

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

RECUPERAÇÃO DE  $\gamma$ -ORIZANOL A PARTIR DE RESÍDUO DA  
INDÚSTRIA DE ÓLEO DE ARROZ UTILIZANDO EXTRAÇÃO  
SUPERCRÍTICA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE  
PROCESSO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

SUSANA PEREIRA DE JESUS  
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense

Florianópolis – SC  
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

RECUPERAÇÃO DE  $\gamma$ -ORIZANOL A PARTIR DE RESÍDUO DA  
INDÚSTRIA DE ÓLEO DE ARROZ UTILIZANDO EXTRAÇÃO  
SUPERCRÍTICA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE  
PROCESSO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Dissertação apresentada ao Curso 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.

Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense

SUSANA PEREIRA DE JESUS  
Engenheira de Alimentos

Florianópolis – SC  
2010



SUSANA PEREIRA DE JESUS

RECUPERAÇÃO DE  $\gamma$ -ORIZANOL A PARTIR DE RESÍDUO DA  
INDÚSTRIA DE ÓLEO DE ARROZ UTILIZANDO EXTRAÇÃO  
SUPERCRÍTICA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE  
PROCESSO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de concentração 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alcilene R. M. Fritz  
Coordenadora CPGEA/EQA/UFSC

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Haiko Hense – Orientador, CPGEA/EQA/UFSC

---

Prof. Dr. Julian Martínez – CPGEA/EQA/UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aziza Kamal Genena – UTFPR/Medianeira

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2010.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mafalda e Antonio, e irmãos, Alberto e Heloisa, pelo amor, apoio e incentivo em todas as situações.

Aos meus sobrinhos, Isadora e Mateus, pelos abraços, beijinhos, carinhos, brincadeiras e risadas contagiantes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Haiko Hense, pela orientação, gentileza e bom-humor com os quais me recebeu sempre que precisei de ajuda.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Salvador Ferreira e Dr. Julian Martínez por terem me inspirado a apreciar a Termodinâmica.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Edna Regina Amante pela gentil colaboração no esclarecimento de dúvidas.

À estagiária de iniciação científica, Laís, pela parceria neste trabalho.

Aos colegas do LATESC pelos auxílios e bons momentos compartilhados. Em especial às amigas: Nati, pelas incontáveis dicas, ensinamentos, contribuições e por ter me ensinado a decifrar o equipamento de ESC; Paty, pela companhia e risadas nos momentos de tensão pré ou pós ESC; Ana, pelas muitas dicas sobre peculiaridades diversas da rotina do laboratório.

Aos cozinheiros do LATESC, pelas delícias preparadas para os agradáveis momentos de confraternização da equipe.

Às tias queridas, Lui, Tere e Ana, pelo apoio e bons momentos que passamos juntas durante os oito anos de moradia em Florianópolis.

Aos primos-amigos e colegas de apartamento, Aline e Guilherme, pela companhia e paciência no dia-a-dia.

Aos amigos Fernanda, Camila e Gustavo, que mesmo longe sempre se fizeram presentes de maneira especial. Ao amigo Gilson pelos muitos *downloads* de Statistica, Fortran, etc.

Aos amigos do mestrado, Luis F. e Luis C., pelos momentos de  
diversão compartilhados.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pelo  
suporte na realização deste trabalho.

Ao programa de bolsas REUNI de Pós-Graduação pela concessão da  
bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro na realização da pesquisa.

À indústria IRGOVEL Ltda. pela doação da matéria-prima.



*"Quanto maior a dificuldade, tanto maior o mérito em superá-la."  
(H. W. Beecher)*

## RESUMO

O óleo de arroz é naturalmente rico em antioxidantes, dentre os quais se destaca o  $\gamma$ -orizanol. Entretanto, no refino químico, o teor de  $\gamma$ -orizanol no óleo é reduzido expressivamente em consequência da etapa de neutralização, na qual quantidade significativa do  $\gamma$ -orizanol passa a fazer parte do resíduo (borra de neutralização) ao invés de permanecer no óleo neutro. A borra de neutralização pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de ácidos graxos por meio de processo de destilação, sendo que o  $\gamma$ -orizanol fica concentrado no resíduo gerado neste processo. O objetivo principal do presente trabalho foi a recuperação do  $\gamma$ -orizanol pela técnica de extração supercrítica (ESC), utilizando como matéria-prima o resíduo da destilação da borra de neutralização do óleo de arroz (RDBN). O pré-tratamento da matéria-prima englobou as etapas de hidrólise alcalina, precipitação induzida por íons cálcio, filtração a vácuo, secagem e moagem. Análises de caracterização da matéria-prima, caracterização térmica do  $\gamma$ -orizanol e caracterização granulométrica da matriz das extrações foram efetuadas para melhor conhecimento dos materiais em estudo. A técnica de extração Soxhlet, utilizando diferentes solventes, foi realizada com o intuito de comparar resultados entre extração convencional e ESC em termos de rendimento e qualidade dos extratos. A influência dos parâmetros de processo (pressão e temperatura), sobre o rendimento e qualidade dos extratos supercríticos, foi avaliada por meio de experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial completo  $3^2$ . A caracterização dos extratos obtidos por ESC e Soxhlet foi realizada em termos de rendimento global, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método de DPPH, teor de  $\gamma$ -orizanol, taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol e composição em ácidos graxos. A modelagem matemática da curva de ESC foi feita por meio da aplicação dos modelos de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999), Crank (1975), Gaspar et al. (2003) e Martínez et al. (2003). Na ESC os extratos obtidos a 300 bar/30 °C e 200 bar/30 °C apresentaram os maiores rendimentos globais ( $39 \pm 1\%$  e  $35 \pm 4\%$ , m/m, respectivamente) maiores taxas de recuperação do  $\gamma$ -orizanol ( $31,3\%$  e  $27,8\%$ , m/m, respectivamente) e teores de  $\gamma$ -orizanol relativamente altos ( $3,2\%$ , m/m, em ambas as condições). O modelo

de Martínez et al. (2003) foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais.

## ABSTRACT

Rice bran oil (RBO) is a natural source of antioxidants. Special attention is usually given to  $\gamma$ -oryzanol, which is one of the most important antioxidants from RBO. However, a great decrease in the  $\gamma$ -oryzanol content of RBO happens due to chemical refining. A significant amount of  $\gamma$ -oryzanol is removed into the rice bran oil soapstock (RBOS), which is the byproduct of deacidification step. The RBOS can be used as raw material for fatty acids (FA) production through distillation process. In this case, the  $\gamma$ -oryzanol remains in the distillation residue. Thus this residue of distillation from rice bran oil soapstock (RDS) can be used as a source of  $\gamma$ -oryzanol. The main purpose of this work was to investigate the recovery of  $\gamma$ -oryzanol from the RDS using supercritical fluid extraction (SFE). The raw material pretreatment included the following steps: alkaline hydrolysis, calcium ion induced precipitation, vacuum filtration, drying and milling. Raw material characterization analysis and  $\gamma$ -oryzanol thermal characterization were conducted in order to have a better understanding of the material under investigation. The particle characterization of the extraction feed material was also determined. The Soxhlet extraction technique using different solvents was conducted in order to compare results with SFE in terms of yield and quality. The process parameters (pressure and temperature) effects over yield and quality of SFE extracts were evaluated by experiments planned according to a factorial design. The extracts obtained by SFE and Soxhlet were characterized in terms of global yield, total phenolic content, antioxidant activity according to DPPH assay,  $\gamma$ -oryzanol content,  $\gamma$ -oryzanol recovery rate and FA composition. The mathematical modeling of SFE overall extraction curve (OEC) was evaluated applying the models presented by Esquível, Bernardo-Gil and King (1999), Crank (1975), Gaspar et al. (2003) and Martínez et al. (2003). The SFE condition of 300 bar/30 °C and 200 bar/30 °C presented the highest global yields ( $39 \pm 1\%$  and  $35 \pm 4\%$ , w/w, respectively), the highest  $\gamma$ -oryzanol recovery rates (31.3 % and 27.8 %, w/w, respectively) and relatively high  $\gamma$ -oryzanol contents (3.2 %, w/w, in both conditions). The model proposed by Martínez et al. (2003) presented the best fit to OEC experimental data.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura do grão de arroz. ....	27
Figura 2. (a) Arroz com farelo. (b) Arroz polido.....	28
Figura 3. Fluxograma de processamento do óleo de arroz. ....	34
Figura 4. Fluxograma do processo de destilação de ácidos graxos a partir da borra de neutralização do óleo de arroz.....	35
Figura 5. Estrutura química dos quatro componentes majoritários do $\gamma$ -orizanol. ....	36
Figura 6. Diagrama de fases para o $\text{CO}_2$ .....	40
Figura 7. Representação da curva de ESC com três etapas bem definidas. ....	41
Figura 8. Estabilização do radical livre DPPH. ....	49
Figura 9. Mudança de coloração característica do método do DPPH. ....	49
Figura 10. Aparecimento de coloração característica da reação do método de Folin-Ciocalteu. ....	50
Figura 11. Etapas do pré-tratamento da matéria-prima. ....	56
Figura 12. (a) esquema representativo e (b) foto do aparato experimental de extração Soxhlet.....	58
Figura 13. Foto do rotaevaporador. ....	59
Figura 14. Diagrama esquemático do equipamento de ESC. ....	61
Figura 15. Foto do equipamento de ESC.....	62
Figura 16. Esquema representativo da montagem do leito de extração para os experimentos de rendimento. ....	64
Figura 17. Análise termogravimétrica (TGA) para o orizanol em atmosfera composta por nitrogênio (80 %) e oxigênio (20 %). ....	81
Figura 18. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para o orizanol em atmosfera composta por nitrogênio (80 %) e oxigênio (20 %). ....	81
Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura da matriz das extrações. ....	85
Figura 20. Curva de extração ensaio preliminar (massa substrato = 15 g; vazão solvente = 0,8 kg/h; T = 40 °C; P = 200 bar). ....	86
Figura 21. Curva de ESC para definição do tempo de extração dos ensaios de rendimento. ....	87
Figura 22. Gráfico de barras dos resultados de rendimento global obtidos através das técnicas de extração Soxhlet e Supercrítica. ....	89

Figura 23. Mistura solvente + extrato obtida na extração Soxhlet ...	90
Figura 24. Gráfico da inversão das isotermas de rendimento global da ESC.....	91
Figura 25. Fotos da matriz retirada do leite após processo de ESC nas diferentes temperaturas de trabalho. ....	94
Figura 26. Superfície de resposta para o rendimento ( $X_0$ , %) em função da temperatura e da pressão.....	97
Figura 27. Curvas de contorno para o rendimento ( $X_0$ , %) em função da temperatura e da pressão.....	97
Figura 28. Gráfico de barras dos resultados de teor de fenólicos totais (TFT) obtidos para as extrações Soxhlet e Supercrítica. ....	99
Figura 29. Gráfico de superfície de resposta para o teor de fenólicos totais (TFT, mgEAG/g) em função da temperatura e da pressão. ...	101
Figura 30. Curvas de contorno para o teor de fenólicos totais (TFT, mgEAG/g) em função da temperatura e da pressão. ....	101
Figura 31. Gráfico de barras dos resultados da atividade antioxidante pelo método de DPPH, expressa pelo valor do $EC_{50}$ , para as técnicas de extração Soxhlet e Supercrítica. ....	104
Figura 32. Gráfico de superfície de resposta para o valor de $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função da pressão e da temperatura. ....	106
Figura 33. Curvas de contorno para o valor de $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função da pressão e da temperatura.....	106
Figura 34. Fotos dos extratos. ....	113
Figura 35. Curva experimental (200 bar/30 °C/0,6 $\text{kg h}^{-1}$ ) e curvas modeladas utilizando os modelos: empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999); difusivo de Crank (1975); SSP de Gaspar et al. (2003); logístico de Martínez et al. (2003).....	114
Figura 36. Curva padrão de ácido gálico.....	136
Figura 37. Regressão linear para cálculo do $EC_{50}$ .....	138
Figura 38. MEV de partículas do substrato, aumento de 33x.....	139
Figura 39. MEV de partícula “grossa”, formada por aglomerado de partículas do substrato, aumento de 50x.....	139
Figura 40. MEV de partículas do substrato, aumento de 200x.....	140
Figura 41. MEV de partículas do substrato, aumento de 120x.....	140
Figura 42. MEV de partículas do substrato, aumento de 330x.....	141
Figura 43. MEV de partículas do substrato, aumento de 330x.....	141

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da produção de arroz por continente e produção mundial total nos últimos anos. ....	26
Tabela 2. Conteúdo de $\gamma$ -orizanol e esteróis totais em amostras de óleo de arroz em diferentes etapas do refino químico. ....	29
Tabela 3. Estimativa da produção anual atual e do potencial de produção anual de óleo de arroz nos principais países produtores de arroz. ....	31
Tabela 4. Índice de polaridade dos solventes utilizados nas extrações convencionais. ....	58
Tabela 5. Planejamento fatorial completo $3^2$ com 2 fatores (T e P) variando em 3 níveis, para experimentos de rendimento.....	74
Tabela 6. Resultados das análises de caracterização da matéria-prima.....	76
Tabela 7. Exemplos do teor de fenólicos totais (TFT) em extratos aquosos de plantas de interesse industrial investigadas por Dudonné et al. (2009).....	78
Tabela 8. Composição em ácidos graxos (% , m/m) da matéria-prima e do óleo de arroz.....	79
Tabela 9. Rendimento do pré-tratamento da matéria-prima. ....	84
Tabela 10. Resultados de rendimento global ( $X_0$ ) obtidos através das técnicas de extração Soxhlet e Supercrítica (ESC).....	88
Tabela 11. Teor de fenólicos totais (TFT), expresso em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato, para Soxhlet e ESC.....	98
Tabela 12. Estimativa da atividade antioxidante pelo método do DPPH para os extratos de Soxhlet e ESC.....	103
Tabela 13. Teor de $\gamma$ -orizanol (TGO) e taxa de recuperação do $\gamma$ -orizanol (RGO) para os extratos de Soxhlet e ESC.....	107
Tabela 14. Composição em ácidos graxos (% , m/m) dos extratos de Soxhlet e ESC.....	112
Tabela 15. Dados utilizados na modelagem matemática da curva de ESC a 200 bar / 30 °C / 0,6 kg <sup>-1</sup> .....	114
Tabela 16. Parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) obtidos na modelagem matemática da ESC.....	115
Tabela 17. Dados experimentais de absorvância em função da concentração da solução de ácido gálico.....	135

Tabela 18. Dados experimentais obtidos no ensaio de DPPH: análise em triplicata para extrato de ESC a 300 bar/40 °C.....	137
Tabela 19. ANOVA para resultados do rendimento global ( $X_0$ , %) em função da pressão (bar) e da temperatura (°C).....	142
Tabela 20. ANOVA para resultados do teor de fenólicos totais (TFT, mgEAG/g) em função da pressão (bar) e da temperatura (°C).....	142
Tabela 21. ANOVA para resultados do $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função da pressão (bar) e da temperatura (°C).....	142
Tabela 22. Ponto de fusão de ácidos graxos identificados nas análises de cromatografia gasosa. ....	143



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: atividade antioxidante.

AET: acetato de etila.

AG: ácidos graxos.

BNOA: borra de neutralização do óleo de arroz.

CER: taxa constante de extração.

CG: cromatografia gasosa.

CLAE/UV: cromatografia líquida de alta eficiência sob detecção ultravioleta.

DCM: diclorometano.

DSC: calorimetria exploratória diferencial.

ESC: extração supercrítica.

ETOH: etanol.

FER: taxa decrescente de extração.

HEX: hexano.

MEV: microscopia eletrônica de varredura.

p: probabilidade de significância, valor-p.

RDBN: resíduo da destilação da borra de neutralização do óleo de arroz.

TGA: termogravimetria.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  = nível de significância, estipulado em 5% (0,05).

A = absorvância.

$b_1$  = parâmetro ajustável do modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) (min).

$b_2$  = parâmetro ajustável do modelo de Martínez et al. (2003) ( $\text{min}^{-1}$ ).

$D_1$  = coeficiente de difusão, parâmetro ajustável do modelo de Crank (1975) ( $\text{m}^2/\text{min}$ ).

$D_2$  = coeficiente de difusão, parâmetro ajustável do modelo de Gaspar et al. (2003) ( $\text{m}^2/\text{min}$ ).

EAG = equivalente em ácido gálico (mgEAG/L), obtido através da curva padrão.

$EC_{50}$  = concentração efetiva referente a 50% de atividade antioxidante ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

h = coordenada axial do leito de extração (m).

H = comprimento total do leito de extração (m).

M = massa de substrato alimentada no leito de extração (g).

$m_E$  = massa de extrato (g)

n = número inteiro.

P = pressão (bar).

r = raio da partícula (m).

RGO = taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanól (% , m/m).

T = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

t = tempo de extração (min);

TFT = teor de fenólicos totais (mgEAG/g).

TGO = teor de  $\gamma$ -orizanol ( $\%$ , m/m).

TL = teor de lipídios ( $\%$ , m/m).

$t_m$  = parâmetro ajustável do modelo de Martínez et al. (2003) (min).

TUV = teor de umidade e voláteis ( $\%$ , m/m).

$X_0$  = rendimento global ( $\%$ , m/m).

$x_0$  = razão mássica de extrato no substrato (g/g);

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção específica [ $\text{L}/(\text{g}_{\text{orizanol}} \cdot \text{cm})$ ].

$\delta$  = espessura da partícula (placa) (m).

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>16</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>17</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>26</b>
4.1 RESÍDUO INDUSTRIAL DO ÓLEO DE ARROZ .....	26
4.1.1 Arroz ( <i>Oryza sativa</i> ).....	26
4.1.2 Óleo de arroz .....	28
4.1.2.1 Produção mundial de óleo de arroz.....	29
4.1.2.2 Processamento do óleo de arroz.....	32
4.1.2.3 Borra de neutralização do óleo de arroz.....	33
4.1.2.4 Destilação de ácidos graxos da borra de neutralização.....	35
4.1.3 O $\gamma$ -orizanol .....	35
4.2 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA (ESC) .....	38
4.2.1 Fluido supercrítico .....	39
4.2.2 Curva de extração .....	40
4.2.3 Modelagem matemática das curvas de extração.....	42
4.2.3.1 Modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) .....	43
4.2.3.2 Modelo difusivo de Crank (1975).....	44
4.2.3.3 Modelo SSP de Gaspar et al. (2003).....	44
4.2.3.4 Modelo logístico de Martínez et al. (2003).....	45
4.2.4 Tecnologia supercrítica aplicada a subprodutos do arroz .....	46
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	48
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA .....	51
5.1.1 Determinação do teor de umidade e voláteis .....	51
5.1.2 Determinação do teor de lipídios .....	52
5.1.3 Determinação do teor de $\gamma$ -orizanol.....	52

5.1.4	Determinação do teor de fenólicos totais.....	53
5.1.5	Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH.....	53
5.1.6	Determinação do perfil de ácidos graxos.....	53
5.2	CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO $\Gamma$ -ORIZANOL..	53
5.3	PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA.....	54
5.4	CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA MATRIZ DAS EXTRAÇÕES.....	56
5.5	EXTRAÇÃO SOXHLET.....	57
5.6	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	59
5.6.1	Equipamento de ESC.....	59
5.6.2	Ensaio preliminares.....	62
5.6.3	Ensaio de rendimento global.....	62
5.6.4	Ensaio de cinética.....	65
5.7	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	65
5.7.1	Cálculo do rendimento global.....	65
5.7.2	Determinação do teor de fenólicos totais.....	66
5.7.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH.....	67
5.7.4	Determinação do teor de $\gamma$ -orizanol.....	68
5.7.4.1	Quantificação do $\gamma$ -orizanol por CLAE/UV.....	69
5.7.4.2	Quantificação do $\gamma$ -orizanol por espectrofotometria UV.....	70
5.7.5	Cálculo da taxa de recuperação do $\gamma$ -orizanol.....	71
5.7.6	Determinação do perfil de ácidos graxos.....	72
5.8	ESTUDO PRELIMINAR DE MODELAGEM MATEMÁTICA.....	73
5.9	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	73
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	76
6.2	CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO $\Gamma$ -ORIZANOL..	80
6.3	PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA.....	82
6.4	CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA MATRIZ DAS EXTRAÇÕES.....	84
6.5	ENSAIOS PRELIMINARES ESC.....	85
6.6	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE SOXHLET E ESC.....	88
6.6.1	Rendimento global de extração.....	88

6.6.1.1	Efeito da pressão e da temperatura no rendimento global .....	91
6.6.2	Teor de fenólicos totais.....	98
6.6.2.1	Efeito da pressão e da temperatura no teor de fenólicos totais.....	100
6.6.3	Atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH .....	102
6.6.3.1	Efeito da pressão e da temperatura na atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH.....	105
6.6.4	Teor de $\gamma$ -orizanol e taxa de recuperação do $\gamma$ -orizanol . .....	107
6.6.5	Composição em ácidos graxos.....	110
6.7	ESTUDO PRELIMINAR DE MODELAGEM	
	MATEMÁTICA .....	113
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES .....</b>	<b>121</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>122</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>135</b>
	APÊNDICE I – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CÁLCULO DO TFT.....	135
	APÊNDICE II – CÁLCULO DO EC <sub>50</sub> .....	137
	APÊNDICE IV – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA).....	142
	APÊNDICE V – PONTO DE FUSÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS .....	143

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido mundialmente pela ampla disponibilidade de recursos naturais, os quais consistem em fontes de inúmeras substâncias biologicamente ativas, com potencial de aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além das matérias-primas *in natura*, outra imensa fonte de recursos naturais são os resíduos provenientes da agroindústria. As indústrias processadoras de alimentos geram grande quantidade de resíduos, os quais geralmente possuem composição rica em nutrientes e compostos diversos. Estes resíduos, se submetidos a processamento tecnológico adequado, podem ser utilizados como fonte de produtos naturais de alto valor agregado.

De acordo com Barbieri (2005), o mercado mundial de extração de produtos naturais movimenta anualmente cerca de US\$500 bilhões. O Brasil, apesar da imensa disponibilidade de recursos naturais, participa de uma parcela muito pequena (~10 %) deste mercado. O principal motivo apontado como responsável por esta pequena participação é a falta de investimentos em tecnologias inovadoras, capazes de agregar valor ao produto. Na tentativa de reverter esta situação, pesquisadores trabalham constantemente no desenvolvimento de tecnologias que possam despertar o interesse do setor industrial, tal como a extração supercrítica (BARBIERI, 2005).

A extração supercrítica é uma tecnologia limpa, que não deixa resíduos nocivos nos produtos e subprodutos gerados, tampouco no meio ambiente. A técnica consiste no contato entre a matriz (matéria-prima) e um solvente a alta pressão, o qual solubiliza compostos específicos, resultando na extração do produto de interesse. Meireles, Zahedi e Hatami (2009) relatam que a ESC já comprovou ser um processo tecnicamente e economicamente viável para uma ampla variedade de substratos sólidos, fato que é coerente com o crescente número de unidades industriais instaladas pelo mundo. Entretanto, em alguns países como o Brasil, a aplicação da ESC em escala industrial ainda não se tornou realidade, principalmente em função do alto custo de investimento inicial quando comparado às técnicas convencionais de extração.

Os antioxidantes naturais, com destaque para os compostos fenólicos, são substâncias bioativas que têm despertado grande

interesse nos últimos anos. As propriedades antioxidantes de diversos extratos, obtidos a partir de plantas nativas e de resíduos agroindustriais, têm sido extensivamente estudadas pela comunidade científica ao redor do mundo (DUDONNÉ et al., 2009; MENSOR et al., 2001; PESCHEL et al., 2006).

O óleo de arroz é naturalmente rico em antioxidantes, entre os quais se destaca o  $\gamma$ -orizanol, composto bioativo associado a inúmeros efeitos fisiológicos positivos, sendo a maioria deles relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares (JULIANO et al., 2005). O óleo de arroz bruto contém cerca de 1,5 – 2,9 % de  $\gamma$ -orizanol. Durante o refino químico, no entanto, este teor pode ser reduzido em até 90 %. A etapa de neutralização é a principal responsável por esta redução, pois quantidade significativa de  $\gamma$ -orizanol é carregada junto da borra de neutralização (resíduo do processo), ao invés de permanecer no óleo neutro (PAUCAR-MENACHO et al., 2007; VAN HOED et al., 2006). Uma das aplicações industriais da borra de neutralização é a produção de ácidos graxos através de processo de destilação. Neste caso, após a destilação da borra, o  $\gamma$ -orizanol originalmente presente na mesma permanece no resíduo do processo, conhecido como “calda da destilação” ou “resíduo da destilação”. O resíduo da destilação de ácidos graxos da borra de neutralização do óleo de arroz (RDBN) consiste, portanto, numa matéria-prima potencial para processos de recuperação do  $\gamma$ -orizanol (DAS et al., 1998).

Diversos estudos propõem a utilização da ESC para a recuperação de compostos bioativos presentes em resíduos agroindustriais (CAMPOS et al., 2008; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PERRETTI et al., 2003). Muitas pesquisas relatam a aplicação da tecnologia supercrítica para a obtenção de óleo a partir do farelo de arroz (resíduo do beneficiamento do arroz branco) (BALACHANDRAN et al., 2008; POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2009a; XU; GODBER, 2000). A ESC da borra de neutralização do óleo de arroz, visando a recuperação do  $\gamma$ -orizanol, foi investigada por Calheiros (2007). Contudo, na literatura científica consultada (artigos de periódicos internacionais), não existem trabalhos que tratem da ESC do RDBN.

O objetivo principal do presente trabalho foi investigar o processo de ESC do RDBN visando à obtenção de extratos ricos em  $\gamma$ -orizanol.



## 2 JUSTIFICATIVA

O Brasil necessita de pesquisas e investimentos direcionados ao desenvolvimento de tecnologias inovadoras, capazes de gerar riqueza a partir dos recursos naturais. Tecnologias que possibilitem que o país deixe de ser apenas um exportador de matérias-primas para se tornar um exportador de produtos industrializados de alto valor agregado. Neste contexto, o estudo da técnica de ESC merece especial destaque, uma vez que tem potencial para gerar produtos de qualidade diferenciada, com inúmeras possibilidades de aplicações industriais.

Os resíduos do beneficiamento do arroz e do processamento do óleo de arroz são ricas fontes de antioxidantes naturais. Em função disso, pesquisas a partir de tais resíduos têm sido realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina, tais como os trabalhos desenvolvidos por Sarmento (2002); Jahn (2004) e Calheiros (2007). O presente trabalho está inserido nesta linha de pesquisa, fazendo parte de projeto que tem como objetivo a obtenção do  $\gamma$ -orizanol a partir do resíduo da indústria de óleo de arroz. Cabe ressaltar que, diferente do trabalho desenvolvido por Calheiros (2007), o qual utilizou a borra de neutralização, neste trabalho a matéria-prima utilizada foi o RDBN.

Os antioxidantes naturais são compostos bioativos que despertam grande interesse por parte dos pesquisadores e das indústrias de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. As evidências epidemiológicas comprovando efeitos positivos de alguns antioxidantes naturais (como o  $\gamma$ -orizanol) na fisiologia humana, bem como a busca crescente dos consumidores por alimentos com ingredientes naturais e características funcionais, têm impulsionado a expansão contínua do mercado de produtos naturais.

Portanto, a importância de estudos na área de tecnologias inovadoras de processamento industrial, a possibilidade de obtenção de compostos de alto valor agregado a partir de resíduos agroindustriais, a valiosa ação benéfica dos antioxidantes nos sistemas biológicos, bem como a crescente expansão do mercado de produtos naturais, são fatores que justificam a relevância do tema desenvolvido no presente trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a recuperação de  $\gamma$ -orizanol a partir do RDBN utilizando a técnica de extração supercrítica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar o aproveitamento do RDBN para obtenção de extratos enriquecidos em  $\gamma$ -orizanol;
- b) Caracterizar o RDBN em termos de teor de umidade e voláteis, teor de lipídios, teor de  $\gamma$ -orizanol, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método de DPPH e composição de ácidos graxos;
- c) Caracterizar o  $\gamma$ -orizanol em termos de estabilidade térmica;
- d) Estabelecer uma metodologia para pré-tratamento do RDBN, de forma a transformá-lo num material com características adequadas para ser aplicado como matriz do processo de ESC;
- e) Avaliar o efeito dos parâmetros de processo (pressão e temperatura) no rendimento e qualidade dos extratos supercríticos;
- f) Realizar extrações Soxhlet, utilizando diferentes solventes;
- g) Caracterizar e comparar os extratos obtidos, pelas técnicas de Soxhlet e ESC, em termos de rendimento e qualidade (teor de  $\gamma$ -orizanol, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método de DPPH e composição de ácidos graxos), bem como calcular a taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol nos extratos;
- h) Fazer um estudo preliminar da modelagem matemática dos dados experimentais obtidos para a curva de extração do processo de ESC.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 RESÍDUO INDUSTRIAL DO ÓLEO DE ARROZ

#### 4.1.1 Arroz (*Oryza sativa*)

O arroz consiste numa das culturas de maior importância, social e econômica, no contexto mundial. É cultivado e consumido em todos os continentes, destacando-se pela grande área de cultivo que ocupa e, conseqüentemente, pela elevada produção mundial (EMBRAPA, 2005). De acordo com dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a previsão para a produção mundial de arroz em 2009 foi estimada em 696 milhões de toneladas (FAO, 2009). A distribuição da produção mundial de arroz, por regiões, é apresentada na Tabela 1.

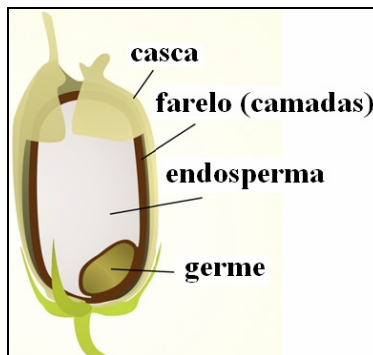
**Tabela 1. Distribuição da produção de arroz por continente e produção mundial total nos últimos anos**

Região	Participação em 2008 (%)		
Ásia	91		
América	5,2		
<i>América do Sul</i>	<b>3,5</b>		
<i>Brasil</i>	<b>1,8</b>		
África	3,4		
Europa	0,5		
Oceania	0,005		
Produção TOTAL (em milhões de t)	2007	2008	2009
	657,4	685,0	696*

Fonte: FAOSTAT, 2009a. \* Estimativa FAO, 2009.

O Brasil se destaca por ser o país com maior produção fora do continente asiático. A produção nacional de arroz foi de 12,1 milhões de toneladas em 2008, sendo Rio Grande do Sul e Santa Catarina os principais estados produtores, responsáveis por 61 % e 8,3 % da produção nacional, respectivamente (EMBRAPA 2005; 2008).

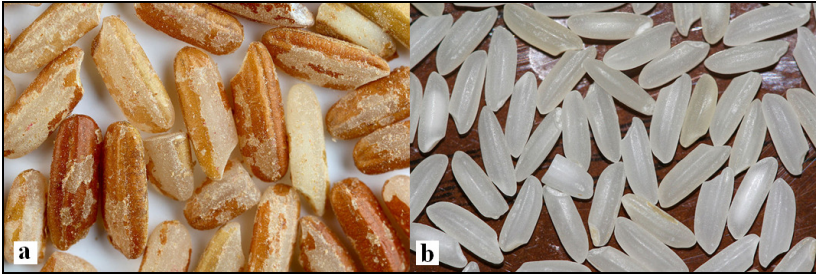
O grão de arroz é composto por cariopse e casca. A casca, que é uma camada protetora, corresponde a aproximadamente 20 % da massa total. A cariopse é composta, na parte mais externa, por diferentes camadas (pericarpo, tegumento e camada de aleurona) e internamente pelo endosperma, que corresponde a cerca de 70 % da massa total do grão. O germe localiza-se na base do grão e é rico em lipídios. A porção conhecida como farelo (pericarpo + tegumento + camada de aleurona + germe) corresponde a aproximadamente 10 % da massa total e concentra os lipídios presentes no grão (PAUCAR-MENACHO et al., 2007; WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). A estrutura do grão de arroz é apresentada de forma esquemática na Figura 1.



**Figura 1. Esquema da estrutura do grão de arroz.**

Fonte: adaptado de Stabilized rice bran (2009).

