

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EMPREGO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO A ALTA E BAIXA PRESSÃO PARA OBTENÇÃO DE  
POLIFENÓIS ANTIOXIDANTES DO SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL DE MAÇÃ**

**ÉRIKA TACIANA SANTANA RIBEIRO**  
**Engenheira de Alimentos**

**Florianópolis - SC**

**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EMPREGO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO A ALTA E BAIXA PRESSÃO PARA OBTENÇÃO DE  
POLIFENÓIS ANTIOXIDANTES DO SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL DE MAÇÃ**

**ÉRIKA TACIANA SANTANA RIBEIRO**  
**Engenheira de Alimentos**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira**  
**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Roseane Fett**

**Florianópolis - SC**  
**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EMPREGO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO A ALTA E BAIXA PRESSÃO PARA OBTENÇÃO DE  
POLIFENÓIS ANTIOXIDANTES DO SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL DE MAÇÃ**

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

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Roseane Fett

**ÉRIKA TACIANA SANTANA RIBEIRO**  
**Engenheira de Alimentos**

**Florianópolis - SC**  
**2007**

## ***AGRADECIMENTOS***

Agradeço imensamente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais amados Deuselito Ribeiro e Lucimar Ribeiro, minha irmã Ylka Ribeiro e sobrinha Giovanna pelo esforço conjunto e amor incondicional.

Ao meu noivo Kleber Souza pelo incentivo e por seu sincero amor.

A Prof<sup>ª</sup>. Sandra Regina Salvador Ferreira pela orientação, estímulo e contribuições para a realização deste trabalho.

A Prof<sup>ª</sup>. Roseane Fett pela oportunidade e confiança em todos os momentos.

Ao Prof. Haiko Hense pelas orientações técnicas para realização dos experimentos.

A Melissa Raymundo pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos do LATESC, Eliane Michielin, Aziza Genena, Danielle Biscaia, Murilo Costeli, Jéferson Correia, Gustavo Souza, Maurício Neves e Daniel Nasato pela parceria e momentos felizes.

Aos amigos da CAL, Luciano Gonzaga, Márcia Soares, Bianca Beal, Janaína Baggio, Cirielle Cataneo e Ismael Rockenbach pelos momentos de aprendizado conjunto.

As empresas Ficher e Fraiburgo Agrícola, nas pessoas de Hudson Amparo e Vilson Gaio pelo fornecimento da matéria-prima e gentileza.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite, sugestões e comentários.

Aos Departamentos de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, e de Ciências e Tecnologias de Alimentos pelo apoio.

A CAPES pelo suporte financeiro.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa, minha eterna gratidão.

*"Senhor, concede-me a serenidade  
para aceitar as coisas que não posso modificar;  
coragem para modificar aquelas que eu posso  
e sabedoria para perceber a diferença".*

*São Francisco de Assis*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1. Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Maçã e Bagaço de Maçã .....	4
3.1.1. Propriedades Funcionais do Bagaço de Maçã.....	7
3.2. Oxidação e Radicais Livres.....	8
3.2.1. Oxidação em Sistemas Biológicos.....	9
3.2.2. Oxidação em Alimentos.....	10
3.3. Antioxidantes .....	11
3.3.1. Compostos Fenólicos .....	12
3.3.2. Métodos para Determinação de Fenólicos em Extratos Naturais .....	13
3.4. Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante .....	14
3.4.1. Método ABTS .....	15
3.4.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ Ácido Linoléico.....	16
3.5. Métodos de Extração.....	16
3.6. Extração Supercrítica .....	18
3.6.1. Fluidos Supercríticos.....	19
3.6.2. Curva de Extração.....	20
3.6.3. Uso de Co-solvente .....	21
3.7. Modelagem Matemática.....	22
3.7.1. Modelo de Sovová .....	22
3.7.2. Modelo Logístico (LM) .....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1. Caracterização da Matéria-Prima.....	25
4.1.1. Determinação da Umidade.....	26

4.1.2.	Secagem da Matéria-Prima Fresca.....	26
4.1.3.	Padronização do Tamanho das Partículas.....	27
4.1.4.	Determinação dos Ácidos Fenólicos do Bagaço de Maçã.....	27
4.2.	Extrações Convencionais.....	29
4.2.1.	Extração Soxhlet.....	29
4.2.2.	Extração Seqüencial.....	30
4.3.	Caracterização do Leito de Partículas.....	30
4.3.1.	Determinação do Diâmetro de Partículas.....	31
4.3.2.	Determinação da Densidade Real.....	32
4.3.3.	Determinação da Densidade Aparente.....	32
4.3.4.	Determinação da Porosidade Total do Leito.....	32
4.4.	Determinação da Densidade do Solvente CO <sub>2</sub> .....	32
4.5.	Extração com CO <sub>2</sub> Supercrítico (ESC).....	32
4.5.1.	Equipamento de Extração Supercrítica 1.....	33
4.5.2.	Equipamento de Extração Supercrítica 2.....	35
4.5.3.	Determinação do Rendimento Global (X <sub>0</sub> ).....	37
4.5.4.	Ensaio Cinético - Curvas de Extração.....	38
4.6.	Pré-análise: Preparo dos Extratos para Análise Quantitativa.....	38
4.7.	Determinação do Conteúdo Fenólico dos Extratos.....	38
4.8.	Determinação da Atividade Antioxidante.....	40
4.8.1.	Método ABTS.....	40
4.8.2.	Sistema β-caroteno/ Ácido linoléico.....	41
4.9.	Análise Estatística.....	42
4.10.	Determinação do Perfil Químico.....	43
4.11.	Modelagem Matemática.....	44
4.12.	Resumo dos Ensaio.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1.	Testes Preliminares.....	48
5.1.1.	Ensaio Preliminares de ESC.....	48
5.1.2.	Caracterização da Matéria-Prima.....	49
5.2.	Avaliação de Extratos do Subproduto Agroindustrial de Maçã Obtidos por Técnicas de Extração a Baixa e Alta Pressão.....	51

5.2.1.	Introdução .....	51
5.2.2.	Materiais e Métodos.....	51
5.2.3.	Resultados e Discussão .....	53
5.3.	Recuperação de Polifenóis Antioxidantes de Extratos do Subproduto Agro-industrial de Maçã ( <i>Malus communis</i> ).....	66
5.3.1.	Introdução .....	66
5.3.2.	Materiais e Métodos.....	67
5.3.3.	Resultados e Discussão .....	68
6.	CONCLUSÃO .....	82
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8.	ANEXOS .....	95
	Anexo I - Equações para Aplicação do Modelo Descrito por Sovová (1994).....	95
	Anexo II - Equações para Aplicação do Modelo Descrito por Martínez et al. (2003). .....	101
	Anexo III - Método de Obtenção de Ácidos Fenólicos de Matrizes Vegetais.....	104
	Anexo IV - Procedimento de Obtenção de Extratos Seqüenciais. ....	105
	Anexo V - Fotos das Unidades de Extração Supercrítica do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESEC). ....	106
	Anexo VI - Curvas de Calibração .....	107
	Anexo VII - Curvas de Extração Ajustadas pelo SAS.....	108
	Anexo VIII - Gráfico de Correlação. ....	115
	Anexo IX - Cromatogramas Obtidos nas Análises de Cromatografia Gasosa das Frações e Extratos do Bagaço de Maçã.....	116

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Bagaço de maçã seco e triturado empregado nos experimentos de extração.....	27
Figura 4.2 - Diagrama esquemático do equipamento de extração supercrítica 1. ....	34
Figura 4.3 - Diagrama esquemático do equipamento de extração supercrítica 2. ....	36
Figura 5.1 - Curva experimental da ESC do bagaço de maçã a 200 bar, 40°C e vazão de 5 g/min...	49
Figura 5.2 - Inversão das isotermas de rendimento para ESC de bagaço de maçã. ....	56
Figura 5.3 - Superfície de resposta do rendimento global da ESC de bagaço de maçã para diferentes condições de temperatura e pressão. ....	57
Figura 5.4 - Influência da vazão do CO <sub>2</sub> na ESC do bagaço de maçã. ....	60
Figura 5.5 - Influência da pressão na ESC de bagaço de maçã. ....	60
Figura 5.6 - Influência da temperatura na ESC de bagaço de maçã. ....	61
Figura 5.7 - Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de bagaço de maçã para a condição de 150 bar, temperaturas de 40 e 50°C, e vazão de 1,20 gCO <sub>2</sub> /min.....	64
Figura 5.8 - Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de bagaço de maçã para a condição de 200bar, 50°C e vazão de 5,0 gCO <sub>2</sub> /min.....	64
Figura 5.9 - Grupo carbonila representado pelas estruturas químicas genéricas A: núcleo flavilium, B: hidoxicinamatos e C: hidroxibenzoatos. ....	72
Figura 5.10- Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema β-caroteno/ácido linoléico, dos extratos supercríticos, BHT e sinergismo .....	75
Figura 5.11 - Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema β-caroteno/ácido linoléico dos extratos supercríticos com co-solvente, BHT e sinergismo. ....	77
Figura 5.12 - Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema β-caroteno/ácido linoléico, dos extratos soxhlet,. ....	78
Figura 5.13 - Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema β-caroteno/ácido linoléico, dos extratos seqüenciais.....	78
Figura I - Processo de extração dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis.....	104
Figura II - Processo de extração seqüencial.....	105
Figura III - Equipamento de extração 1. ....	106

