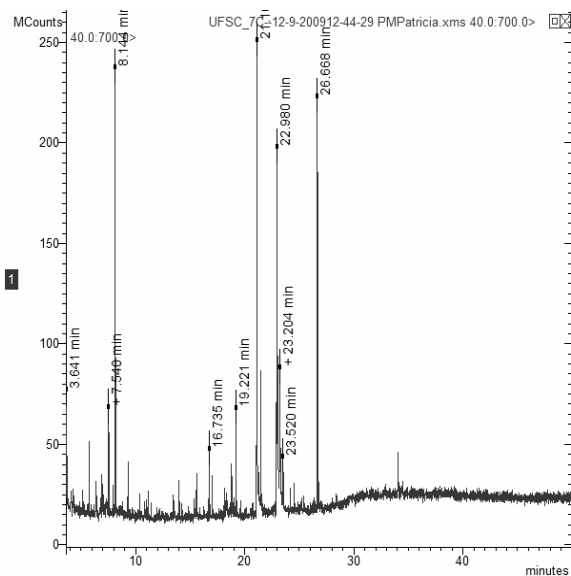


Figura 38: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-EtOAc.

Tabela 39: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-EtOAc.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2-metil octano	7,541	2,86
L-Limoneno	8,144	13,42
α -aromandreno	15,593	1,27
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,108	22,95
Ácido oléico	22,980	17,27
Outros	-	42,23

A17. CG-EM UE-HX

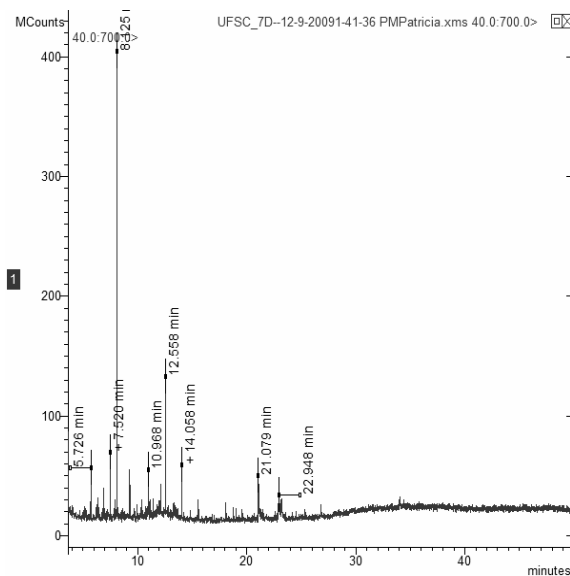


Figura 39: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-HX.

Tabela 40: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-HX.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
L-Limoneno	8,125	45,28
Hexadecano	12,558	14,93
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,079	4,41
Outros	-	35,39

A18. CG-EM UE-DCM

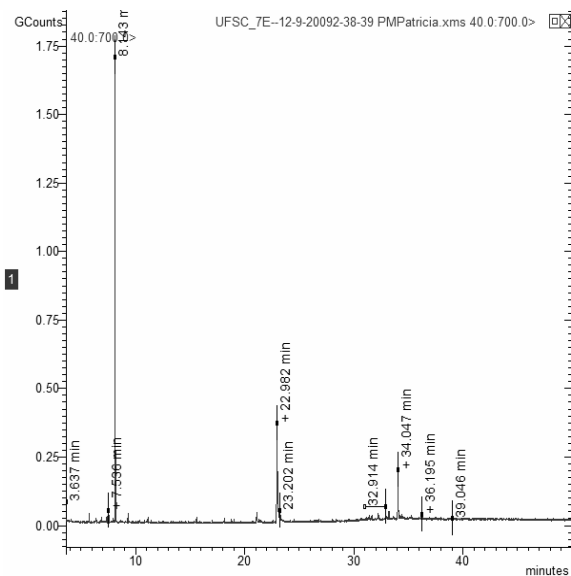


Figura 40: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-DCM.

Tabela 41: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por UE-DCM.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Decano	5,744	1,07
4-metil tridecano	7,536	1,53
L-Limoneno	8,143	51,92
Ácido oléico	22,982	17,84
Campesterol	32,914	2,85
β-sitosterol	34,047	12,91
Outros	-	11,89

A19. CG-EM ESC 250 bar/ 50 °C + 2 % EtOH

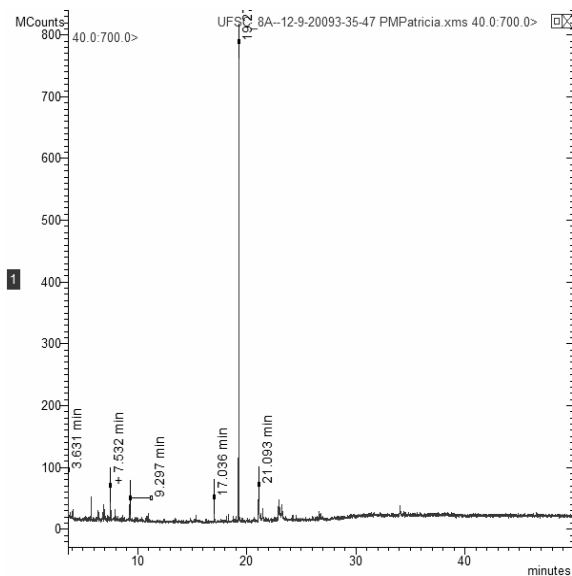


Figura 41: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 2 % EtOH.