O arroz integral é obtido através do descascamento, separando-se a casca da cariopse. Já o arroz branco é obtido quando o arroz integral é polido para a remoção do farelo. No beneficiamento do arroz branco polido é gerada uma quantidade de 5 a 10 % de farelo. Este subproduto é composto de 15-20 % de óleo, sendo por isso usado como matéria-prima para o processo de extração do óleo de arroz (BALACHANDRAN et al. 2008; PAUCAR-MENACHO et al., 2007; WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). As Figuras 2(a) e 2(b) ilustram o arroz não polido (com farelo) e o arroz polido, respectivamente.



**Figura 2. (a) Arroz com farelo. (b) Arroz polido.**

Fonte: adaptado de (a) Acharya (2008); (b) Acharya (2006).

Em função da elevada quantidade de arroz produzido no mundo, a extração de óleo, a partir do farelo de arroz, representa uma atividade de grande potencial a ser explorada para a produção de óleo comestível de alta qualidade (MORETTO; FETT, 1998).

#### 4.1.2 Óleo de arroz

O crescente espaço que o óleo de arroz vem ocupando no cenário mundial é consequência de sua composição balanceada de ácidos graxos (AG) e da presença de compostos minoritários com ação bioativa, os quais estão presentes na fração insaponificável. Tais fatores lhe conferem estabilidade oxidativa e propriedades nutracêuticas (MANJULA; SUBRAMANIAN, 2009). De acordo com Kahlon (2009), o óleo de arroz é composto por: 19,3 % de AG saturados; 40,9 % de AG monoinsaturados; 35,6 % de AG poliinsaturados; 4,1 % de material insaponificável. Entre os compostos bioativos, destacam-se o  $\gamma$ -orizanol, tocotrienóis, tocoferóis e fitosteróis. Estes compostos, com poderosa ação antioxidante, possuem elevado potencial de aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. O  $\gamma$ -orizanol, em especial, merece destaque porque é encontrado em um número muito limitado de óleos vegetais, sendo, portanto, um antioxidante característico do óleo de arroz (PAUCAR-MENACHO et al., 2007; RAJAM et al., 2005; VAN HOED et al., 2006).

O óleo de arroz bruto contém cerca de 1,5 – 2,9 % de  $\gamma$ -orizanol. No óleo de arroz refinado, entretanto, este teor é bem

menor, podendo ser reduzido em até 90 % em relação ao conteúdo inicial (PAUCAR-MENACHO et al., 2007; VAN HOED et al., 2006). Esta redução brusca ocorre em função de perdas durante o processamento, usualmente feito através do tradicional refino químico. A etapa de neutralização (também conhecida como desacidificação) é a principal responsável pela redução dos teores de  $\gamma$ -orizanol e esteróis totais durante o processamento do óleo, conforme pode ser visualizado na Tabela 2.

**Tabela 2. Conteúdo de  $\gamma$ -orizanol e esteróis totais em amostras de óleo de arroz em diferentes etapas do refino químico**

Amostra de óleo	$\gamma$ -orizanol (g/100g)	Esteróis totais (g/100g)
Bruto	1,8	2,94
Neutralizado	0,4	2,15
Clarificado	0,4	1,92
Decerado	0,3	1,91
Desodorizado	0,3	1,83

Fonte: VAN HOED et al., 2006.

#### 4.1.2.1 Produção mundial de óleo de arroz

O óleo de arroz é extensivamente consumido em países asiáticos (Japão, Coréia, China, Taiwan e Tailândia), sendo considerado um “óleo comestível *Premium*”. Os países que se destacam como maiores produtores de óleo de arroz são Índia, China, Japão, Mianmar e Tailândia, totalizando mais de 95 % da produção mundial (COMMODITYONLINE, 2009; VAN HOED et al., 2006). A Índia é o maior produtor mundial de óleo de arroz, possuindo um potencial de produção da ordem de 1,2 milhões de toneladas (t). Estimativas indicam que a produção anual de óleo de arroz na Índia, em 2006, foi de 0,75 milhões de toneladas (MANJULA; SUBRAMANIAN, 2009).

No Brasil a produção de óleo de arroz se concentra no Rio Grande do Sul, onde a produção anual era de 15 mil toneladas, de acordo com dados de Scavariello (2002). Este valor, entretanto, pode ser considerado extremamente baixo em relação ao potencial de

geração de farelo de arroz que o país possui. De acordo com informações divulgadas em reportagens (HELLER, 2008; IFT, 2008), a Indústria IRGOVEL Ltda., maior produtora de óleo de arroz do Brasil e da América Latina, foi adquirida em fevereiro de 2008 pela multinacional NutraCea Inc., que declarou ter planos de expandir a produção anual da indústria para 70 mil toneladas de óleo de arroz. As reportagens citam ainda que, no momento da aquisição pela NutraCea, a unidade industrial estaria operando com menos de 1/3 de sua capacidade total, ou seja, menos de 23 mil t/ano (HELLER, 2008; IFT, 2008).

A produção mundial de farelo de arroz, matéria-prima para a extração do óleo, é de 50 – 60 milhões de toneladas por ano. Entretanto, grande parte desta biomassa, extremamente rica em nutrientes, é destinada à alimentação animal. O Japão produz cerca de 0,9 milhões de toneladas de farelo de arroz por ano, sendo que 34 % deste total são destinados à produção de óleo, para aplicações alimentícias ou industriais (POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2009b). De acordo com Balachandran et al. (2008), considerando uma produção anual de 40 milhões de toneladas de farelo de arroz, com teor de óleo de 15 – 22 %, a estimativa do potencial para produção mundial de óleo de arroz seria de 6 a 8 milhões de toneladas. Contudo, grande parte do farelo de arroz gerado no mundo é subutilizada. A Índia pode ser considerada uma exceção, pois cerca de 50 – 60 % do farelo gerado é destinado à extração de óleo, percentual relativamente alto se comparado a outros países grandes produtores de arroz (BALACHANDRAN et al., 2008).

O potencial de produção de óleo de arroz no mundo ainda é tão subutilizado que até mesmo o levantamento de dados sobre tal produção é difícil de ser feito. Prova disso é o fato de que no FAOSTAT (FAO *Statistical Database*), sistema de dados estatísticos da FAO, há opção para a busca de dados de produção para os mais diversos tipos de óleo (coco, amendoim, algodão, linhaça, milho, oliva, palma, palmiste, colza, açafraão, gergelim, soja, girassol), porém não há opção de busca para o óleo de arroz (FAOSTAT, 2009b).

A Tabela 3 apresenta estimativas sobre a produção atual e valores calculados para o potencial de produção de óleo de arroz nos principais países produtores de arroz.

**Tabela 3. Estimativa da produção anual atual e do potencial de produção anual de óleo de arroz nos principais países produtores de arroz**

País	Produção de arroz (mil t) <sup>(a)</sup>	Farelo de arroz (mil t) <sup>(b)</sup>	Produção de óleo de arroz	
			Atual (mil t)	Potencial (mil t) <sup>(c)</sup>
China	193354	15468	232 <sup>(d)</sup>	1392
Índia	148260	11861	750 <sup>(e)</sup>	1067
Indonésia	60251	4820	17 <sup>(f)</sup>	434
Bangladesh	46905	3752	*	338
Vietnã	38725	3098	*	279
Mianmar	30500	2440	86 <sup>(f)</sup>	220
Tailândia	30467	2437	*	219
Filipinas	16816	1345	*	121
<b>Brasil</b>	<b>12100</b>	<b>968</b>	<b>20</b> <sup>(g)</sup>	<b>87</b>
Japão	11029	882	45 <sup>(h)</sup>	79
EUA	9240	739	*	67
Mundial	685013	54801	1400 <sup>(i)</sup>	4932

\* Dados não encontrados.

<sup>(a)</sup> Dados referentes à produção no ano de 2008 (FAOSTAT, 2009a).

<sup>(b)</sup> Calculado sobre 8 % (POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2009b) da produção mundial de arroz.

<sup>(c)</sup> Calculado considerando que 60 % do farelo produzido sejam destinados à extração de óleo e que, a partir deste, obtenha-se 15 % (BALACHANDRAN et al., 2008) de rendimento em óleo.

<sup>(d)</sup> Considerando que atualmente 10 % do farelo sejam usados para a extração de óleo (CHANGMING, 2009).

<sup>(e)</sup> De acordo com Manjula; Subramanian (2009).

<sup>(f)</sup> Dados desatualizados, retirados de Scavariello (1997);

<sup>(g)</sup> Calculado a partir de dados citados em reportagens (HELLER, 2008; IFT, 2008).

<sup>(h)</sup> Considerando que atualmente 34 % do farelo sejam destinados à extração de óleo, de acordo com Pourali; Asghari; Yoshida (2009b).

<sup>(i)</sup> Dado retirado de reportagem (COMMODITYONLINE, 2009).

O Brasil, como 9º maior produtor mundial de arroz (FAOSTAT, 2009a) possui significativo potencial de produção deste tipo de óleo. De acordo com dados retirados em site de compra pela internet (NUTRACEA ONLINE STORE, 2009), o preço de uma garrafa (750 mL) de “Óleo de Arroz *Premium*” é de US\$9,95, o que



equivale a aproximadamente R\$17,3 (conforme cotação do dólar em 28/12/2009). Tal valor sugere que, além dos benefícios nutricionais, o óleo de arroz também é um produto muito interessante do ponto de vista econômico.

#### 4.1.2.2 Processamento do óleo de arroz

A principal dificuldade na obtenção do óleo de arroz a partir do farelo consiste no fato de que este contém vários sistemas enzimáticos. As enzimas lipolíticas hidrolisam os triglicerídeos aumentando rapidamente o teor de ácidos graxos livres, o que dificulta o refino e reduz o rendimento em óleo neutro. Em função disto, para que o farelo possa ser utilizado como matéria-prima, o processo hidrolítico precisa ser controlado através de uma etapa de estabilização (métodos físicos ou químicos). Outra opção é fazer a extração do óleo imediatamente após o beneficiamento do farelo (MORETTO; FETT, 1998; PAUCAR-MENACHO et al., 2007).

A extração convencional do óleo é feita utilizando hexano como solvente. Em seguida, o óleo de arroz bruto, que possui alto teor de ceras e ácidos graxos livres, deve passar pelo processo de refino, composto pelas seguintes etapas (OETTERER; REGITANO-D`ARCE; SPOTO, 2006):

- a) *degomagem*: é a etapa que tem como objetivo a remoção dos fosfolipídios;
- b) *neutralização*: consiste na remoção dos ácidos graxos livres através da reação destes com um álcali (NaOH), resultando na formação de sais orgânicos de sódio (ou sabões). Estes sabões, denominados “borra de neutralização”, são o principal resíduo das indústrias de óleos vegetais;
- c) *clarificação*: consiste num processo físico de adsorção que visa eliminar pigmentos, compostos de enxofre, sabões residuais, metais, entre outras substâncias indesejadas;
- d) *desodorização*: é a operação de acabamento dos óleos vegetais, visando eliminar compostos voláteis associados a sabor e odor desagradáveis.

A Figura 3 ilustra o fluxograma de processo do óleo de arroz. No processamento do óleo de arroz a neutralização merece especial

destaque. É nesta etapa que ocorre a perda de importantes compostos bioativos, que são transferidos para o resíduo (borra de neutralização) ao invés de permanecer no óleo neutro (conforme apresentado na Tabela 2, item 4.1.2).

#### 4.1.2.3 Borra de neutralização do óleo de arroz

A borra de neutralização do óleo de arroz é composta por água (65–70 %), sabões (20–22 %), material insaponificável (7–7,5 %) e glicerídeos (2–2,5 %) (NARAYAN; BARHATE; RAGHAVARAO, 2006). É na fração insaponificável que está presente o  $\gamma$ -orizanol, cujo teor na borra de neutralização pode variar de 1,3 a 3,1 %, de acordo com dados relatados por Seetharamaiah e Prabhakar (1986 apud CALHEIROS, 2007, p. 54). Estes teores de composição podem sofrer variações dependendo das condições de processo específicas de cada indústria, tais como: quantidade de água e álcali usados na etapa de neutralização, tempo de centrifugação e composição inicial do farelo de arroz (NARAYAN; BARHATE; RAGHAVARAO, 2006).

A borra de neutralização é, em geral, utilizada como matéria-prima em indústrias de sabões/detergentes. Outra aplicação consiste na destilação da borra para obtenção de ácidos graxos destinados a indústrias químicas. Além disso, tendo em vista a presença do  $\gamma$ -orizanol, muitos artigos e patentes sobre a recuperação, isolamento e/ou purificação deste antioxidante a partir da borra de neutralização do óleo de arroz (BNOA) têm sido publicados nos últimos anos (INDIRA et al., 2004; NARAYAN; BARHATE; RAGHAVARAO, 2006; RAO; RAO; THENGUMPILLIL, 2002).

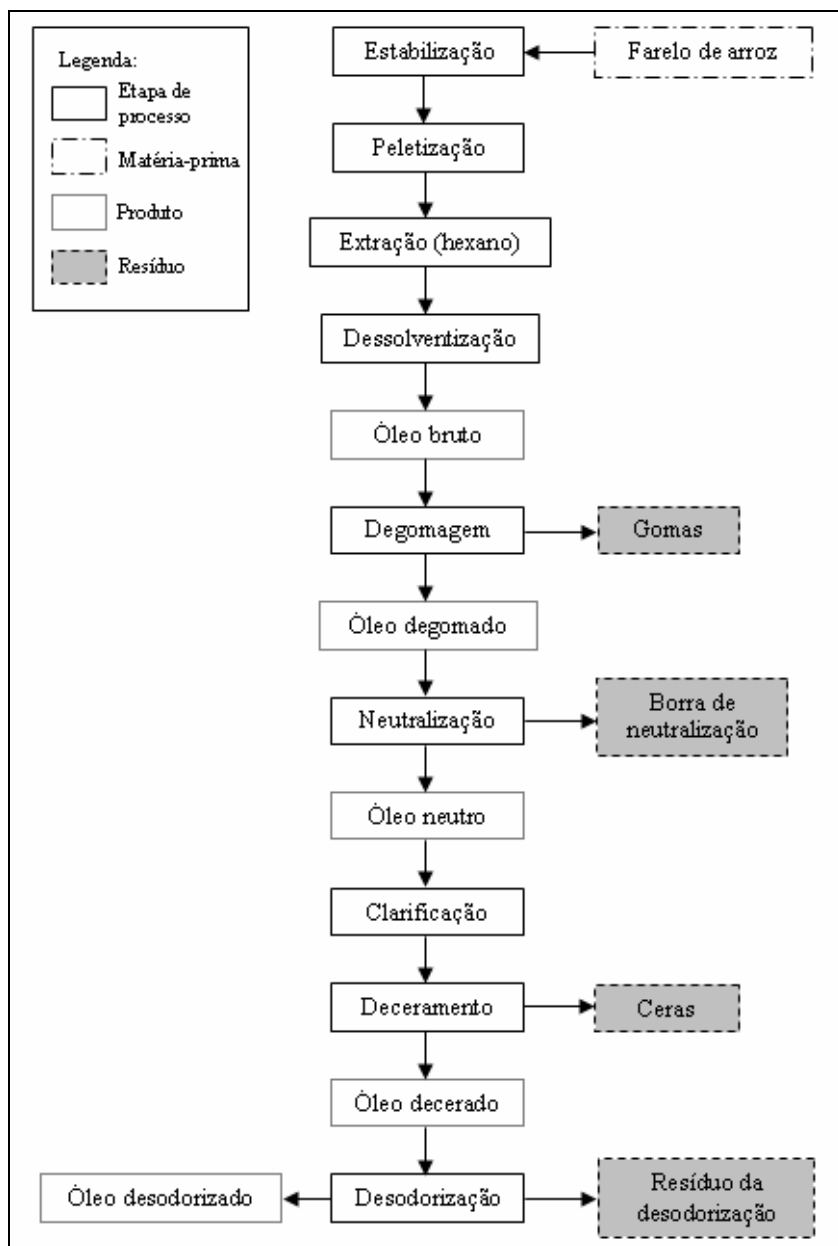
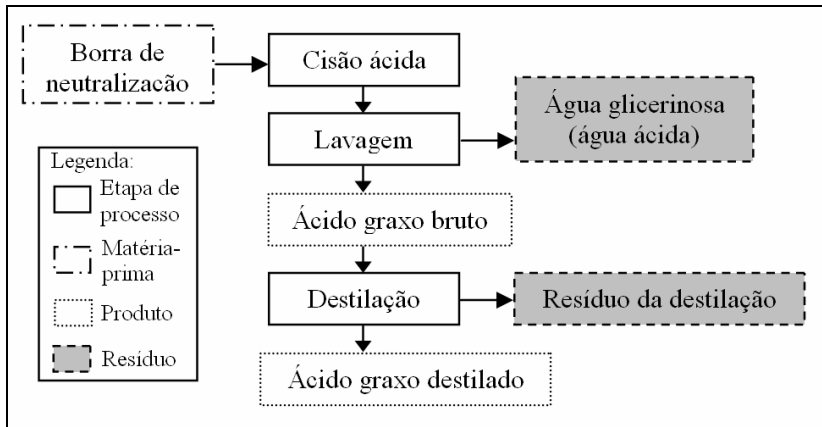


Figura 3. Fluxograma de processamento do óleo de arroz.

Fonte: adaptado de Calheiros (2007).

4.1.2.4 Destilação de ácidos graxos da borra de neutralização

Uma das aplicações do subproduto da neutralização é a produção de ácidos graxos do arroz. Neste caso, a borra é reacidificada e os ácidos graxos são obtidos através de destilação a vácuo (DAS et al., 1998). Este processo tem como resíduo a calda da destilação, ou resíduo da destilação da borra de neutralização (RDBN). Após a destilação o  $\gamma$ -orizanol originalmente presente na borra permanece no resíduo, apresentando-se, portanto, em maior concentração neste subproduto do processo. Na Figura 4 é apresentado o fluxograma do processo de obtenção de ácidos graxos a partir da borra de neutralização do óleo de arroz.



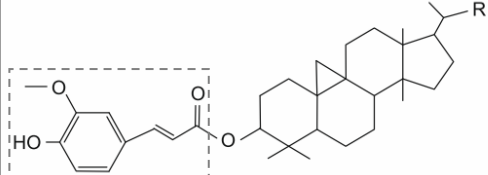

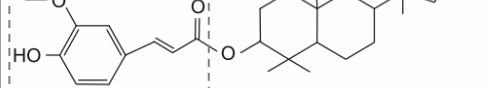

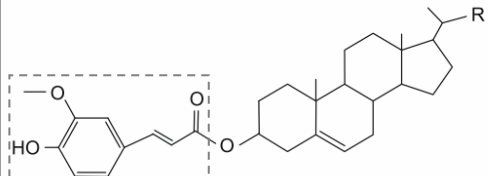

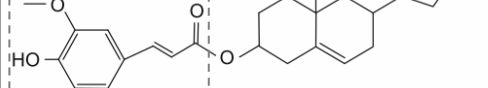

**Figura 4. Fluxograma do processo de destilação de ácidos graxos a partir da borra de neutralização do óleo de arroz.**

Fonte: adaptado de Calheiros (2007).

4.1.3 O  $\gamma$ -orizanol

O nome  $\gamma$ -orizanol é atribuído à complexa mistura de ésteres do ácido ferúlico com esteróis e álcools triterpênicos (BUCCI et al., 2003). Trata-se, portanto, de um composto derivado do ácido ferúlico, o qual é um derivado do ácido hidroxicinâmico, que consiste em um tipo de ácido fenólico. Os ácidos fenólicos, por sua

vez, compõem uma das classes de maior importância dentre os compostos fenólicos, destacando-se como um dos tipos de antioxidantes fenólicos mais comuns em fontes naturais (ANGELO; JORGE, 2007). As estruturas químicas dos principais componentes do  $\gamma$ -orizanol estão apresentadas na Figura 5.

Estrutura Molecular	R	Nome do composto
		24-Methylen-cycloartanylferulate
		Cycloartanylferulate
		$\beta$ -Sitosterylferulate
		Campesterlyferulate

**Figura 5. Estrutura química dos quatro componentes majoritários do  $\gamma$ -orizanol. Em destaque (pontilhado) a estrutura derivada do ácido ferúlico.**

Fonte: Lerma-García et al. (2009).

Os compostos fenólicos, quimicamente, são estruturas que possuem hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, o que lhes confere poder antioxidante. São compostos amplamente distribuídos na natureza, constituindo um grupo bastante diversificado de fitoquímicos. Extratos de ervas e plantas diversas têm sido intensamente estudados em função do poder antioxidante dos mesmos, o que em geral é atribuído ao alto teor de fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007).

Os fenólicos são capazes de doar hidrogênio e formar híbridos de ressonância estáveis com elétrons não pareados, permitindo que a molécula atue como agente redutora, supressora de oxigênio singlete ou doadora de radical hidrogênio livre. Estudos epidemiológicos confirmam os efeitos protetores dos fenólicos contra doenças cardiovasculares e cânceres (MIRA et al., 2009).

O  $\gamma$ -orizanol, assim como outros compostos fenólicos de origem natural, destaca-se por apresentar poderosa ação antioxidante. Diversos estudos relatam propriedades benéficas à saúde associadas ao consumo de  $\gamma$ -orizanol. A melhora do perfil lipídico plasmático, redução do colesterol total, aumento dos níveis de HDL colesterol, prevenção da aterosclerose precoce, inibição da agregação plaquetária e auxílio no tratamento de processos inflamatórios são efeitos fisiológicos positivos atribuídos ao  $\gamma$ -orizanol (BUCCI et al., 2003; JULIANO et al., 2005; RODRIGUES; ONOYAMA; MEIRELLES, 2006). Propostas para utilização industrial do  $\gamma$ -orizanol incluem aplicações potenciais em indústrias alimentícia (como aditivo inibidor de oxidação), cosmética (em cremes e protetores solares) e farmacêutica (suplementos e produtos diversos) (BUCCI et al., 2003; JULIANO et al., 2005).

Exemplos de propostas de aplicação do  $\gamma$ -orizanol em alimentos incluem a utilização deste como antioxidante em produtos com alto teor de lipídios. Chotimarkorn, Benjakul e Silalai (2008a) estudaram o efeito da adição de extratos de farelo de arroz, ricos em  $\gamma$ -orizanol, na estabilidade oxidativa de óleo de atum refinado. Os resultados obtidos comprovaram o potencial dos extratos adicionados como fonte de antioxidantes naturais, capazes de inibir a oxidação lipídica durante a estocagem de alimentos ricos em AG poliinsaturados. Gutierrez et al. (2005) desenvolveram um queijo *cheddar* com adição de  $\gamma$ -orizanol, avaliando atributos de qualidade e sensoriais, além da intenção de compra por parte dos consumidores. O estudo demonstrou que o queijo contendo  $\gamma$ -orizanol (100 mg por porção individual de 28 g) destacou-se por apresentar bons atributos sensoriais e aumento da intenção de compra no momento em que os provadores foram informados dos benefícios à saúde associados ao produto. Os resultados comprovaram a aceitabilidade do queijo desenvolvido e o potencial do  $\gamma$ -orizanol na formulação de produtos para o mercado de alimentos funcionais. Nanua, Mcgregor e Godber (2000) investigaram o efeito da adição de óleo de arroz, enriquecido em  $\gamma$ -orizanol, na formulação de leite em pó integral. Resultados efetivos foram obtidos para a inibição da oxidação em leite em pó integral submetido a tratamento térmico ameno (74 °C/20 s).

## 4.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

A ESC consiste numa técnica de separação alternativa aos processos convencionais, que começou a ser aplicada em escala comercial a partir da década de 80, com início na Alemanha (BRUNNER, 1994). As primeiras aplicações em processos de grande escala estavam relacionadas à indústria alimentícia, com os processos de descafeinização de grãos de café, descafeinização de folhas de chá preto e produção de extratos de lúpulo. Outras aplicações comerciais consistem na extração de temperos e aromatizantes, além de outros componentes com alto valor agregado (BRUNNER, 1994). De acordo com King (2003), um segmento importante da capacidade total de produção das mais de 50 plantas de processamento com fluido supercrítico, espalhadas pelo mundo, se dedica à obtenção de produtos destinados ao mercado de nutracêuticos.

Entre as vantagens bem conhecidas e consolidadas da ESC destacam-se as seguintes (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2007):

- a) *“tecnologia limpa”*: é um processo livre de solventes tóxicos, não gerando resíduos nocivos ao meio ambiente e nem aos produtos obtidos;
- b) *alta qualidade dos extratos*: o emprego de baixas temperaturas evita a degradação térmica, ao passo que a ausência de luz e oxigênio evita as reações de oxidação;
- c) *versatilidade*: a modificação das condições operacionais permite o ajuste do poder de solvatação e seletividade do solvente;
- d) *não necessita pós-processamento*: o solvente é fácil e completamente removido do extrato durante o processo;
- e) *possibilidade de reciclo*: eficiência no uso do solvente;
- f) *baixo consumo energético*: não necessita operações de aquecimento a altas temperaturas, por tempo prolongado, como ocorre nas extrações convencionais com solvente orgânico.

Em relação às desvantagens da ESC, o principal obstáculo para a aplicação da tecnologia supercrítica em escala industrial consiste no alto custo de investimento inicial (MARTÍNEZ, 2005;

PEREIRA; MEIRELES, 2007), uma vez que o uso de altas pressões encarece de forma expressiva o preço dos equipamentos.

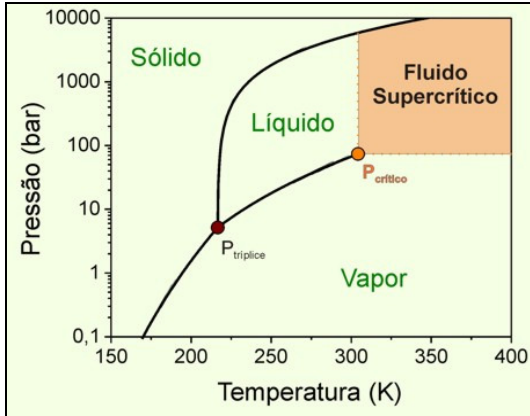
Um dos fluidos mais utilizados em ESC é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que apresenta as seguintes vantagens (GENENA, 2005; MEZZOMO, 2008): o estado supercrítico é facilmente atingido ( $T_c = 31,04 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $P_c = 73,8 \text{ bar}$ ), é relativamente barato e disponível em alta pureza, é inerte e seguro (não inflamável, não corrosivo, não tóxico) possuindo status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), é facilmente separado do produto por modificações nas condições de temperatura e pressão.

King (2002) afirma que o uso de fluidos pressurizados (nos estados sub ou supercrítico) possibilita o desenvolvimento de técnicas versáteis para o processamento de produtos de origem natural, além de ser uma opção ecologicamente benéfica. Cita ainda que, através da seleção apropriada do fluido a ser utilizado na extração, pode-se obter extratos com potencial para aplicação direta em produtos nutracêuticos, fármacos ou cosméticos. De acordo com Meireles, Zahedi e Hatami (2009) a ESC já comprovou ser uma opção tecnologicamente e economicamente viável para o processamento de diversos substratos sólidos. Tal fato pode ser notado pelo número crescente de plantas industriais ao redor do mundo, ainda que em alguns países, como é o caso do Brasil, o processo ainda não seja aplicado em escala industrial.

#### 4.2.1 Fluido supercrítico

O principal diferencial da ESC consiste na aplicação de um fluido supercrítico como solvente. De acordo com Brunner (1994), um composto encontra-se no estado supercrítico se estiver em temperatura (T) maior que a temperatura crítica ( $T_c$ ) e pressão (P) maior que a pressão crítica ( $P_c$ ). Na Figura 6 é apresentado um diagrama de fases com indicação da região de fluido supercrítico.





**Figura 6. Diagrama de fases para o CO<sub>2</sub>.**

Fonte: adaptado de GPQVA (2009).

No ponto crítico, e em suas proximidades, pequenas modificações nas condições de temperatura e pressão resultam em variações de grande magnitude nas propriedades dos fluidos. De acordo com Brunner (1994), efeitos similares aos do estado supercrítico podem ser atingidos em condições nas quais  $P > P_c$  e  $T < T_c$ , para temperaturas próximas da crítica (subcríticas).

Propriedades dos fluidos supercríticos (FSCs), importantes no processo de extração, são a densidade, a viscosidade e o coeficiente de difusão (GENENA, 2005). Nos FSCs os valores de densidade são comparáveis aos de um líquido, os valores de viscosidade comparáveis aos de um gás, e os valores dos coeficientes de difusão são cerca de uma ordem de magnitude maiores que os dos líquidos. Tais propriedades, intermediárias entre os estados gasoso e líquido, valorizam o poder de solvatação dos FSCs em relação aos gases e, ao mesmo tempo, aumentam a taxa de transferência de massa em relação aos líquidos (KITZBERGER, 2005).

#### 4.2.2 Curva de extração

A otimização de um processo industrial de ESC requer o conhecimento de dados termodinâmicos (solubilidade e seletividade) e dados cinéticos (taxa de transferência de massa) (FERREIRA et al.,

1999). A representação da cinética da ESC é feita através da construção da curva de extração, que normalmente é apresentada como um gráfico da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. A curva típica de ESC é dividida em 3 regiões bem definidas (CAMPOS et al., 2005; FERREIRA; MEIRELES, 2002; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009):

1<sup>a</sup>) *etapa com taxa constante de extração (CER)*: a superfície externa da partícula está coberta com o soluto, que é chamado “soluto de fácil acesso”. Neste período a convecção é o mecanismo dominante e, portanto, a resistência à transferência de massa está na fase fluida;

2<sup>a</sup>) *etapa com taxa decrescente de extração (FER)*: falhas na cobertura de soluto sobre a superfície externa começam a aparecer, dando início à difusão do soluto presente no interior da partícula. Nesta etapa os mecanismos de transferência de massa por difusão e por convecção ocorrem simultaneamente;

3<sup>a</sup>) *etapa difusional*: a camada externa de soluto praticamente desaparece. A transferência de massa se dá por difusão do interior das partículas do substrato. Neste período a resistência à transferência de massa está na fase sólida.

A representação esquemática de uma curva de extração, com as 3 regiões bem definidas, é apresentada na Figura 7.

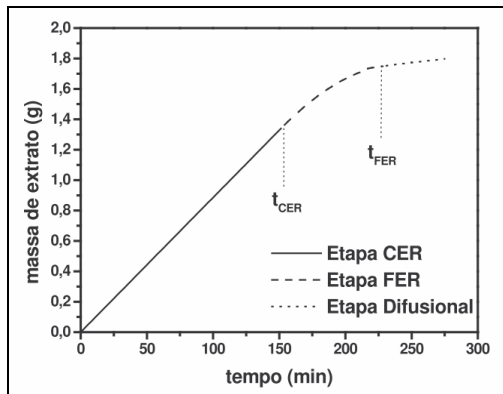


Figura 7. Representação da curva de ESC com três etapas bem definidas.

Fonte: Martínez (2005).

A investigação das curvas de ESC, bem como o conhecimento do efeito de mudanças das condições operacionais sobre as mesmas, é importante para a definição de parâmetros de *design* de processo, tais como volume de extrator, vazão de solvente e tempo de extração (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

#### 4.2.3 Modelagem matemática das curvas de extração

O alto custo de investimento para instalação de uma unidade industrial consiste no principal empecilho à disseminação da ESC em muitos países. Desta forma, ferramentas que auxiliem os profissionais responsáveis pela tomada de decisões de *design* de processo precisam estar disponíveis (MEIRELES; ZAHEDI; HATAMI, 2009). Neste contexto, a modelagem matemática de dados experimentais de ESC consiste numa ferramenta muito útil, uma vez que tem como principal objetivo a determinação de parâmetros para *design* de processo, tais como dimensões de equipamentos, vazão de solvente e tamanho de partícula. A obtenção de tais parâmetros torna possível a predição da viabilidade econômica do processo de ESC em escala industrial, através de estudos de simulação das curvas de extração (MARTÍNEZ et al., 2003).

Um modelo, idealmente, deve ser um instrumento matemático capaz de refletir os fenômenos físicos da extração e os dados observados experimentalmente (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009). Quando o modelo descreve bem o fenômeno que ocorre dentro do leito de extração, ele pode ser usado para o *design* de processo e aumento de escala de processo (*scale-up*) (MEIRELES; ZAHEDI; HATAMI, 2009).