Figura IV - Equipamento de extração 2, acoplado a bomba de co-solvente.....	106
Figura V - Curva padrão de ácido gálico utilizada na análise do conteúdo de fenólico dos extratos e frações de bagaço de maçã.....	107
Figura VI - Curva padrão de Trolox utilizada na análise da atividade antioxidante pelo método ABTS dos extratos e frações de bagaço de maçã.....	107
Figura VII - Gráfico SAS da dispersão para ESC a 150 bar, 40°C e 1,20 gCO <sub>2</sub> /min.....	109
Figura VIII - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 150 bar, 40°C e 1,20 gCO <sub>2</sub> /min.....	109
Figura IX - Gráfico SAS da dispersão para ESC a 150 bar, 50°C e 1,20 gCO <sub>2</sub> /min.....	111
Figura X - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 150 bar, 50°C e 1,20 gCO <sub>2</sub> /min.....	111
Figura XI - Gráfico SAS da dispersão para ESC a 200 bar, 50°C e 5,0 gCO <sub>2</sub> /min.....	113
Figura XII - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 200 bar, 50°C e 5,0 gCO <sub>2</sub> /min.....	113
Figura XIII - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 200 bar, 40°C e 1,20 gCO <sub>2</sub> /min utilizada para obtenção do valor de solubilidade (3,1 x 10 <sup>-3</sup> g de extrato/g de CO <sub>2</sub> ) empregado na aplicação do modelo de Sovová.....	115
Figura XIV - Correlação entre o índice de polifenóis totais (GAE) das frações de bagaço de maçã e atividade antioxidante determinada pelo método ABTS.....	115
Figura XV - Cromatograma referente aos compostos identificados na fração de ácido fenólico livre (AFL) do bagaço de maçã.....	116
Figura XVI - Cromatograma referente aos compostos identificados na fração de ácido fenólicos esterificado solúvel (AFES) do bagaço de maçã.....	116
Figura XVII - Cromatograma referente aos compostos identificados na fração ácido fenólico esterificado insolúvel (AFEI) do bagaço de maçã.....	117
Figura XVIII - Cromatograma referente aos compostos identificados no ESC obtido com CO <sub>2</sub> puro a 150 bar, 30°C e vazão de 5,0 g/min.....	117
Figura XIX - Cromatograma referente aos compostos identificados no ESC obtido com (CO <sub>2</sub> + 5% de acetona) a 150 bar, 30°C e vazão de 5,0 g/min.....	118
Figura XX - Cromatograma referente aos compostos identificados no extrato soxhlet de acetona.....	118
Figura XXI - Cromatograma referente aos compostos identificados no extrato soxhlet de etanol.....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Variáveis e níveis de variação do planejamento fatorial $3^2$ .....	43
Tabela 4.2 - Resumo dos ensaios realizados com o bagaço de maçã. ....	46
Tabela 5.1 - Composição química do bagaço de maçã (mg/g de amostra) <sup>(A)</sup> .....	50
Tabela 5.2 - Rendimento das extrações convencionais do bagaço de maçã. ....	53
Tabela 5.3 - Rendimento global ( $X_0$ ) da ESC de bagaço de maçã com CO <sub>2</sub> puro para diferentes condições de operação. ....	55
Tabela 5.4 - Rendimento da ESC de bagaço de maçã com co-solvente. ....	58
Tabela 5.5 - Características do leite de partícula. ....	59
Tabela 5.6 - Parâmetros para a aplicação dos modelos de Sovová e Martínez.....	63
Tabela 5.7 - Erros médios quadráticos obtidos nos modelos empregados.....	63
Tabela 5.8 - Atividade antioxidante e conteúdo fenólico total das frações de bagaço de maçã. ....	69
Tabela 5.9 - Fenólicos de extratos de bagaço de maçã obtidos por diferentes técnicas de extração. ....	70
Tabela 5.10 - Atividade antioxidante pelo método ABTS de extratos de bagaço de maçã.....	73
Tabela 5.11 - Atividade antioxidante (%) através dos sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico de extratos de bagaço de maçã obtidos por diferentes técnicas de extração. ....	76
Tabela 5.12 - Composição química de extratos do bagaço de maçã (mg/g de extrato) <sup>(A)</sup> .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Unidade
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	-
b	Parâmetro ajustável do modelo Logístico	$\text{min}^{-1}$
CER	Índice referente à etapa de taxa constante de extração	-
$d_a$	Densidade aparente das partículas	$\text{g/cm}^3$
$d_r$	Densidade real das partículas	$\text{g/cm}^3$
$d_{gw}$	Diâmetro médio geométrico	cm
$\bar{D}_i$	Diâmetro médio de partículas da peneira i	cm
$\bar{D}_s$	Diâmetro médio superficial das partículas	cm
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl	-
ESC	Extração supercrítica	-
FER	Índice referente à etapa de taxa decrescente de extração	-
FSC	Fluído supercrítico	-
GAE	Equivalente em ácido gálico	-
h	Coordenada axial	m
$J(x,y)$	Taxa de transferência de massa interfacial	$\text{kg/m}^3 \cdot \text{s}$
K	Massa de soluto de difícil acesso	g
$K_{Ya}$	Coeficiente de transferência de massa na fase fluída	$\text{s}^{-1}$
$K_{Xa}$	Coeficiente de transferência de massa na fase sólida	$\text{s}^{-1}$
$M_{CER}$	Taxa de extração na etapa CER	kg/s
$m_{ext}$	Massa de extrato	g
$m_0$	Massa total inicial de soluto na coluna de extração	g
n	Número total de frações	-
N	Massa de sólido inerte	g
O	Massa de soluto extraível	kg

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidade</b>
$\text{OH}^\bullet$	Radical hidroxil	-
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete	-
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido	-
$P$	Massa de soluto de fácil acesso	g
$P$	Pressão de extração	bar
$Q_{\text{CO}_2}$	Vazão de solvente $\text{CO}_2$	g/min ou
$T$	Temperatura de extração	$^\circ\text{C}$
$t_{\text{CER}}$	Duração da etapa constante de extração	s
$t_{\text{FER}}$	Duração da taxa decrescente de extração	s
$t_m$	Parâmetro ajustável do modelo Logístico	min
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico	-
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox	-
$u$	Velocidade superficial do solvente	m/s
$U$	Velocidade intersticial do solvente	$\text{m}^3/\text{s}$
$x_p$	Razão mássica de soluto de fácil acesso	$\text{g}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{sólido}}$
$x_k$	Razão mássica de soluto de difícil acesso	$\text{g}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{sólido}}$
$x_0$	Razão mássica inicial de soluto na fase sólida	g/g
$X_0$	Rendimento global de extração	%
$X$	Razão mássica de soluto na fase sólida	$\text{g}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{sólido}}$
$W$	Parâmetro para o período de taxa de extração lenta	-
$Y$	Concentração normalizada de soluto na fase solvente	-
$Y^*$	Concentração de equilíbrio (solubilidade)	$\text{g}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{solvente}}$
$Z$	Parâmetro da etapa CER	-
$\rho_s$	Densidade da fase sólida	$\text{kg}_{\text{sólido}}/\text{m}^3$
$\rho_f$	Densidade da fase fluida	$\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$
$\varepsilon$	Porosidade total do leito de extração	-

## RESUMO

O bagaço de maçã é o resíduo industrial oriundo da produção de suco, apresenta baixo valor comercial, sendo que anualmente no Brasil cerca de 22 mil toneladas deste material são destinadas para a alimentação animal ou utilizadas como adubo orgânico. A investigação das propriedades biológicas, isto é da atividade antiinflamatória, antioxidante e cardioprotetora de subprodutos agroindustriais tem sido o escopo de diversas pesquisas no mundo, devido à presença de compostos bioativos remanescentes no resíduo do beneficiamento. A extração de compostos naturais de matrizes vegetais pode ser realizada através de técnicas convencionais como a extração soxhlet e seqüencial que utiliza solventes orgânicos líquidos ou ainda através de métodos alternativos como a extração supercrítica (ESC) que utiliza o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi a obtenção de extratos de bagaço de maçã via extração supercrítica utilizando como solvente o CO<sub>2</sub> puro e CO<sub>2</sub> com co-solvente, bem como a comparação desses com extratos obtidos através da extração soxhlet e seqüencial em termos de rendimento do processo, conteúdo fenólico, capacidade antioxidante e perfil químico visando a re-utilização dos polifênóis antioxidantes remanescentes na biomassa de descarte. As técnicas convencionais foram realizadas com os solventes hexano, éter etílico, acetona, etanol e água, sendo que o maior rendimento de extração ( $37,3 \pm 0,8\%$ ) e conteúdo fenólico ( $402 \pm 18$  mg GAE/100 g) foi obtido através da extração soxhlet com etanol. Diferentes condições de temperatura (30, 40 e 50°C) e pressão (150, 200 e 250 bar) foram empregados na obtenção dos ESC, sendo que o maior rendimento,  $4,1 \pm 0,1\%$  (m/m), foi atingido a 250bar e 50°C. A ESC com co-solvente foi realizada a 150 bar e 30°C empregando concentrações de 5 e 10% (m/m) de etanol, e acetona a 5% (m/m). Os extratos supercríticos com co-solvente e com CO<sub>2</sub> puro nas condições de 150 bar e temperaturas de 30, 40 e 50°C demonstraram uma maior atividade antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. O extrato acetônico obtido através da técnica soxhlet apresentou a maior atividade antioxidante ( $49,5 \pm 0,5$   $\mu$ M/g TEAC) no método ABTS. Os ácidos caféico, sináptico e clorogênico foram alguns dos compostos químicos identificados nos extratos, assegurando assim, o bagaço de maçã como fonte de polifenóis antioxidantes. Para o estudo cinético das curvas de ESC foram utilizados dois modelos de transferência de massa, ambos baseados no balanço de massa do leito de extração. O modelo de Martínez forneceu o melhor ajuste para os dados experimentais das curvas de ESC do bagaço de maçã.

## ABSTRACT

Apple pomace is an industrial residue from the juice production and presents low commercial value. Brazil presents near 22,000 ton/year of apple pomace used as manure or animal feed. The biological properties such as anti-oxidative potential from the agro industrial byproducts have been extensively studied, focusing in the several bioactive compounds present in the industrial residues. The extraction of natural compounds from vegetable matrixes can be performed by conventional techniques such as soxhlet extraction and sequential extraction with organic solvents. Another possibility is the use of the alternative method of supercritical fluid extraction (SFE) that uses supercritical carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) as solvent. Therefore, the objective of this work was to obtain apple pomace extracts using supercritical CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> plus co-solvent, and compare the high pressure extracts with the ones achieved using soxhlet and sequential extractions in terms of process yield, total phenolic content (TPC), antioxidant capacity and chemical profile, searching for a better use for the industrial waste. The conventional techniques were performed with hexane, ethyl ether, acetone, ethanol and water, where the highest yield ( $37.3 \pm 0.8\%$ ) and TPC ( $402 \pm 18$  mg GAE/100 g) was obtained by soxhlet with ethanol. Different conditions of temperature (30, 40 and 50°C) and pressure (150, 200 and 250 bar) were studied in the SFE, and the highest yield (4.11% m/m) was obtained at 250bar and 50°C. The SFE with co-solvent was performed at 150 bar and 30°C, with 5 and 10% (m/m) of ethanol, and also with 5% of acetone. The SFE extracts with co-solvent indicate the highest values of antioxidant activity evaluated by  $\beta$ -carotene/linoleic acid system. Soxhlet extract with acetone present higher antioxidant value ( $49.5 \pm 0.5$   $\mu$ M/g TEAC) according to ABTS<sup>•+</sup>. Caffeic acid, synapic acid and chlorogenic acid were some of the compounds identified in the extracts, assuring that the apple pomace is an important source of antioxidant polyphenols. For the kinectic study of the SFE extraction curves two mass transfer models were used: the Sovová (1994) model and the Martínez et al. (2003) model. Martínez model was showed good agreement between experimental and modeled values.

## 1. Introdução

Atualmente a cultura da maçã é uma atividade econômica consolidada na região Sul do Brasil, com repercussão no cenário internacional, contribuindo com cerca de 1,5% da produção mundial, sendo o Estado de Santa Catarina o líder na produção nacional do fruto (WOSIACKI, et al., 2000; BRDE, 2005).

No início da década de 90 começou a surgir o interesse, por parte de indústrias brasileiras de grande porte em aproveitar a crescente demanda mundial por sucos concentrados de maçã (EPAGRI, 1999). A produção de suco concentrado no Brasil destina-se quase que totalmente para o mercado externo, onde enfrenta uma acirrada concorrência com grandes produtores, como Argentina e China (BRDE, 2005).

O resíduo da extração do suco de maçã (bagaço) se apresenta como o principal subproduto gerado na agroindústria da maçã (HANG, 1987). O resultado dessa extração compreende de casca, polpa, semente e centro (KENNEDY et al., 1999). No Brasil, o bagaço de maçã é dispensado no solo como adubo orgânico ou utilizado na alimentação animal (KENNEDY et al., 1999; VILLAS-BOAS e ESPOSITO, 2001).

As maçãs, especialmente suas cascas e sementes são ricas em flavonóides (por exemplo, quercetinas e antocianidinas) e em consideráveis quantidades de derivados do ácido hidroxicinâmico, representado principalmente pelo ácido clorogênico (LANCASTER, 1992; NICOLAS et al., 1994). Os polifenóis responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro* da maçã encontram-se presentes no bagaço (LU e FOO, 2000). Todavia, a atividade biológica destes compostos está diretamente ligada a sua estrutura química, que por sua vez é determinada por fatores como variedade, maturidade, estação de colheita, tipo de processamento, e origem geográfica da fruta (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Existem evidências de que a oxidação pode induzir obstruções fisiológicas, causando o envelhecimento das células. A preocupação com os efeitos nocivos das espécies derivadas de oxigênio está aliada ao interesse por compostos com potencial antioxidante. Isto tem levado ao desenvolvimento de pesquisas sobre a presença de compostos fenólicos em plantas, uma vez que estes apresentam atividade farmacológica de inibição da oxidação lipídica e proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PENG et al., 2005; BALASUNDRAM et al., 2006; SOARES, 2002; RAYMUNDO, 2003).

A possibilidade de recuperação de polifenóis de resíduos agroindustriais tem sido abordada, devido aos fitoquímicos remanescentes no resíduo vegetal processado, sendo a tecnologia extrativa empregada, outro aspecto pertinente (LU e FOO, 2000; PESCHEL et al., 2005; BALASUNDRAM et al., 2006, CAMPOS, 2005; BAGGIO, 2006; FREITAS, 2006).