Tabela 42: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 2 % EtOH.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,738	3,83
Decano	7,532	3,93
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,272	78,18
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,093	5,17
Outros	-	12,73

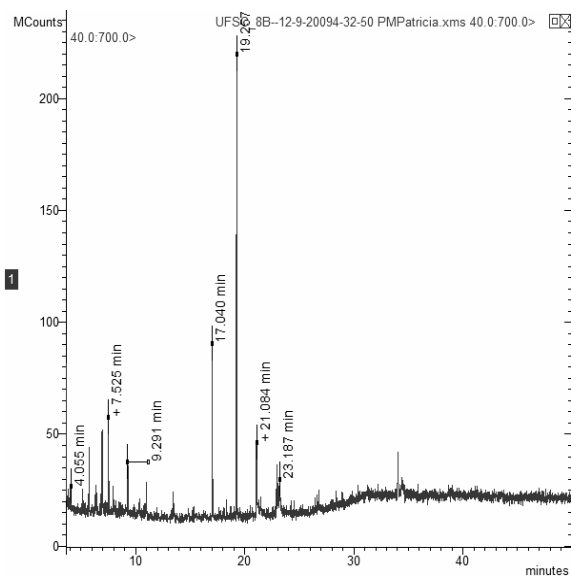
A20. CG-EM ESC 250 bar/ 50 °C + 5 % EtOH

Figura 42: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 5 % EtOH.

Tabela 43: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 5 % EtOH.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Nonano	5,731	9,19
Glicerina	6,931	17,19
Etil α -D-glucopiranosídeo	17,040	37,42
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,257	2,45
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,084	9,19
Outros	-	78,98

A21. CG-EM ESC 250 bar/ 50 °C + 8 % EtOH

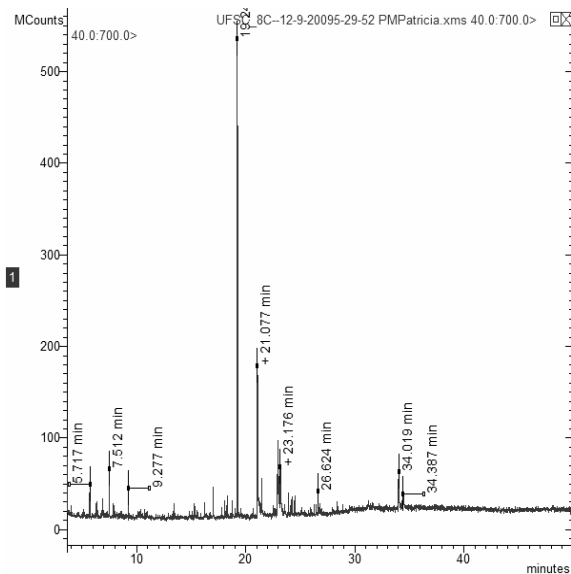


Figura 43: CG-EM do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 8 % EtOH.

Tabela 44: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de bagaço de laranja obtido por ESC a 250 bar/ 50 °C + 8 % EtOH.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
2-metil nonano	5,717	2,20
Decano	7,512	2,83
N-(2-ciano-etil)-benzenesulfonamida	19,246	38,53
Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	21,077	14,90
9-Octadecenal	22,951	7,72
β-sitosterol	34,019	5,97
Outros	-	27,85

A22. CG-EM Óleo comercial - Cold pressed oil

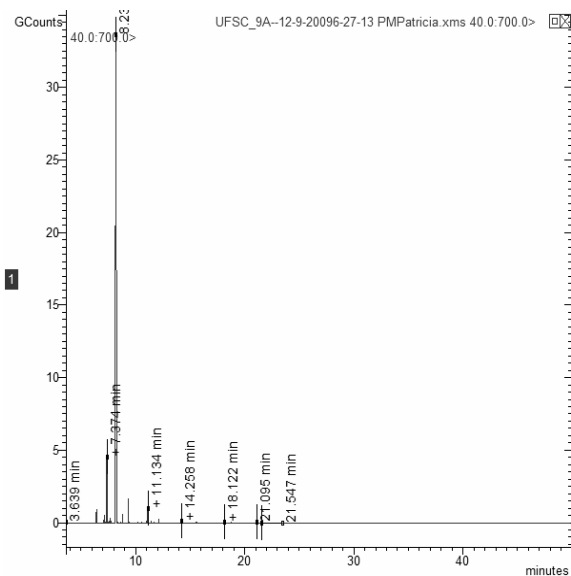


Figura 44: CG-EM do óleo de laranja comercial obtido por prensagem a frio.

Tabela 45: Compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do óleo de laranja comercial obtido por prensagem a frio.

Componente	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
1R- α -pineno	6,413	0,56
Sabineno	7,125	0,36
β -mirreno	7,374	3,25
Octanal	7,648	0,25
D-Limoneno	8,155	8,83
Linalol	9,338	1,14
Decanal	11,134	0,72
Outros	-	85,26

10. ANEXOS

**ANEXO I: CERTIFICADO DE ENSAIO -
DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL**

**ANEXO II: ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DE PRODUTO
- ÓLEO NATURAL DE LARANJA DOCE**

ANEXO I: CERTIFICADO DE ENSAIO - DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL

**ANEXO II: ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DE PRODUTO - ÓLEO
NATURAL DE LARANJA DOCE**

*“Sucesso é o resultado da prática constante de
fundamentos e ações vencedoras.
Não há nada de milagroso no processo, nem sorte envolvida.
Amadores aspiram, profissionais trabalham.”*

- Bill Russell -