Diversos modelos matemáticos para descrição do processo de ESC estão disponíveis na literatura. Estes podem ser empíricos ou baseados no balanço de massa no leito de extração. No último caso, cada autor cria sua própria interpretação do fenômeno de transferência de massa que ocorre durante o processo (MEIRELES; ZAHEDI; HATAMI, 2009). A maior parte dos modelos tem como base o balanço de massa no leito de extração, o qual pode ser dividido em duas fases distintas: (1) fase sólida, composta pela matriz vegetal da qual o soluto é extraído; (2) fase fluida, composta

pelo solvente supercrítico e pelo soluto dissolvido no mesmo (MARTÍNEZ et al., 2003). De acordo com Gaspar et al. (2003), o modelo pode se basear no balanço de massa da fase sólida, da fase fluida, ou de ambas as fases. Exemplos de modelos disponíveis na literatura são: o modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999); os modelos difusivos, baseados no balanço de massa na fase sólida, como o de Crank (1975) adaptado por Reverchon (1997) e o de Gaspar et al. (2003); o modelo logístico de Martínez et al. (2003), que é baseado no balanço de massa dentro do leito de extração (fase sólida e fase fluida).

#### 4.2.3.1 Modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999)

Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) apresentaram um modelo empírico para modelagem matemática da ESC de óleo de casca de azeitona. O modelo utilizado, com apenas um parâmetro ajustável, se ajustou bem aos dados experimentais, embora a natureza empírica do mesmo implique na ausência de significado físico (ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL; KING, 1999).

O modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) utiliza a equação de cinética de crescimento microbiano de Monod para descrição das curvas de extração, conforme Equação 1 (ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL; KING, 1999; MARTÍNEZ, 2005):

$$m_E(t) = x_0 M \left( \frac{t}{b_1 + t} \right) \quad (1)$$

Onde:

$m_E(t)$  = massa de extrato em função do tempo (g);

$x_0$  = razão mássica de extrato no substrato (g/g);

$M$  = massa de substrato alimentada no leito de extração (g);

$t$  = tempo de extração (min);

$b_1$  = parâmetro ajustável, sem significado físico (min).

## 4.2.3.2 Modelo difusivo de Crank (1975)

O modelo de Crank (1975) foi adaptado por Reverchon (1997) para utilização em processos de ESC. O modelo considera a transferência de massa na partícula como uma analogia à transferência difusiva de calor. O balanço de massa é aplicado na fase sólida, sendo cada partícula tratada como um corpo esférico uniforme, no qual as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas, tal como uma esfera quente que perde calor para o meio em função do tempo (MEZZOMO, 2008; REVERCHON, 1997).

A aplicação da segunda lei de Fick para a difusão, com resolução do balanço de massa na superfície da partícula, dá origem à Equação 2, que descreve a massa de extrato se difundindo através da partícula, em função do tempo (MEZZOMO, 2008; REVERCHON, 1997).

$$m_E(t) = x_0 M \left[ 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D_1 t}{r^2}\right) \right] \quad (2)$$

Onde:

$m_E(t)$  = massa de extrato em função do tempo (g);

$x_0$  = razão mássica de extrato no substrato (g/g);

$M$  = massa de substrato alimentada no leito de extração (g);

$t$  = tempo de extração (min);

$n$  = número inteiro;

$D_1$  = coeficiente de difusão, parâmetro ajustável ( $m^2/\text{min}$ );

$r$  = raio da partícula (m).

## 4.2.3.3 Modelo SSP de Gaspar et al. (2003)

O modelo conhecido como SSP (*Simple Single Plate*), de Gaspar et al. (2003), assim como o de Crank (1975), também considera a transferência de massa na partícula através do

mecanismo difusivo. A principal diferença está na geometria da partícula, que no caso do SSP é considerada uma placa (MEZZOMO, 2008).

O modelo se baseia no balanço de massa na fase sólida, fazendo-se as seguintes considerações: (1) o material extraível encontra-se uniformemente distribuído dentro das partículas; (2) o transporte intraparticular é descrito por um processo difusivo; (3) a concentração de soluto na fase fluida é negligenciável quando comparada à concentração da fase sólida; (4) o balanço de massa na fase fluida é negligenciado. O modelo é descrito pela Equação 3 (GASPAR et al., 2003).

$$m_E(t) = x_0 M \left[ 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{D_2(2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad (3)$$

Onde:

$m_E(t)$  = massa de extrato em função do tempo (g);

$x_0$  = razão mássica de extrato no substrato (g/g);

$M$  = massa de substrato alimentada no leito de extração (g);

$t$  = tempo de extração (min);

$n$  = número inteiro;

$D_2$  = coeficiente de difusão, parâmetro ajustável ( $m^2/\text{min}$ );

$\delta$  = espessura da partícula (placa) (m).

#### 4.2.3.4 Modelo logístico de Martínez et al. (2003)

Martínez et al. (2003) propuseram um modelo matemático baseado no balanço diferencial de massa no leito de extração. O modelo pode ser aplicado considerando-se o extrato como um único pseudocomponente ou, ainda, como uma mistura de vários grupos de compostos (sistema multicomponente), classificados de acordo com suas estruturas químicas.

O modelo logístico considera o balanço de massa na fase sólida e na fase fluida, dentro do leito de extração. O acúmulo e a dispersão na fase fluida são negligenciados, pois se assume que ambos os efeitos não têm influência significativa no processo quando

comparados à convecção. O termo de transferência de massa interfacial é representado por uma das soluções da equação logística (MARTÍNEZ et al., 2003).

No modelo logístico, quando o tempo tende ao infinito, a massa de extrato tende a um valor fixo, assintoticamente. Este valor fixo pode ser considerado como o total de massa extraível, para determinadas condições operacionais de processo. A expressão do modelo, para um pseudocomponente, é dada pela Equação 4 (MARTÍNEZ et al., 2003; MARTÍNEZ, 2005).

$$m_E(h = H, t) = \frac{x_0 M}{\exp(b_2 t_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(b_2 t_m)}{1 + \exp[b_2(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (4)$$

Onde:

$m_E$  = massa de extrato em função do tempo (g);

$h$  = coordenada axial (m);

$H$  = comprimento total do leito (m);

$t$  = tempo de extração (min);

$x_0$  = razão mássica de extrato no substrato (g/g);

$M$  = massa de substrato alimentada no leito de extração (g);

$b_2$  = parâmetro ajustável, sem significado físico ( $\text{min}^{-1}$ );

$t_m$  = parâmetro ajustável, o qual corresponde ao instante no qual a taxa de extração alcança o valor máximo (min).

#### 4.2.4 Tecnologia supercrítica aplicada a subprodutos do arroz

A utilização da extração supercrítica no processamento de subprodutos do arroz já foi tema de investigação de diversos estudos. Nos últimos anos o foco principal consiste na recuperação, fracionamento e/ou preservação de compostos minoritários com ação bioativa, como é o caso do  $\gamma$ -orizanol.

Xu e Godber (2000) compararam a ESC com o método convencional de extração com solventes orgânicos na obtenção de óleo a partir do farelo de arroz. Os resultados foram avaliados em termos de eficiência na extração de lipídios e de  $\gamma$ -orizanol. O teor de  $\gamma$ -orizanol no extrato obtido com  $\text{CO}_2$  supercrítico (50 °C/689 bar/25

min) foi cerca de quatro vezes superior do que o melhor resultado obtido para as extrações convencionais. Em relação ao rendimento de óleo extraído, nas extrações convencionais os valores obtidos foram de 13 – 15 % (m/m), enquanto na ESC os rendimentos variaram entre 9 – 13 % (m/m).

Aspectos do processo de desacidificação do óleo de arroz bruto através de fracionamento com CO<sub>2</sub> supercrítico foram investigados por Dunford e King (2000; 2001) e Dunford, Teel e King (2003). Os resultados obtidos por Dunford, Teel e King (2003) demonstraram que o fracionamento em pressão moderada (138 bar) e alta temperatura (80 °C) não apenas foi efetivo na remoção dos ácidos graxos livres presentes no óleo bruto, mas também resultou no enriquecimento do conteúdo de  $\gamma$ -orizanol na fração refinada. Danielski et al. (2005) propuseram a ESC de óleo a partir do farelo de arroz, seguida de desacidificação através de fracionamento com CO<sub>2</sub> supercrítico. Os rendimentos de óleo obtidos foram da ordem de 20 % (m/m) e o processo de desacidificação proposto foi eficiente na remoção dos ácidos graxos livres. Analogamente, Balachandran et al. (2008) apresentaram um processo integrado de extração e refino, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, para a obtenção de óleo de arroz rico em compostos nutracêuticos. O máximo teor de  $\gamma$ -orizanol (1,1 %, m/m) e máximo rendimento de óleo (20 %, m/m) foram obtidos na ESC a 500 bar/60 °C/1,5 h. Chen et al. (2008) também estudaram a desacidificação de óleo de arroz utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico.

Recentemente processos de extração com água subcrítica, a partir de farelo de arroz, também foram investigados (LERMA-GARCÍA et al., 2009). Pourali, Asghari e Yoshida (2009a) propuseram um processo, utilizando água subcrítica, para inativação da enzima lipase do farelo de arroz com simultânea extração do óleo presente no mesmo. Os resultados demonstraram que o processo com água subcrítica foi eficiente na extração de óleo a partir do farelo de arroz (94 % de recuperação do óleo), além de estabilizar completamente o óleo obtido.

Calheiros (2007), em pesquisa desenvolvida no LATESC/EQA/UFSC, estudou a obtenção de  $\gamma$ -orizanol a partir da BNOA utilizando ESC com CO<sub>2</sub>. Na melhor condição (300 bar/60 °C) o rendimento de extrato foi de 12,5 % (m/m), com teor de  $\gamma$ -orizanol igual a 16 % (m/m) e taxa de recuperação de  $\gamma$ -orizanol igual a 69 % (m/m). Contudo, a grande maioria do extenso número



de publicações e patentes relacionadas com a recuperação, produção, isolamento e/ou purificação de  $\gamma$ -orizanol a partir da BNOA relata a utilização de técnicas de cristalização, precipitação, extração e/ou fracionamento com solventes orgânicos convencionais (LERMA-GARCÍA et al., 2009; NARAYAN; BARHATE; RAGHAVARAO, 2006).

### 4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

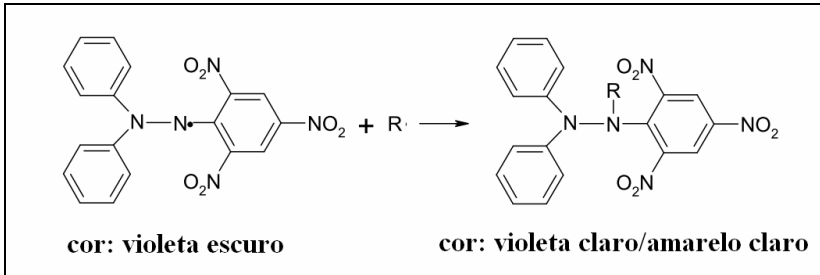
Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar significativamente a oxidação de substratos oxidáveis. A importância dos antioxidantes para os alimentos e sistemas biológicos é bem conhecida, uma vez que protegem os mesmos dos processos oxidativos (BISCAIA, 2007).

Nos alimentos, a oxidação lipídica tem como consequência o desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis (ranço), além da formação de compostos secundários potencialmente tóxicos (BISCAIA, 2007). Nos sistemas biológicos o estresse oxidativo consiste, basicamente, no desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. Tal processo ocorre quando a produção de espécies reativas ao oxigênio está acelerada ou quando os mecanismos de proteção contra as espécies reativas ao oxigênio estão deteriorados. A peroxidação lipídica consiste na principal consequência do estresse oxidativo, resultando em graves danos às membranas celulares. Acredita-se que cerca de 95 % das doenças crônicas degenerativas (como é o caso do Alzheimer, aterosclerose e envelhecimento precoce, entre diversas outras) são induzidas por estresse oxidativo (VICENTINO; MENEZES, 2007).

O interesse na investigação da atividade antioxidante de produtos naturais aumentou expressivamente a partir do momento em que evidências epidemiológicas comprovaram o efeito benéfico de alguns alimentos, ricos em substâncias antioxidantes, na prevenção de doenças (BISCAIA, 2007; RUFINO et al., 2007). Tal interesse impulsionou o desenvolvimento de métodos para determinação de atividade antioxidante. Os métodos existentes são bastante diversificados e baseiam-se em diferentes mecanismos de

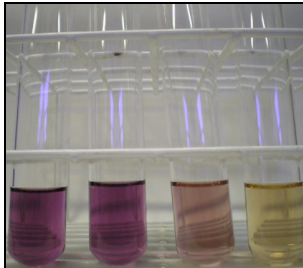
reação. O método do radical livre DPPH é um dos mais usados atualmente (RUFINO et al., 2007).

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical orgânico livre, estável à temperatura ambiente, que produz uma coloração violeta intensa quando em solução com etanol. Este radical é reduzido na presença de molécula antioxidante, resultando na descoloração da solução etanólica. O decréscimo na coloração, medido através da leitura de absorbância, é proporcional à concentração de antioxidantes no meio reacional. O método do DPPH consiste numa técnica fácil e rápida de medição da capacidade antioxidante (MENSOR et al., 2001). As Figuras 8 e 9 ilustram, respectivamente, o esquema reacional do método do DPPH e a descoloração típica do meio reacional.



**Figura 8. Estabilização do radical livre DPPH.**

Fonte: Rufino et al. (2007).



**Figura 9. Mudança de coloração característica do método do DPPH.**

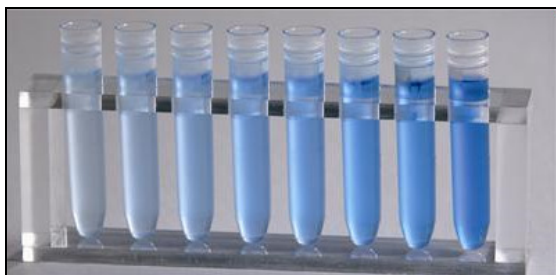
Fonte: Rufino et al. (2007).

Outra técnica bastante utilizada, na investigação de extratos com potencial antioxidante, é a determinação do teor de fenólicos

totais (TFT) através do método de Folin-Ciocalteu. De acordo com Roginsk e Lissi (2005), ainda que este método não caracterize ou expresse um valor de atividade antioxidante, é um dos melhores para a estimativa da capacidade antioxidante de alimentos. A técnica, que é bastante prática, consiste na mensuração dos compostos fenólicos presentes na amostra, sendo que valores altos para o TFT sugerem elevada atividade antioxidante.

No método de Folin-Ciocalteu o mecanismo é uma reação de oxi-redução, sendo que o sistema de teste consiste numa mistura de tungstato e molibdato em meio básico. Neste meio os compostos fenólicos são oxidados, reação que resulta na formação do radical superóxido, o qual reage com o molibdato formando óxido de molibdênio, que possui coloração azul intensa (MEZZOMO, 2008; ROGINSK; LISSI, 2005). O aparecimento da coloração azul (Figura 10) é mensurado através de leitura da absorbância, a qual será proporcional ao conteúdo de fenólicos presentes no meio reacional. O conteúdo de fenólicos totais é calculado a partir de uma curva padrão de ácido gálico. O resultado da análise, portanto, é expresso em EAG (equivalente em ácido gálico).

Diversos pesquisadores têm utilizado os métodos do DPPH e de Folin-Ciocalteu na análise do potencial antioxidante de produtos naturais (BISCAIA 2007; CAMPOS et al., 2008; CHAN; LIM; CHEW, 2007; NINGAPPA; DINESHA; SRINIVAS, 2008).



**Figura 10. Aparecimento de coloração característica da reação do método de Folin-Ciocalteu.**

Fonte: Protein assay (2009).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O resíduo da destilação da borra de neutralização do óleo de arroz (RDBN) foi fornecido pela indústria IRGOVEL Ltda. (Pelotas/RS, Brasil). O material foi recebido em embalagem plástica de 20 L e, posteriormente, subdividido em embalagens plásticas de polipropileno com capacidade para 2 L, sendo estas acondicionadas em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp, Joinville/SC).

#### 5.1.1 Determinação do teor de umidade e voláteis

A caracterização da matéria-prima, em termos de teor de umidade e voláteis, foi feita de acordo com o método Ca 2c-25 da AOCS (2004), o qual é aplicável a óleos e gorduras de origem animal ou vegetal. A técnica é gravimétrica e baseia-se na perda de massa sofrida pela amostra quando submetida a aquecimento (130 °C) em estufa com circulação de ar forçada.

Cápsulas de alumínio foram previamente aferidas por meio de aquecimento em estufa (130 °C/circulação de ar) (A3 CARF., De Leo, Porto Alegre/RS), resfriamento em dessecador e pesagem em balança analítica (AS200, OHAUS, Florham Park/NJ) até atingir peso constante. A amostra de RDBN (5 g) foi colocada na cápsula de alumínio, aquecida em estufa (130 °C/circulação de ar) por 30 min, resfriada em dessecador e pesada. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas, sucessivamente, até que a amostra atingisse peso constante. O cálculo do teor de umidade e voláteis foi realizado de acordo com a Equação 5.

$$\text{TUV}(\%) = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100 \quad (5)$$

Onde:

TUV = teor de umidade e voláteis (% , m/m);

$m_i$  = massa inicial de amostra (g);

$m_f$  = massa final de amostra (g).

### 5.1.2 Determinação do teor de lipídios

A determinação do teor de lipídios/extrato etéreo da MP foi feita de acordo com metodologia 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), a qual se baseia na extração direta em Soxhlet.

A amostra de RDBN (5 g) foi acondicionada em cartucho de papel filtro, sendo este colocado no extrator Soxhlet. O solvente utilizado foi éter etílico (150 mL), com tempo de refluxo igual a 8 h e aquecimento controlado através da taxa de gotejamento no condensador (4 a 5 gotas/s). A eliminação do solvente foi feita em rotaevaporador. O cálculo do teor de lipídios foi realizado de acordo com a Equação 6.

$$TL(\%) = \frac{m_{lip}}{m_a} * 100 \quad (6)$$

Onde:

TL = teor de lipídios (% , m/m);

$m_{lip}$  = massa de lipídios (extrato) (g);

$m_a$  = massa de amostra (g).

### 5.1.3 Determinação do teor de $\gamma$ -orizanol

A quantificação do teor de  $\gamma$ -orizanol na MATÉRIA-PRIMA foi realizada pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência sob detecção ultravioleta (CLAE/UV) e espectrofotometria UV, conforme metodologias de Scavariello (2002) e Bucci et al. (2003), respectivamente (ver item 5.7.4).

#### 5.1.4 Determinação do teor de fenólicos totais

A quantificação do teor de fenólicos totais na MATÉRIA-PRIMA foi feita pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, de acordo com metodologia de Singleton e Rossi (1965 apud Campos et al., 2008, p. 8415) (ver item 5.7.2).

#### 5.1.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH

A estimativa da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi realizada de acordo com Mensor et al. (2001) (ver item 5.7.3).

#### 5.1.6 Determinação do perfil de ácidos graxos

A composição da matéria-prima em termos de ácidos graxos foi determinada pela técnica de Cromatografia Gasosa (CG), de acordo com método oficial da AOCS (1996) (ver item 5.7.6).

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO $\gamma$ -ORIZANOL

As análises de termogravimetria (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas para caracterizar o  $\gamma$ -orizanol em termos de estabilidade térmica. Ambas as análises foram realizadas pelo Laboratório de Polímeros, na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

A curva de TGA foi obtida em equipamento detector tipo Shimadzu TGA-50. O intervalo de temperatura explorado foi de 20 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. A atmosfera de análise foi composta por nitrogênio e oxigênio, em proporção similar

a do ar atmosférico ( $80 \pm 0,5 \%$  e  $20 \pm 0,5 \%$ , respectivamente), utilizando-se vazão de 50 mL/min. A amostra (7,5 mg) foi acondicionada em célula (cadinho) de platina.

A análise de DSC foi realizada em equipamento detector tipo Shimadzu DSC-50, utilizando-se mesma atmosfera, vazão e taxa de aquecimento da análise de TGA. O intervalo de temperatura investigado foi de 20 a 200 °C. A amostra (7,6 mg) foi acondicionada em célula de alumínio.

Cabe ressaltar que a amostra utilizada nas análises não foi um padrão puro (grau analítico) do  $\gamma$ -orizanol, em função de não se dispor de tal padrão. O material utilizado foi uma mistura com diferentes frações do orizanol, majoritariamente composto pelos principais componentes do  $\gamma$ -orizanol.

### 5.3 PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

O pré-tratamento da matéria-prima foi baseado na metodologia descrita por Das et al. (1998), compreendendo as seguintes etapas: hidrólise alcalina, precipitação induzida por íons cálcio, filtração a vácuo, secagem e moagem.

Na hidrólise alcalina 150 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH 1,8 M) foram adicionadas a 66 g de matéria-prima, sendo a mistura mantida em aquecimento (90 °C) e agitação constante por aproximadamente 1,5 h. Em seguida 1200 mL de água destilada foram adicionados ao material hidrolisado, mantendo-se agitação constante (sem aquecimento) até dissolução completa (~20 min). Então, lentamente, na forma de gotejamento, 180 mL de solução aquosa de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  0,75 M) foram adicionadas enquanto o sistema era mantido sob agitação manual. Após término da adição do  $\text{CaCl}_2$ , e conseqüente precipitação do material, o sistema foi mantido sob agitação por mais 15 min.

A solução contendo o precipitado foi filtrada a vácuo. O filtrado, contendo o excesso de NaOH, foi descartado. O precipitado úmido obtido foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar (A3 CARF., De Leo, Porto Alegre/RS) a 35 °C por 24 h. Cabe ressaltar que a baixa temperatura de secagem foi aplicada a fim de se evitar a fusão do material. Em termos de estabilidade térmica do  $\gamma$ -

orizanol, não haveria problemas em realizar a secagem em temperatura mais elevada (conforme justificativa do item 6.2), o que diminuiria o tempo desta etapa.

Ao final da secagem o precipitado seco foi caracterizado em termos de umidade, através de técnica gravimétrica baseada na determinação da perda de umidade e substâncias voláteis em estufa (105 °C) de acordo com método 950.46B da AOAC (1990).

A moagem do precipitado seco foi realizada em liquidificador doméstico (RI 2034, Walita, Varginha/MG), e o material obtido foi acondicionado em embalagens plásticas de polipropileno e estocado em freezer doméstico (Freezer 260, Brastemp, Joinville/SC). Este precipitado moído passou por seleção visual de tamanho de partícula (partículas “grossas” foram descartadas) e foi utilizado como matriz em todos os processos de extração. Nas Figuras 11(a) a 11(d) são apresentadas fotos da MP, do precipitado úmido obtido após filtração a vácuo, do material utilizado como matriz das extrações e das partículas “grossas” descartadas através de seleção visual.

A padronização e a caracterização granulométrica das partículas obtidas não puderam ser realizadas através da utilização de agitador mecânico de peneiras (procedimento usual), pois o material obtido apresentava aspecto coesivo (“grudento/pegajoso”) e, em função disso, aderiu-se aos poros da peneira ao invés de fluir através dos mesmos. Por este motivo, a seleção/padronização de tamanho de partícula teve de ser feita visualmente e o diâmetro médio de partícula foi obtido a partir de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).





**Figura 11. Etapas do pré-tratamento da matéria-prima. (a) matéria-prima; (b) precipitado úmido, obtido após etapa de filtração a vácuo; (c) matriz das extrações: material obtido após secagem e moagem do precipitado úmido; (d) partículas grossas descartadas na seleção visual.**

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA MATRIZ DAS EXTRAÇÕES

O material obtido após pré-tratamento da matéria-prima, e utilizado como matriz dos processos de extração, foi caracterizado em termos de tamanho e morfologia de partícula através de análise de MEV.

A análise de MEV foi realizada em microscópio JEOL JSM-6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina. Micrografias com

aumento de 33 até 350 vezes foram obtidas, conforme fotos apresentadas no Apêndice III. O diâmetro médio de partícula foi calculado a partir das micrografias obtidas, utilizando-se para tal o *software* Size Meter versão 1.1 (Luis Henrique Castelan Carlson, LCP/EQA/UFSC, SC, Brasil).

## 5.5 EXTRAÇÃO SOXHLET

As extrações utilizando solventes orgânicos convencionais foram realizadas através da técnica de extração Soxhlet, conforme metodologia descrita por Campos et al. (2008). O principal objetivo destas extrações foi obter resultados para fazer a comparação entre extração convencional e ESC em termos de rendimento global, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método do DPPH, teor de  $\gamma$ -orizanol, taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol e composição de ácidos graxos.

O esquema representativo e a foto do aparato de extração Soxhlet são apresentados nas Figuras 12(a) e 12(b), respectivamente. O sistema de extração é composto por um extrator Soxhlet, acoplado na parte inferior a um balão e na parte superior a um condensador. O solvente contido no balão permanece em contato com uma fonte de aquecimento, evapora e atravessa o braço do extrator Soxhlet atingindo o condensador. Após ser resfriado, o solvente condensa e passa a gotejar sobre a amostra que fica dentro de um cartucho de papel filtro acondicionado no extrator Soxhlet. Quando o solvente em contato com a amostra atinge o nível do sifão do extrator ocorre o refluxo, o solvente retorna ao balão carregando consigo os compostos solubilizados e o processo recomeça. Uma etapa posterior é necessária para eliminação do solvente.

As condições utilizadas na extração Soxhlet foram: 5 g de matéria prima; 150 mL de solvente; tempo de refluxo igual a 6h; aquecimento controlado através da taxa de gotejamento no condensador (4 a 5 gotas/s). Os solventes usados foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, cujos índices de polaridade estão expressos na Tabela 4.

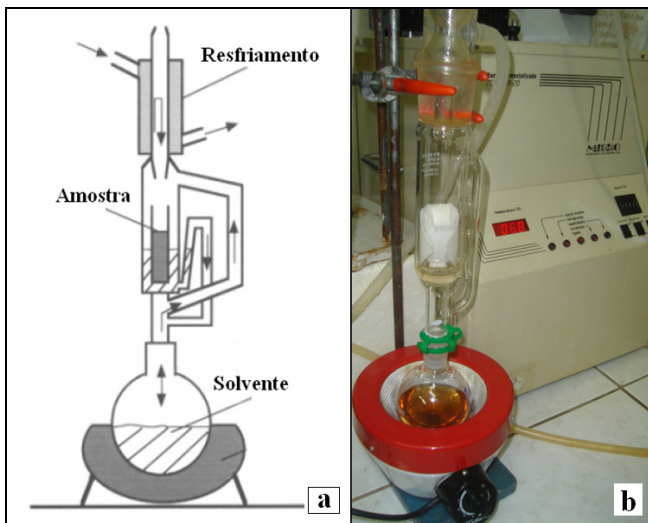


Figura 12. (a) esquema representativo e (b) foto do aparato experimental de extração Soxhlet.

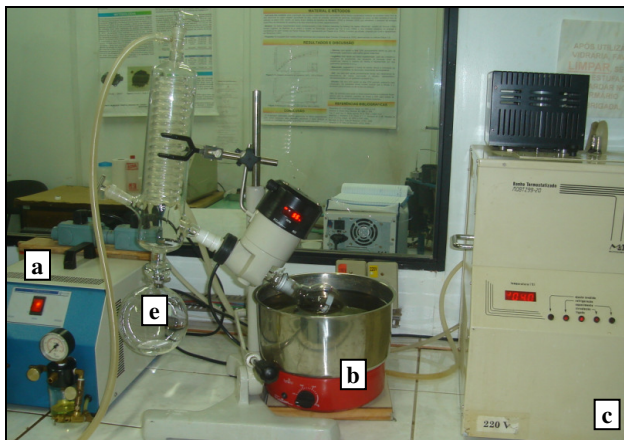
Fonte: (a) Martínez (2005).

Tabela 4. Índice de polaridade dos solventes utilizados nas extrações Soxhlet.

Solvente	Índice de Polaridade
Hexano	0
Diclorometano	3,1
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2

Fonte: BYERS, 2009.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a eliminação do solvente foi feita em rotaevaporador com controle de vácuo e temperatura. A Figura 13 ilustra o equipamento usado na rotaevaporação.



**Figura 13.** Foto do rotaevaporador. (a) bomba de vácuo; (b) banho de aquecimento da mistura soluto + solvente; (c) banho de resfriamento conectado ao condensador; (e) solvente recuperado.

## 5.6 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

Na ESC utilizou-se como solvente o  $\text{CO}_2$  puro. Os experimentos de extração foram divididos nos segmentos: ensaios preliminares, ensaios de rendimento global e ensaios de cinética.

### 5.6.1 Equipamento de ESC

A unidade de ESC disponível no LATESC tem capacidade para operar em pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente na faixa de 0,1 a 2,5 kg/h. O equipamento foi projetado e construído no Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha. O diagrama representativo e a foto do equipamento são apresentados, respectivamente, nas Figuras 14 e 15.

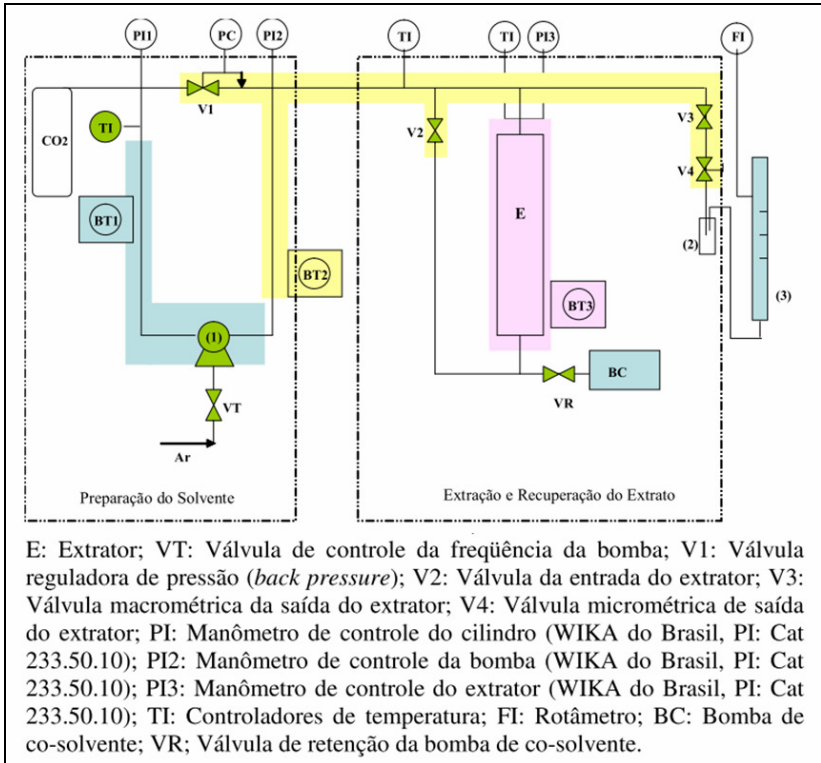
O suprimento de  $\text{CO}_2$  (99,9 % de pureza) consiste em um cilindro de 25 kg (White Martins, Brasil) equipado com tubo pescador e diretamente conectado à linha de extração. Após abertura

e regulagem das válvulas do cilindro, o CO<sub>2</sub> ( $P_{\min} = 55$  bar) segue para um banho termostático (BT1) (Thermo Haake, C10-K10) que possui solução de etilenoglicol como fluido refrigerante e tem temperatura programada em  $-5^{\circ}\text{C}$ . A solução de etilenoglicol circula através de mangueira que envolve a bomba (1) (M111, Maximator, Niedersachsen). Este procedimento de refrigeração é importante para garantir que o CO<sub>2</sub> entre e se mantenha no estado líquido ao passar pela bomba, evitando problemas de cavitação. A bomba é pneumática e trabalha alimentada por ar comprimido filtrado com pressão entre 5 e 7 bar.