A indústria farmacêutica utiliza-se de uma série de técnicas de extração, que são classificadas conforme sua eficiência. A maceração bem como suas variáveis, e soxhlet, ainda são as técnicas de extração mais empregadas. Denominadas também de técnica extrativa à baixa pressão ou convencional, elas tem levantado questionamentos quanto ao alto dispêndio energético requisitado na etapa de eliminação dos solventes líquidos, além da degradação de compostos biologicamente sensíveis promovida pelas elevadas temperaturas de processo.

A extração supercrítica (ESC) utiliza fluidos supercríticos (FSC) como solventes de extração e seu emprego em processos industriais vem ganhando espaço continuamente. O solvente supercrítico habitualmente utilizado é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que devido a sua natureza apolar solubiliza, preferencialmente, compostos apolares (FERREIRA et al., 1999; POLIAKOFF e KING, 2001). A extração de compostos com polaridade intermediária torna-se possível quanto se adiciona modificadores ou co-solventes na ESC, ou seja, solventes orgânicos líquidos de natureza polar.

A ESC oferece inúmeras vantagens quando em comparação ao processo de extração convencional, incluindo: reduções do volume de solvente, tempo de extração, e obtenção de extratos mais seletivos propiciado pelo ajuste dos parâmetros de processo tais como pressão e temperatura (WOOD et al., 2006).

## 2. Objetivo

O objetivo principal deste trabalho consiste na obtenção de extratos de bagaço de maçã (*Malus communis*) através de extração supercrítica utilizando como solvente CO<sub>2</sub> puro e CO<sub>2</sub> com co-solvente, bem como a comparação dos extratos supercríticos com os extratos convencionais em termos de rendimento, conteúdo fenólico, capacidade antioxidante e perfil de ácidos fenólicos, visando a re-utilização dos polifênois remanescentes na biomassa de descarte.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Obtenção de extratos de bagaço de maçã empregando solventes orgânicos de diferentes polaridades para as técnicas convencionais de extração do tipo soxhlet e seqüencial;
- Avaliação dos parâmetros de processo da extração supercrítica como vazão de solvente ( $Q_{CO_2}$ ), tempo de extração, temperatura (T) e pressão (P);
- Determinação do conteúdo de fenólicos dos extratos convencionais;
- Quantificação da capacidade antioxidante dos extratos supercrítico e convencional, utilizando técnicas específicas: método colorimétrico ABTS e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico;
- Seleção de co-solvente para extração supercrítica, a partir dos melhores valores de rendimento e capacidade antioxidante dos extratos convencionais;
- Obtenção das frações de ácidos fenólicos livres (AFL), esterificados solúveis (AFES) e esterificados insolúveis (AFEI) do bagaço de maçã seco;
- Identificação do perfil de ácidos fenólicos dos extratos com melhor capacidade antioxidante através de cromatografia gasosa com ionização de chamas (CG-IC);
- Modelagem matemática de curvas de extração supercrítica de bagaço de maçã empregando os modelos de transferência de massa de Sovová (1994) e Martínez et al. (2003).

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Maçã e Bagaço de Maçã

A maçã (*Pirus malus*, L ou *Malus communis*, DC), é uma das frutas mais cultivadas do mundo (WIKIPEDIA. Acesso em: 10 de Outubro de 2006). Os plantios da macieira concentram-se basicamente no Sul do Brasil, predominantemente nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM) (2007), a produção de maçãs no Brasil é crescente, passando da condição de total importador para um país que conquista cada vez mais o mercado exterior, através da adaptação da maior parte dos pomares às normas de produção integrada, que controlam o uso de agroquímicos, reduzem o risco de contaminação ambiental e oferecem segurança alimentar ao consumidor.

A maçã apresenta grandes virtudes medicinais, além do fato de ser a fruta que combina bem com praticamente todos os alimentos. É excelente para prevenir e manter a taxa de colesterol em níveis aceitáveis, através da ingestão de uma maçã por dia. Esse efeito é devido ao alto teor de pectina, encontrada na casca. Também tem um efeito acentuado para emagrecimento, pois a pectina dificulta a absorção das gorduras, da glicose e elimina o colesterol. O alto teor de potássio contido na polpa da maçã faz eliminar o sódio excedente, eliminando o excesso de água retida no corpo (SAÚDE & LAR. Acesso em: 12 de Janeiro de 2007).

Tradicionalmente consumida *in natura*, a maçã é considerada uma excelente fruta de mesa e pode ser encontrada na forma de produtos derivados como sidra, vinagre, chá, suco, doces, geléias e lácteos (SIMIONI, 2000).

O Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul (BRDE) (2005), reportou que a maior safra da história do setor foi colhida em 2004 com 977.863 toneladas, tendo Santa Catarina contribuído com 583.205 toneladas, ou seja, 59,6% da produção nacional. Enquanto que em 2005 e 2006 a produção foi de 850 mil toneladas e 700 mil toneladas, respectivamente.

De acordo com a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) (1999), o panorama da industrialização de maçãs em Santa Catarina e mesmo no Brasil começou a passar por um processo de mudança quando no início dos anos 90 surgiu o interesse por parte de indústrias de grande porte em aproveitar a crescente demanda mundial por sucos concentrados de maçã.

O percentual de industrialização de maçã em relação à produção nacional foi de 25% em 2004, ante 18% em 2003 e 19% em 2002. Os fatores que determinam o volume de industrialização de maçã são o tamanho da safra e a qualidade da fruta. Quase sempre, a fruta só é industrializada se não apresenta qualidade para consumo *in natura*, ou se o mercado está saturado. A exceção ocorre com a fruta destinada à indústria de suco concentrado, que precisa de uma matéria-prima de alta qualidade, rejeitando frutos deteriorados ou com resíduos de agrotóxicos (BRDE, 2005).

O processo de industrialização de maçã para a obtenção de suco, sidra, vinagre, doce e geléia faz retornar ao meio ambiente, quantidades apreciáveis de descarte sólido (bagaço) o qual continua sendo pouco aproveitado no sentido de “agregar valor” à produção (RAUPP et al., 2004).

Sabe-se que a quantidade de bagaço produzida está diretamente relacionada com a tecnologia empregada na extração do suco de maçã que pode representar de 20-40% do peso das maçãs processadas (STURZA, 1995). Esse subproduto contém 80% de umidade, 5% de fibras (composta por 31% de celulose, 15% de lignina, 12% celulose e 9% de pectina insolúvel em água) e 14% de sólidos solúveis dos quais a maioria corresponde a açúcares invertidos, uma mistura de glicose, frutose e sacarose, o que o torna muito susceptível à deterioração por microrganismos e, por esse motivo, a incorreta disposição do material pode acarretar problemas ambientais (CHEN et al., 1988; DOWNING, 1989).

De acordo com os dados de produção, e considerando um percentual de industrialização estável de 25%, pode-se estimar que de 2004 a 2006 o Brasil tenha gerado o equivalente a 66.150 toneladas de bagaço de maçã fresco. A título de exemplificação somente uma das empresas processadoras de suco do Estado de Santa Catarina produziu cerca de 13.140 toneladas de bagaço fresco em três anos, destinado somente à alimentação animal.

No Brasil, o bagaço é dispensado no solo como adubo orgânico ou utilizado como ração animal, porém a fermentação no rumem provoca alcoolemia, com prejuízos à saúde do gado bovino, além de ser uma alternativa pouco rentável e por vezes até insignificante (KENNEDY et al., 1999; VILLAS-BOAS e ESPOSITO, 2001; RAUPP et al., 2004).

A literatura descreve aplicações do bagaço que compreendem produção de etanol (fermentação em estado sólido), aromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas, enzimas, extração de fibras e carvão vegetal (JEWELL e CUMMINGS, 1984; CHEN et al., 1988; DOWNING, 1989; ALMOSNINO e BELIN, 1991; NGADI e CORREIA, 1992; BEROVIC e OSTROVERSNIK, 1997; KENNEDY et al., 1999). Investigações das propriedades de proteção à saúde existentes no bagaço da maçã devido aos compostos fenólicos existentes na fruta *in natura* vem sendo uma outra

linha em desenvolvimento, embora tais grupos de compostos sejam vistos como problemáticos porque promovem a descoloração da fruta e de seus produtos (LU e FOO, 2000; BALASUNDRAM et al., 2006; PESCHEL et al., 2005).

Esta descoloração é oriunda de reações catalisadas por uma enzima conhecida como polifenoloxidase (PPO) através da oxidação enzimática de compostos fenólicos. A enzima PPO é encontrada praticamente em todos os tecidos vegetais, em concentrações especialmente altas em cogumelos, pêssego, maçã, banana, manga, folhas de chá, abacate e café. Contudo, o escurecimento de frutas e vegetais catalisados pelas PPOs pode ser prevenido por meio da inativação térmica da enzima pelo uso de calor, dentre outras formas (ARAÚJO, 1999). De acordo com Valderrama et al. (2001), a atividade da PPO diminui com o aumento da temperatura e tempo de exposição do extrato enzimático, sendo elas inativadas com 10 minutos de tratamento a 75°C.

Os efeitos benéficos provenientes do consumo da maçã, principalmente na redução do colesterol, são freqüentemente atribuídos aos componentes presentes na fruta, como fibras, vitamina C e compostos fenólicos (CURTI, 2003). Estes últimos compostos são de relevante importância devido as suas contribuições para a cor, sabor e aroma da fruta e de seus produtos derivados e tem sido objeto de grande interesse por causa de suas propriedades biológicas, tais como atividade antiinflamatória, antitumoral, antihistamínica, habilidade de captura de radicais livres e de proteção contra as doenças cardíacas. Os polifenóis da maçã tais como quercetina glicosídica, epicatequina, ácido clorgênico, procianidinas, demonstraram forte atividade antioxidante *in vitro* (PENG et al., 2005), e estão em quantidade mais apreciáveis na casca e mucilagem da fruta, enquanto as sementes são constituídas por aproximadamente 81% de ácidos graxos, tais como, ácidos linoléico e palmítico (LU e FOO, 1998; PESCHEL et al., 2005).

O Applephenon<sup>®</sup> é um exemplo de produto rico em polifenóis de maçã. Produzido no Japão, tem sido utilizado como suplemento alimentar e/ou aditivo em alimentos e vem sendo comercializado à US\$ 280,00/Kg (MAYPRO. Acesso em: 08 de Janeiro de 2007).

Logo, o interesse em utilizar um subproduto agroindustrial, particularmente o bagaço de maçã, deve-se ao fato de que os compostos bioativos da fruta *in natura* ficam remanescentes na biomassa fresca, mesmo após o processo de produção do suco de maçã (LU e FOO, 2000; PESCHEL et al., 2005). A agroindústria da maçã tem mostrado interesse em alternativas econômicas e tecnologicamente viáveis para a utilização desse descarte sólido e aguarda sugestões para que esse produto deixe de ser considerado, embora quantitativamente relevante, apenas como resíduo.

### 3.1.1. Propriedades Funcionais do Bagaço de Maçã

A Investigação das propriedades funcionais e farmacológicas do subproduto agroindustrial do suco de maçã deve-se em grande parte aos conhecidos benefícios da fruta na saúde humana, além da busca por métodos viáveis de reutilização do material orgânico de descarte.

Estudos relacionados com a atividade biológica dos polifenóis da maçã iniciaram-se a partir dos anos 90 quando se observou a associação do alto consumo de frutas e vegetais na redução de transtornos fisiológicos como câncer e arteriosclerose.

Sun et al. (2002), quantificaram um conteúdo fenólico de  $296,3 \pm 6,4$  mg/100g na maçã fresca. Segundo Gardner et al. (2000), o suco de maçã apresenta um conteúdo de  $339 \pm 43$  mg/L. Enquanto que Cieslik et al. (2006) apresentaram para o conteúdo fenólico da maçã, em peso seco, um valor entre 905 e 1030 mg/100g.

A grande variabilidade do conteúdo e atividade biológica dos compostos fenólicos de frutas, vegetais e seus subprodutos agroindustriais foram observados por Balasundram et al. (2006). Os autores atribuíram tais variações à complexidade dos grupos de compostos, aos métodos de extração e tipo de análise. Também ressaltaram que a atividade biológica dos compostos fenólicos depende da estrutura química que por sua vez é determinada por fatores intrínsecos como gênero, espécie e cultivar, bem como por fatores extrínsecos como prática agrícola, condições ambientais, manejo e armazenamento.

Os polifenóis de maçã foram reportados por conter várias funções fisiológicas incluindo atividade antialérgica *in vivo*, atividade anticáries *in vivo*, e atividade inibitória *in vivo* e *in vitro* de algumas enzimas e receptores (SHOJI et al., 2004).

Lu e Foo (1997), identificaram nos extratos acetônico e hexanólico de semente de bagaço de maçã alguns polifenóis, tais como ácido clorogênico e *p*-cumárico, além da floridzina e quercetina glicosídica. O extrato de hexano conteve ácidos graxos, predominantemente o ácido linoléico.

Lu e Foo (1999), isolaram do bagaço de maçã liofilizado extraído com acetona 70%, polifenóis de baixo peso molecular. Esses polifenóis foram identificados como sendo, epicatequina, floridzina, fletina, ácido caféico e quercetina.

Para a quercetina tem-se atribuído as propriedades antioxidante, antiviral, antiinflamatória, antitumoral e anti-hemorragica (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Posteriormente, Lu e Foo (2000) determinaram a capacidade antioxidante dos polifenóis isolados do extrato acetônico de bagaço de maçã através do método DPPH e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Procianidinas e quercetinas glicosídicas demonstraram forte atividade no

sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. No método DPPH, todos os polifenóis examinados, isoladamente, demonstraram um  $EC_{50}$  (concentração mínima de extrato capaz de fornecer 50% de atividade antioxidante) variando de 0,06 a 0,60. Tais resultados indicaram os polifenóis floridzina, 3-hidroxfloordzina, ácido clorogênico, epicatequina, epicatequina dímera, trímera, tetrâmera e oligômeros, além da quercetina glicosídica, substâncias com boas propriedades antioxidantes.

Sroka e Cisowski (2003), investigaram a atividade anti-radical de alguns ácidos fenólicos através do método DPPH. Os resultados mostraram que a atividade mais forte de seqüestro do DPPH foi exibida pelo ácido gálico, com 3 grupos hidroxila ligados ao anel aromático na posição orto. Os ácidos fenólicos com 2 grupamentos hidroxila ligados ao anel aromático na posição orto, os ácidos caféico e protocatequínico, mostraram alta atividade antioxidante. Compostos com apenas um grupamento hidroxila, como o ácido salicílico, exibiram a menor atividade anti-radical. Os resultados obtidos mostraram que a atividade antioxidante dos fenólicos correlacionou-se positivamente com o número de grupos hidroxila ligada ao anel aromático.

Considerando-se que a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um iniciador importante da aterogênese (STEINBERG et al., 1989; STEINBRECHER et al., 1990), vários autores utilizaram o modelo de oxidação de LDL *in vitro* para verificar o potencial antioxidante de ácidos fenólicos. Alguns deles, como o caféico e o clorogênico, apresentaram um elevado poder antioxidante neste sistema, sendo comparado ao poder encontrado para a vitamina E, C e  $\beta$ -caroteno (LARANJINHA et al., 1994; VINSON et al., 1995; LARANJINHA et al., 1996; VINSON e DABBAGH, 1998).

Peschel et al. (2005), investigaram o potencial antioxidante de onze subprodutos de frutas e vegetais, entre eles o bagaço de maçã, na tentativa de recuperação dos polifenóis com propriedade antioxidante. A atividade antioxidante do extrato acetônico do bagaço de maçã foi analisado através dos métodos da habilidade de captura do radical DPPH ( $77,63 \pm 0,42$ )%, método do tiocianato ( $71,52 \pm 1,44$ )% e peroxidação do ácido tiobarbitúrico ( $76,72 \pm 1,95$ )%. Ao extrato foi atribuída uma alta eficiência, frente aos padrões butil-hidroxi-tolueno (BHT), extrato de semente de uva, extrato de chá verde e extrato supercrítico de alecrim.

### 3.2. Oxidação e Radicais Livres

Sabe-se que os seres humanos dependem da oxidação biológica como fonte de energia para a sobrevivência e atividade, contudo, a ação do oxigênio é ambígua. As espécies reativas do oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil

(OH<sup>\*</sup>) podem causar danos funcionais ao homem, apesar de serem constantemente formadas no corpo humano (HAMID et al., 2002).

As EROs são as várias formas de oxigênio ativado, singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), entre as quais se incluem os denominados radicais livres. Os termos, radical livre, agente oxidante, espécie radicalar, espécie ativada e espécie reativa são freqüentemente utilizados para designar, de forma genérica, todas as espécies reativas do oxigênio de importância biológica e que podem ser definidas como qualquer espécie química capaz de existir independentemente de outras espécies e que possui um ou mais elétrons não pareados (RAYMUNDO, 2003; SOARES, 2002).

O papel das reações dos radicais livres nas doenças humanas, biologia, toxicologia, e na deterioração de alimentos tornou-se uma área de intenso interesse. Em destaque, a reação de lipoperoxidação dos radicais livres como um ponto importante na indústria alimentícia, onde a oxidação é minimizada em alimentos contendo lipídios através do uso de antioxidantes durante a industrialização (BAGGIO, 2006).

As EROs podem atuar em sistemas biológicos bem como nos alimentos, uma vez que os ácidos graxos poliinsaturados, constituintes fundamentais das membranas celulares e de diversos tipos de alimentos, principalmente os industrializados, são altamente vulneráveis ao ataque dos radicais livres.

Nas seções 3.2.1 e 3.2.2 são abordados os mecanismos que desencadeiam a oxidação lipídica em sistemas biológicos e nos alimentos, respectivamente.

### **3.2.1. Oxidação em Sistemas Biológicos**

A oxidação no sistema biológico ocorre devido à ação de radicais livres presentes no organismo humano. Estas moléculas possuem um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outro elétron, e por isso são extremamente reativas. Elas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

Os radicais do oxigênio tais como alcoxila ( $RO^*$ ), peroxila ( $ROO^*$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), dentre outros, são formados nos processos biológicos e causam alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares. Eles desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos poliinsaturados da membrana lipoprotéica, denominadas de lipoperoxidação, que afetam a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Tais reações de oxidação estão associadas às doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, queda do sistema imunológico, disfunções cerebrais, catarata, dentre outras, devido aos danos oxidativos que estes provocam no DNA, proteínas e outras macromoléculas que são acumuladas com a idade (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992; BAGGIO, 2006).

Os danos oxidativos aos tecidos biológicos são modulados por muitos fatores, incluindo a composição do substrato, concentração de oxigênio e pró-oxidantes. Os sistemas biológicos controlam estes fatores oxidativos via diversos mecanismos antioxidantes que restringem a reatividade dos radicais livres. Muitos componentes da dieta, essenciais ou não, podem contribuir para estes sistemas de defesa antioxidantes (DECKER, 1997).

### 3.2.2. Oxidação em Alimentos

Os lipídios desempenham um importante papel no que diz respeito à qualidade de certos produtos alimentícios, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis. Além de conferir valor nutritivo aos alimentos, através dos ácidos graxos essenciais (ex. ácidos linoléico e linolênico) e de vitaminas lipossolúveis (ex. A, D, E e K) (BORGES et al., 1999).

Na oxidação dos alimentos, o oxidante mais comum é o oxigênio, embora outras substâncias químicas adicionadas ou endógenas possam também servir como oxidante.

A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorantes que ocorrem durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo final dos alimentos. É responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo. Além disso, também provoca outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional, a integridade e a segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (ARAÚJO, 1999).

Também conhecida como rancificação, ocorre nos lipídios que contêm ácidos graxos insaturados e que podem sofrer oxidação, degradação ou polimerização por um mecanismo de radicais livres. Destas transformações resultam aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois, hidrocarbonetos etc.

A reação em cadeia de radicais livres, neste tipo de rancificação, se dá em três etapas ou fases que são distinguíveis pelos produtos formados e pelas características organolépticas de cada uma das fases. Na primeira fase, conhecida por fase inicial ou de indução, em que não há cheiro ou gosto de ranço, forma-se os primeiros radicais livres; a segunda fase ou de propagação já apresenta cheiro e sabor que tendem a aumentar rapidamente. Também há um aumento da quantidade dos peróxidos e de seus produtos de decomposição; a terceira fase ou terminação caracteriza-se por cheiro e sabor fortes, alterações da cor e da viscosidade do lipídio, bem como de sua composição.

A velocidade da oxidação lipídica nos alimentos pode ser reduzida pela adição de antioxidantes representados por meios físicos, por exemplo, as embalagens, e químicos pelo uso de compostos antioxidante e a eliminação de metais contaminantes e pigmentos fotossensíveis (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

### **3.3. Antioxidantes**

Uma substância antioxidante pode ser definida como um composto ou substância química que inibe a oxidação, bem como por qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, pode retardar ou inibir significativamente a oxidação do mesmo (ATOUI et al., 2005).

Antioxidantes podem ser compostos de origem natural ou sintética que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que têm propriedade de prevenir a oxidação de outras substâncias como proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos (MOREIRA e MANCINI FILHO, 2003).

O organismo humano possui dois mecanismos antioxidantes de defesa contra os radicais livres. O primeiro é representado pelo sistema endógeno de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas). O segundo sistema de proteção denomina-se exógeno e é obtido por meio da dieta (BRENNA e PAGLIARINI, 2001; YILDIRIM et al., 2001).

Em decorrência da eficiência parcial do sistema antioxidante endógeno do organismo humano, torna-se necessária a contribuição de antioxidantes exógenos, obtidos através da dieta (PIETTA et al., 1998).

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (MILIAUSKAS et al., 2004). Encontra-se ainda nas frutas, nos vegetais e condimentos outras classes de substâncias que

também contribuem para suas propriedades biológicas, como os compostos nitrogenados, carotenóides, vitaminas, polissacarídeos e clorofila (PIMENTEL et al., 2005).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SOARES, 2002). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é inibida por antioxidantes sintéticos. Os compostos mais utilizados, entre outros, são butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tércio-butil-hidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil galato (PG). Embora os antioxidantes sintéticos sejam amplamente utilizados pela indústria alimentícia, existem argumentos com relação a sua segurança e efeitos adversos quando usadas como aditivos alimentares (WURTZEN, 1990).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que possivelmente possam permitir a substituição ou associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. Os estudos têm se concentrado nos compostos fenólicos, pois agem como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes, além de atuarem também nos processos oxidativos catalizados por metais, tanto *in vivo*, como *in vitro* (DONNELLY e ROBINSON, 1995; WILLIAMSON et al., 1998). Desta forma, um maior enfoque será dado a esta classe de compostos na seção 3.3.1.

### 3.3.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligado a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998).

Podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os flavonóides são os compostos que apresentam a estrutura química descrita como C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Já os denominados de não flavonóides e

também conhecidos como ácidos fenólicos são classificados como (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004):

(1) derivados das estruturas químicas  $C_6-C_1$  específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico; são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza;

(2) derivados das estruturas químicas  $C_6-C_3$  específicas dos ácidos caféico, *p*-cumárico e hidroxicinamatos; sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal;

(3) derivados das estruturas químicas  $C_6-C_2-C_6$  específicas do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídeo.

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

As propriedades químicas dos compostos fenólicos como seqüestradores de radicais doadores de hidrogênio sugerem sua atividade antioxidante. Para que um polifenol possa ser definido como antioxidante é necessário satisfazer duas condições básicas: primeiro, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato, bloquear, retardar ou prevenir a autoxidação ou a oxidação mediada por um radical livre; segundo, o radical resultante formado após o seqüestro deve ser estável nas ligações de hidrogênio intramoleculares. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus ésteres depende do número de grupos hidroxila da molécula, e é reforçada pelo impedimento estérico (RICE-EVANS et al., 1996).