A válvula globo, conhecida como *back pressure*, (V1) (Tescom Cat n°26-1761-24-161) é utilizada para regular a pressão de operação desejada. Após passar pela válvula de entrada (V2) (Maximator Cat n° 3710.0104) o CO<sub>2</sub> atinge o extrator (E), que é constituído de um cilindro de aço inox encamisado, com 31,60 cm de comprimento, 2,012 cm de diâmetro interno, volume interno de 103,28 mL e extremidades rosqueadas. Depois que o CO<sub>2</sub> atravessa o extrator, solubilizando e carregando os compostos extraídos, a mistura de CO<sub>2</sub> + extrato passa pelas válvulas de saída macrométrica (V3) (Sitec Shutoff valve 710.3010) e micrométrica (V4) (Sitec Microvalve 710.3012). Após despressurização nas válvulas de saída o CO<sub>2</sub> retorna ao estado gasoso e o extrato é coletado em frasco âmbar (2) imerso em banho de gelo para evitar a perda de compostos voláteis. O CO<sub>2</sub> gasoso segue por tubulação até o rotâmetro (ABB Automation Products 10 A 61), onde é feita a medida da vazão de solvente.

A temperatura do extrator é mantida constante na temperatura operacional desejada através da circulação de água aquecida por um banho termostático (BT3) (Thermo Haake, DC30-B30) conectado à camisa do extrator. A linha que liga a bomba ao extrator e a linha de saída do extrator são mantidas submersas em água aquecida por um banho termostático (BT2) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) programado na temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$ . Este procedimento é essencial para evitar o congelamento nas válvulas de saída em função do efeito *Joule-Thompson* (expansão adiabática, processo isentálpico) que ocorre na expansão do CO<sub>2</sub>. A válvula micrométrica (V4) é importante para que se consiga fazer um ajuste fino da vazão de solvente utilizada no processo. Em caso de extrações com co-

solvente, uma bomba de co-solvente (BC) é acoplada na tubulação de entrada do extrator.



**Figura 14. Diagrama esquemático do equipamento de ESC.**

Fonte: Biscaia (2007).



**Figura 15.** Foto do equipamento de ESC do LATESC/EQA/UFSC.

### 5.6.2 Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares tiveram como finalidade conhecer o comportamento da matriz em relação ao processo de ESC, bem como determinar as condições para os ensaios de rendimento global com CO<sub>2</sub> puro.

No total 9 ensaios preliminares foram realizados, variando-se as seguintes condições operacionais: massa de amostra (15, 10, 7 e 4 g), vazão de solvente (0,9; 0,8 e 0,6 kg/h) e tempo de extração (4 a 7 h). Estes valores foram estabelecidos com base nas condições operacionais usualmente utilizadas em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do LATESC.

### 5.6.3 Ensaios de rendimento global

Nos ensaios de rendimento global o objetivo foi avaliar a influência dos parâmetros pressão (P) e temperatura (T) nas características (rendimento global, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método do DPPH, teor de  $\gamma$ -orizanol, taxa de

recuperação do  $\gamma$ -orizanol) dos extratos obtidos via ESC, utilizando  $\text{CO}_2$  como solvente.

As condições fixadas nos ensaios foram:  $4,1 \pm 0,1$  g de amostra, vazão de solvente igual a  $0,6 \pm 0,1$  kg/h, tempo de extração de 4,5 h e altura do leito igual a  $3,6 \pm 0,2$  cm. O tempo foi determinado a partir dos resultados dos ensaios preliminares, conforme justificativa apresentada no item 6.5. Os parâmetros P (100, 200 e 300 bar) e T (30, 40 e 50 °C) foram variados seguindo planejamento fatorial completo  $3^2$  (ver item 5.9). A coleta do extrato foi realizada de uma única vez, em frasco âmbar previamente pesado, ao final do tempo total de extração. O material (extrato) expelido durante a despressurização (purga) do equipamento também foi coletado em frasco âmbar e quantificado. Além disso, após despressurização do equipamento, uma alíquota (~ 50 mL) de etanol era injetada na linha de saída do extrato (tubulação que liga a saída do extrator ao frasco de coleta do extrato) para recuperar o material extraído que ficava retido na linha. Este material foi coletado em frasco âmbar e posteriormente rotaevaporado para quantificação da massa de extrato retida na linha. Para o cálculo do rendimento global tanto a massa de extrato recuperada na purga, quanto a massa resultante da limpeza da linha com etanol, foram adicionadas à massa coletada ao final da extração. Portanto, a massa total de extrato foi calculada de acordo com a Equação 7.

$$m_E = m_{\text{ext}} + m_{\text{pg}} + m_{\text{limp}} \quad (7)$$

Onde:

$m_E$  = massa de extrato;

$m_{\text{ext}}$  = massa coletada ao final do tempo de extração;

$m_{\text{pg}}$  = massa coletada na purga de  $\text{CO}_2$  do equipamento;

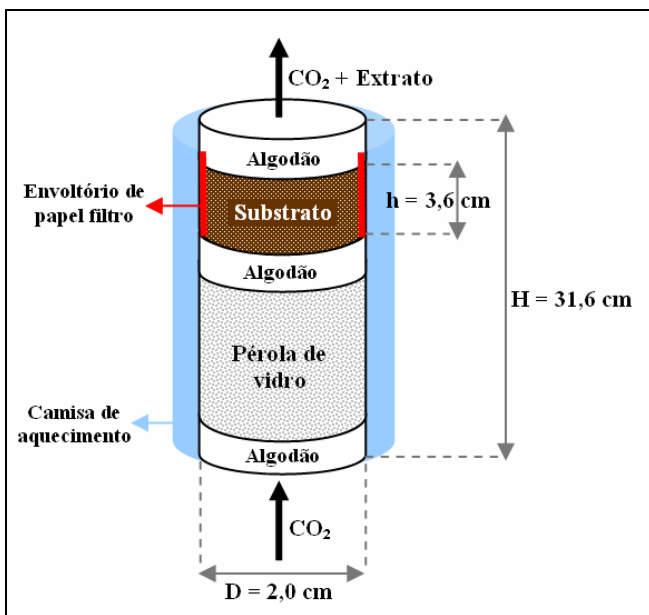
$m_{\text{limp}}$  = massa recuperada na limpeza da linha com etanol.

O procedimento de recuperação do extrato retido na linha, através da limpeza com etanol, foi adotado porque a massa retida na linha apresentava influência significativa no rendimento global da extração.

A altura do leito foi mantida constante através da reprodução do mesmo procedimento na montagem do leito de cada extração.



Além da massa de substrato (4 g), pérolas de vidro (100 g) foram utilizadas para preenchimento do leito, além de algodão na camada intermediária (entre substrato e pérolas) e nas extremidades da coluna. O revestimento de algodão nas extremidades é importante para evitar a entrada de partículas na linha de extração e consequente entupimento da mesma. Outro procedimento adotado foi a utilização de papel filtro para formar um envoltório na parede interna do extrator, sendo este colocado na região de contato direto com o substrato. Este procedimento foi utilizado porque nos ensaios preliminares observou-se que, nas temperaturas mais altas testadas, ocorria fusão parcial da matriz da extração, e o material derretido aderiria fortemente à parede da coluna, dificultando a retirada do mesmo e o processo de limpeza após a extração. A Figura 16 ilustra a representação esquemática do leito de extração.



**Figura 16.** Esquema representativo da montagem do leito de extração para os experimentos de rendimento.

Cada experimento foi feito no mínimo em duplicata, sendo que na grande maioria dos casos 3 ou mais replicatas foram realizadas em função dos altos desvios padrões obtidos. A quantificação da

massa dos extratos foi feita em balança analítica (AS200, OHAUS, Florham Park/NJ) e os frascos contendo os mesmos foram armazenados em freezer doméstico (Freezer 260, Brastemp, Joinville/SC) até o momento de realização das análises qualitativas.

#### 5.6.4 Ensaios de cinética

Ensaios de cinética foram realizados para obtenção da curva de extração. Nestes ensaios a massa extraída foi coletada (frasco âmbar previamente pesado) e quantificada (balança analítica AS200, OHAUS, Florham Park/NJ) em intervalos de tempo pré-determinados (10 em 10 min no início, 20 em 20 min, 30 em 30 min no final). Os experimentos foram conduzidos até um tempo total superior ao necessário para atingir o período difusional da curva de extração, sendo que este tempo foi identificado pelo aparecimento de uma região linear na curva de extração obtida. As condições operacionais utilizadas foram:  $P = 200$  bar;  $T = 30$  °C; vazão de solvente = 0,6 kg/h; massa de substrato = 4 g.

### 5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos foram avaliados em termos de rendimento global, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método do DPPH, teor de  $\gamma$ -orizanol, taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol e composição de ácidos graxos.

#### 5.7.1 Cálculo do rendimento global

Em ESC, o rendimento global ( $X_0$ ) pode ser definido como a quantidade de material extraível a partir de um substrato sob determinadas condições operacionais (MARTÍNEZ, 2005). Portanto, para o cálculo de  $X_0$ , foi admitido que no tempo de extração dos ensaios de rendimento (4,5 h) a quantidade de solvente utilizada (2,7

kg de CO<sub>2</sub>) foi suficiente para extrair toda a matéria extraível presente na massa de amostra alimentada no extrator. Partindo desta consideração, o rendimento global da extração foi calculado através da Equação 8.

$$X_0(\%) = \frac{m_E}{M} * 100 \quad (8)$$

Onde:

$m_E$  = massa de extrato (g);

$M$  = massa de substrato alimentada no leito de extração (g);

$X_0$  = rendimento global da extração (% , m/m).

Nas extrações Soxhlet, de forma análoga, o tempo de refluxo utilizado (6 h) foi considerado suficiente para que o solvente pudesse extrair todo o material solúvel presente no substrato. Assim sendo, o cálculo de  $X_0$  também foi feito a partir da Equação 8.

### 5.7.2 Determinação do teor de fenólicos totais

Na determinação do teor de fenólicos totais (TFT) foi utilizada a metodologia de Singleton e Rossi (1965 apud CAMPOS et al., 2008, p. 8415; MEZZOMO, 2008). As amostras a serem analisadas (extratos) foram diluídas em etanol de forma a obter-se uma solução com concentração de 5 g/L. Para os extratos de hexano, diclorometano e acetato de etila foram usadas pequenas alíquotas de éter etílico (proporção éter etílico:etanol = 1:19; V/V) a fim de auxiliar na solubilização dos extratos.

O meio reacional foi preparado em balões volumétricos de 10 mL, de acordo com a seguinte ordem pré-estabelecida de adição dos reagentes: 100 µL da solução de amostra; 2 mL de água destilada; 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich); 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 20% (m/V) (a adição da solução de carbonato de sódio deve ser feita pelo menos após 30 s do início da reação, porém antes que se complete 8 min da mesma); água destilada até completar o volume final de 10 mL. Após agitação

a mistura foi mantida em repouso por 2 h, ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (765 nm) e, por meio da correlação com a curva padrão de ácido gálico, o TFT foi expresso em termos de mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato. O branco foi preparado seguindo mesmo procedimento, substituindo-se apenas a adição da solução de amostra pela adição de 100 µL de etanol.

Para construção da curva padrão de ácido gálico foi preparada uma solução estoque de ácido gálico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. Ltda) em água destilada na concentração de 5 g/L. A partir desta solução estoque, novas diluições em água destilada foram feitas em balões volumétricos de 100 mL de modo a obter-se soluções com concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L. Uma alíquota de 100 µL de cada uma das soluções diluídas de ácido gálico foi utilizada para compor o meio reacional, em balão volumétrico de 10 mL, conforme procedimento descrito anteriormente para a solução de amostra.

A curva padrão de ácido gálico e a equação obtida para o cálculo do TFT estão apresentadas no Apêndice I. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 5.7.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH

O ensaio de captura do radical livre DPPH foi realizado de acordo com metodologia descrita por Mensor et al. (2001). As amostras a serem analisadas (extratos) foram diluídas em etanol de forma a obter-se soluções estoque com concentração de 1 g/L. Para os extratos de hexano, diclorometano e acetato de etila foram utilizadas pequenas alíquotas de éter etílico (proporção éter etílico:etanol = 1:19; V/V) a fim de auxiliar na solubilização dos extratos.

As soluções estoque (1 g/L) obtidas foram diluídas em etanol de forma a atingir concentrações finais de 25, 50, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL. Para o preparo do meio reacional, 1,0 mL de solução etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) com concentração igual a 0,3 mM foi adicionada a 2,5 mL de cada uma das soluções diluídas da

amostra em diferentes concentrações (25 a 1000 µg/mL). A mistura reacional foi agitada e deixada em repouso (ao abrigo de luz e calor) por 30 min para que a reação se completasse. A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. Os valores de absorbância (Abs) foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) através da Equação 9.

$$AA(\%) = 100 - \left[ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) * 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \quad (9)$$

Para cada uma das concentrações (25 a 1000 µg/mL) foi preparado um branco correspondente a tal concentração, fazendo-se a adição de 1,0 mL de etanol a 2,5 mL da solução diluída da amostra. O controle negativo foi preparado pela adição de 1,0 mL de solução etanólica de DPPH (0,3 mM) a 2,5 mL de etanol. Os valores de AA% foram plotados em função da concentração (µg/mL) da solução da amostra analisada. Através da regressão linear das curvas obtidas (conforme exemplo do Apêndice II) foram geradas equações relacionando a AA% com a concentração da solução (µg/mL). A partir destas equações foi feito o cálculo do EC<sub>50</sub>, que consiste na concentração para a qual a AA% correspondente possui valor igual a 50 %. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### 5.7.4 Determinação do teor de γ-orizanol

As técnicas mais comuns para a determinação do γ-orizanol são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria ultravioleta (UV) (BUCCI et al., 2003). O método de CLAE é preciso e eficiente, porém apresenta como desvantagem o elevado custo da análise (150 a 250 reais/amostra). A técnica de espectrofotometria, por outro lado, é simples, prática e barata, mas a desvantagem é que nem sempre os resultados obtidos são precisos, pois a leitura da absorbância pode sofrer forte interferência da matriz (componentes da amostra), levando a resultados equivocados (BUCCI et al., 2003).

Em muitos trabalhos científicos a quantificação do  $\gamma$ -orizanol é feita por espectrofotometria UV, utilizando hexano, heptano ou éter de petróleo como solvente, com leitura da absorbância em comprimento de onda igual a 314, 315 ou 316 nm (BUCCI et al., 2003; DAS et al., 1998; YOSHIE et al., 2009; ZULLAIKAH; MELWITA; JU, 2009). Entretanto, em estudo detalhado sobre comparação de métodos espectrofotométricos para determinação de  $\gamma$ -orizanol, Bucci et al. (2003) relatam que, para a técnica de espectrofotometria em comprimento de onda fixo, os resultados obtidos são mais precisos quando se utiliza álcool isopropílico como solvente de diluição das amostras. Neste caso a medição é feita a 327 nm, comprimento de onda no qual há menor interferência da matriz da amostra na leitura da absorbância.

No presente trabalho ambos os métodos de determinação do  $\gamma$ -orizanol foram utilizados. A análise de CLAE foi realizada para se ter garantia da exatidão dos resultados obtidos. Porém, tendo em vista o alto custo desta análise, associado a restrições de recursos financeiros, nem todos os extratos de ESC puderam ser analisados por esta metodologia. Em função disto, os extratos de ESC a serem analisados por CLAE foram estrategicamente selecionados em função dos resultados que apresentaram nos ensaios de atividade antioxidante (Folin Ciocalteu e DPPH). Além disso, com intuito de comparação entre os métodos, e para que se pudesse fazer a determinação do teor de  $\gamma$ -orizanol dos extratos de ESC não submetidos à análise de CLAE, também foi realizada a quantificação do  $\gamma$ -orizanol por espectrofotometria UV. As metodologias utilizadas estão descritas nos itens abaixo.

#### 5.7.4.1 Quantificação do $\gamma$ -orizanol por CLAE/UV

As análises de determinação do teor de  $\gamma$ -orizanol, por cromatografia líquida de alta eficiência sob detecção ultravioleta (CLAE/UV), foram realizadas pelo setor de prestação de serviços do Laboratório de Óleos e Gorduras, da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A análise de CLAE/UV foi realizada de acordo com metodologia descrita por Scavariello (2002). O sistema de análise era

composto de: bomba isocrática (Perkin Elmer Series 200); detector UV/Visível (Perkin Elmer LC 290); coluna (Thermo Electron Corporation LICHROSORB RP 18 4,6 x 250 mm, 5 mm acoplada a pré-coluna C18-5). As condições de análise foram as seguintes:

- a) comprimento de onda: 315 nm;
- b) fase móvel: acetonitrila/metanol/isopropanol (50:45:5) com fluxo de 1,0 mL/min;
- c) volume injetado: 20 mL;
- d) solvente da amostra: hexano.

#### 5.7.4.2 Quantificação do $\gamma$ -orizanol por espectrofotometria UV

A determinação do teor de  $\gamma$ -orizanol por espectrofotometria, em comprimento de onda fixo, foi realizada de acordo com Bucci et al. (2003). As amostras (extratos) foram diluídas em álcool isopropílico, de forma a se obter soluções com concentrações de aproximadamente 0,2 g/L. A absorbância destas soluções foi determinada em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu) a 327 nm, comprimento de onda no qual o espectro de absorção UV do  $\gamma$ -orizanol apresenta um pico máximo quando diluído no solvente em questão. O cálculo da concentração de  $\gamma$ -orizanol na solução diluída foi feito com base na lei de Lambert Beer, conforme Equação 10. As análises foram realizadas, no mínimo, em triplicatas, sendo os resultados expressos em termos de teor de  $\gamma$ -orizanol (%), m/m), conforme Equação 11.

$$C_{GO} = \frac{A}{\varepsilon * l} \quad (10)$$

$$TGO_{E-UV} (\%) = \left( \frac{C_{GO}}{C_{DIL}} \right) * 100 \quad (11)$$

Onde:

$C_{GO}$  = concentração de  $\gamma$ -orizanol na solução diluída de extrato ( $g_{\text{orizanol}}/L$ );

$A$  = absorvância medida a 327 nm;

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção específica [ $L/(g_{\text{orizanol}} \cdot \text{cm})$ ];

$l$  = comprimento interno da cubeta (cm).

$TGO_{E-UV}$  (%) = teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por espectrofotometria UV (% m/m);

$C_{DIL}$  = concentração de extrato na solução diluída ( $g_{\text{extrato}}/L$ ).

De acordo com Bucci et al. (2003), o coeficiente de extinção específica do  $\gamma$ -orizanol a 327 nm, para diluição em álcool isopropílico, é igual a  $33,82 \text{ g}^{-1} \text{ Lcm}^{-1}$ .

Para os extratos de Soxhlet dos solventes hexano e acetato de etila, excepcionalmente, a determinação foi realizada de acordo com Zullaikah, Melwita e Ju (2009), pois estes extratos não apresentaram solubilidade no álcool isopropílico. Neste caso, a determinação espectrofotométrica do  $\gamma$ -orizanol foi realizada utilizando as seguintes condições: hexano como solvente; comprimento de onda igual a 316 nm; coeficiente de extinção específica igual a  $36,84 \text{ g}^{-1} \text{ Lcm}^{-1}$  (ZULLAIKAH; MELWITA; JU, 2009).

### 5.7.5 Cálculo da taxa de recuperação do $\gamma$ -orizanol

O cálculo da taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol foi feito com base na razão entre a massa de  $\gamma$ -orizanol no extrato obtido ( $m_{GOE}$ ) e a massa de  $\gamma$ -orizanol originalmente presente no substrato alimentado no processo de extração ( $M_{GO}$ ). Para tanto foram usadas as Equações 12 a 14, conforme apresentado abaixo. No cálculo da taxa de recuperação foi considerado que não existem perdas de  $\gamma$ -orizanol durante a etapa de pré-tratamento da matéria-prima.

$$RGO(\%) = \left( \frac{m_{GOE}}{M_{GO}} \right) * 100 \quad (12)$$



$$m_{GOE} = \left( \frac{TGO}{100} \right) * m_E = \left( \frac{TGO}{100} \right) * \left( \frac{X_0}{100} \right) * M \quad (13)$$

$$M_{GO} = \left( \frac{M}{R_{PT}} \right) * \left( \frac{TGO_{MP}}{100} \right) \quad (14)$$

Onde:

RGO = taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol (% , m/m);

$m_{GOE}$  = massa de  $\gamma$ -orizanol no extrato (g);

$M_{GO}$  = massa de  $\gamma$ -orizanol contida na massa de substrato alimentada no leito da extração (g);

TGO = teor de  $\gamma$ -orizanol no extrato (% , m/m);

$m_E$  = massa de extrato (g);

$X_0$  = rendimento global da extração (% , m/m);

M = massa de substrato alimentada no leito de extração (g);

$R_{PT}$  = rendimento do pré-tratamento (g de substrato da extração/g de matéria-prima ou, em outras palavras, g precipitado seco/g de RDBN);

$TGO_{MP}$  = teor de  $\gamma$ -orizanol na matéria-prima (RDBN).

### 5.7.6 Determinação do perfil de ácidos graxos

A determinação da composição em ácidos graxos foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa (CG), conforme metodologia oficial da AOCS (1996). As análises foram realizadas no Laboratório de Óleos e Gorduras/FEA/UNICAMP.

A descrição do sistema e as condições de análise são apresentadas abaixo:

- a) cromatógrafo gasoso capilar: CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM;
- b) coluna capilar: DB-23 AGILENT (50 % cyanopropyl) – methylpolysiloxane; dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m filme;
- c) condições de operação do cromatógrafo: fluxo coluna = 1,00 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura do

detector = 280 °C; temperatura do injetor = 250 °C; temperatura forno = 110 °C – 5 minutos, 110 – 215 °C (5 °C/min), 215 °C – 34 minutos; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1,0 µL.

## 5.8 ESTUDO PRELIMINAR DE MODELAGEM MATEMÁTICA

A modelagem do processo de ESC foi realizada com objetivo de se ter uma avaliação preliminar da adequação de modelos disponíveis na literatura aos dados experimentais da ESC do RDBN. Para tanto, foram utilizados: (1) o modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999); (2) o modelo difusivo de Crank (1975) adaptado por Reverchon (1997); (3) o modelo SSP de Gaspar et al. (2003); (4) o modelo logístico de Martínez et al. (2003). A aplicação dos modelos foi efetuada através do *software* Mass Transfer, desenvolvido por Correia, Michielin e Ferreira (2006), no LATESC/EQA/UFSC.

Na aplicação dos modelos o parâmetro  $x_0$  foi considerado como dado experimental característico da condição operacional da curva a ser modelada, sendo definido como 10 % superior ao valor final de rendimento global (em termos de massa de extrato/massa de substrato, g/g) obtido para o respectivo experimento, conforme descrito por Martínez (2005).

## 5.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A influência dos fatores pressão (P) e temperatura (T), no rendimento global e qualidade dos extratos obtidos por ESC, foi avaliada através de ensaios de rendimento (item 5.6.3). Estes ensaios foram executados de acordo com um delineamento experimental em esquema fatorial completo  $3^2$ , do tipo inteiramente casualizado. Os 2 fatores investigados (P e T) foram variados em 3 níveis (100, 200 e 300 bar; 30, 40 e 50 °C, respectivamente), totalizando 9 tratamentos distintos, conforme apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5. Planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup> com 2 fatores (T e P) variando em 3 níveis, para experimentos de rendimento**

Ensaio	Variáveis codificadas de T	Variáveis codificadas de P	Variáveis reais de T (°C)	Variáveis reais de P (bar)
1	-1	-1	30	100
2	-1	0	30	200
3	-1	+1	30	300
4	0	-1	40	100
5	0	0	40	200
6	0	+1	40	300
7	+1	-1	50	100
8	+1	0	50	200
9	+1	+1	50	300

## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados de rendimento global, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante (em termos de EC<sub>50</sub>) e teor de  $\gamma$ -orizanol (determinação por espectrofotometria), obtidos para os extratos originados por diferentes tratamentos (T e P, na ESC; tipo de solvente, na extração Soxhlet), foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA). Uma vez que, de acordo com a ANOVA, houvesse diferença significativa entre as médias dos tratamentos, a continuidade da análise era feita através da aplicação do Teste de Tukey, que avalia as diferenças significativas entre os pares de tratamentos (MEZZOMO, 2008).

Portanto, a partir do Teste de Tukey, foi possível verificar quais os resultados (X<sub>0</sub>, TFT, EC<sub>50</sub> e TGO<sub>E-UV</sub>) dos diferentes tratamentos (extrações Soxhlet com diferentes solventes e ESC em diferentes condições de P e T) diferiam entre si. Os resultados obtidos para as diferenças estatísticas, através do Teste de Tukey, estão apresentados no Capítulo 6 (Resultados e Discussão), expressos na forma de letras sobrescritas às médias dos tratamentos.

Gráficos de superfície de resposta, curvas de contorno e equações polinomiais de segunda ordem foram geradas para

expressar a dependência das variáveis resposta ( $X_0$ , TFT e  $EC_{50}$ ) em relação aos fatores (P e T) avaliados nos ensaios de rendimento.

Em todas as análises o valor de 5 % foi utilizado para o nível de significância ( $\alpha = 0,05$ ), sendo que toda a análise estatística foi realizada através do *software* Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc., USA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Os resultados das análises de caracterização do RDBN estão expressos na Tabela 6.

**Tabela 6. Resultados das análises de caracterização da matéria-prima**

Análise	Resultado
Umidade e voláteis (% m/m)	$0,5 \pm 0,1$
Lipídios/Extrato etéreo (% m/m)	$99,3 \pm 0,2$
TGO <sub>CLAE</sub> (% m/m)	4,8
TGO <sub>E-UV</sub> (% m/m)	$7,2 \pm 0,1$
TFT (mgEAG/g)	$48,5 \pm 0,3$
EC <sub>50</sub> (µg/mL)	$814 \pm 34$

TGO<sub>CLAE</sub> = teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por CLAE/UV.

TGO<sub>E-UV</sub> = teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por espectrofotometria UV.

Os valores encontrados para os teores de umidade e voláteis ( $0,5 \pm 0,1$  %) e de lipídios ( $99,3 \pm 0,2$  %) confirmam a natureza essencialmente lipídica do material, o que é coerente com a origem da matéria-prima visto que esta é num resíduo do processamento do óleo de arroz.

O teor de  $\gamma$ -orizanol obtido por análise de CLAE/UV (4,8 %) comprova o fato de que, neste resíduo, tal antioxidante encontra-se em maior concentração do que na borra de neutralização ou no próprio óleo de arroz. Calheiros (2007), investigando a BNOA, oriunda da mesma indústria que forneceu a matéria-prima do presente trabalho, encontrou um teor de  $\gamma$ -orizanol igual a 1,5 %, valor em concordância com o citado (1,4 – 1,5 %) por Narayan, Barhate e Raghavarao (2006). No óleo de arroz bruto, de acordo com Paucar-Menacho et al. (2007), o conteúdo de  $\gamma$ -orizanol varia na faixa de 1,5 a 2,9 %. Pode-se considerar, portanto, que o teor de  $\gamma$ -orizanol encontrado é relativamente alto, o que faz da matéria-prima em estudo uma fonte potencial para recuperação deste composto bioativo.

Das et al. (1998), em estudo sobre o RDBN, relatam um teor de  $\gamma$ -orizanol de 6 %. Entretanto, Das et al. (1998) realizaram a quantificação do  $\gamma$ -orizanol apenas por espectrofotometria UV (éter de petróleo/315 nm), o que eventualmente pode resultar em valores mais altos do que aqueles que se obtêm por análise de CLAE, conforme relatado por Bucci et al. (2003). Na determinação do teor de  $\gamma$ -orizanol realizada por espectrofotometria UV (álcool isopropílico/327 nm), obteve-se um valor bem mais alto ( $7,2 \pm 0,1$  %) que o resultado da análise de CLAE/UV e bem mais próximo ao teor citado por Das et al. (1998). Tal fato demonstra que o método espectrofotométrico, em comprimento de onda fixo, não é preciso na quantificação de  $\gamma$ -orizanol da matéria-prima em estudo, pois a matriz da amostra interferiu de forma significativa na medição da absorbância, o que levou ao erro no resultado obtido.

As técnicas comumente utilizadas para a análise de fenólicos, como o método de Folin-Ciocalteu, não são padronizadas e nem divulgadas por órgãos oficiais (ANGELO; JORGE, 2007). Da mesma forma, o método do radical livre DPPH, extensivamente utilizado para medição de atividade antioxidante, não possui uma técnica padronizada e divulgada por órgãos oficiais. Em função disso, diversos autores distintos são utilizados como referências das metodologias para os ensaios de Folin-Ciocalteu e DPPH, sendo que alguns pesquisadores ainda fazem suas próprias modificações nos métodos. Isto faz com que a comparação de resultados, entre diferentes autores, de diferentes grupos de pesquisa, seja bastante complicada, uma vez que, embora se utilize o mesmo nome para as análises, em geral a metodologia utilizada não é idêntica, e muitas vezes nem a forma de expressão dos resultados é coincidente. Apesar disso, mesmo sabendo da dificuldade de comparação de resultados, bem como das variações que podem estar associadas à falta de padronização das técnicas utilizadas, alguns autores serão citados nos parágrafos a seguir a fim de se ter uma idéia comparativa dos resultados obtidos para o TFT e o valor de  $EC_{50}$ .

O TFT encontrado na matéria-prima ( $48,5 \pm 0,3$  mgEAG/g de RDBN) foi bem superior ao TFT obtido para diferentes variedades de farelo de arroz (2,2 a 3,6 mgEAG/g de farelo), conforme citado por Iqbal; Bhangar; Anwar (2005) e Chotimarkorn; Benjakul; Silalai (2008b). Ribeiro (2007) ao investigar bagaço de maçã, resíduo do processamento de suco, obteve TFT de 25 mgEAG/g de bagaço.

Dudonné et al. (2009) investigaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos de 30 plantas de interesse industrial. Os TFTs encontrados nestes extratos variaram de 7 a 397 mgEAG/g, sendo que alguns exemplos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7. Exemplos do teor de fenólicos totais (TFT) em extratos aquosos de plantas de interesse industrial investigadas por Dudonné et al. (2009)**

Planta	Parte usada	TFT (mgEAG/g)
Sálvia	Erva	18
Gengibre	Raiz	26
Camomila	flor	34
Jasmim	flor	87
Eucalipto	folha	114
Erva mate	folha	203
Canela	casca	309

O valor de  $EC_{50}$  da matéria-prima em estudo, de  $814 \pm 34$   $\mu\text{g/mL}$ , foi superior àqueles encontrados por Chotimarkorn, Benjakul e Silalai (2008b) para diferentes variedades de farelo de arroz, para as quais os valores de  $EC_{50}$  variaram entre 380 e 740  $\mu\text{g/mL}$ . Cetkovic et al. (2008), investigando bagaço de maçã, resíduo da indústria de processamento de suco, encontrou  $EC_{50}$  igual a 6330  $\mu\text{g/mL}$ .

Na Tabela 8 é apresentado o resultado da CG, análise realizada para determinar o perfil de ácidos graxos da matéria-prima. A fim de se ter um parâmetro para comparação, a composição típica de ácidos graxos do óleo de arroz também é apresentada nesta tabela.

**Tabela 8. Composição em ácidos graxos (% , m/m) da matéria-prima e do óleo de arroz**

Ácido Graxo (AG)		RDBN <sup>(a)</sup>	Óleo de arroz <sup>(b)</sup>
<b>Saturados</b>		<b>24,94</b>	<b>18,8 – 25,3</b>
C12:0	Láurico	0,06	--
C14:0	Mirístico	0,21	0,2 – 0,4
C15:0	Pentadecanóico	0,06	*
C16:0	Palmitico	15,47	15,4 – 20,6
C17:0	Margárico	0,06	*
C18:0	Estearico	1,98	1,6 – 2,2
C20:0	Araquídico	1,28	0,7 – 0,8
C22:0	Behênico	1,37	0,3 – 0,4
C24:0	Lignocérico	4,45	0,6 – 0,9
<b>Monoinsaturados</b>		<b>42,78</b>	<b>41,6 – 47,7</b>
C16:1	Palmitoléico	0,12	0,0 – 0,2
C18:1	Oléico	39,11	41,1 – 46,7
C18:1 Trans	Elaídico	2,53	*
C20:1	Gadoléico	0,86	0,5 – 0,8
C22:1	Erúico	0,16	--
<b>Poliinsaturados</b>		<b>31,38</b>	<b>30,6 – 36,4</b>
C18:2	Linoléico	29,52	29,6 – 34,9
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,50	*
C18:3	Linolênico	1,20	1,0 – 1,5
C18:3 Trans	Translinolênico	0,16	*
NI	Não Identificada	0,90	*

<sup>(a)</sup> RDBN = resíduo da destilação de ácidos graxos da borra de neutralização do óleo de arroz. <sup>(b)</sup> Scavariello (2002). \* Valores não relatados na fonte pesquisada.

A composição de AG encontrados no RDBN, bem como a proporção entre os mesmos, tem semelhanças aos valores relatados por Scavariello (2002) para o óleo de arroz. A proporção entre AG saturados (24,94 %), AG monoinsaturados (42,78 %) e AG poliinsaturados (31,38 %) está dentro da faixa de valores descritos para o óleo de arroz (18,8 – 25,3 %; 41,6 – 46,7 %; 30,6 – 36,4 %; respectivamente). Esta semelhança é coerente, uma vez que a matéria-prima em questão é subproduto do processamento do óleo de arroz, sendo por isso composta basicamente pelos mesmos ácidos graxos.



A principal diferença que se observa no perfil de ácidos graxos do RDBN, quando comparado ao do óleo de arroz, é que o resíduo apresenta teores maiores de AG saturados de cadeia longa (1,28 % de C20:0; 1,37 % de C22:0; 4,45 % de C24:0), os quais possuem elevados pontos de fusão (conforme Tabela 22 do Apêndice V). Além disso, outra diferença notável é a presença de AG trans (2,53 % de C18:1 trans; 0,50 % de C18:2 trans; 0,16 % de C18:3 trans), os quais não estão presentes no óleo de arroz. Tais fatores, maior proporção de AG saturados de cadeia longa e presença de AG trans, são responsáveis por aumentar o ponto de fusão do material, que se apresenta como um líquido bem pastoso/viscoso (Figura 11(a)) em temperatura ambiente e, quando acondicionado em refrigerador doméstico, adquire consistência semi-sólida.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO $\gamma$ -ORIZANOL

A estabilidade térmica do  $\gamma$ -orizanol, a fim de se conhecer o seu comportamento mediante a aplicação de temperaturas elevadas (como a T do pré-tratamento da matéria-prima, por exemplo) foi estudada através das análises de TGA e de DSC, conforme resultados apresentados nos gráficos das Figuras 17 e 18, respectivamente.

A curva de TGA (Figura 17) ilustra o processo de decomposição térmica do material em função da temperatura. Inicialmente, tem-se 100 % da massa da amostra que foi submetida à análise. O material mantém-se estável (região linear da curva de TGA) até temperaturas relativamente altas. A partir de 173 °C é detectado um leve início de decomposição e, acima de 355 °C, o material passa a se decompor rápida e bruscamente. Ao se atingir 550 °C não há mais resíduos do material. Os resultados obtidos são similares aos dados relatados por Bucci et al. (2003), que em análise de TGA, realizada em atmosfera de N<sub>2</sub>, observaram rápido processo de degradação térmica do  $\gamma$ -orizanol em temperaturas acima de 360 °C e decomposição total do material ao se atingir 530 °C.

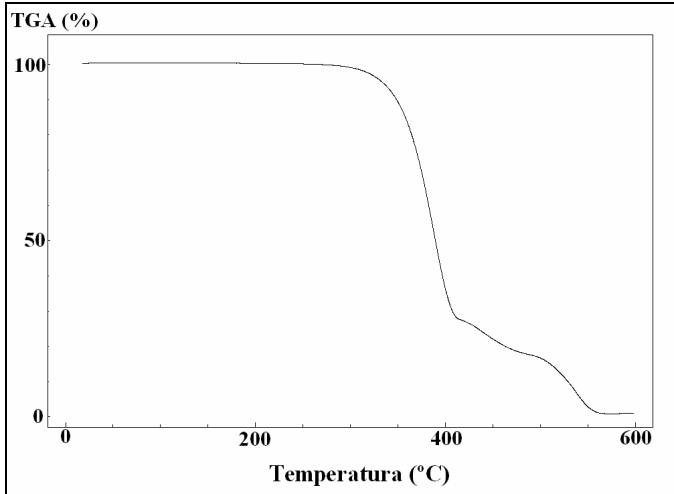


Figura 17. Análise termogravimétrica (TGA) para o orizanol em atmosfera composta por nitrogênio (80 %) e oxigênio (20 %).

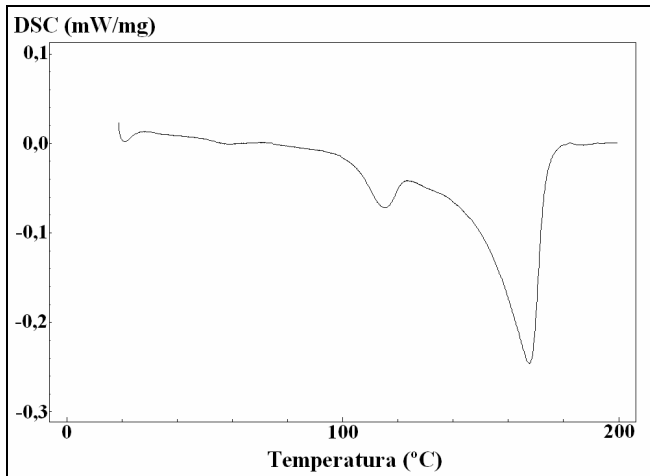


Figura 18. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para o orizanol em atmosfera composta por nitrogênio (80 %) e oxigênio (20 %).

Na curva de DSC (Figura 18) é possível verificar um pico endotérmico bastante pronunciado, detectado na região entre 142 e

173 °C, com pico máximo em 168 °C. Essa região endotérmica representa o processo de fusão do material. Bucci et al. (2003), em análise de DSC (atmosfera composta por N<sub>2</sub>) para o  $\gamma$ -orizanol, evidenciou um processo endotérmico, relativo ao ponto de fusão, na temperatura de 150 °C.

Os dados obtidos nas análises de caracterização térmica do  $\gamma$ -orizanol permitem afirmar que este composto é bastante estável a temperaturas altas. Desta forma, tem-se a garantia de que a temperatura utilizada no pré-tratamento (90 °C, por longo período de aquecimento) não provoca a degradação térmica do  $\gamma$ -orizanol presente na matéria prima. Além disso, tendo em vista a estabilidade térmica apresentada, sugere-se que também não ocorre degradação do  $\gamma$ -orizanol em função das temperaturas utilizadas na extração Soxhlet.

### 6.3 PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

O pré-tratamento da matéria-prima consistiu num dos principais desafios do presente trabalho, por isso cabem aqui algumas considerações. Diversas reações e testes preliminares foram efetuados até que se chegou ao tratamento eleito para o preparo do substrato utilizado nas extrações.

A proposta inicial era fazer um pré-tratamento baseado em reação de saponificação, de acordo com metodologia descrita por Rao, Rao e Thengumpillil (2002) e empregada posteriormente por Calheiros (2007). Baseado nestes autores, foram feitos testes de saponificação com soluções de NaOH em água, NaOH em etanol e NaOH em misturas de água+etanol. Diferentes concentrações de soluções alcalinas, aquosas e etanólicas, foram testadas. Os melhores resultados foram obtidos com solução etanólica de NaOH (10 %, m/V), fazendo-se a reação com aquecimento em banho-maria. Entretanto, dois problemas importantes foram detectados neste tratamento: (1) dificuldade de reprodução dos resultados, visto que a cada batelada de reação o material obtido apresentava aspecto diferenciado; (2) ineficiência na neutralização do pH após o término da reação.

De acordo com Rao, Rao e Thengumpillil (2002), ao final da saponificação, o excesso de álcali deve ser neutralizado através da adição de bicarbonato de sódio. No entanto, nos testes realizados, a neutralização não foi eficiente, visto que o final da reação só era detectado quando o material adquiria consistência semi-sólida, momento em que o bicarbonato de sódio já não se misturava de forma eficiente com o material obtido. Uma vez que o pH no produto da saponificação permanecia alto (13 – 14) o tratamento de saponificação foi descartado, pois de acordo com Seetharamaiah e Prabhakar (1986 apud Calheiros, 2007, p. 39), o pH ótimo para extração de  $\gamma$ -orizanol, a partir da borra de neutralização, está na faixa de 9 – 10.

Depois de descartado o primeiro tratamento proposto, novos testes foram realizados baseando-se na metodologia descrita por Das et al. (1998), cujo princípio essencial está na precipitação induzida por íons cálcio. Neste tratamento, obteve-se boa reprodutibilidade dos resultados e, além disso, todo o excesso de álcali era eliminado junto do filtrado (pH = 14) na etapa de filtração a vácuo, de forma que o material obtido adquiria pH na faixa indicada como ideal por Calheiros (2007).

Ao final do pré-tratamento (após etapa de secagem), o material resultante foi caracterizado em termos de umidade e voláteis. O resultado obtido para a análise de umidade e voláteis foi de  $4,4 \pm 0,4$  %, valor este que caracteriza a umidade do material utilizado como matriz de alimentação nas extrações.

Na Tabela 9 são apresentados os dados relativos aos rendimentos obtidos nas etapas do pré-tratamento, bem como o rendimento completo (total) do mesmo. Nas primeiras etapas (hidrólise alcalina + precipitação com íons cálcio + filtração a vácuo) há um desvio padrão alto associado ao rendimento, o que é função da intensa manipulação e trocas de recipientes que são feitas durante estas etapas, além do fato de não se ter um controle preciso da umidade final do material (precipitado úmido) obtido através da etapa de filtração. Na etapa de secagem, por outro lado, o desvio padrão é bastante reduzido, pois as condições de processo são mantidas constantes com maior precisão (35 °C/24 h/circulação de ar) e não há manipulação ou troca de recipientes durante a etapa. Para o pré-tratamento completo, obteve-se um rendimento total de 120 % (1,2 g de precipitado seco/g de RDBN), resultado da adição

do cloreto de cálcio e do acréscimo na umidade do material, que aumenta de  $0,5 \pm 0,1$  % (RDBN) para  $4,4 \pm 0,4$  % (precipitado seco).

**Tabela 9. Rendimento do pré-tratamento da matéria-prima**

Etapa	Rendimento
Hidrólise + precipitação com íons cálcio + filtração	$3,6 \pm 0,5$ g de ppt úmido/g de RDBN
Secagem	$0,33 \pm 0,05$ g de ppt seco/g de ppt úmido
Pré-tratamento (TOTAL)	$1,2 \pm 0,2$ g ppt seco/g de RDBN

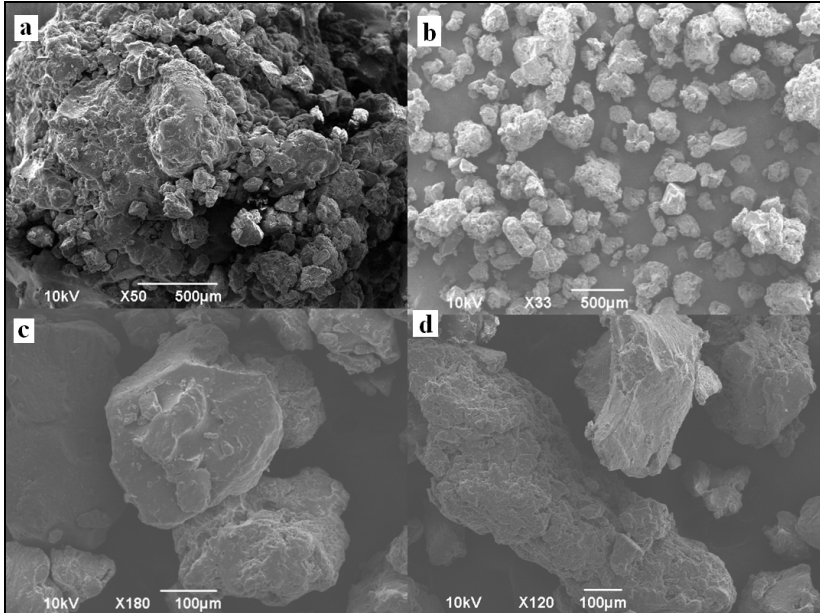
ppt = precipitado; RDBN = resíduo da destilação de ácidos graxos da borra de neutralização do óleo de arroz; ppt seco = material que, após moagem, foi utilizado como matriz das extrações.

#### 6.4 CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA MATRIZ DAS EXTRAÇÕES

A caracterização da matriz das extrações, em termos de dimensão e morfologia de partícula, foi realizada através de análise de MEV, sendo que as micrografias obtidas estão apresentadas nas Figuras 19(a) a 19(d). No Apêndice III as micrografias obtidas por MEV são apresentadas em maiores dimensões e em maior número de fotos.

O diâmetro médio de partícula obtido foi de  $202 \pm 92$   $\mu\text{m}$ , sendo este calculado a partir das micrografias de MEV. O elevado desvio padrão obtido reflete a não uniformidade no tamanho das partículas, o que pode ser observado visualmente na micrografia da Figura 19(b).

Além da não uniformidade em termos de tamanho de partícula, observa-se que o aspecto morfológico do material também não é homogêneo. Algumas partículas apresentam-se densas/compactas, enquanto outras aparentam ter estrutura porosa, tal como pode ser visto nas Figuras 19(c) e 19(d).



**Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura da matriz das extrações. (a) aglomerado de partículas, aumento de 50x; (b) partículas dispersas, aumento de 33x; (c) aumento de 180x; (d) aumento de 120x.**

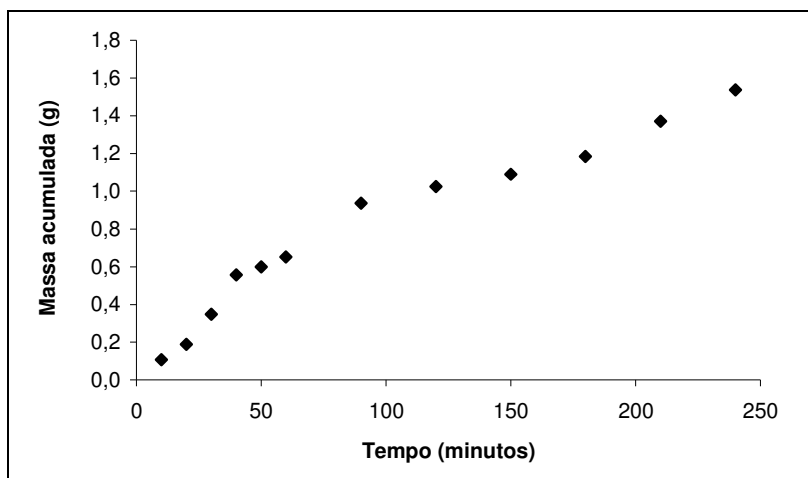
A não homogeneidade percebida nas partículas pode ser justificada em função do complexo pré-tratamento químico que dá origem às mesmas. Ainda que, macroscopicamente, o material obtido no pré-tratamento pareça relativamente uniforme, em escala microscópica observa-se certa heterogeneidade, possivelmente porque nem todas as porções da matéria-prima atingem o mesmo grau de reação, principalmente na etapa em que o material hidrolisado precisa ser dissolvido em água para então ser precipitado pelos íons cálcio (conforme item 5.3).

## 6.5 ENSAIOS PRELIMINARES ESC

Os ensaios preliminares foram realizados com a finalidade de definir os parâmetros operacionais (massa de substrato, tempo de

extração, vazão de solvente) a serem utilizados nos ensaios de rendimento global.

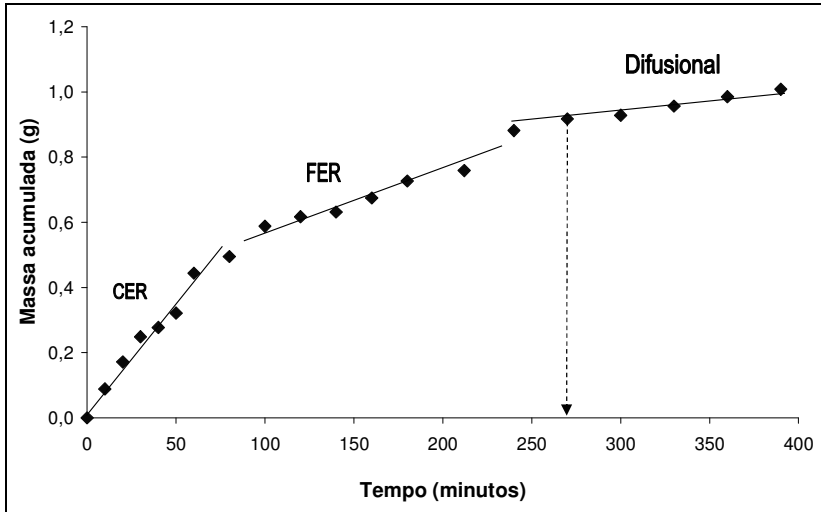
As massas de substrato testadas foram 15, 10, 7 e 4 g. Inicialmente, utilizando a massa de 15 g, observou-se que, após 4 h (240 min) de extração, ainda não havia sinais de início da etapa difusional, como pode ser verificado na Figura 20. Por esta razão, novos testes foram feitos diminuindo-se gradativamente a massa de alimentação no leito, até o valor final de 4 g. A opção de fixar a quantidade de substrato em 4 g, nos ensaios de rendimento global, foi feita visando dois fatores importantes: economia de solvente e redução do tempo de extração. A curva de extração obtida para a massa de 4 g está apresentada na Figura 21.



**Figura 20. Curva de extração ensaio preliminar (massa substrato = 15 g; vazão solvente = 0,8 kg/h; T = 40 °C; P = 200 bar).**

De acordo com Campos et al. (2005) Ferreira e Meireles (2002) e Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009), a curva de extração é dividida em três regiões bem definidas: etapa com taxa constante de extração (CER), etapa com taxa decrescente de extração (FER) e etapa difusional. Depois que se atinge a etapa difusional o aumento da massa extraída em função do tempo é muito pequeno, motivo pelo qual a extração pode ser interrompida logo depois que o processo atinge esta etapa. Na Figura 21 é possível observar que o tempo necessário para atingir a etapa difusional, nas condições empregadas,

é de aproximadamente 240 min. Uma vez considerado que a etapa difusional já havia sido atingida, o tempo de extração para os experimentos de rendimento global foi estipulado em 4,5 h (270 min).



**Figura 21. Curva de ESC para definição do tempo de extração dos ensaios de rendimento (massa substrato = 4 g; vazão solvente = 0,6 kg/h; T = 30 °C; P = 200 bar).**

Em relação à vazão de solvente, baseado em alguns testes utilizando 0,9; 0,8 e 0,6 kg de CO<sub>2</sub>/h, optou-se por definir em 0,6 kg/h a vazão dos experimentos de rendimento global. Este valor foi escolhido em função da maior facilidade na manipulação do equipamento (vazões altas são mais difíceis de serem atingidas nos experimentos a 300 bar) e por ter apresentado bons resultados nos ensaios preliminares. Portanto, nos ensaios de rendimento global, com tempo de 4,5 h e vazão 0,6 kg/h, o consumo de CO<sub>2</sub> ficou fixado em 2,7 kg, resultando num valor de 675 para a razão massa de solvente por massa de substrato ( $m_{\text{solv}}/M = 2700\text{g}/4\text{g} = 675$ ).



## 6.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE SOXHLET E ESC

### 6.6.1 Rendimento global de extração

Os rendimentos obtidos através das técnicas de extração aplicadas estão apresentados na Tabela 10. Nas extrações Soxhlet o objetivo foi avaliar a influência do tipo de solvente (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol) nas características dos extratos obtidos. Na ESC o objetivo foi avaliar a influência dos parâmetros operacionais (P e T) no rendimento e qualidade dos extratos obtidos.

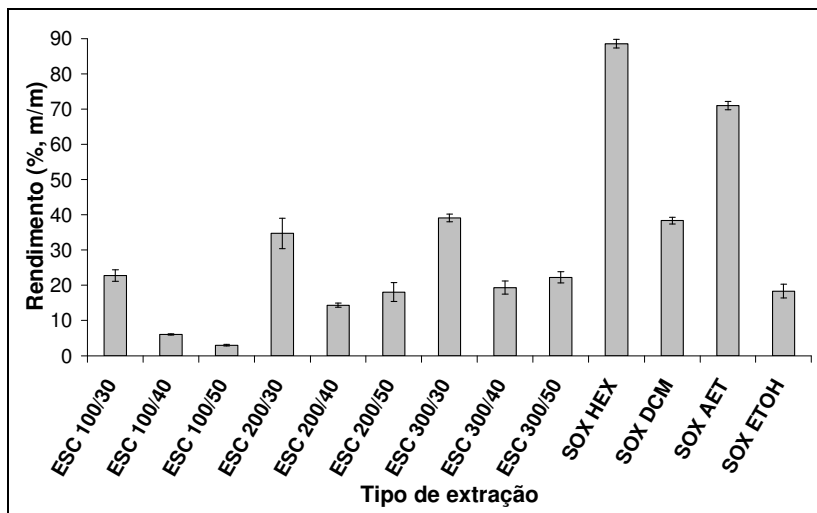
**Tabela 10. Resultados de rendimento global ( $X_0$ ) obtidos através das técnicas de extração Soxhlet e Supercrítica (ESC)**

Tipo de Extração	Característica do solvente	Rendimento global <sup>(3)</sup>
<b>Soxhlet</b>	<b>Índice de polaridade <sup>(1)</sup></b>	<b><math>X_0</math> (% , m/m)</b>
Hexano	0	89 <sup>f</sup> ± 1
Diclorometano	3,1	38 <sup>d</sup> ± 1
Acetato de etila	4,4	71 <sup>e</sup> ± 1
Etanol	5,2	18 <sup>b,c</sup> ± 2
<b>ESC</b>	<b>Densidade do CO<sub>2</sub> (kg/m<sup>3</sup>) <sup>(2)</sup></b>	<b><math>X_0</math> (% , m/m)</b>
100 bar / 30 °C	772	23 <sup>c</sup> ± 2
100 bar / 40 °C	629	6,1 <sup>a</sup> ± 0,2
100 bar / 50 °C	385	3,0 <sup>a</sup> ± 0,2
200 bar / 30 °C	890	35 <sup>d</sup> ± 4
200 bar / 40 °C	840	14 <sup>b</sup> ± 1
200 bar / 50 °C	784	18 <sup>b,c</sup> ± 3
300 bar / 30 °C	948	39 <sup>d</sup> ± 1
300 bar / 40 °C	910	19 <sup>b,c</sup> ± 2
300 bar / 50 °C	871	22 <sup>c</sup> ± 2

<sup>(1)</sup> Byers (2009). <sup>(2)</sup> Angus et al. (1976).

<sup>(3)</sup> Letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem significativamente (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

Na Figura 22 os resultados são ilustrados através de um gráfico de barras do rendimento em função do tipo (técnica e condição) de extração aplicado.



**Figura 22.** Gráfico de barras dos resultados de rendimento global obtidos através das técnicas de extração Soxhlet (SOX) e Supercrítica (ESC). HEX = hexano; DCM = diclorometano; AET = acetato de etila; ETOH = etanol; 100/30 = 100 bar/30 °C.

A partir da observação dos dados apresentados na Tabela 10 e na Figura 22 é possível verificar que os rendimentos mais elevados foram obtidos na extração Soxhlet, com hexano e acetato de etila ( $89 \pm 1\%$  e  $71 \pm 1\%$ , respectivamente). O elevado rendimento obtido com o hexano, que é um solvente apolar, justifica-se em função do carácter essencialmente lipídico da matéria prima (teor de lipídios =  $99,3 \pm 0,2\%$ , conforme Tabela 6). O rendimento alcançado pelo acetato de etila mostra que solventes de polaridade intermediária também promovem alta solubilização dos compostos presentes na matriz. Já para o etanol, solvente de alta polaridade, o rendimento foi o menor ( $18 \pm 2\%$ ) entre as extrações Soxhlet. As misturas de extrato+solvente, obtidas na extração Soxhlet, são apresentadas na Figura 23, onde é possível verificar que o extrato etanólico se diferencia pela tonalidade amarela, enquanto os demais possuem coloração marrom intensa, tal como a matéria-prima.



**Figura 23. Mistura solvente + extrato obtida na extração Soxhlet: (a) hexano; (b) diclorometano; (c) acetato de etila; (d) etanol.**

Os resultados indicam, portanto, que a matriz das extrações possui grande quantidade de compostos de polaridade baixa a intermediária, e pequena quantidade de compostos de polaridade intermediária a alta. De acordo com Kumoro, Hasan e Singh (2009), matrizes vegetais contêm várias moléculas de diferentes grupos funcionais, de forma que é difícil prever a solubilidade das mesmas em um solvente específico. Uma forma alternativa de considerar a solubilidade é usar o conceito de polaridade. A polaridade, por sua vez, pode ser definida como a habilidade que uma molécula tem de interagir fortemente com outras moléculas polares.

Na extração Soxhlet a alta temperatura de operação, o refluxo de solvente e as interações soluto-solvente são fatores que contribuem para a maior dissolução de compostos e, conseqüentemente, rendimentos mais elevados frente a outras técnicas (MEZZOMO, 2008; MICHIELIN et al., 2009). Na técnica Soxhlet o solvente é utilizado em sua temperatura de ebulição, condição na qual a tensão superficial e a viscosidade são reduzidas em função das temperaturas elevadas. Desta forma, o solvente tem mais facilidade de alcançar os poros da matriz, acessando o soluto e solubilizando uma maior quantidade e variedade de compostos (MEZZOMO, 2008).

Os rendimentos obtidos para a ESC (Tabela 10) foram inferiores aos obtidos por Soxhlet com hexano e acetato de etila, e similares aos rendimentos obtidos por Soxhlet com diclorometano ( $38 \pm 1 \%$ ) e etanol ( $18 \pm 2 \%$ ). Rendimentos superiores para extrações Soxhlet, quando comparadas à ESC, são frequentemente relatados na literatura (GENENA et al., 2008; MEZZOMO, 2008;

MICHELIN et al., 2009). Menores rendimentos de extrato, em geral, são atribuídos a processos com maior seletividade (BISCAIA; FERREIRA, 2009; CAMPOS et al., 2008; WEINHOLD et al., 2008).

### 6.6.1.1 Efeito da pressão e da temperatura no rendimento global

A avaliação do efeito da pressão e da temperatura, no rendimento e qualidade dos extratos obtidos por ESC, foi feita seguindo planejamento experimental fatorial completo  $3^2$  (conforme item 5.9). A Figura 24 apresenta as isotermas de rendimento global da ESC em função da pressão, conforme dados da Tabela 10. As linhas tracejadas que unem os pontos experimentais da Figura 24 foram traçadas apenas para fins ilustrativos.

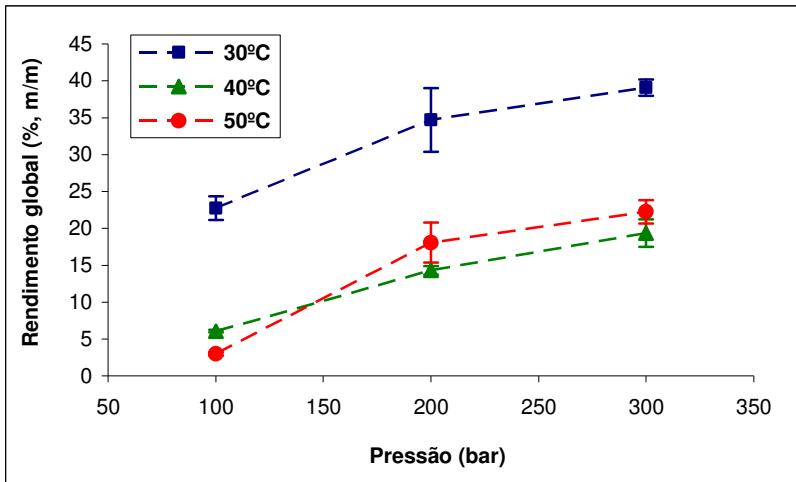


Figura 24. Gráfico da inversão das isotermas de rendimento global da ESC.

Fixando-se a temperatura (isto é, analisando uma isoterma), é possível perceber (Figura 24 e Tabela 10) que  $X_0$  aumenta à medida que a pressão de operação é elevada. Para a condição isotérmica de 50 °C, por exemplo, o rendimento aumenta de  $3,0 \pm 0,2$  % para  $22 \pm$

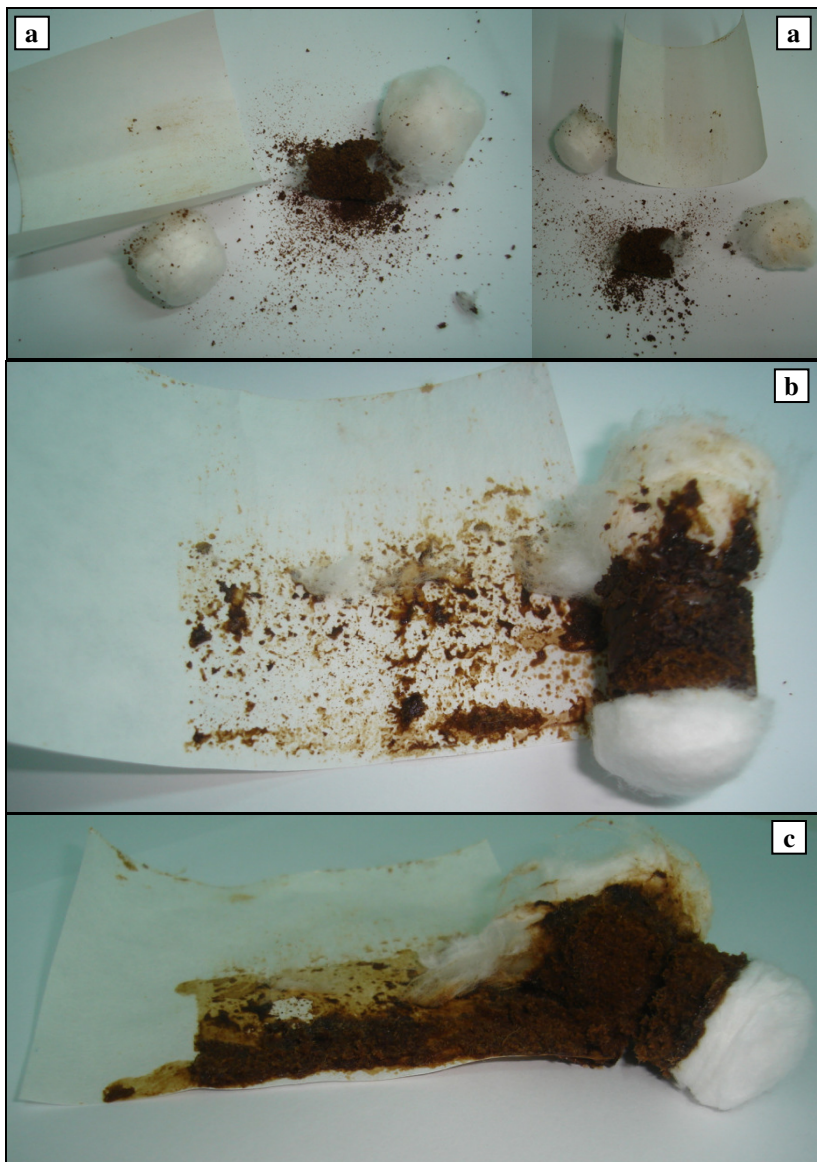
2 % quando a pressão é elevada de 100 para 300 bar, respectivamente. Este efeito da pressão é função da alteração que ocorre na densidade do solvente. Para uma mesma temperatura, a elevação da pressão provoca acréscimo na densidade do solvente e, conseqüentemente, elevação em seu poder de solvatação, aumentando a solubilidade dos compostos extraíveis. Tal efeito já foi relatado por Brunner (1994) e por diversos outros autores em trabalhos mais recentes (KITZBERGER et al., 2009; MICHIELIN et al., 2009; WEINHOLD et al., 2008).