### 3.3.2. Métodos para Determinação de Fenólicos em Extratos Naturais

Os métodos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para a determinação de fenólicos totais (SALUNKHE et al., 1989).

O ensaio de Folin-Ciocalteu tem sido utilizado para mensurar os fenólicos totais em produtos naturais, mas o seu mecanismo básico é uma reação de oxi-redução. Embora não deva caracterizar a atividade antioxidante, este método é um dos melhores para estimar a atividade antioxidante de amostras de alimentos (ROGINSK e LISSI, 2005).

Existe uma controvérsia sobre o que tem sido detectado no método de Folin-Ciocalteu, se somente fenóis ou fenóis de agentes redutores adicionados de quelatos de metal. O método de Folin-Ciocalteu é simples e pode ser útil na caracterização e padronização de amostras naturais. O método sofre a interferência de várias substâncias, particularmente açúcares, amins aromáticas,

enxofre, ácidos orgânicos, ácido ascórbico e redutores, e a eliminação dos interferentes deve ser feita.

O método de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido em 1927 e modificado por Singleton e Rossi em 1965 (PRIOR et al., 2005). Baseia-se na oxidação de fenólicos em meio básico resultando na formação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o qual por sua vez, reage com molibdato formando óxido de molibdênio ( $MoO_4^+$ ), que apresenta uma absorvância muito intensa a 765 nm (PRIOR et al., 2005; ROGINSK e LISSI, 2005). O conteúdo fenólico determinado pelo teste de Folin-Ciocalteu é, freqüentemente expressos em *gallic acid equivalent* (GAE) ou equivalente ácido gálico (EAG), embora alguns pesquisadores optem pelo uso de padrões tais como, catequina, ácido tânico e ácido clorogênico (VINSON et al., 2001; KATSUBE et al., 2003; NAKAMURA et al., 2003).

### 3.4. Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante de uma amostra pode depender da tecnologia e do radical livre gerador ou oxidante utilizado nesta medida. Além disso, a comparação de diferentes métodos analíticos constitui um fator chave para ajudar os pesquisadores a escolherem um método e entender os resultados obtidos através do mesmo (CAO e PRIOR, 1998).

Um fator que promove distintos desafios aos ensaios de determinação da capacidade antioxidante é que dentro de sistemas biológicos existem pelo menos quatro fontes gerais de antioxidantes: (1) enzimas, por exemplo, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase; (2) moléculas grandes (albumina, ceruloplasmina, ferritina e outras proteínas); (3) moléculas pequenas (ácido ascórbico, glutathione, ácido úrico, tocoferol, carotenóides e polifenóis); e (4) alguns hormônios (estrogênio, angiotensina, melatonina, etc). Por outro lado existe múltiplos radicais livres e fontes oxidantes [exemplo,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $NO^{\cdot}$ ,  $RO(O)^{\cdot}$ ], e ambos, oxidantes e antioxidantes têm diferentes características químicas e físicas. Individualmente os antioxidantes, em alguns casos, podem agir através de múltiplos mecanismos em um sistema único, ou através de diferentes mecanismos únicos dependendo do sistema de reação. Além disso, os antioxidantes podem responder de diferentes maneiras para diferentes radicais ou fontes oxidantes (PRIOR et al., 2005).

Conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “scavenger”, quando ele age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “quencher”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação.

Vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante estão disponíveis. Eles incluem: métodos de espectrofotometria de absorção no visível, medida da atividade sequestradora de radicais livres em sistemas aquosos ou lipídicos (DPPH, ABTS), métodos de fluorescência, métodos de quimioluminescência, métodos eletroquímicos, que medem o consumo de oxigênio por lipídios peroxidáveis eletroquimicamente, e determinação do potencial redox dos antioxidantes (HU e SKIBSTED, 2002).

### 3.4.1. Método ABTS

Embora os ensaios TEAC e de DPPH normalmente sejam classificados como de transferência de elétron único, estes dois radicais podem indicar, na realidade, a redução direta via transferência de elétrons ou através da neutralização via transferência de átomo H (JIMÉNEZ et al., 2004). Padrões de reatividade e mecanismos são difíceis de interpretar sem informação detalhada sobre a composição e estruturas dos antioxidantes que são testados. A interpretação é particularmente dificultada quando uma molécula pequena que reduz os agentes como ácido ascórbico estão presentes em extratos de fenóis.

O ensaio de TEAC foi informado primeiro por Miller et al. (1993), e está baseado na habilidade de captura (*scavenger*) de antioxidantes através do tempo de vida do radical aniônico  $ABTS^{\bullet-}$ . Neste ensaio, o 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), ABTS, é oxidado por radical peróxil ou outros oxidantes a seu radical catiônico  $ABTS^{\bullet+}$  que é intensamente colorido e a avaliação da capacidade antioxidante é medida como a habilidade dos compostos do teste em reduzir a coloração reagindo diretamente com o radical  $ABTS^{\bullet+}$ . O método ABTS é um dos mais utilizados entre os testes indiretos de avaliação da atividade antioxidante.

O princípio do método consiste em monitorar o decaimento do radical produzido pela oxidação do ABTS, causada pela adição de uma amostra contendo fenólicos. O ABTS absorve na faixa de 600 – 750 nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria. Na ausência de fenólicos, o ABTS é estável, mas ele reage energeticamente com um doador de H, como os fenólicos, sendo então convertido em uma forma incolor de ABTS. Os autores determinaram que a quantidade de ABTS consumida está relacionada à reação com os fenólicos presentes na amostra, a qual é expressa como relativos ao Trolox. Este valor foi designado TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), sigla em inglês para capacidade antioxidante equivalente ao Trolox.

Dentre as vantagens da utilização do método ABTS pode-se citar que o método é um ensaio operacionalmente simples, tem sido usado em muitas pesquisas de laboratório para estudar a

capacidade antioxidante de muitos compostos e amostras de alimentos (CAO e PRIOR, 1998; GIL, 2000; PROTEGGENTE et al., 2002; PELLEGRINI et al., 2003). O ABTS<sup>+</sup> reage rapidamente com antioxidantes, tipicamente dentro de 30min. Pode ser usado para soluções com diferentes pH's, bem como para o estudo da influência do pH nos mecanismos antioxidantes. É solúvel em solventes aquosos e orgânicos e não é afetado por força iônica, assim pode ser usado para determinar a capacidade de extrato e fluido corpóreo, hidrófilo e lipofílico (AWIKA et al., 2003).

Sua principal limitação é geral a todos os métodos indiretos de avaliação da atividade antioxidante: o valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra estudada em reagir com o ABTS, mais do que sua capacidade de inibir o processo oxidativo. O radical ABTS usado em ensaios de TEAC não é encontrado dentro do organismo de mamíferos e assim representa uma fonte não-fisiológica de radical (PRIOR et al., 2005).

### 3.4.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ Ácido Linoléico

Os carotenóides descolorem através de autooxidação, oxidação induzida pela luz ou calor além da oxidação induzida por radicais peroxila (por exemplo, oxidação de lipídios). Esta descoloração, por sua vez, pode ser reduzida ou pode ser prevenida através de antioxidantes que doem átomos de hidrogênio para extinguir os radicais. Embora,  $\beta$ -caroteno seja freqüentemente tratado como o alvo do ensaio, sua perda de cor a 470 nm pode acontecer através de múltiplos caminhos, logo a interpretação dos resultados pode ser complicada (BURDA e OLESZEK, 2001).

Este ensaio baseia-se na perda de cor do  $\beta$ -caroteno durante sua cooxidação com o ácido linoléico em uma emulsão aquosa, monitorada como o decaimento da absorbância na região visível (MILLER, 1971). A adição de uma amostra contendo antioxidantes, antioxidantes individuais (VON GADOW et al., 1997), ou extratos naturais (MOURE et al, 2000) resulta no retardo da perda de cor do  $\beta$ -caroteno. Os resultados, geralmente expressos em percentual da atividade antioxidante, são obtidos pela razão entre a queda da densidade ótica das amostras pela do controle ao final de duas horas de ensaio, bem como para cada intervalo de tempo de 15 ou 30 minutos.

### 3.5. Métodos de Extração

Diferentes técnicas de extração, como maceração, percolação cíclica (soxhlet) e extração supercrítica têm sido empregadas para isolar antioxidantes de plantas (GRIGONIS et al., 2005), sendo que a quantidade e qualidade dos compostos com potencial antioxidante podem ser limitadas pelo tipo de técnica e solvente utilizados.

As operações de extração soxhlet e seqüencial utilizam solventes líquidos e por isso são denominadas de convencionais. A primeira caracteriza-se pelo esgotamento da matéria-prima devido ao refluxo contínuo do solvente aquecido (SONAGLIO et al., 2003) enquanto a segunda consiste no contato da matéria-prima com o solvente por um determinado tempo, à temperatura ambiente sob agitação constante. Nesta técnica a matéria-prima é submetida a uma seqüência de extrações com solventes de polaridade crescente. Moreira e Mancini Filho (2003), empregaram extração seqüencial para determinação antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce. Raymundo et al. (2004), utilizaram o método de extração seqüencial para obtenção dos extratos etéreo e metanólico de algas verde (*Chlorophyta*), objetivando a avaliação antioxidante *in vitro* dos extratos.

Para estas extrações a etapa de eliminação do solvente é uma operação comum. Esta etapa, no entanto, prejudica a qualidade dos compostos extraídos devido ao uso de temperaturas elevadas além do grande dispêndio de energia (GRIGONIS et al., 2005).

Os líquidos extratores mais utilizados são os hidrocarbonetos alifáticos (éter de petróleo e o n-hexano), álcoois (etanol e metanol), cetonas (acetona e metiletilcetona), ácido acético, acetato de etila, éter etílico e água (SONAGLIO et al., 2003).

A extração com CO<sub>2</sub> supercrítico é um método atrativo para a indústria alimentícia porque utiliza um solvente seguro, atóxico e de fácil remoção. O método é rápido e os parâmetros podem ser ajustados para diferentes temperatura e pressão. Todavia, o CO<sub>2</sub> é um solvente apolar e esta é a grande desvantagem para seu uso no isolamento de antioxidantes, que na maioria dos casos são compostos fenólicos polares (ZIAKOVA e BRANDSTETEROVA, 2002). O uso de co-solvente, como etanol, tem sido empregado na extração supercrítica, a fim de contornar esta limitação (GRIGONIS et al., 2005).

A maior parte dos ácidos fenólicos por não se encontrar no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, podem ser extraídos através de solventes orgânicos polares, como água e etanol. Enquanto que para extração de flavonóides geralmente se utiliza solventes com polaridade crescente, ou seja, a primeira extração se realiza com solvente apolar capaz de retirar óleos, gorduras, esteróis e pigmentos, e em seguida aumentando a polaridade do solvente (acetona, metanol, água) se extraem os flavonóides (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Lu e Foo (1997,1999), empregaram extração com polaridade crescente para quantificação e identificação dos compostos presentes na semente do bagaço de maçã. Das extrações obteve-se um

extrato de hexano (apolar) e outro de acetona (polar). No entanto os autores não mencionam o tipo de técnica aplicada bem com as condições de extração.

Peschel et al. (2005), avaliaram o rendimento e conteúdo fenólico de extratos de bagaço de maçã utilizando o sistema soxhlet. Foram selecionados os solventes, água, etanol, metanol, acetona e hexano, tendo o extrato aquoso demonstrado maior rendimento, enquanto que o metanol apresentou um maior conteúdo fenólico.

### **3.6. Extração Supercrítica**

O desenvolvimento de novas técnicas de separação para a indústria química e de alimentos tem recebido nos últimos anos grande atenção devido às restrições ambientais, regulamentos de saúde pública e a necessidade de minimização de custos com energia. O uso de solventes orgânicos utilizados pela indústria processadora de alimentos para obtenção de extratos naturais, implica em dificuldades quanto ao tipo de solvente a ser empregado além da desvantagem referente às transformações oxidativas ocorridas durante a remoção do solvente (CARVALHO JUNIOR et al., 2005).