O efeito da temperatura, entretanto, é bem mais complexo. A inversão das isotermas de rendimento, fenômeno típico observado em diversos estudos de ESC (KITZBERGER et al., 2009; MICHIELIN et al., 2009; MEZZOMO, 2008), só é observada para as isotermas de 40 °C e 50 °C, nas quais uma região de inversão (*crossover*) é detectada em pressão entre 140 e 150 bar. Para a condição de 100 bar (abaixo da pressão de inversão), o rendimento diminui (de  $23 \pm 2$  % para  $3,0 \pm 0,2$  %) em função do decréscimo na densidade do CO<sub>2</sub> (de 772 para 385 kg/m<sup>3</sup>) resultante do aumento da temperatura (de 30 para 50 °C). Inversamente, para 300 bar (acima da pressão de inversão), o rendimento aumenta (de  $19 \pm 2$  % para  $22 \pm 2$  %, ainda que esta diferença não seja significativa estatisticamente) com o aumento da temperatura (de 40 para 50 °C). A isoterma de 30 °C, no entanto, está deslocada bem acima das demais isotermas (conforme Figura 24), não apresentando qualquer tendência de inversão com as mesmas. Os rendimentos alcançados nesta temperatura (30 °C) são superiores e diferem significativamente dos demais (40 e 50 °C), ao nível de 5 % de significância, quando comparados para uma mesma pressão (conforme Tabela 10).

Tipicamente, o efeito da temperatura no processo de ESC, analisado para uma pressão fixa, é explicado por dois mecanismos que ocorrem simultaneamente. Por um lado, o aumento da temperatura resulta em decréscimo na densidade do solvente, com redução do poder de solvatação do mesmo e, conseqüentemente, diminuição da solubilidade. Por outro lado, o aumento da temperatura provoca acréscimo na pressão de vapor do soluto, o que resulta em aumento da solubilidade. Em pressões relativamente baixas (abaixo da pressão de inversão), o efeito da densidade do solvente é o mecanismo que prevalece. Já em pressões relativamente

altas (acima da pressão de inversão) o efeito da pressão de vapor torna-se o mecanismo dominante (BRUNNER, 1994; DANIELSKI, MICHIELIN e FERREIRA, 2007; MICHIELIN et al., 2005).

No sistema em estudo, além do efeito que a temperatura exerce na densidade do solvente e na pressão de vapor do soluto, foi possível verificar que a temperatura também tem importante influência sobre a estrutura física da matriz da extração, tornando o efeito desta variável ainda mais complexo. O substrato utilizado na ESC era, macroscopicamente, um pó fino, de partículas sólidas de tamanho e aspecto não homogêneos (conforme MEV da Figura 19), e que apresentavam forte tendência de adesão umas com as outras, tendo em vista que o material era altamente coesivo (“pegajoso”, “grudento”). Em função deste aspecto de coesão, as partículas quando pressionadas, ainda que manualmente, se uniam formando um bloco de maior dimensão, o que já modificava a estrutura das mesmas. Além disso, com o aumento da temperatura (para 40 °C e 50 °C), associado às altas pressões de trabalho, iniciava-se um processo de fusão parcial dentro do leito, de forma que a estrutura da matriz, inicialmente mais próxima a de sólido poroso, passava a se transformar em sólido pastoso, dificultando a transferência de massa através do leito de extração. Tal efeito, decorrente da fusão parcial observada a 40 e 50 °C, justifica o fato de os rendimentos obtidos a 30 °C terem sido bem mais elevados que nas demais temperaturas. A ilustração do efeito da temperatura sobre a estrutura da matriz da extração é apresentada na Figura 25, onde através da observação do material retirado do leito, após o processo de ESC, é possível verificar que a 30 °C não há indícios de fusão parcial. Por outro lado, a 40 e 50 °C, a fusão parcial, bem como o aspecto pastoso do material, ficam evidenciados uma vez que a matriz se adere ao papel filtro utilizado como envoltório na parede interna do leito.



**Figura 25.** Fotos da matriz retirada do leito após processo de ESC nas diferentes temperaturas de trabalho: (a) 30 °C; (b) 40 °C; (c) 50 °C.

A análise de variância (ANOVA) para os resultados da variável resposta rendimento global em função dos fatores temperatura e pressão está apresentada no Apêndice IV. De acordo com os resultados da ANOVA, tanto a pressão ( $p = 9,07 \times 10^{-9}$ ), quanto a temperatura ( $p = 3,84 \times 10^{-12}$ ) exerceram efeito significativo sobre o rendimento. O efeito da interação entre ambos os fatores (P\*T), contudo, não foi significativo ( $p = 0,2129$ ) sobre o rendimento.

Os resultados do teste de Tukey (Tabela 10), para comparação das médias dos diferentes tratamentos de ESC, indicam que, para uma mesma pressão, não há diferenças estatisticamente significativas, ao nível de 5% de significância, para os rendimentos obtidos nas temperaturas de 40 e 50 °C. Além disso, quando se avalia uma dada temperatura (condição isotérmica), é possível perceber que os rendimentos obtidos nas pressões de 200 e 300 bar não diferem significativamente entre si.

Até mesmo rendimentos cujos valores são aparentemente bastante distintos, como  $14 \pm 1 \%$  e  $19 \pm 2 \%$  (Tabela 10), não diferiram significativamente pelo teste de Tukey, o que pode ser explicado pelos altos desvios padrões obtidos nos experimentos realizados. Os elevados desvios podem ser justificados pela falta de uniformidade do substrato, tendo em vista que a seleção de tamanho de partícula foi feita visualmente e que a matéria-prima passa por extensivo pré-tratamento (conforme item 5.3). O complexo pré-tratamento químico contribui para a não garantia de homogeneidade do material utilizado como matriz das extrações, ainda que cuidados minuciosos tenham sido tomados quanto a isso (os materiais obtidos por diferentes bateladas de pré-tratamento foram misturados intimamente para compor um único lote de amostra, que foi então utilizado em todos os experimentos de rendimento global). Além disso, a tendência altamente coesiva do material pode ter contribuído para a compactação das partículas em detrimento da formação de um leito tipicamente poroso, dificultando a transferência de massa e possibilitando a formação de caminhos preferenciais através do leito de extração.

Os maiores rendimentos na ESC,  $39 \pm 1 \%$  e  $35 \pm 4 \%$ , foram alcançados na temperatura de 30 °C e pressões de 300 e 200 bar, respectivamente, sendo que entre eles não houve diferença significativa estatisticamente.



As Figura 26 e 27 ilustram os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno, respectivamente, nos quais o rendimento é função da temperatura e da pressão. A equação polinomial de segunda ordem que representa a dependência do rendimento global em função da temperatura e da pressão é apresentada na Equação 15. Este modelo polinomial, composto por termos lineares (T e P), quadráticos ( $T^2$  e  $P^2$ ) e de interação (T\*P) foi obtido a partir da superfície de resposta representada na Figura 26. De acordo com Mezzomo (2008), a equação obtida, a partir da superfície de resposta que descreve o comportamento de  $X_0$  em função de T e P, pode ser utilizada para estimar os valores de  $X_0$  em outras condições de temperatura e pressão, desde que se esteja dentro da faixa de condições nas quais a referida equação foi gerada.

$$X_0 = 191,1506 - 9,3747T + 0,2105P + 0,1047T^2 + 0,0007TP - 0,0004P^2 \quad (15)$$

Onde:

$X_0$  = Rendimento global (%; m/m);

T = temperatura (°C);

P = pressão (bar).

Através da observação da superfície de resposta e das curvas de contorno (Figuras 26 e 27), é possível perceber que o  $X_0$  atinge valores mais baixos na região de menor pressão (~100 bar) e maiores temperaturas (40 a 50 °C). Valores intermediários para  $X_0$  (de 15 a 25 %) podem ser atingidos em ampla faixa de pressões e temperaturas. Já os valores mais altos para  $X_0$  são obtidos na região de maiores pressões (200 a 300 bar) e menor temperatura (30 °C).

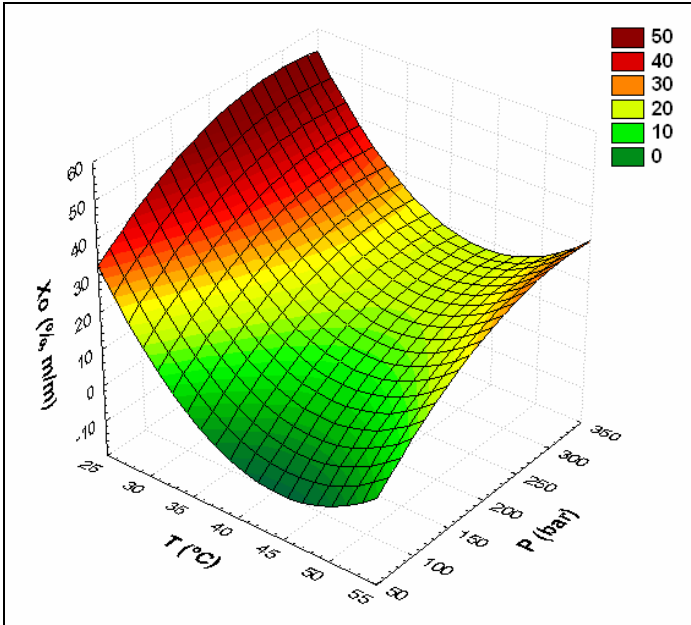


Figura 26. Superfície de resposta para o rendimento ( $X_0$ , %) em função da temperatura ( $T$ , °C) e da pressão ( $P$ , bar).

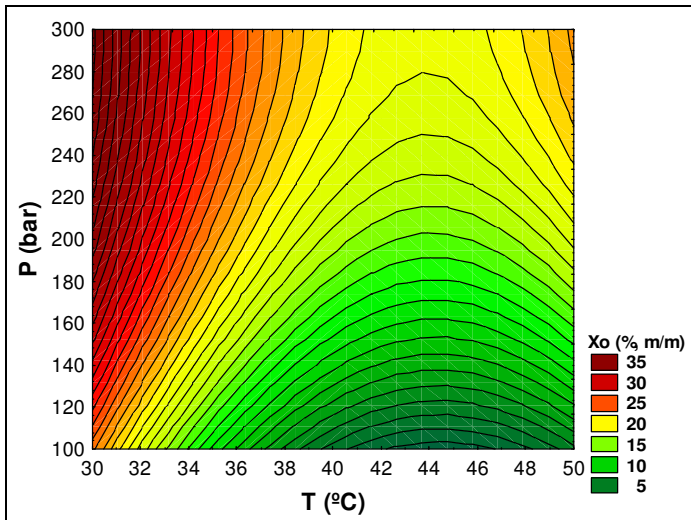


Figura 27. Curvas de contorno para o rendimento ( $X_0$ , %) em função da temperatura ( $T$ , °C) e da pressão ( $P$ , bar).

## 6.6.2 Teor de fenólicos totais

Os resultados da caracterização dos extratos em termos de TFT, através do método de Folin Ciocalteu, são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11. Teor de fenólicos totais (TFT), expresso em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato, para Soxhlet e ESC**

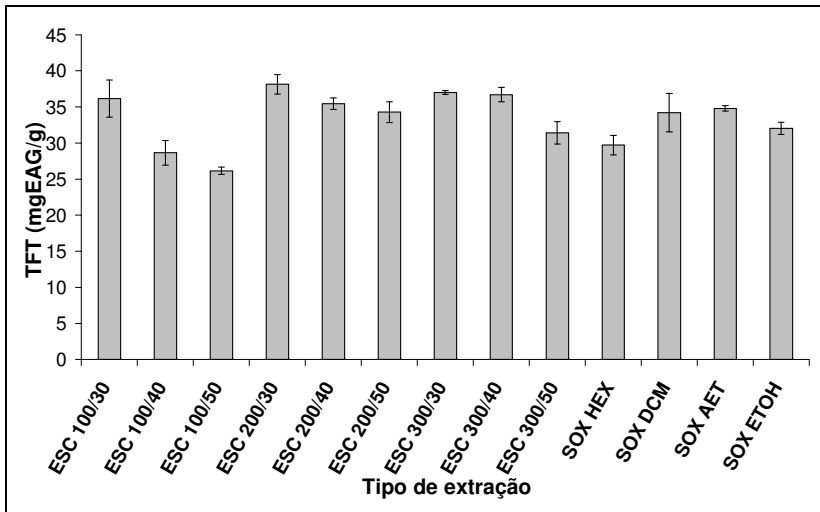
Extração	TFT (mgEAG/g) <sup>(1)</sup>
Soxhlet hexano	30 <sup>a,b</sup> ± 1
Soxhlet diclorometano	34 <sup>c,d,e,f</sup> ± 3
Soxhlet acetato de etila	34,8 <sup>c,d,e,f</sup> ± 0,4
Soxhlet etanol	32 <sup>b,c,d</sup> ± 1
ESC 100 bar / 30 °C	36 <sup>e,f</sup> ± 3
ESC 100 bar / 40 °C	29 <sup>a,b</sup> ± 2
ESC 100 bar / 50 °C	26 <sup>a</sup> ± 1
ESC 200 bar / 30 °C	38 <sup>f</sup> ± 1
ESC 200 bar / 40 °C	35 <sup>d,e,f</sup> ± 1
ESC 200 bar / 50 °C	34 <sup>c,d,e,f</sup> ± 1
ESC 300 bar / 30 °C	37,0 <sup>e,f</sup> ± 0,3
ESC 300 bar / 40 °C	37 <sup>e,f</sup> ± 1
ESC 300 bar / 50 °C	31 <sup>b,c</sup> ± 2

<sup>(1)</sup> Letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem significativamente (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

O  $\gamma$ -orizanol é um derivado do ácido ferúlico, que por sua vez faz parte da classe de ácidos fenólicos, que tem grande importância dentro do grupo dos compostos fenólicos. De acordo com Angelo e Jorge (2007), o ensaio de Folin Ciocalteu, utilizado para determinação do teor de fenólicos totais, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, sem fazer distinção entre classes específicas de compostos fenólicos.

A Figura 28 apresenta o gráfico de barras para os resultados de TFT obtidos para os extratos de Soxhlet e ESC. Através da análise da Tabela 11 e Figura 28 é possível verificar que, para a maioria dos tratamentos, o TFT apresentou resultados na mesma ordem de grandeza. Entre as extrações Soxhlet, o único solvente que resultou

em valor um pouco menor para o TFT ( $30 \pm 1$  mgEAG/g) foi o hexano, cujo resultado apresentou diferença significativa, ao nível de 5% de significância, em relação aos resultados obtidos com os solventes diclorometano ( $34 \pm 3$  mgEAG/g) e acetato de etila ( $34,8 \pm 0,4$  mgEAG/g). Comparando Soxhlet *versus* ESC, verifica-se que os TFTs obtidos para os extratos supercríticos foram, em geral, similares ou superiores aos alcançados nos extratos de Soxhlet (Tabela 11 e Figura 28).



**Figura 28.** Gráfico de barras dos resultados de teor de fenólicos totais (TFT) obtidos para as extrações Soxhlet (SOX) e Supercrítica (ESC). HEX = hexano; DCM = diclorometano; AET = acetato de etila; ETOH = etanol; 100/30 = 100 bar/30 °C.

Os resultados obtidos para o TFT (26 a 38 mgEAG/g de extrato) apresentam semelhança com os valores citados por Wiboonsirikul et al. (2008), que encontraram valores da ordem de 30 a 60 mgEAG/g para o TFT de extratos obtidos via tratamento com água quente pressurizada (água subcrítica), utilizando como matéria-prima o resíduo da produção de proteína e óleo a partir de farelo de arroz. Bouzid et al. (2005), estudando o resíduo do processamento de óleo de oliva, investigaram a aplicação de um tratamento enzimático ao extrato etanólico obtido a partir de tal resíduo, encontrando um TFT igual a 323 mgEAG/g de extrato seco. Ribeiro (2007) utilizou

diferentes técnicas (Soxhlet, ESC, ESC+co-solventes) para obtenção de extratos a partir de bagaço de maçã. Os maiores TFTs encontrados foram: 4 mgEAG/g, 0,65 mgEAG/g e 1,7 mgEAG/g para Soxhlet com etanol, ESC e ESC com co-solvente, respectivamente.

Além de Ribeiro (2007) outros autores que compararam a qualidade de extratos obtidos por extração convencional e ESC, também encontraram maiores TFT para os extratos convencionais. Biscaia (2007), estudando extratos de própolis, obteve TFT igual a 139 mgEAG/g para maceração com etanol/água (1:1) e 55 mgEAG/g para ESC com CO<sub>2</sub> puro (100 bar/50 °C). Mezzomo (2008), ao investigar extratos de amêndoa de pêssego, encontrou TFT de 128 mgEAG/g para Soxhlet com etanol e 31 mgEAG/g para ESC com CO<sub>2</sub> puro (300 bar/50 °C). Michielin (2009), para extratos de erva baleeira, obteve TFT igual a 358 mgEAG/g para maceração com acetato de etila e 112 mgEAG/g para ESC com CO<sub>2</sub> puro (200 bar/40 °C). No presente trabalho, contudo, os extratos obtidos com solventes convencionais (técnica Soxhlet) e com CO<sub>2</sub> puro (ESC) apresentaram TFTs similares. Este fato sugere que os compostos fenólicos presentes na matriz possuem polaridades intermediárias, sendo extraídos por solventes com diferentes graus de polaridade (desde o CO<sub>2</sub>, que é apolar, até o etanol, com polaridade relativamente alta).

#### 6.6.2.1 Efeito da pressão e da temperatura no teor de fenólicos totais

A ANOVA para os resultados da variável resposta TFT em função dos fatores pressão e temperatura é apresentada no Apêndice IV. De acordo com a ANOVA, tanto a temperatura ( $p = 6,78 \times 10^{-10}$ ) e a pressão ( $p = 6,01 \times 10^{-5}$ ), quanto o efeito da interação de ambos os fatores (T\*P) ( $p = 3,90 \times 10^{-4}$ ), apresentaram efeito significativo, ao nível de 5% de significância, sobre o TFT dos extratos supercríticos.

Os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno para o TFT, em função da pressão e da temperatura, são ilustrados nas Figuras 29 e 30, respectivamente. O modelo polinomial, de segunda ordem, para representação da dependência do TFT em função da temperatura e da pressão é apresentado na Equação 16.

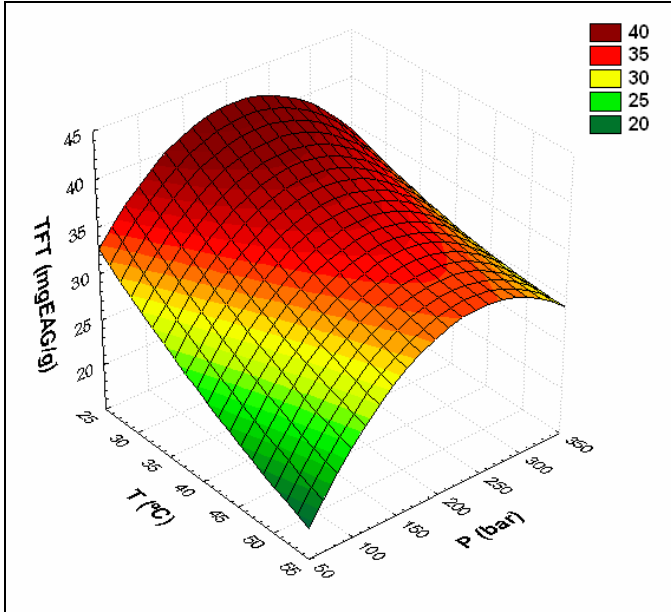


Figura 29. Gráfico de superfície de resposta para o teor de fenólicos totais (TFT, mgEAG/g) em função da temperatura (T, °C) e da pressão (P, bar).

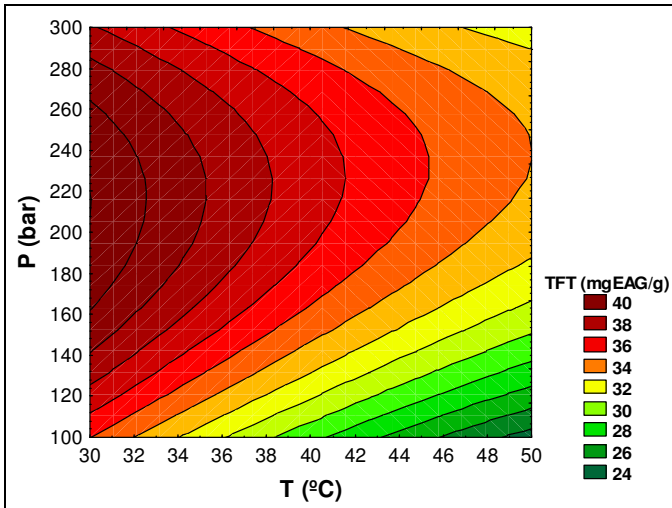


Figura 30. Curvas de contorno para o teor de fenólicos totais (TFT, mgEAG/g) em função da temperatura (T, °C) e da pressão (P, bar).

$$TFT = 45,3906 - 0,9170T + 0,1365P + 0,0050T^2 + 0,0010TP - 0,0004P^2 \quad (16)$$

Onde:

TFT = teor de fenólicos totais (mgEAG/g);

T = temperatura (°C);

P = pressão (bar).

Através da análise da superfície de resposta e das curvas de contorno (Figuras 29 e 30), é possível perceber que o TFT atinge os menores valores na região de baixa pressão (100 bar) e altas temperaturas (40 a 50 °C). Já os valores mais altos para o TFT encontram-se na região de alta pressão (200 a 300 bar) e baixas temperaturas (30 a 40 °C). Portanto, há uma tendência de decréscimo no TFT a medida que se reduz a pressão e se aumenta a temperatura de processo.

### 6.6.3 Atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH

Os resultados da caracterização dos extratos em termos de estimativa da atividade antioxidante, pelo método do radical livre DPPH, estão expressos em termos de  $EC_{50}$  e são apresentados na Tabela 12 e no gráfico de barras da Figura 31. O  $EC_{50}$  é um parâmetro extensivamente utilizado na expressão de resultados de eficiência em ensaios de determinação de capacidade antioxidante (GENENA et al., 2008).

Cabe ressaltar que o valor de  $EC_{50}$  representa a concentração efetiva para que se atinja 50 % de atividade antioxidante, de acordo com Equação 9 (item 5.7.3). Portanto, quanto menor o valor de  $EC_{50}$ , menor a concentração necessária para que se tenha 50 % de atividade antioxidante (AA) de acordo com o método do DPPH, e maior a atividade antioxidante do sistema em estudo. Em outras palavras, baixos valores para  $EC_{50}$  estão associados à elevada AA e vice-versa.

**Tabela 12. Estimativa da atividade antioxidante pelo método do DPPH (expressa em EC<sub>50</sub>) para os extratos de Soxhlet (SOX) e ESC**

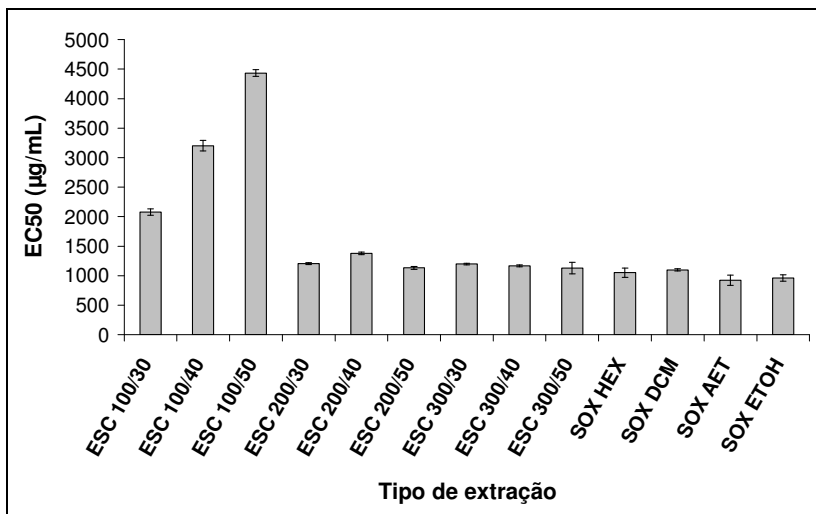
<b>Extração</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg/mL) <sup>(1)</sup></b>
Soxhlet hexano	1051 <sup>a,b,c</sup> ± 77
Soxhlet diclorometano	1099 <sup>b,c</sup> ± 18
Soxhlet acetato de etila	921 <sup>a</sup> ± 88
Soxhlet etanol	960 <sup>a,b</sup> ± 56
ESC 100 bar / 30 °C	2079 <sup>e</sup> ± 54
ESC 100 bar / 40 °C	3201 <sup>f</sup> ± 91
ESC 100 bar / 50 °C	4433 <sup>g</sup> ± 55
ESC 200 bar / 30 °C	1206 <sup>c</sup> ± 17
ESC 200 bar / 40 °C	1378 <sup>d</sup> ± 21
ESC 200 bar / 50 °C	1132 <sup>c</sup> ± 25
ESC 300 bar / 30 °C	1197 <sup>c</sup> ± 15
ESC 300 bar / 40 °C	1166 <sup>c</sup> ± 15
ESC 300 bar / 50 °C	1131 <sup>c</sup> ± 99

<sup>(1)</sup> Letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem significativamente (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

Em geral, os tratamentos aplicados, incluindo Soxhlet e ESC, resultaram em extratos com valores de EC<sub>50</sub> da mesma ordem de grandeza, exceto para ESC a 100 bar (conforme Tabela 12). Entre as extrações Soxhlet, praticamente não houve diferenças entre os solventes utilizados, ainda que estatisticamente tenha sido detectada diferença significativa entre o acetato de etila (921 ± 88 µg/mL) e o diclorometano (1099 ± 18 µg/mL).

Comparando os resultados de Soxhlet e ESC (Tabela 12) é possível verificar que os valores de EC<sub>50</sub> para a ESC são apenas ligeiramente superiores aos obtidos para Soxhlet, na maioria dos casos nem apresentando diferença significativa estatisticamente em relação aos tratamentos com hexano (1051 ± 77 µg/mL) e diclorometano (1099 ± 18 µg/mL). Exceção se faz às condições de ESC a 100 bar, pressão na qual foram obtidos, para todas as temperaturas (30, 40 e 50 °C), valores bem mais altos para o EC<sub>50</sub> (2079 ± 54; 3201 ± 91 e 4433 ± 55 µg/mL, respectivamente), sugerindo atividades antioxidantes bem mais baixas nos extratos obtidos nesta pressão. A similaridade entre os valores de EC<sub>50</sub> para os extratos de Soxhlet e ESC a 200 e 300 bar fica bem nítida no gráfico de barras da Figura 31.





**Figura 31.** Gráfico de barras dos resultados da atividade antioxidante pelo método de DPPH, expressa pelo valor do EC<sub>50</sub>, para as técnicas de extração Soxhlet (SOX) e Supercrítica (ESC). HEX = hexano; DCM = diclorometano; AET = acetato de etila; ETOH = etanol; 100/30 = 100 bar/30 °C.

Os resultados obtidos para os valores de EC<sub>50</sub> foram superiores aos relatados por Genena et al. (2008), Kitzberger (2005) e Michielin (2009). Genena et al. (2008) investigou a obtenção de extratos de alecrim, por extração Soxhlet e supercrítica, e obteve valores de EC<sub>50</sub> na faixa de 9 µg/mL (Soxhlet com hexano) a 27 µg/mL (ESC 100 bar/30 °C). Kitzberger (2005), em estudo sobre obtenção de extratos de cogumelo shiitake, encontrou valores de EC<sub>50</sub> variando entre 132 µg/mL (maceração com diclorometano) a 190 µg/mL (ESC 200 bar/40 °C/5 % etanol). Michielin (2009) testou diferentes técnicas e condições para obtenção de extratos a partir de erva baleeira, e obteve uma ampla faixa de valores para EC<sub>50</sub>, os quais variaram entre 9 µg/mL (maceração com acetato de etila) a 1984 µg/mL (hidrodestilação).

A similaridade verificada nos resultados de EC<sub>50</sub>, obtidos para as técnicas de Soxhlet e ESC, indica que os compostos antioxidantes detectados pelo método do DPPH não foram afetados pelas temperaturas altas utilizadas na extração Soxhlet. Além disso, sugere

também que tais compostos possuem polaridades intermediárias, visto que resultados parecidos foram obtidos para solventes com ampla faixa de polaridade. Os valores de  $EC_{50}$  da ESC a 100 bar foram os únicos resultados que nitidamente se diferenciaram dos demais, o que provavelmente é consequência da menor solubilidade dos compostos antioxidantes em função das baixas densidades do  $CO_2$  nesta pressão, especialmente nas temperaturas de 40 °C e 50 °C.

#### 6.6.3.1 Efeito da pressão e da temperatura na atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH

Os resultados da ANOVA para a variável resposta  $EC_{50}$ , em função dos fatores pressão e temperatura, são apresentados no Apêndice IV. De acordo com tais resultados, tanto a temperatura ( $p = 7,77 \times 10^{-16}$ ) e a pressão ( $p \approx 0,0000$ ), quanto o efeito da interação entre ambos os fatores (T\*P) ( $p \approx 0,0000$ ), apresentaram efeito significativo sobre o valor de  $EC_{50}$ .

As Figuras 32 e 33 apresentam os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno para o valor de  $EC_{50}$  em função da pressão e da temperatura. O modelo polinomial de segunda ordem, com os termos linear, quadrático e de interação, para representação da dependência do  $EC_{50}$  em função da temperatura e da pressão, é apresentado na Equação 17.

$$EC_{50} = 288,9849 + 190,0578T - 25,5334P - 0,4259T^2 - 0,5906TP + 0,0972P^2 \quad (17)$$

Onde:

$EC_{50}$  = concentração efetiva referente a 50% de atividade antioxidante ( $\mu\text{g/mL}$ );

T = temperatura (°C);

P = pressão (bar).

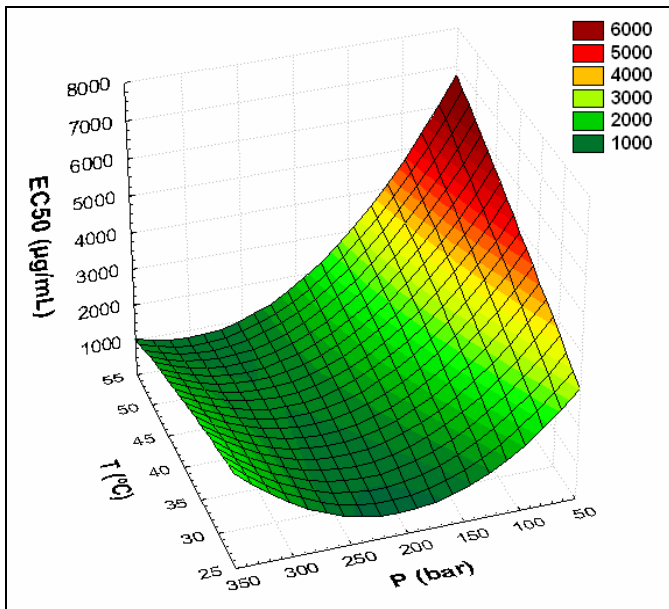


Figura 32. Gráfico de superfície de resposta para o valor de EC<sub>50</sub> (µg/mL) em função da pressão (P, bar) e da temperatura (T, °C).

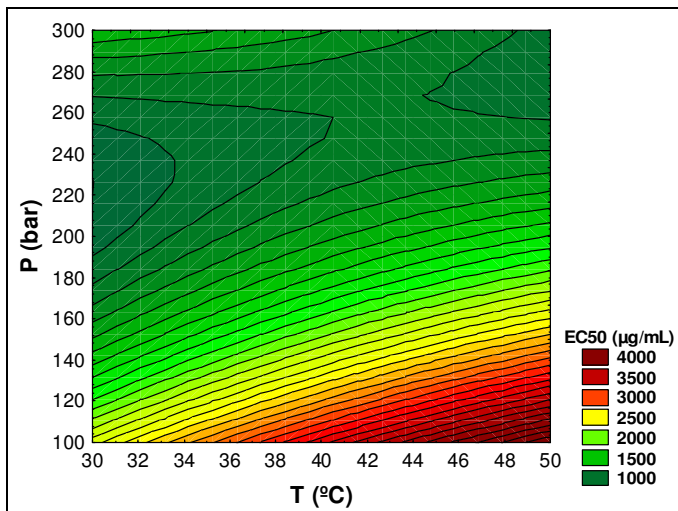


Figura 33. Curvas de contorno para o valor de EC<sub>50</sub> (µg/mL) em função da pressão (P, bar) e da temperatura (T, °C).

Observando-se a superfície de resposta e as curvas de contorno (Figuras 32 e 33), pode-se perceber que o  $EC_{50}$  atinge valores elevados (e, portanto, baixa AA) na região de menor pressão (100 bar) para todas as temperaturas (30 a 50 °C). Fora desta região, nas pressões mais altas (200 a 300 bar), valores mais baixos (maior AA) e muito similares são obtidos em todas as temperaturas (30 a 50 °C).

#### 6.6.4 Teor de $\gamma$ -orizanol e taxa de recuperação do $\gamma$ -orizanol

Os resultados da caracterização dos extratos, em termos de teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por análise de CLAE/UV, teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por espectrofotometria UV e taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13. Teor de  $\gamma$ -orizanol (TGO) e taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol (RGO) para os extratos de Soxhlet (SOX) e ESC**

Extração	TGO <sub>CLAE</sub> (%, m/m)	TGO <sub>E-UV</sub> (%, m/m) <sup>(1)</sup>	RGO (%, m/m)
SOX hexano	3,4	6,5 <sup>h</sup> ± 0,2	75,3
SOX diclorometano	3,4	5,8 <sup>g</sup> ± 0,1	32,6
SOX acetato de etila	3,3	6,03 <sup>g</sup> ± 0,05	58,6
SOX etanol	2,3	4,5 <sup>f</sup> ± 0,1	10,5
ESC 100 bar / 30 °C	1,2	1,29 <sup>c</sup> ± 0,02	6,8
ESC 100 bar / 40 °C	*	0,8 <sup>b</sup> ± 0,1	1,2 <sup>(2)</sup>
ESC 100 bar / 50 °C	*	0,51 <sup>a</sup> ± 0,02	0,4 <sup>(2)</sup>
ESC 200 bar / 30 °C	3,2	3,1 <sup>e</sup> ± 0,2	27,8
ESC 200 bar / 40 °C	*	2,38 <sup>d</sup> ± 0,01	11,7 <sup>(2)</sup>
ESC 200 bar / 50 °C	*	3,2 <sup>e</sup> ± 0,1	17,0 <sup>(2)</sup>
ESC 300 bar / 30 °C	3,2	3,1 <sup>e</sup> ± 0,1	31,3
ESC 300 bar / 40 °C	2,6	2,45 <sup>d</sup> ± 0,04	12,6
ESC 300 bar / 50 °C	3,4	3,0 <sup>e</sup> ± 0,1	18,9

TGO<sub>CLAE</sub> = teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por CLAE/UV. TGO<sub>E-UV</sub> = teor de  $\gamma$ -orizanol determinado por espectrofotometria UV. \*Determinação não realizada, em função do alto custo da análise. <sup>(1)</sup> Letras iguais não diferem significativamente (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). <sup>(2)</sup> Calculado levando em consideração o TGO<sub>E-UV</sub>.

A partir dos resultados da Tabela 13 é possível verificar que o TGO obtido por espectrofotometria UV, para os extratos de Soxhlet, foi quase 2x maior que o TGO detectado por análise de CLAE/UV. Tal diferença indica que a técnica de espectrofotometria UV não é adequada para a quantificação do TGO nestes extratos, possivelmente em função de interferências provocadas pela matriz do extrato na leitura da absorbância. Bucci et al. (2003), ao analisar amostras de óleo de arroz, também obtiveram resultados diferentes para o TGO determinado por CLAE e por espectrofotometria UV em comprimento de onda fixo. Os erros foram atribuídos à interferência provocada pela matriz oleosa, sendo tal interferência relatada como um problema inerente a este método de quantificação do  $\gamma$ -orizanol (BUCCI et al., 2003).

Os valores obtidos para os extratos de ESC, na determinação do TGO por espectrofotometria UV, foram similares ao TGO determinado pela análise de CLAE/UV. Neste caso, portanto, a matriz do extrato não provocou interferência na leitura da absorbância. Desta forma, o método de espectrofotometria UV poderia ser utilizado pra estimar o TGO de extratos obtidos por ESC, principalmente em testes/estudos preliminares, ainda que eventuais análises de CLAE sejam indicadas para confirmação de resultados finais.

O máximo valor obtido para o TGO dos extratos (3,4 %, m/m) é superior aos teores relatados para o óleo de arroz por Perretti et al. (2003), Dunford e King (2000) e Balachandran et al. (2008). Perretti et al. (2003), investigando a ESC de subprodutos do beneficiamento do arroz, relataram um teor de  $\gamma$ -orizanol (TGO) máximo igual a 1,8 % (m/m) para o extrato (óleo) obtido a partir do farelo de arroz (689 bar/80 °C). Dunford e King (2000), em processo de refino de óleo de arroz bruto através de fracionamento com CO<sub>2</sub> supercrítico, obtiveram um TGO de 1,8 % (m/m) no óleo refinado (136 bar/45 °C), teor relatado como 3x superior ao de uma amostra de óleo comercializada com denominação de “óleo de arroz com alto conteúdo de  $\gamma$ -orizanol”. Balachandran et al. (2008), em processo integrado de extração e refino de óleo de arroz, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, obteve um TGO máximo de 1,1 % (m/m) no óleo obtido na melhor condição estudada (500 bar/60 °C).

Comparando-se os resultados do presente trabalho ( $X_0 = 81 \pm 1$  % e  $39 \pm 1$  %; TGO<sub>CLAE</sub> = 3,4 % e 3,2 %; RGO = 75,3 % e 31,3 %;

para Soxhlet com hexano e ESC 300 bar/30 °C, respectivamente) com dados de Scavariello (1997) e Calheiros (2007), os quais investigaram a recuperação de  $\gamma$ -orizanol a partir da BNOA, observa-se que os rendimentos globais obtidos foram maiores, porém os extratos apresentaram menor TGO e menor taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol (RGO). Calheiros (2007), na ESC a partir da BNOA, relatou os seguintes resultados para o extrato obtido na melhor condição (300 bar/60 °C):  $X_0 = 12,5 \%$  (m/m); TGO = 16 % (m/m); RGO = 69 %. Scavariello (1997) testou diferentes solventes orgânicos e condições operacionais para a recuperação de  $\gamma$ -orizanol a partir da BNOA. A melhor condição foi obtida na extração da borra com acetona (10 °C/60 min/relação solvente:borra = 7:1), com os seguintes resultados:  $X_0 = 17,2 \%$  ; TGO = 6,25 % (m/m); RGO = 90,5 %.

Das et al. (1998), estudaram a obtenção de  $\gamma$ -orizanol a partir do RDBN, utilizando o mesmo pré-tratamento que foi aplicado no presente trabalho. O precipitado seco obtido ao final do pré-tratamento foi então submetido às seguintes etapas: (1) extração com acetato de etila; (2) isolamento do  $\gamma$ -orizanol em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando clorofórmio como eluente; (3) purificação com carvão ativado, em solução metanólica. Ao final do processo, Das et al. (1998) obtiveram cristais de  $\gamma$ -orizanol, com pureza de 96 % e RGO igual a 76 %, material relatado como adequado para aplicação em produtos farmacêuticos de alto valor agregado.

A partir da análise comparativa com os dados das referências citadas acima, é possível concluir que o RDBN é uma matéria-prima potencial para recuperação e obtenção de  $\gamma$ -orizanol. Através dos processos de extração aplicados, obteve-se TGOs superiores aos teores reportados para extratos obtidos a partir do farelo de arroz, porém inferiores aos teores relatados para extração a partir da BNOA, ainda que esta última contenha um TGO menor (1,5 % detectado por Calheiros (2007); 1,2 % relatado por Scavariello (1997)) que o do RDBN (4,8 %, obtido neste trabalho). Além disso, fica evidenciado que para a obtenção de um material com elevado TGO, como cristais de alta pureza, etapas posteriores ao processo de extração são necessárias, visando o isolamento e purificação do  $\gamma$ -orizanol, tal como proposto por Das et al. (1998).

Cabe ressaltar que, os extratos obtidos por ESC, embora não representem um material de elevada pureza, podem ser considerados como ricos em  $\gamma$ -orizanol, e acredita-se que os mesmos tenham potencial para aplicação industrial sem necessitar de um processo adicional de purificação. A composição essencialmente lipídica destes extratos, com elevada proporção de AG monoinsaturados e poliinsaturados (conforme Tabela 14, item 6.6.5), associada ao potencial antioxidante conferido pelo  $\gamma$ -orizanol, possibilitaria a utilização dos mesmos em formulações alimentícias, por exemplo, ou em aplicações para produtos cosméticos. Em relação à extração Soxhlet, verificou-se que a consistência dos extratos obtidos possivelmente dificultaria ou impossibilitaria a aplicação direta dos mesmos, tal como será discutido em mais detalhes no item 6.6.5.

Através da avaliação conjunta dos resultados de rendimento global, teor de  $\gamma$ -orizanol e taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol, sugere-se como melhores condições para obtenção do extrato supercrítico a ESC a 300 bar/30 °C ( $X_0 = 39 \pm 1\%$ ; TGO = 3,2 %; RGO = 31,3 %) e a ESC a 200 bar/30 °C ( $X_0 = 35 \pm 4\%$ ; TGO = 3,2 %; RGO = 27,8 %). A ESC a 300 bar/50 °C, ainda que apresente o máximo TGO (3,4 %), resultou em valores bastante inferiores de  $X_0$  ( $22 \pm 2\%$ ) e RGO (18,9 %), o que faz com que as extrações a 300 bar/30 °C e 200 bar/30 °C sejam possivelmente mais interessantes. Contudo, para que se possa avaliar com clareza a condição mais interessante do ponto de vista econômico, faz-se necessário um estudo detalhado da viabilidade econômica do processo nas diferentes condições operacionais sugeridas.

#### 6.6.5 Composição em ácidos graxos

A Tabela 14 apresenta os resultados da análise de CG para determinação do perfil de ácidos graxos dos extratos de Soxhlet e ESC. Para a ESC apenas uma condição (300 bar/30 °C) foi selecionada para realização da análise cromatográfica, procedimento adotado em função do alto custo da mesma. A escolha do extrato de ESC foi feita com base nos resultados apresentados em termos de rendimento e qualidade (conforme itens 6.6.1 a 6.6.4). Os pontos de

fusão dos principais AG identificados nas análises de CG são apresentados no Apêndice V.

Em relação à extração Soxhlet, os extratos obtidos com diclorometano e etanol destacam-se por apresentar menores teores de AG saturados e maiores teores de AG poliinsaturados quando comparados aos extratos de hexano e acetato de etila. As proporções de AG saturados de cadeia longa (C18:0; C20:0; C22:0; C24:0) são menores nos extratos de diclorometano e etanol. Tal fator, juntamente com a maior proporção de AG poliinsaturados, faz com que tais extratos possuam pontos de fusão menores que os extratos de hexano e acetato de etila. Os extratos de diclorometano e etanol apresentam consistência semi-sólida e são razoavelmente maleáveis, enquanto os extratos de hexano e acetato de etila são sólidos e não apresentam boas características de plasticidade, o que possivelmente dificultaria a aplicação direta destes em formulações de produtos alimentícios, por exemplo.

O extrato de ESC apresentou proporções de AG nitidamente diferenciadas em relação a todos os extratos de Soxhlet, especialmente para AG saturados (C16:0; C18:0; C20:0; C22:0; C24:0), ácido oléico (C18:1) e ácido linoléico (C18:2). A quantidade bem inferior de AG saturados, juntamente com as maiores proporções de AG monoinsaturados e AG poliinsaturados, justifica o menor ponto de fusão observado para o extrato de ESC em comparação com os extratos de Soxhlet. O extrato de ESC apresenta consistência semi-sólida e, aparentemente, boas características de plasticidade.

O extrato obtido com diclorometano apresenta maior proporção de AG saturados e menor proporção de AG poliinsaturados em relação ao extrato supercrítico, o que confere ao extrato de diclorometano um maior ponto de fusão quando comparado ao extrato de ESC. Além disso, os extratos de Soxhlet com hexano, acetato de etila e diclorometano apresentaram coloração marrom intensa (conforme Figura 34). Além dos maiores pontos de fusão em relação ao extrato de ESC, a coloração destes extratos possivelmente dificultaria e/ou impossibilitaria a utilização direta dos mesmos em aplicações alimentícias.

Portanto, sugere-se que o extrato de ESC é o que possui atributos de aparência e consistência (conforme Tabela 14 e Figura 34) mais adequados para utilização direta em aplicações industriais.

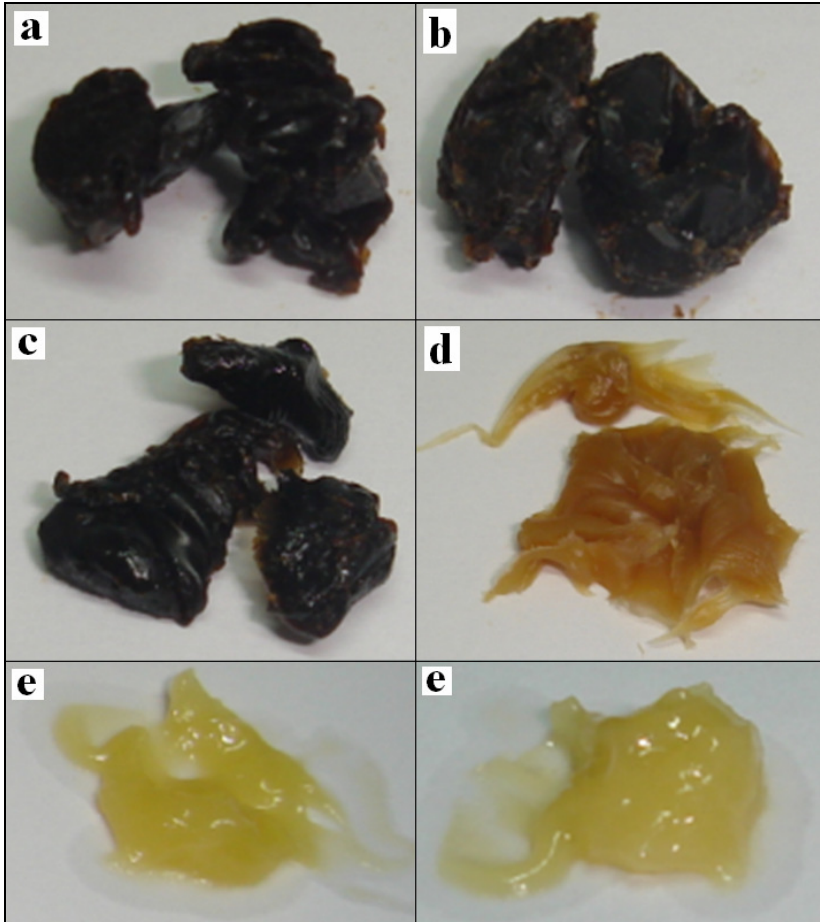


As elevadas proporções de AG monoinsaturados (47,61 %) e poliinsaturados (40,48 %) também favorecem a utilização deste extrato em aplicações diversas, como formulações para a indústria alimentícia.

**Tabela 14. Composição em ácidos graxos (% , m/m) dos extratos de Soxhlet e ESC.**

Ácido graxo		SOX HEX	SOX DCM	SOX AET	SOX ETOH	ESC 300/30
<b>Saturados</b>		<b>23,97</b>	<b>17,37</b>	<b>22,84</b>	<b>21,74</b>	<b>11,13</b>
C12:0	Láurico	-	0,08	-	0,12	0,04
C14:0	Mirístico	0,21	0,18	0,21	0,28	0,19
C15:0	Pentadecanóico	-	-	-	0,08	0,04
C16:0	Palmitico	15,61	11,75	14,97	15,52	8,84
C17:0	Margárico	0,08	0,07	0,08	0,09	0,06
C18:0	Estearico	1,97	1,37	1,93	1,74	0,82
C20:0	Araquídico	1,17	0,79	1,11	0,89	0,34
C22:0	Behênico	1,21	0,79	1,12	0,84	0,28
C24:0	Lignocérico	3,72	2,34	3,42	2,18	0,52
<b>Monoinsaturados</b>		<b>43,27</b>	<b>46,07</b>	<b>43,62</b>	<b>43,31</b>	<b>47,61</b>
C16:1	Palmitoléico	0,21	0,24	0,22	0,27	0,17
C18:1	Oléico	39,51	42,55	39,88	39,65	44,51
C18:1 (T)	Elaídico	2,58	2,30	2,55	2,50	2,07
C20:1	Gadoléico	0,82	0,82	0,82	0,71	0,75
C22:1	Erúico	0,15	0,16	0,15	0,18	0,11
<b>Poliinsaturados</b>		<b>31,90</b>	<b>35,75</b>	<b>32,67</b>	<b>34,11</b>	<b>40,48</b>
C18:2	Linoléico	29,63	33,83	30,49	31,77	37,86
C18:2 (T)	Linoelaídico	0,92	0,58	0,53	0,99	0,61
C18:3	Linolênico	1,18	1,34	1,26	1,35	1,60
C18:3 (T)	Translinolênico	0,17	-	0,39	-	0,41
Não Identificado		0,86	0,81	0,87	0,84	0,78

(T) = trans; HEX = hexano; DCM = diclorometano; AET = acetato de etila; ETOH = etanol; SOX = Soxhlet; ESC = extração supercrítica; 300/30 = 300 bar/30 °C.



**Figura 34.** Fotos dos extratos: (a) Soxhlet hexano; (b) Soxhlet acetato de etila; (c) Soxhlet diclorometano; (d) Soxhlet etanol; (e) ESC.

## 6.7 ESTUDO PRELIMINAR DE MODELAGEM MATEMÁTICA

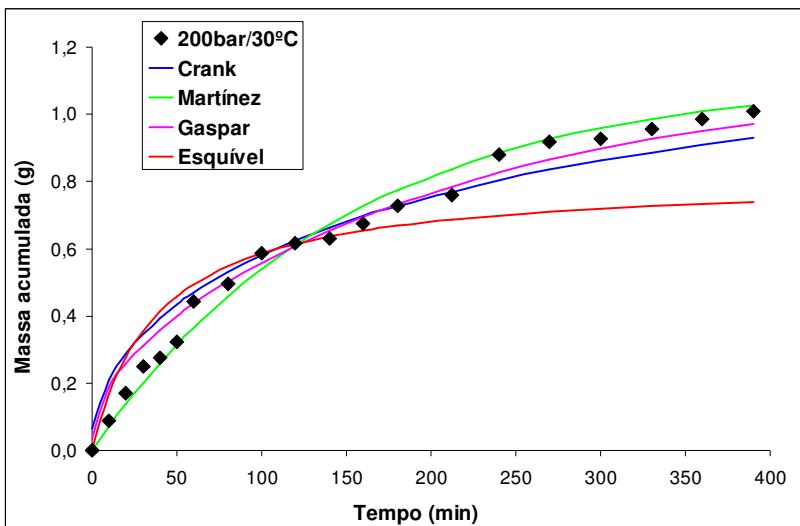
Os dados necessários para aplicação dos modelos matemáticos utilizados, conforme Equações 1 a 4 (item 4.2.3), estão listados na Tabela 15. A curva de extração obtida experimentalmente (200 bar /

30 ° C / vazão de solvente = 0,6 kg/h), juntamente com as curvas modeladas, está ilustrada na Figura 35.

**Tabela 15. Dados utilizados na modelagem matemática da curva de ESC a 200 bar / 30 °C / 0,6 kgh<sup>-1</sup>.**

Modelo	Dados	
(2), (3)	M <sub>0</sub> (g)	1,1091
(1), (4)	M (g)	4,14
(1), (4)	x <sub>0</sub> (g/g)	0,2679
(2)	r (m)	1,01 x 10 <sup>-4</sup>
(3)	δ (m)	2,02 x 10 <sup>-4</sup>

(1) modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999); (2) modelo difusivo de Crank (1975); (3) modelo SSP de Gaspar et al. (2003); (4) modelo logístico de Martínez et al. (2003).



**Figura 35. Curva experimental (200 bar/30 °C/0,6 kgh<sup>-1</sup>) e curvas modeladas utilizando os modelos: empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999); difusivo de Crank (1975); SSP de Gaspar et al. (2003); logístico de Martínez et al. (2003).**

Através da observação da Figura 35, é possível perceber que o modelo logístico (MARTÍNEZ et al., 2003) foi o que apresentou

melhor ajuste aos dados experimentais. O melhor desempenho do modelo logístico é confirmado pelo valor do erro médio quadrático (EMQ), que foi o menor (0,0015) entre os modelos testados, conforme pode ser visto na Tabela 16. O modelo SSP (GASPAR et al., 2003) apresentou o segundo melhor ajuste (EMQ = 0,0024), seguido pelo modelo difusivo (CRANK, 1975). O modelo empírico (ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL; KING, 1999) foi o que teve o maior EMQ (0,0194) e, conseqüentemente, pior desempenho na modelagem matemática.

O modelo logístico apresentou especial proximidade com os dados experimentais no início da etapa CER e na etapa difusional. Os modelos SSP e difusivo apresentaram boa concordância com os valores experimentais principalmente na região da etapa FER, subestimando os dados obtidos na etapa difusional. O modelo empírico não apresentou proximidade com os dados experimentais em nenhuma das regiões da curva de extração.

**Tabela 16. Parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) obtidos na modelagem matemática da ESC (200 bar/30 °C/0,6 kgh<sup>-1</sup>)**

Modelo	Parâmetros ajustáveis	EMQ
Esquível <sup>(1)</sup>	$b_1 = 38,71$ (min)	0,0194
Crank <sup>(2)</sup>	$D_1 = 3,51 \times 10^{-12}$ (m <sup>2</sup> /min)	0,0053
SSP <sup>(3)</sup>	$D_2 = 1,98 \times 10^{-11}$ (m <sup>2</sup> /min)	0,0024
Martínez <sup>(4)</sup>	$b_2 = 0,0067$ (min <sup>-1</sup> ) $t_m = - 609,40$ (min)	0,0015

(1) modelo empírico de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999); (2) modelo difusivo de Crank (1975); (3) modelo SSP de Gaspar et al. (2003); (4) modelo logístico de Martínez et al. (2003).

Na Tabela 16 são apresentados os parâmetros ajustáveis obtidos para os modelos aplicados. O modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999), por sua natureza empírica, não possui qualquer relação com os fenômenos de transferência de massa que ocorrem dentro do leito de extração. O parâmetro ajustável deste modelo ( $b_1$ ), portanto, não é dotado de significado físico.

O modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) apresenta bons ajustes para curvas de extração com formato hiperbólico (MARTÍNEZ, 2005), o que é característico de sistemas nos quais o soluto tem fácil contato com o solvente e, por isso, é facilmente extraído (MEZZOMO, 2008; SOUSA et al., 2005). Silva et al.

(2009) relata que o modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) foi o que melhor representou os dados experimentais da ESC de óleo de carqueja. Mezzomo (2008), em algumas condições operacionais, também obteve bons ajustes para o modelo de Esquível, Bernardo-Gil e King (1999) na modelagem da ESC de óleo de amêndoa de pêssego. No presente trabalho, contudo, o grande desvio observado entre este modelo e os dados experimentais sugere que o soluto não seja facilmente extraído da matriz.

Os modelos de Gaspar et al. (2003) e Crank (1975), ambos baseados apenas no mecanismo difusivo de transferência de massa, apresentaram ajustes relativamente bons. O modelo SSP (GASPAR et al., 2003), em especial, apresentou um EMQ relativamente próximo ao do melhor ajuste, obtido pelo modelo logístico. Biscaia e Ferreira (2009) também obtiveram bons resultados para o modelo SSP no ajuste de dados de ESC de própolis. Genena (2005) relata bom ajuste do modelo de Crank aos dados experimentais de ESC de alecrim. O bom ajuste dos modelos difusivos é indicativo de que a resistência interna, na fase sólida, tem fundamental importância no mecanismo de transferência de massa que ocorre dentro do leito de extração.

Os parâmetros ajustáveis dos modelos SSP e de Crank representam o coeficiente de difusão do soluto na matriz sólida. No entanto, os valores obtidos para estes parâmetros não podem ser considerados como valor real do coeficiente de difusão, uma vez que se sabe que o processo de transferência de massa na ESC não é exclusivamente difusivo. É por isso que os parâmetros  $D_1$  e  $D_2$  (Tabela 16) possuem valores diferentes, apesar de possuírem, teoricamente, o mesmo significado físico.

No modelo logístico o parâmetro  $t_m$  corresponde ao instante no qual a taxa de extração alcança seu valor máximo (MARTÍNEZ et al., 2003). Entretanto, uma vez que o valor obtido para este parâmetro foi negativo (- 609,40), este deixa de ter significado físico. Neste caso, a taxa de extração tem seu valor máximo no instante inicial da extração, ou seja, no tempo igual a zero (GENENA, 2005; MEZZOMO, 2008).

Um dos fatores que contribui para o melhor desempenho do modelo logístico é a existência de dois parâmetros ajustáveis, o que contribui para um melhor ajuste dos dados experimentais em comparação aos demais modelos, os quais possuem apenas um

parâmetro ajustável (GENENA, 2005; KITZBERGER et al., 2009). Além disso, o modelo logístico, entre os aplicados, é o que mais leva em consideração os fenômenos físicos que de fato ocorrem no leito de extração. O modelo é baseado no balanço diferencial de massa dentro do leito, considerando fenômenos de transferência de massa que ocorrem na fase sólida e na fase fluida. Diversos autores, em estudos de modelagem matemática de curvas de ESC, já relataram desempenhos muito bons para o modelo logístico, para diversas matérias-primas, tais como: alecrim (GENENA, 2005); borra de neutralização do óleo de arroz (CALHEIROS, 2007), cogumelo shiitake (KITZBERGER et al., 2009); óleo de amêndoa de pêssego (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009); própolis (BISCAIA; FERREIRA, 2009).

## 7 CONCLUSÕES

As principais conclusões resultantes da realização deste trabalho estão listadas nos itens abaixo.

- O RDBN consiste num resíduo industrial com composição rica em  $\gamma$ -orizanol (4,8 %), além de elevadas proporções de AG monoinsaturados e poliinsaturados.

- O  $\gamma$ -orizanol é um antioxidante com alta estabilidade térmica, pois o rápido processo de degradação do mesmo só ocorre em temperaturas acima de 355 °C. Tal característica facilita a eventual aplicação deste antioxidante em qualquer tipo de produto, inclusive em produtos sujeitos a tratamento térmico intenso.

- O pré-tratamento aplicado na matéria-prima resultou em um material adequado para utilização como matriz nos processos de extração. O rendimento obtido no pré-tratamento foi de 120 % (1,2 g de precipitado seco/g de RDBN).

- Através das análises de MEV foi possível verificar que a matriz das extrações não apresentou uniformidade em termos de tamanho de partícula (diâmetro médio =  $202 \pm 92 \mu\text{m}$ ) e nem de aspecto morfológico.

- O maior  $X_0$  ( $89 \pm 1 \%$ ) foi obtido para Soxhlet com hexano. Este resultado se justifica em função do caráter essencialmente lipídico da matéria prima (e por isso a elevada solubilidade no hexano), assim como pelas condições operacionais inerentes à extração Soxhlet (alta temperatura, refluxo de solvente, interações soluto-solvente), as quais favorecem maiores rendimentos frente a outras técnicas, como a ESC.

- Os valores de  $X_0$  obtidos para a ESC variaram de  $3,0 \pm 0,2 \%$  (100 bar/50 °C) até  $39 \pm 1 \%$  (300 bar/30 °C), o que demonstra a forte influência que os parâmetros operacionais pressão e temperatura exerceram sobre o rendimento. Em uma condição isotérmica, a elevação da pressão resultou em aumento do  $X_0$ , efeito que é consequência do acréscimo na densidade do solvente.

- A influência da temperatura sobre  $X_0$  foi mais complexa do que os efeitos de temperatura tipicamente relatados em estudos de ESC. O fenômeno de inversão das isotermas de rendimento foi observado apenas para as temperaturas de 40 e 50 °C, para as quais foi detectada uma região de inversão em pressão próxima a 150 bar.

Neste caso, abaixo da P de inversão predominou o efeito da densidade do solvente (diminuição do  $X_0$  com o aumento da T), enquanto acima da P de inversão predominou o efeito da pressão de vapor do soluto (elevação de  $X_0$  com o aumento da T). Os valores mais altos de  $X_0$ , contudo, foram obtidos na temperatura de 30 °C, cuja isoterma de rendimento está deslocada bem acima das demais (conforme Figura 24). Acredita-se que o processo parcial de fusão do substrato, verificado a 40 e 50 °C, seja responsável pelos menores rendimentos obtidos nestas temperaturas. O substrato, que a 30 °C tem estrutura próxima a de sólido poroso, tende a se transformar em sólido pastoso em função do processo de fusão parcial observado nas temperaturas de 40 e 50 °C, dificultando o processo de transferência de massa no leito de extração.

- Resultados da mesma ordem de grandeza (variando entre  $26 \pm 1$  e  $38 \pm 1$  mgEAG/g) foram obtidos para o TFT dos extratos em todos os tratamentos aplicados, sendo que os TFTs dos extratos de ESC foram, em geral, similares ou superiores aos obtidos nos extratos de Soxhlet. Na ESC, os menores TFTs ( $26 \pm 1$  e  $29 \pm 2$  mgEAG/g) foram encontrados na pressão de 100 bar e temperaturas de 50 e 40 °C, respectivamente. Para todas as demais condições de ESC, exceto 300 bar/50 °C, não houve diferença estatisticamente significativa entre os TFTs, que variaram de  $34 \pm 1$  a  $38 \pm 1$  mgEAG/g.

- Todos os tratamentos aplicados, incluindo Soxhlet e ESC, resultaram em extratos com valores de  $EC_{50}$  da mesma ordem de grandeza ( $921 \pm 88$  a  $1378 \pm 21$  µg/mL), exceto para ESC a 100 bar. Na pressão de 100 bar e temperaturas de 30, 40 e 50 °C, obteve-se, respectivamente, valores de  $EC_{50}$  iguais a  $2079 \pm 54$ ,  $3201 \pm 91$  e  $4433 \pm 55$  µg/mL, os quais indicam a menor atividade antioxidante dos extratos obtidos nesta pressão.

- A utilização do método de espectrofotometria UV, para determinação do teor de  $\gamma$ -orizanol, resultou em valores superestimados para o TGO do RDBN e dos extratos de Soxhlet, erro que é justificado pela interferência da matriz na leitura da absorbância. Para os extratos de ESC, por outro lado, obteve-se boa correlação e similaridade entre o TGO determinado pelas técnicas de espectrofotometria UV e de CLAE/UV.

- O máximo TGO (3,4 %, m/m) foi obtido a 300 bar/50 °C, condição na qual obteve-se valores intermediários para o rendimento



( $X_0 = 22 \pm 2 \%$ , m/m) e para a taxa de recuperação do  $\gamma$ -orizanol (RGO = 18,9 %, m/m). Para as condições de 300 bar/30 °C e 200 bar/30 °C, o TGO detectado foi similar (3,2 %, m/m, em ambos os casos), sendo que nestas condições obteve-se os maiores rendimentos ( $X_0 = 39 \pm 1\%$  e  $X_0 = 35 \pm 4 \%$ , m/m, respectivamente) e maiores taxas de recuperação do  $\gamma$ -orizanol (RGO = 31,3 % e RGO = 27,8%, m/m, respectivamente) entre os extratos supercríticos. Portanto, analisando os dados de forma conjunta, verifica-se que o potencial de produção de  $\gamma$ -orizanol/g de substrato é maior nas condições de 300 bar/30 °C e 200 bar/30 °C. A definição da condição operacional mais viável economicamente, porém, só poderia ser feita mediante uma análise detalhada da viabilidade econômica englobando todos os custos envolvidos no processo.

- Em relação à técnica Soxhlet, o extrato com maior potencial para aplicação industrial, em função das características de consistência (conforme item 6.6.5), da coloração (Figura 34) e do *status* GRAS do solvente, é o extrato obtido com etanol. Entretanto, para Soxhlet com etanol obteve-se menor  $X_0$  ( $18 \pm 2 \%$ , m/m) e menor TGO (2,3 %, m/m) que para os extratos obtidos nas melhores condições da ESC.

- O modelo matemático que melhor representou os dados experimentais foi o modelo logístico de Martínez et al. (2003) (EMQ = 0,0015). O melhor ajuste deste modelo frente aos demais aplicados (ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL; KING, 1999; CRANK, 1975; GASPAR ET AL., 2003) pode ser justificado pela presença de dois parâmetros ajustáveis e pela melhor descrição dos fenômenos de transferência de massa que ocorrem dentro do leito de extração.