Um método seguro para extração de matrizes vegetais é a extração supercrítica (ESC). Esta técnica permite recuperar os vários tipos de aromas voláteis e não somente óleo volátil, de modo bastante eficiente. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO<sub>2</sub> é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nesta temperatura, o CO<sub>2</sub> atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO<sub>2</sub> retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES e SPITZER, 2003).

A ESC é uma operação unitária que explora o poder de solvatação de fluidos a temperatura e pressão acima de seus pontos críticos.

No processo de ESC em matrizes sólidas, o fluido supercrítico escoar através do leito fixo (de partículas sólidas) e solubiliza os compostos existentes na matriz sólida, sendo o solvente alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. Durante a extração, a matriz sólida absorve o solvente supercrítico, dilatando a estrutura da célula, promovendo uma diminuição na resistência à transferência de massa e os compostos extraíveis são dissolvidos pelo solvente e transferidos por difusão para a superfície externa, sendo transportados pelo fluido até

uma válvula de despressurização e devido a menor pressão o extrato é liberado do meio gasoso e coletado (BRUNNER, 1994).

Nas últimas décadas os processos que utilizam fluidos supercríticos vem sendo aplicados com sucesso na obtenção de uma grande variedade de compostos orgânicos de plantas e ervas. A ESC oferece inúmeras vantagens quando em comparação ao processo de extração convencional, incluindo: reduções do volume de solvente e tempo de extração, e obtenção de extratos mais seletivos propiciado pelo ajuste dos parâmetros de processo tais como pressão e temperatura (WOOD et al., 2006).

Considerada uma tecnologia limpa a extração com fluido supercrítico é hoje bem aceita em diversas áreas, principalmente aquelas que atuam em setores ligados à saúde humana, como alimentos e medicamentos. A extensa pesquisa nesta área é indicada pelo fato de que 19 patentes foram solicitadas nos EUA, entre 1974 e 1984, somente para descafeinação do café (SINGH e SINGH, 1996). As indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos possuem grande interesse por processos que forneçam produtos isentos de resíduos tóxicos e que a incidência de degradação dos compostos ativos seja quase nula (PEREIRA, 2005).

### **3.6.1. Fluidos Supercríticos**

Fluidos supercríticos (FSC) são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão críticas. O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio. Os fluidos supercríticos têm a característica de combinar algumas propriedades de líquidos com outras propriedades de fases gasosas (POLIAKOFF e KING, 2001; MICHIELIN, 2002). Uma substância no seu estado supercrítico apresenta densidade similar a de líquidos enquanto que a viscosidade e difusividade são mais próximas ao do gás. As densidades apresentadas por estes fluidos são próximas as dos líquidos (0,6 à 1,6 g/cm<sup>3</sup>), associadas à valores intermediários de difusividade entre gases (0,1 à 0,4 cm<sup>2</sup>/s) e líquidos (de 0,2 x 10<sup>-5</sup> à 2 x 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s), enquanto que a viscosidade, da mesma forma que a dos gases é baixa (1 x 10<sup>-4</sup> à 3 x 10<sup>-4</sup> g/cm.s). Estas propriedades tornam altas as taxas de extração, uma vez que as altas densidades dos fluidos conferem grande poder de solvatação, enquanto os baixos valores de viscosidade combinados com altos valores de difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida.

O poder de dissolução de um fluido supercrítico está diretamente relacionado com sua densidade, sendo facilmente manipulado por mudanças na temperatura e pressão do processo. Nas

vizinhanças do ponto crítico, grandes mudanças de densidade podem ser produzidas por pequenas mudanças na pressão e temperatura, que aumenta com o aumento da pressão a temperatura constante e diminui com o aumento na temperatura a pressão constante (PEREIRA, 2005).

O fluido supercrítico habitualmente utilizado na ESC é dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), esta escolha justifica-se porque o  $\text{CO}_2$  possui baixa viscosidade, é atóxico, não deixa resíduos nos produtos extraídos, é abundante e por isso barato, tem baixa pressão e temperatura crítica ( $P_c = 73,8$  bar e  $T_c = 31,06^\circ\text{C}$ ), de forma a não degradar termicamente os alimentos e diminuir custos de compressão, mantém fragrâncias e aromas inalterados, não é inflamável e inofensivo ao meio ambiente (BRUNNER, 1994; POLIAKOFF e KING, 2001; GRIGONIS et al., 2005).

Porém algumas desvantagens na utilização de  $\text{CO}_2$  como FSC podem ser observadas: o equilíbrio de fases entre o solvente supercrítico e o soluto pode ser muito complexo; como o  $\text{CO}_2$  é não-polar dissolve muito bem os solutos não polares ou de baixa polaridade; a aplicação para isolamento de antioxidantes pode ser ineficiente já que na maioria das vezes esta capacidade é atribuída a combinações de compostos fenólicos polares; a adição de co-solventes pode alterar a polaridade do  $\text{CO}_2$ , mas podem ficar resíduos desses solventes no extrato, sendo necessário um processo subsequente de eliminação dessas impurezas (ZIAKOVA e BRANDSTETEROVA, 2002; BERNARDO-GIL et al., 2002; CAMPOS, 2005).

### 3.6.2. Curva de Extração

Curvas típicas de extração de soluto de matrizes vegetais com FSC são normalmente representadas por três etapas distintas (FERREIRA e MEIRELES, 2002):

1. Etapa de taxa constante de extração (CER), onde o predomínio da transferência de massa é devido à convecção na fase fluida;
2. Etapa de taxa decrescente de extração (FER), onde tanto os efeitos convectivos na fase fluida quanto as difusionais na fase sólida determinam a velocidade de extração;
3. Etapa de taxa de extração baixa, onde ocorre o predomínio do fenômeno difusivo no sólido.

A curva de extração representa o comportamento da extração à medida que o soluto é extraído e pode ser determinada através do método dinâmico de extração, relacionando a quantidade de produto extraído com o tempo de extração e/ou massa de solvente utilizada. O método dinâmico se caracteriza pelo escoamento contínuo do solvente supercrítico através de um leito fixo de

partículas, geralmente sólido, por um longo tempo de contato a fim de que condições próximas do equilíbrio possam ser obtidas (DANIELSKI et al., 2007).

As curvas de extração são obtidas através da seguinte relação:

$$m_{extr} = Q_{CO_2} \int_0^{t_{total}} y(t) dt \quad (3.1)$$

Onde:  $m_{extr}$  é a massa de extrato obtida em kg;  $Q_{CO_2}$  é a vazão de solvente em kg/s;  $t$  é o tempo em s e  $y(t)$  é a concentração de soluto na fase solvente em kg.

A equação (3.1) representa uma curva de extração onde a concentração de soluto na fase solvente varia com o tempo de extração. A maioria dos modelos matemáticos que descrevem o mecanismo de transferência de massa emprega parâmetros como vazão do solvente, o teor de óleo extraível e características das partículas sólidas como diâmetro e porosidade do leito.

### 3.6.3. Uso de Co-solvente

Mesmo a altas densidades, o  $CO_2$  possui habilidade limitada em dissolver moléculas polares. Entretanto, as características dos fluidos supercríticos podem ser modificadas pela adição de compostos miscíveis e polares, mencionado na literatura como co-solvente (CS) ou modificador. Os co-solventes possuem propriedades físico-químicas diferentes e, dessa forma, podem quebrar as interações entre soluto-matriz sólida, por exemplo, forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio, facilitando o transporte do soluto dos poros intersticiais para a superfície da matriz. Uma das explicações para tal efeito é porque a adição de um co-solvente com polaridade maior do que a do  $CO_2$  aumenta a polaridade da mistura e dessa forma a solubilidade de um certo soluto ou classe de compostos (PEREIRA, 2005; ALMEIDA, 2006).

A polaridade está intimamente ligada às propriedades físicas e químicas das moléculas, exercendo influência sobre o ponto de fusão, o ponto de ebulição e a solubilidade das mesmas em determinado solvente (MORRISON e BOYD, 1996), e inclui a soma de todas as interações soluto-solvente, como as pontes de hidrogênio e forças de van der Walls (JEON e CHESNEY, 1999).

Campos (2005), utilizou etanol como co-solvente a 10, 15 e 20% em massa para condição operacional de 150 bar e 40°C, a fim de melhorar o perfil de composição e valores de rendimento do óleo de bagaço de uva Cabernet Sauvignon extraído com  $CO_2$  puro. Utilizando  $CO_2$  puro um rendimento de 2,39% foi obtido, enquanto que ao adicionar etanol 15% (m/m) seu rendimento passou para 9,20%.

Kitzberger (2005), empregou etanol, diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE) como co-solvente na extração supercrítica de óleo de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) à 200 bar e 40°C, visando a extração de compostos antioxidantes do shiitake. Ao utilizar CO<sub>2</sub> puro um rendimento de 0,65% foi obtido, ao adicionar etanol 15% (m/m), seu rendimento passou para 3,81%. A adição dos co-solventes DCM e AE a 15%, refletiram em rendimentos de 0,85% e 0,91%, respectivamente, ambos superiores ao rendimento de 0,65%.

### 3.7. Modelagem Matemática

Para a determinação das taxas de extração é importante o conhecimento dos mecanismos envolvidos na transferência de massa: difusão, convecção natural ou convecção forçada (FERREIRA et al., 1999).

O comportamento cinético de um processo de extração é controlado pelos mecanismos de transporte de massa que determina a taxa na qual o material é extraído de uma partícula.

A otimização dos processos de extração supercrítica necessita do conhecimento de propriedades termodinâmicas (solubilidade e seletividade) e propriedades cinéticas (taxa com que o soluto é transferido para a fase supercrítica), para fazer possível a predição da viabilidade de processos de ESC em escala industrial (REVERCHON, 1997; MARTÍNEZ et al., 2003).

O processo de extração depende de condições de operação tais como temperatura, pressão, vazão de solvente, morfologia do material, tratamento prévio da matriz sólida porosa e das propriedades físicas do leito fixo como a porosidade, distribuição de tamanho de partícula, conteúdo inicial de soluto na matriz sólida e altura do leito fixo (CORRÊA et al., 2001 apud. MICHIELIN, 2002).

Vários modelos de transferência de massa estão disponíveis na literatura e são utilizados para descrever as curvas de extração de dados experimentais. Dentre eles citamos o modelo de Sovová (1994) e o modelo de Martínez et al. (2003) como métodos baseados na definição do teor total de óleo presente na matriz sólida.

Os modelos de transferência de massa avaliados neste trabalho para a descrição das curvas de extração da oleoresina de bagaço de maçã são apresentados a seguir.

#### 3.7.1. Modelo de Sovová

O modelo de Sovová (1994) descreve um leito cilíndrico de extração supercrítica, através do qual um solvente escoar na direção axial, com velocidade  $U$ . O solvente entra puro no extrator, e sua

temperatura e pressão são mantidas constantes ao longo do processo. O leite é homogêneo quanto ao tamanho das partículas sólidas e à distribuição inicial do soluto.

Sovová (1994) considera a existência de células intactas e células rompidas formando o leite. Dessa forma, o soluto se apresenta sob duas condições: soluto de fácil acesso ( $x_p$ ) e o soluto de difícil acesso ( $x_k$ ). Durante o processo de extração o soluto de fácil acesso é extraído primeiro, sendo seguido pelo soluto de difícil acesso, e a partir de então se inicia a fase final de extração descrita como etapa difusiva. O processo pode então ser dividido em três etapas (PEREIRA, 2005; MARTÍNEZ, 2002).

As equações (3.2), (3.3) e (3.4) descrevem as três etapas do processo. As equações que descrevem o modelo estão no Anexo I.