De maneira geral conclui-se que o resíduo industrial investigado possui potencial para ser utilizado como matéria-prima em processos de recuperação/obtenção de  $\gamma$ -orizanol. Dentre os extratos obtidos a partir de tal resíduo sugere-se que o extrato de ESC foi o que apresentou características (coloração, consistência, composição de ácidos graxos) possivelmente mais adequadas à utilização direta do mesmo como uma “gordura semi-sólida enriquecida em  $\gamma$ -orizanol” com potencial para aplicação em produtos alimentícios e/ou cosméticos.

## 8 SUGESTÕES

As sugestões consideradas relevantes, em termos de continuidade do trabalho desenvolvido, estão descritas nos itens a seguir:

- a) *estudo detalhado de cinética e modelagem matemática*: investigar a influência de parâmetros operacionais (sugere-se pressão e vazão de solvente) nas curvas de extração, avaliando os parâmetros cinéticos e parâmetros ajustáveis de modelos matemáticos disponíveis na literatura;
- b) *estudo de aumento de escala*: elaborar propostas de aumento de escala e avaliar qual delas fornece a melhor estimativa do comportamento do processo de ESC em maior escala;
- c) *estudo de viabilidade econômica*: investigar a estimativa de custos do processo de ESC avaliando diferentes condições de processo;
- d) *teste de aplicação em produto*: desenvolver uma formulação alimentícia para aplicação do extrato de ESC enriquecido em  $\gamma$ -orizanol.

Cabe ressaltar que a sugestão descrita no item (a) fazia parte do projeto inicial do presente trabalho. Entretanto, em função de fatores técnicos (problemas no funcionamento do único equipamento de ESC disponível no laboratório), não foi possível a realização desta etapa do estudo.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA S. **Sona-masuri.jpg**. 2006. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sona-masuri.jpg>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

ACHARYA S. **Unpolished-rice.jpg**. 2008. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Unpolished-rice.jpg>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

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**. 11 ed. Washington, 1990.

AOCS (American Oil Chemists' Society). **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. American Oil Chemists' Society, 3 ed., Champaign, 1996.

AOCS (American Oil Chemists' Society). Official Method Ca 2c-25: Moisture and volatile matter air Oven method. In: **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. American Oil Chemists' Society, Washington, 2004.

BALACHANDRAN, C. et al. An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2905–2912, 2008.

BARBIERI, J. Técnica de extração natural agrega valor aos produtos. **Jornal na UNICAMP**, Campinas, 13 a 19 jun 2005, p. 11. Disponível em: [www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/jornalPDF/ju291pg11.pdf](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju291pg11.pdf). Acesso em: 15 jan. 2010.

BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas.** 2007. 142 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

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

BOUZID, O. et al. Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1855–1862, 2005.

BRUNNER, G. **Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluid and the applications to separation processes.** 1<sup>a</sup> ed. Darstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994. 387 p.

BUCCI, R. et al. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 1254–1259, 2003.

BYERS, J.A. **Phenomenex catalogue.** Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2009.

CALHEIROS, M. N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz.** 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CAMPOS, L.M.A.S. et al. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 163–170, 2005.

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

CETKOVIC G. et al. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 109, p. 340–347, 2008.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; CHEW, Y.L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1214–1222, 2007.

CHANGMING, T. Domestic rice bran oil production to expand. **China daily**, Nov. 2009. Disponível em: <[http://www.chinadaily.com.cn/bizchina/2009-11/16/content\\_8975455.htm](http://www.chinadaily.com.cn/bizchina/2009-11/16/content_8975455.htm)>. Acesso em: 28 dez. 2009.

CHEN, C.R. et al. Supercritical–carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, p. 322–331, 2008.

CHOTIMARKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tune oil during storage. **Food Research International**, v. 41, p. 616–622, 2008a.

CHOTIMARKORN C.; BENJAKUL S.; SILALAI N. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. **Food Chemistry**, v. 111, p. 636–641, 2008b.

COMMODITYONLINE. **Rice bran refined oil**. Disponível em: <[www.commodityonline.com/commodities/oil-oilseeds/ricebranrefinedoil.php](http://www.commodityonline.com/commodities/oil-oilseeds/ricebranrefinedoil.php)>. Acesso em: 28 dez. 2009.

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

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

DANIELSKI, L. et al. A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran. **The Journal of Supercritical-Fluids**, v. 34, p. 133–141, 2005.

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO<sub>2</sub>: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1054–1059, 2007.

DAS, P.K. et al. Isolation of  $\gamma$ -oryzanol through calcium ion induced precipitation of anionic micellar aggregates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3073–3080, 1998.

DUDONNÉ S. et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768–1774, 2009.

DUNFORD, N.T.; KING, J.W. Phytosterol enrichment of RBO by a supercritical-carbon dioxide fractionation technique. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1395–1399, 2000.

DUNFORD, N.T.; KING, J.W. Thermal gradient deacidification of crude RBO utilizing supercritical-carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 121–125, 2001.

DUNFORD, N.T., TEEL, J.A.; KING, J.W. A continuous countercurrent supercritical-fluid deacidification process for phytosterol ester fortification in RBO. **Food Research International**, v. 36, p. 175–181, 2003.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Participação dos principais Estados produtores de Arroz (Brasil – 2008)**. Elaboração de SILVA, O. F. para Embrapa Arroz e Feijão, Brasil, 2008. Disponível em: <[http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/produtores\\_arroz.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/produtores_arroz.htm)>. Acesso em: 2 dezembro 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil – Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz. **Embrapa Clima Temperado, Sistemas de**

**Produção** (ISSN 1806-9207), Novembro/2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/index.htm>>. Acesso em: 2 dezembro 2009.

ESQUÍVEL, M.M.; BERNARDO-GIL, M.G.; KING, M.B. Mathematical Models for Supercritical Extraction of Olive Husk Oil, **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 16, p. 43–58, 1999.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Food Outlook – Global Market Analysis – June 2009**. Disponível em: <<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>>. Acesso em: 2 dez. 2009.

FAOSTAT (FAO Statistical Database). **Production, Crops, Rice paddy**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 28 dez. 2009. (2009a).

FAOSTAT (FAO Statistical Database). **Production, Crops processed**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 28 dez. 2009. (2009b).

FERREIRA, S. R. S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235–245, 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. 263–269, 2002.

GASPAR, F. et al. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 25, n. 3, p. 247–260, 2003.

GENENA, A.K. **Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante**. 2005. 179 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GENENA, A.K. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts

obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GPQVA (Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental). **Fluidos supercríticos**. Disponível em: <<http://www.usp.br/gpqa/scf.asp>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

GUTIERREZ, M. et al. Development and quality evaluation of functional cheddar cheese product containing gamma-oryzanol. In: IFT Annual Meeting + Food Expo®, 15-20 July 2005, New Orleans, Louisiana, USA, 2005. **Proceedings of IFT Annual Meeting**. New Orleans: 2005.

HELLER, L. NutraCea takes rice bran oil production to China. **Product & Supplier news in Asia Pacific**, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ap-foodtechnology.com/Product-Categories/Product-Supplier-news-in-Asia-Pacific/NutraCea-takes-rice-bran-oil-production-to-China>>. Acesso em: 28 dez. 2009

IAL (Instituto Adolfo Lutz). 032/IV Lipídios ou extrato etéreo – Extração direta em Soxhlet. In: **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Coordenadores: Zenebon, O., Pascuet, N.S., Tiglea, P. 4. ed. (1. ed digital). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008, p. 117–118.

IFT (Institute of Food Technologists). NutraCea expanding rice bran oil production. **IFT weekly newsletter**, 9 Apr. 2008. Disponível em: <[http://members.ift.org/IFT/Pubs/Newsletters/weekly/nl\\_040908.htm](http://members.ift.org/IFT/Pubs/Newsletters/weekly/nl_040908.htm)>. Acesso em: 28 dez. 2009.

INDIRA, T.N. et al. **Process for the production of orizanol enriched fraction from rice bran oil soapstock**. US 2004/0192948 A1. 30 Sept. 2004.

IQBAL, S.; BHANGER, M.I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. **Food Chemistry**, v. 93, p. 265–272, 2005.

JAHN, G.B. **Extração supercrítica do óleo de farelo de arroz e obtenção de frações enriquecidas em  $\gamma$ -orizanol**. 2004. 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de



Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

JULIANO, C. et al. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 146–154, 2005.

KAHLON, T.S. Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food Applications, Physiological Benefits. In: Editors Cho, S.S. e Samuel, P. **Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. p. 305-321.

KING, J.W. Critical fluid options for isolating and processing agricultural and natural products. In: **Proceedings of the 1st International Symposium on Supercritical Fluid Technology for Energy and Environmental Applications** (Super Green 2002), Suwon, South Korea, 3-6 Nov. 2002.

KING, J.W.; GRABIEL, R.D.; WIGHTMAN, J.D. Subcritical water extraction of anthocyanins from fruit berry substrates. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, Versailles, France, 28-30 Apr. 2003, p. 409 – 418.

KITZBERGER, C.S.G. **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO<sub>2</sub> a Alta Pressão**. 2005. 142 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

KITZBERGER, C.S.G. et al. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35–43, 2009.

KUMORO, A.C.; HASAN, M.; SINGH, H. Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. **ScienceAsia**, v. 35, p. 306-309, 2009.

LERMA-GARCÍA, M.J. et al. Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, 389–404, 2009.

MANJULA, S.; SUBRAMANIAN, R. Simultaneous degumming, dewaxing and decolorizing crude rice bran oil using nonporous membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 66, p. 223–228, 2009.

MARTÍNEZ, J. et al. Multicomponent Model to Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 42, p. 1057–1063, 2003.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico**: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. 2005. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MEIRELES, M.A.A.; ZAHEDI, G.; HATAMI, T. Mathematical modeling of supercritical fluid extraction for obtaining extracts from vetiver root. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, p. 23–31, 2009.

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

MEZZOMO, N. **Óleo de amêndoa de pêsego**: Avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala. 2008. 152 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

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. 2009. 235 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MICHIELIN, E.M.Z. et al. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131–138, 2005.

MICHIELIN E.M.Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615–6623, 2009.

MIRA, N.V.M. et al. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 405–409, 2009.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 150 p.

NANUA, J.N.; MCGREGOR, J.U.; GODBER, J.S. Influence of High-Oryzanol Rice Bran Oil on the Oxidative Stability of Whole Milk Powder. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2426–2431, 2000.

NARAYAN, A.V.; BARHATE, R.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Extraction and Purification of Oryzanol from Rice Bran Oil and Rice Bran Oil Soapstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 8, p. 663–670, 2006.

NINGAPPA, M.B.; DINESHA, R.; SRINIVAS, L. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. **Food Chemistry**, v. 106, p. 720–728, 2008.

NUTRACEA ONLINE STORE. **Pelotas rice bran oil**. Disponível em: <<http://www.nutraceaonline.com/PelotasRiceBranOil>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

OETTERER, M.; REGITANO-D`ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri/SP: Manole, 2006. 612 p.

PAUCAR-MENACHO, L.M. et al. Refining of rice bran oil (*Oryza sativa* L.) to preserve  $\gamma$ -oryzanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 45–53, 2007.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 407–413, 2007.

PERRETTI, G. et al. Improving the value of rice by-products by SFE. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 26, p. 63–71, 2003.

PESCHEL, W. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137–150, 2006.

POURALI, O.; ASGHARI, F.S.; YOSHIDA, H. Simultaneous rice bran oil stabilization and extraction using sub-critical water medium. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 510–516, 2009a.

POURALI, O.; ASGHARI, F.S.; YOSHIDA, H. Sub-critical water treatment of rice bran to produce valuable materials. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1–7, 2009b.

PROTEIN assay. Disponível em: <<http://www.gbiosciences.com/EducationalUploads/EducationalProductsImages/mediumimages/Protein%20assay.jpg>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

RAJAM, L. et al. A Novel Process for Physically Refining Rice Bran Oil Through Simultaneous Degumming and Dewaxing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 3, p. 213–220, 2005.

RAO, K.V.S.A.; RAO, B.V.S.K.; THENGUMPILLIL, N.B.K. **Processes for the isolation of oryzanols from rice bran oil soap stock**. US 6410762, jun., 2002.

REVERCHON, E. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Essential Oils and Related Products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, p. 1–37, 1997.

RIBEIRO, E.T.S. **Emprego de técnicas de extração a alta e baixa pressão para obtenção de polifenóis antioxidantes do subproduto agroindustrial de maçã**. 2007. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

**STABILIZED Rice Bran**. Disponível em: <<http://www.stabilized-ricebran.com/>>. Acesso em: 2 dez. 2009.

RODRIGUES, C.E.C., ONOYAMA, M.M., MEIRELLES, A.J.A. Optimization of the rice bran oil deacidification process by liquid–liquid extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 370–378, 2006.

ROGINSK Y.V.; LISSI, E.A. Review of Methods to Determine Chain-breaking Antioxidant Activity in Food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235–254, 2005.

RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico nº 127, EMBRAPA**, 2007. Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct\\_127.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf)>. Acesso em: 2 dez. 2009.

SARMENTO, C.M.P. **Extração supercrítica de óleo de farelo de arroz e obtenção de frações enriquecidas em tocoferóis e tocotrienóis**. 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SCAVARIELLO, E.M.S. **Recuperação de  $\gamma$ -orizanol da borra de neutralização de óleo de farelo de arroz**. 1997. 87 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

SCAVARIELLO, E.M.S. **Modificação química e enzimática da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. 2002. 150 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SILVA, D.C.M.N. et al. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p.317–326, 2009.

SOUSA, E.M.B.D. et al. Extraction of Volatile Oil from *Croton zehntneri* Pax et Hoff with Pressurized CO<sub>2</sub>: Solubility, Composition and Kinetics. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 3, p. 325–333, 2005.

VAN HOED, V. et al. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 4, p. 315–321, 2006.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, jul. 2008.

WEINHOLD, T.S. et al. *Polygala cyparissias* oleoresin: Comparing CO<sub>2</sub> and classical organic solvent extractions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p.109–117, 2008.

WIBOONSIRIKUL, J. et al. Production and Characterization of Functional Substances from a By-Product of Rice Bran Oil and Protein Production by a Compressed Hot Water Treatment. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 72, n.2, p. 384–392, 2008.

XU, Z.M.; GODBER, J.S. Comparison of supercritical–fluid and solvent extraction methods in extracting  $\gamma$ -oryzanol from rice bran.

**Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 547–551, 2000.

YOSHIE, A. et al. Comparison of  $\gamma$ -oryzanol contents in crude rice bran oils from different sources by various determination methods. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 10, p. 511–518, 2009.

ZULLAIKAH, S.; MELWITA, E.; JU, Y.H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 299–302, 2009.

## APÊNDICES

### APÊNDICE I – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CÁLCULO DO TFT.

Na Tabela 17 e Figura 36 são apresentados os dados experimentais e o respectivo gráfico obtido para a curva padrão de ácido gálico. A curva padrão foi construída plotando-se os dados de concentração de ácido gálico *versus* absorvância a fim de facilitar o cálculo do EAG (equivalente em ácido gálico). A equação obtida através da regressão linear do gráfico da Figura 36 foi utilizada para calcular os resultados de teor de fenólicos totais, conforme Equação 18.

**Tabela 17. Dados experimentais de absorvância em função da concentração da solução de ácido gálico**

Concentração (mg/mL)	Absorvância (a 765 nm)*
0	0,01 ± 0,01
50	0,03 ± 0,01
100	0,08 ± 0,01
150	0,143 ± 0,003
250	0,27 ± 0,01
500	0,55 ± 0,01

\* Resultado de análise em triplicata.



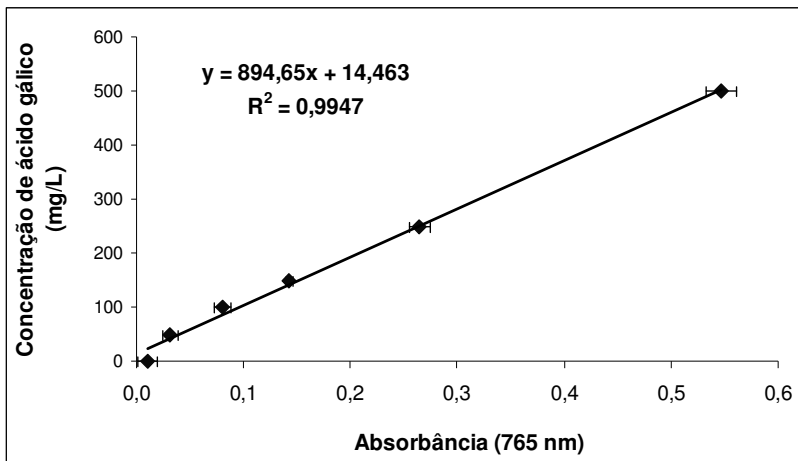


Figura 36. Curva padrão de ácido gálico.

$$TFT(\text{mgEAG} / g_{\text{ext}}) = \frac{EAG}{C_{\text{ext}}} = \frac{(894,65A + 14,463)}{C_{\text{ext}}} \quad (18)$$

Onde:

EAG = equivalente em ácido gálico (mgEAG/L) obtido através da curva padrão;

$C_{\text{ext}}$  = concentração da solução de extrato ( $g_{\text{ext}}/L$ );

A = absorbância (765 nm).

## APÊNDICE II – CÁLCULO DO EC<sub>50</sub>

O procedimento para cálculo do parâmetro EC<sub>50</sub> será exemplificado para o extrato obtido para a ESC a 300 bar/40 °C, conforme dados experimentais da Tabela 18.

**Tabela 18. Dados experimentais obtidos no ensaio de DPPH: análise em triplicata para extrato de ESC a 300 bar/40 °C**

Concentração da solução de extrato (µg/mL)	(Abs <sub>amostra</sub> - Abs <sub>branco</sub> )			Desvio Padrão
	1	2	3	
1000	0,579	0,587	0,569	0,009
750	0,631	0,627	0,639	0,006
500	0,728	0,716	0,717	0,007
250	0,812	0,810	0,814	0,002
125	0,882	0,881	0,903	0,012
25	0,958	0,965	0,962	0,004
Abs <sub>controle</sub>	0,973			

A partir dos dados da Tabela 18, e aplicando-se a Equação 9, os valores de porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foram calculados e plotados em função da concentração (µg/mL), gerando três gráficos, tal como o exemplificado na Figura 37.

$$AA(\%) = 100 - \left[ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) * 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \quad (9)$$

Para cada gráfico gerado (relativos às colunas 1, 2 e 3 da Tabela 18) fez-se a regressão linear para obtenção da equação que descreve a variação da atividade antioxidante (AA, %) em função da concentração da solução de extrato (C<sub>E</sub>, em µg/mL). As equações obtidas, com os respectivos valores de R<sup>2</sup>, estão apresentadas nas Equações 19 a 21.

$$AA_1(\%) = (0,039 * C_E) + 4,1355 \quad (19)$$

$$R_1^2 = 0,9713$$

$$AA_2(\%) = (0,039 * C_E) + 4,2239$$

$$R_2^2 = 0,9554 \quad (20)$$

$$AA_3(\%) = (0,0408 * C_E) + 3,1328$$

$$R_3^2 = 0,9733 \quad (21)$$

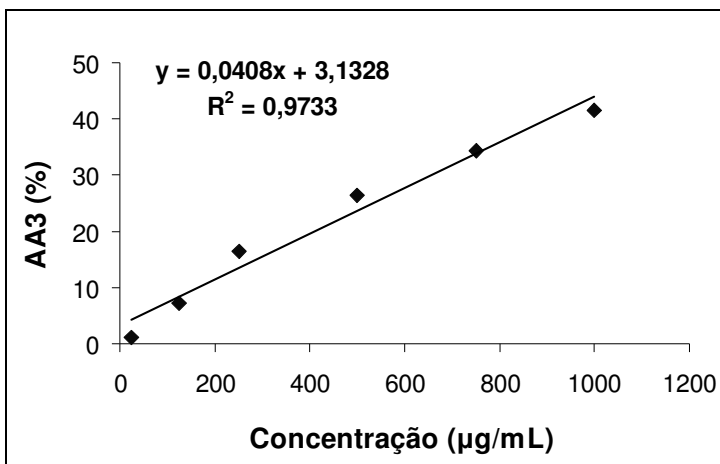
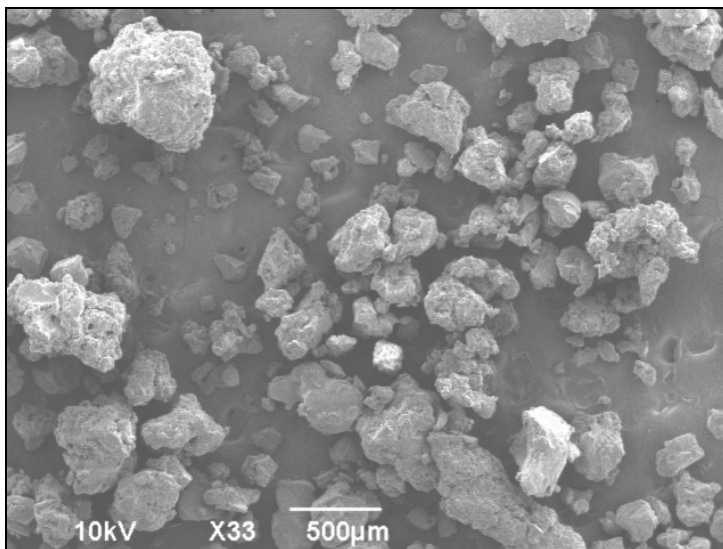


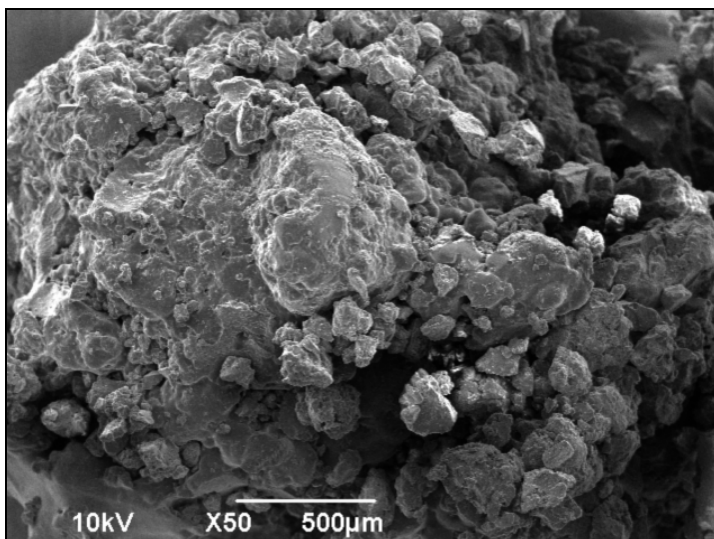
Figura 37. Regressão linear para cálculo do  $EC_{50}$ .

Através das Equações 15, 16 e 17, fez-se o cálculo dos valores de  $EC_{50}$  ( $EC_{50}1 = 1176 \mu\text{g/mL}$ ;  $EC_{50}2 = 1174 \mu\text{g/mL}$ ;  $EC_{50}3 = 1149 \mu\text{g/mL}$ ), os quais correspondem às concentrações nas quais a atividade antioxidante ( $AA_1$ ,  $AA_2$  e  $AA_3$ ) é igual a 50%. O resultado da análise é expresso como a média destes três valores  $\pm$  desvio padrão ( $EC_{50} = 1166 \pm 15 \mu\text{g/mL}$ ).

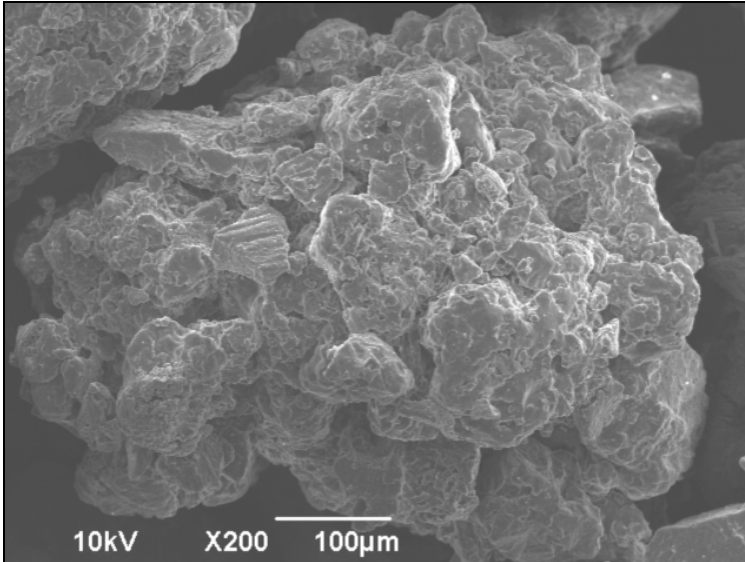
## APÊNDICE III – MICROGRAFIAS DA ANÁLISE DE MEV



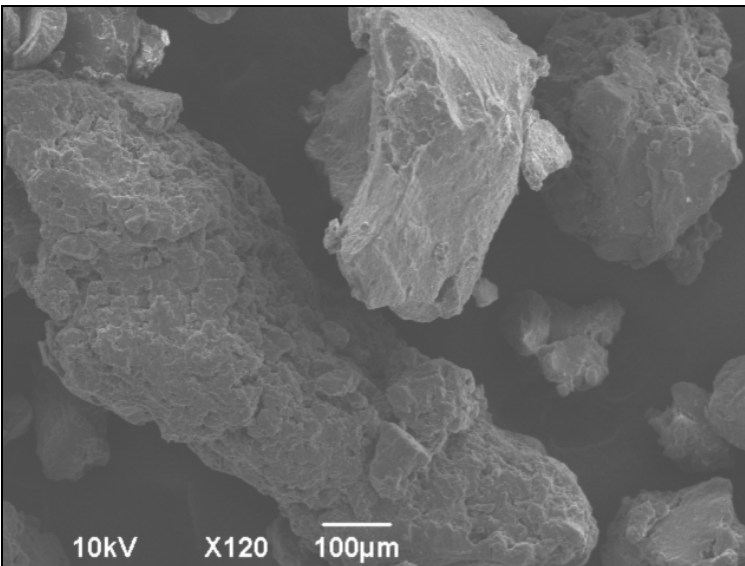
**Figura 38.** Micrografia de partículas do substrato, aumento de 33x.



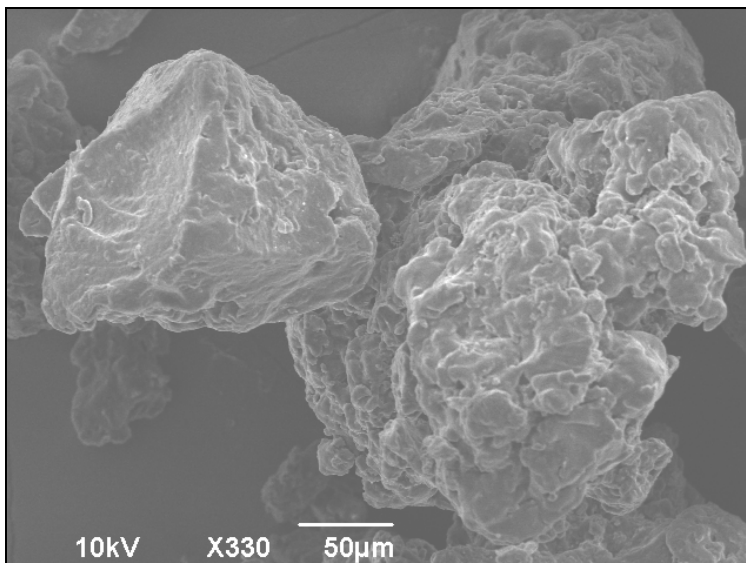
**Figura 39.** Micrografia de partícula “grossa”, formada por aglomerado de partículas do substrato, aumento de 50x.



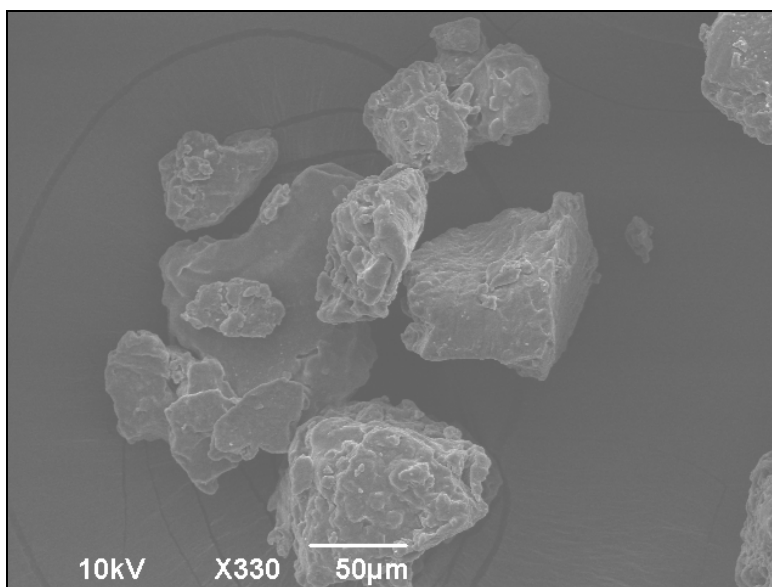
**Figura 40.** Micrografia de partículas do substrato, aumento de 200x.



**Figura 41.** Micrografia de partículas do substrato, aumento de 120x.



**Figura 42. Micrografia de partículas do substrato, aumento de 330x.**



**Figura 43. Micrografia de partículas do substrato, aumento de 330x.**

## APÊNDICE IV – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

**Tabela 19. ANOVA para resultados do rendimento global ( $X_0$ , %) em função da pressão (bar) e da temperatura (°C)**

Efeito	SQ	GL	QM	$F_{\text{calc}}$	p
P (bar)	669,58	2	334,79	66,588	9,07E-09
T (°C)	1797,65	2	898,83	178,773	3,84E-12
P (bar)*T (°C)	32,75	4	8,19	1,628	0,212929
Resíduo	85,47	17	5,03		

\* SQ = somas de quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrados médios;  $F_{\text{calc}}$  = estatística do teste; p = probabilidade de significância.

**Tabela 20. ANOVA para resultados do teor de fenólicos totais (TFT, mgEAG/g) em função da pressão (bar) e da temperatura (°C)**

Efeito	SQ	GL	QM	$F_{\text{calc}}$	P
P (bar)	68,67	2	34,34	14,03	6,01E-05
T (°C)	241,04	2	120,52	49,25	6,78E-10
P (bar)*T (°C)	70,90	4	17,72	7,24	3,90E-04
Resíduo	68,52	28	2,45		

\* SQ = somas de quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrados médios;  $F_{\text{calc}}$  = estatística do teste; p = probabilidade de significância.

**Tabela 21. ANOVA para resultados do  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função da pressão (bar) e da temperatura (°C)**

Efeito	SQ	GL	QM	$F_{\text{calc}}$	P
P (bar)	25443773	2	12721886	3930,35	0,00E-01
T (°C)	234398	2	1171995	362,08	7,77E-16
P (bar)*T (°C)	6075939	4	1518985	469,28	0,00E-01
Resíduo	61500	19	3237		

\* SQ = somas de quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrados médios;  $F_{\text{calc}}$  = estatística do teste; p = probabilidade de significância.

## APÊNDICE V – PONTO DE FUSÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

**Tabela 22. Ponto de fusão (PF) de ácidos graxos identificados nas análises de cromatografia gasosa**

Ácido Graxo (AG)	PF do AG (°C) <sup>(a)</sup>	
<b>Saturados</b>		
C12:0	Láurico	44
C14:0	Mirístico	54,4
C15:0	Pentadecanóico	*
C16:0	Palmítico	62,9
C17:0	Margárico	*
C18:0	Esteárico	69,6
C20:0	Araquídico	75,4
C22:0	Behênico	80
C24:0	Lignocérico	84,2
<b>Monoinsaturados</b>		
C16:1	Palmitoléico	0,5
C18:1	Oléico	13,4
C18:1 Trans	Elaídico	46
C20:1	Gadoléico	*
C22:1	Erúico	34,7
<b>Poliinsaturados</b>		
C18:2	Linoléico	-5
C18:2 Trans	Linoelaídico	*
C18:3	Linolênico	-11
C18:3 Trans	Translinolênico	*

<sup>(a)</sup> Fonte: OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006.

\* Valores não disponibilizados na fonte em questão.