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

$$m_{ext} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{CO_2} t \quad (3.2)$$

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

$$m_{ext} = Y^* \left[ t - t_{CER} \cdot \exp(z_w - Z) \right] Q_{CO_2} \quad (3.3)$$

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

$$m_{ext} = N \left\langle x_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[ \exp\left(\frac{Wx_0}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_{CO_2}}{N}\right)(t_{CER} - t)\right] \frac{x_k}{x_0} \right\} \right\rangle \quad (3.4)$$

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

### 3.7.2. Modelo Logístico (LM)

O modelo Logístico (LM) de Martínez et al. (2003) foi elaborado tendo em vista o extrato como uma mistura de compostos ou grupos de compostos com estrutura química similar. Neste modelo, as equações de balanço de massa apresentam termos relacionados a fenômenos de

transporte que podem ocorrer durante o processo de extração. Este modelo tem dois parâmetros ajustáveis para cada grupo de componentes:  $t_m$ , que é o instante no qual a taxa de extração atinge seu valor máximo, e  $b$ , mas seu significado físico não é bem definido (CARVALHO JUNIOR, 2004; PEREIRA, 2005).

Quando o soluto é considerado como um pseudocomponente, a massa de soluto pode ser descrita conforme a equação (3.5).

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{m_0}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (3.5)$$

Sendo:  $m_0 = x_0 \cdot m_t$

Onde:  $m_{ext}$  é a massa de óleo extraída (g),  $m_0$  é massa inicial total de óleo (soluto) no leito de extração(g),  $t$  é o tempo de extração (s),  $b$  e  $t_m$  são parâmetros ajustáveis do modelo LM expressos em ( $s^{-1}$ ) e (s), respectivamente. O parâmetro  $t_m$  corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou um máximo (CAMPOS, 2005; MARTÍNEZ et al., 2003).

As equações do modelo Logístico de Martínez estão apresentadas no anexo II.

## 4. Materiais e Métodos

Neste capítulo estão apresentados os materiais e métodos utilizados nos experimentos de ESC e nas extrações convencionais (soxhlet e seqüencial) de bagaço de maçã, bem como nas análises da capacidade antioxidante, conteúdo de compostos fenólicos e frações de ácidos fenólicos.

Os experimentos foram realizados nos Departamentos de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, e de Ciências e Tecnologias de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Universidade de São Paulo, conforme descrito no item 4.12.

### 4.1. Caracterização da Matéria-Prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o bagaço de maçã fresco proveniente do processamento de suco concentrado e clarificado de maçã, safra de 2005. A amostra foi fornecida pela empresa Fischer, localizada em Videira (SC). Esse bagaço de maçã é o produto resultante do esmagamento de maçãs da variedade Fuji para a produção de suco e foi obtido após a etapa de prensagem, apresentando um elevado teor de umidade e coloração escura. Toda a amostra fresca coletada foi distribuída em embalagens plásticas de 2 kg, logo após a coleta, e armazenada em freezer doméstico (Brastemp) a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Anteriormente à etapa de caracterização realizou-se um tratamento térmico visando a inativação da enzima polifenoloxidase de todo o bagaço fresco, conforme descrito por Valderrama et al. (2001), mencionado no item 3.1. Cada unidade de embalagem contendo 2 kg de bagaço fresco foi previamente descongelada, distribuída em camadas uniformes no interior de estufa aquecida. Ao atingir  $75^{\circ}\text{C}$  iniciou-se a contagem do tempo necessário a inativação enzimática, isto é, 10 minutos.

Transcorrida a etapa de inativação, o bagaço de maçã foi caracterizado quanto ao seu conteúdo de umidade (item 4.1.1), tamanho médio de partícula (item 4.1.3) e composição de ácidos fenólicos (item 4.1.4).

Com exceção da análise de composição de ácidos fenólicos, os demais experimentos deste item foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) localizado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 4.1.1. Determinação da Umidade

O valor da umidade da amostra fresca foi determinado através de método gravimétrico, submetendo a amostra ao aquecimento em estufa de secagem a 105°C até peso constante (AOAC, 2005).

Cápsulas de alumínio foram submetidas à temperatura de 105°C por duas horas, em seguida foram retiradas da estufa e permaneceram em um dessecador para esfriamento até temperatura ambiente. Uma amostra de 5,0 g de bagaço de maçã foi pesada em cápsula de alumínio, levada para estufa a 105°C por 3 horas, retirada para esfriamento em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Este procedimento foi realizado a cada 30 minutos até que a diferença entre as pesagens não fosse superior a 0,01 g.

Para o cálculo do teor de umidade, foi empregada a seguinte equação:

$$Umidade \% (m/m) = \frac{100 \cdot N}{p} \quad (4.1)$$

Onde  $N$  é a perda de peso (g) e  $p$  é o peso da amostra (g).

A determinação da umidade da amostra foi realizada em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.1.2. Secagem da Matéria-Prima Fresca

Todo o bagaço de maçã fresco foi submetido ao processo de secagem, uma vez que o emprego de sólidos com elevado teor de umidade podem interferir na extração de compostos desejáveis, e também comprometer o tempo de vida útil da amostra.

O processo de secagem foi realizado segundo o procedimento descrito por Raymundo et al. (2004). Nesta etapa, realizaram-se testes preliminares para determinação do tempo de secagem da matéria-prima úmida em estufa a  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Amostras secas por 24 e 33 horas foram submetidas ao processo de extração supercrítica para verificação da influência do teor de umidade no rendimento de extrato conforme descrito no item 5.1.1. Um tempo de secagem de 33 horas em estufa a  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  foi fixado com base nos resultados de rendimento. Todo o bagaço de maçã seco permaneceu acondicionado em embalagens plásticas de 0,5 kg e mantido em freezer doméstico a  $-18^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.3. Padronização do Tamanho das Partículas

Objetivando aumentar a exposição do soluto ao solvente, a matéria-prima foi triturada por 3 minutos em moinho elétrico (IKA, A11 Basic). Em seguida, realizou-se a padronização do tamanho médio das partículas utilizadas nos experimentos. Uma quantidade de 60 g de bagaço de maçã seco era submetida à agitação mecânica por 10 minutos através de uma série de peneiras (mesh: 20, 32, 48, 65, 80 e 100) do tipo *Tyler* com o auxílio de um agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras, SP). A fração intermediária -32/+80 mesh foi escolhida para utilização em todas as extrações, por apresentar um maior rendimento após o peneiramento e também ser adequada e reprodutível à compactação do leito de extração supercrítica. Na Figura 4.1 está apresentada a imagem do bagaço de maçã seco e triturado empregado nos experimentos de extração.



*Figura 4.1 - Bagaço de maçã seco e triturado empregado nos experimentos de extração.*

#### 4.1.4. Determinação dos Ácidos Fenólicos do Bagaço de Maçã

Uma avaliação do conteúdo de ácidos fenólicos do bagaço de maçã seco foi realizada visando assegurar a matéria-prima selecionada como fonte potencial de compostos fenólicos com provável capacidade antioxidante. Para a identificação e quantificação dos ácidos fenólicos de uma matéria-prima bruta faz-se necessário a obtenção das seguintes frações: (1) ácidos fenólicos livres, (2) ácidos fenólicos de ésteres solúveis e (3) ácidos fenólicos de ésteres insolúveis. O procedimento de obtenção destas frações visa a eliminação de compostos de interferência como proteínas, açúcares e ácidos graxos que prejudicam a identificação dos ácidos fenólicos. O processo de

obtenção das três frações de bagaço de maçã foi conduzido segundo Krygier et al. (1982) e encontra-se ilustrado no Anexo III.

**Ácidos Fenólicos Livres (AFL):** Um grama de bagaço de maçã seco, triturado e desengordurado foi extraído com 20 mL de tetrahydrofurano (THF) e homogeneizado por 5 minutos em um agitador de tubos. Este procedimento foi repetido seis vezes na tentativa de conduzir a matéria-prima ao esgotamento. O sobrenadante resultante das seis extrações foi filtrado e desidratado com sulfato de sódio anidro. Todo o solvente foi eliminado em evaporador rotatório (Fisatom 202), sob vácuo a 40°C e a amostra foi diluída com 5 mL de tetrahydrofurano.

**Ácidos Fenólicos de Ésteres Solúveis (AFES):** O resíduo resultante da extração de ácidos fenólicos livres foi novamente extraído com 20 mL de metanol:acetona:água (7:7:6) (v/v). A amostra foi agitada por cinco minutos e centrifugada. Ao final, o sobrenadante foi evaporado sob vácuo a 40°C, até que restasse somente a fase aquosa. A fim de liberar os ésteres solúveis, os quais estão esterificados com proteínas e polipeptídeos, um volume igual de NaOH 4N foi adicionado ao sobrenadante. Após três horas de hidrólise, à temperatura ambiente ( $24 \pm 2$ )°C e ao abrigo da luz, o hidrolisado foi acidificado até pH 2, com HCl 6N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e extraído com hexano para eliminar os ácidos graxos e outros contaminantes e também para extrair os ácidos fenólicos da fase aquosa com auxílio de uma mistura de éter etílico: acetato de etila: tetrahydrofurano (1:1:1) (v/v), com agitação. A fração foi filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro, evaporada com evaporador rotatório a 40°C e ressuspendido com 5 mL de tetrahydrofurano.

**Ácidos Fenólicos de Ésteres Insolúveis (AFEI):** O resíduo da extração dos fenólicos livres foi hidrolisado com 25 mL NaOH 4N, por três horas, à temperatura ambiente ( $24 \pm 2$ )°C e ao abrigo da luz. O extrato de ácidos fenólicos de ligantes insolúveis foi acidificado até pH 2 HCl 6N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e extraído com hexano para eliminar os ácidos graxos e outros contaminantes e também para extrair os ácidos fenólicos da fase aquosa com auxílio de uma mistura de éter etílico: acetato de etila: tetrahydrofurano (1:1:1) (v/v), com agitação. A fração foi filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro, evaporada com evaporador rotatório a 40°C e ressuspendido com 5 mL de tetrahydrofurano.

Os extratos contendo as frações de ácidos fenólicos foram acondicionados em frasco de vidro âmbar sob atmosfera de nitrogênio e conservados em freezer doméstico a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Os ácidos fenólicos das frações foram obtidos no Laboratório de Química de Alimentos, localizado no Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo que a identificação e quantificação através de cromatografia gasosa foi realizada no Laboratório de Lípidos da Universidade de São Paulo (USP-SP), conforme descrito no item 4.10.

## **4.2. Extrações Convencionais**

Extrações convencionais foram realizadas visando comparar os resultados obtidos através da extração supercrítica, em termos de rendimento, conteúdo fenólico e atividade antioxidante. Os resultados obtidos através destas extrações foram utilizados para seleção do co-solvente a ser empregado na extração supercrítica. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

As extrações soxhlet e a seqüencial foram conduzidas no LATESC e no Laboratório de Química de Alimentos, respectivamente.

### **4.2.1. Extração Soxhlet**

A extração por soxhlet é um tipo de percolação cíclica. Este tipo de operação é caracterizado pela extração exaustiva das substâncias ativas. Nesta extração a matriz vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilíndrico, de vidro ou de metal, através do qual é feito passar o líquido extrator, ou solvente orgânico. A extração soxhlet é empregada, sobretudo para extrair sólidos com solventes voláteis, onde em cada ciclo da operação o material vegetal entra em contato com o solvente renovado, tornando a extração eficiente e com pouco consumo de solvente (GRIGONIS et al., 2005).

As extrações soxhlet foram realizadas utilizando diferentes solventes orgânicos: hexano, acetona, etanol, todos de qualidade P.A. (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA) e água deionizada obedecendo à ordem de polaridade, respectivamente de  $0,0 < 5,1 < 5,2 < 9,0$  (BYERS, 2006). As extrações soxhlet foram realizadas conforme procedimento de Peschel et al. (2005).

A extração consistiu em colocar cerca de 5 g de amostra em papel filtro (cartucho). O cartucho de extração contendo a amostra foi inserido no aparelho soxhlet (composto por tubo extrator, balão de vidro de fundo redondo e um condensador), juntamente com 150 ml do solvente e ligado à manta de aquecimento até a temperatura de ebulição do solvente, ficando em refluxo por

06 horas. O solvente foi removido ao final da extração, usando um evaporador rotatório (Fisatom 802) com controle de vácuo (Nova Técnica, Modelo NT 613, Piracicaba, SP). Todos os extratos foram obtidos em triplicata e após a remoção do solvente permaneceram acondicionados em frasco âmbar e foram mantidos em freezer doméstico a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.2. Extração Seqüencial**

A extração seqüencial foi conduzida em triplicata, segundo o procedimento descrito por Moreira e Mancini Filho (2003), utilizando os solventes éter etílico e etanol, ambos de qualidade P.A. (Nucler, CAQ Ind. e Com. LTDA) e água deionizada.

Pesou-se 5,0 g de bagaço de maçã, adicionou-se 50mL de éter etílico e manteve-se a solução sob agitação mecânica por 01 hora ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Após extração, procedeu-se a filtração com papel filtro (Wathman nº1), sendo o volume completado para 50 mL com éter etílico. O resíduo da primeira extração foi recuperado através de secagem em estufa a  $(40 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  e pesado para a obtenção do extrato etanólico. Foi adicionado a massa seca 50 mL de etanol, e a solução permaneceu sob agitação mecânica por 01 hora ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Após extração, procedeu-se a filtração com papel filtro (Wathman nº1), sendo o volume completado para 50 mL com etanol. O resíduo da segunda extração foi recuperado através de secagem em estufa a  $(40 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  e pesado para a obtenção do extrato aquoso. Foi adicionado a massa seca 50 mL de água deionizada, e a solução permaneceu sob agitação mecânica por 01 hora ao abrigo da luz e sob temperatura ambiente. Após extração, procedeu-se a filtração com papel filtro (Wathman nº1), sendo o volume completado para 50 mL com água deionizada.

Ao final das extrações os solventes, éter etílico, etanol e água deionizada foram removidos, através de um evaporador rotatório (Fisatom 202) com controle de vácuo.

O procedimento de obtenção dos extratos seqüenciais encontra-se ilustrado no Anexo IV.

#### **4.3. Caracterização do Leito de Partículas**

A caracterização do leito de partículas representa a determinação das características físicas das partículas e do leito fixo de sólidos, como a densidade do sólido e a porosidade do leito, necessárias para a avaliação das propriedades de transporte, utilizadas na modelagem matemática das curvas de extração.

Foram realizados testes de empacotamento do leito de extração com diferentes quantidades de bagaço de maçã (20 e 27 g) e forma de compactação. Padronizou-se para todos os experimentos,

a utilização do leito de extração empacotado com 20 g de bagaço de maçã, sendo o restante do extrator complementado com esferas de vidro, segundo descrito nos testes preliminares do item 5.1.1.

#### 4.3.1. Determinação do Diâmetro de Partículas

A determinação do diâmetro de partículas da amostra foi conduzida em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras, SP) e de uma série de peneiras do tipo *Tyler* (mesh: 20, 32, 48, 65, 80 e 100). Aproximadamente 120 g de bagaço de maçã previamente triturado por 3 minutos em moinho elétrico (IKA, A11 Basic) foi colocado na peneira de maior abertura e o sistema permaneceu sob agitação mecânica por 30 minutos. Em seguida, as frações retidas em cada peneira foram pesadas em balança analítica (OHAUS, modelo AS200) e o diâmetro médio geométrico ( $d_{gw}$ ) das partículas foi calculado através da equação que utiliza o diâmetro da partícula de superfície externa média, de acordo com as equações (4.2) e (4.3) (GOMIDE, 1983).

$$\bar{D}_s = \sqrt{\frac{\sum_1^n \frac{\Delta\lambda_i}{\bar{D}_i}}{\sum_1^n \frac{\Delta\lambda_i}{\bar{D}_i^3}}} \quad (4.2)$$

$$\Delta\lambda_i = \frac{m_i}{M} \quad (4.3)$$

Onde:

$\bar{D}_s$  = diâmetro médio superficial das partículas (cm)

$m_i$  = massa de amostra retida na peneira  $i$  (g)

$M$  = massa total de amostra (g)

$\bar{D}_i$  = diâmetro médio da peneira  $i$  (cm)

$n$  = número total de frações

#### 4.3.2. Determinação da Densidade Real

A densidade real ( $d_r$ ) do bagaço de maçã foi realizada pelo Laboratório de Materiais Particulados da Universidade de São Carlos – UFSCar (São Carlos, São Paulo) utilizando método de picnometria com gás hélio através do equipamento Ultrapycnometer 1000 da Quantachrome.

#### 4.3.3. Determinação da Densidade Aparente

A densidade aparente ( $d_a$ ) foi calculada, através da relação entre a massa de bagaço seco e triturado utilizada nas extrações pelo volume ocupado pela amostra dentro da célula extratora em  $\text{g}/\text{cm}^3$ , conforme a equação (4.4).

$$d_a = \frac{\text{massa de amostra}}{\text{volume do leito}} \quad (4.4)$$

#### 4.3.4. Determinação da Porosidade Total do Leito

A porosidade total do leito ( $\varepsilon$ ) foi calculada através da relação entre a densidade real e a densidade aparente da amostra de bagaço de maçã, através da equação (4.5).

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad (4.5)$$

#### 4.4. Determinação da Densidade do Solvente $\text{CO}_2$

A densidade do solvente supercrítico ( $\text{CO}_2$ ) nas condições operacionais e ambientais foi determinada através da tabela termodinâmica de Angus et al. (1976), baseada em dados experimentais. Estes dados são necessários para a aplicação do modelo de transferência de massa descrito por Sovová (1994), e para avaliar a influência da densidade do solvente na solubilização do soluto.

#### 4.5. Extração com $\text{CO}_2$ Supercrítico (ESC)

Os procedimentos de extração supercrítica foram realizados no LATESC e consistiram em experimentos cinéticos (curvas de extração) e de determinação de rendimento global ( $X_0$ ). Ambos

os experimentos foram conduzidos através do método dinâmico de extração que consiste na passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida.

Para a obtenção dos extratos supercríticos de bagaço de maçã foram utilizadas duas unidades de extração, conforme descrito no item 4.5.1. e 4.5.2. Para ambos os equipamentos foram realizados ensaios para definir a quantidade de amostra e forma de empacotamento de leito de partículas para todos os experimentos de extração supercrítica, conforme discutido no item 5.1.1.

O equipamento de extração supercrítica 1 opera com pressão máxima de 230 bar e vazão de CO<sub>2</sub> na ordem de 0,5 – 5,0 g/min. E foi utilizado nos testes preliminares para determinação do tempo de secagem do bagaço fresco (item 4.1.2) e para obtenção de curvas de extração e dados de solubilidade na vazão de  $1,20 \pm 0,15$  g/min.

O equipamento de extração supercrítica 2 opera com pressões de até 300 bar e altas vazões de CO<sub>2</sub> na ordem de 1,6 – 41,6 g/min, e nele foram realizados os experimentos de obtenção de X<sub>0</sub>, de ESC com emprego de co-solvente, e curvas de extração na vazão de  $5,0 \pm 0,4$  g/min.

Os experimentos de rendimento global (X<sub>0</sub>), realizaram-se em duplicata e os extratos foram submetidos à análise do conteúdo fenólico, atividade antioxidante e perfil químico. A seguir é apresentada a descrição detalhada das unidades de extração de alta pressão empregadas neste estudo.

#### **4.5.1. Equipamento de Extração Supercrítica 1**

O equipamento de extração supercrítica 1 é composto de um cilindro de CO<sub>2</sub> com tubo pescador (R) que alimenta um tanque pulmão (P) de aço inox de 200 cm<sup>3</sup> encamisado com PVC (Suprilab, Campinas-SP) através de uma válvula de três vias (Hoke, modelo 7165G4Y). Este tanque é resfriado através de um banho termostático (TC) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) cuja temperatura é programada para 1°C com o objetivo de garantir o estado líquido do solvente antes da sua entrada na bomba (B) (Thermo Separation Products, modelo 3200). O tanque pulmão possui um manômetro (PI2) para o controle da pressão com precisão de 0,5% (IOPE, modelo 01221-40-2). Através de uma válvula globo (Whitey, modelo SS-43S4) é possível a passagem do solvente para a bomba que opera no modo de pressão constante, fornecendo uma vazão de solvente adequada, normalmente entre 1 e 6 g/min. A tubulação que liga a bomba ao extrator é mantida submersa em um banho termostático (TC) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) programado para manter constante a temperatura de operação do sistema. Este banho também é responsável por manter constante a temperatura do extrator (E). Na entrada do extrator encontra-se acoplado um manômetro

(PI3) (Header, modelo H-11), onde a pressão de extração é monitorada. O extrator (Suprilab) é composto de um cilindro de aço inoxidável encamisado de 40 cm de comprimento, 2,1 cm de diâmetro interno, volume de 138,5 mL e extremidades rosqueadas, onde é formado o leito fixo de partículas. Na saída do extrator é conectada uma válvula agulha micrométrica (VM) (Swagelok, modelo SS-31RS4), onde ocorre a despressurização da mistura soluto/solvente, e sua conseqüente separação. A VM é aquecida com uma fita de aquecimento (Fisatom, modelo 5), sendo que o seu controle de temperatura é feito através de um potenciômetro (Quimis, modelo Q-323.2). Posteriormente à válvula micrométrica o extrato obtido é coletado em frasco de vidro âmbar (C) e, após o ponto de coleta, encontra-se conectado um bolhômetro (BL) onde são realizadas as leituras de vazão de solvente (LATESC, UFSC), mediante o deslocamento de coluna de líquido, conforme descrito por Jochmann (2000). Na Figura 4.2 é apresentado o esquema do equipamento 1, utilizado no processo de extração de bagaço de maçã com CO<sub>2</sub> supercrítico. A foto do equipamento encontra-se apresentada na Figura III do Anexo V.

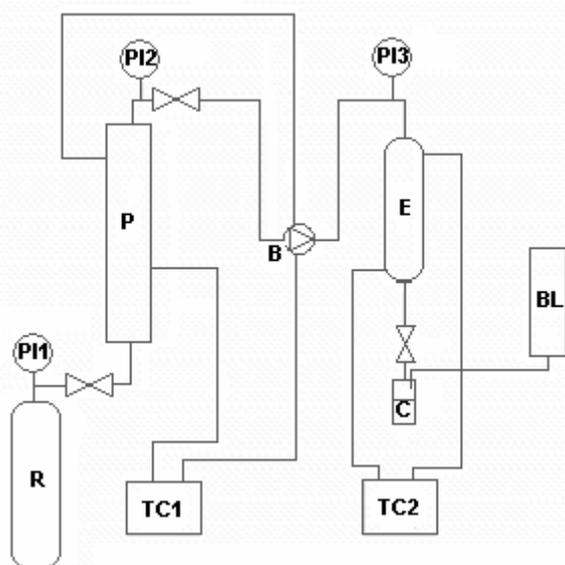


Figura 4.2 - Diagrama esquemático do equipamento de extração supercrítica 1.

Onde:

R - Reservatório de CO<sub>2</sub>

B - Bomba

C - Frasco de vidro âmbar

TC1 - Banho termostático 1

PI1 - Manômetro de controle do cilindro de CO<sub>2</sub>

PI2 - Manômetro do tanque pulmão

PI3 - Manômetro de controle do extrator

P - Tanque pulmão

E - Extrator

BL - Bolhômetro

TC2 - Banho termostático 2

#### 4.5.2. Equipamento de Extração Supercrítica 2

O equipamento de extração supercrítica 2 é composto de um cilindro de CO<sub>2</sub> com 99,9% de pureza (White Martins, Brasil) equipado com vara pescadora que alimenta diretamente a linha de extração. O CO<sub>2</sub> segue para um banho termostático (BT1) (Thermo Haake, C10-K10), com temperatura programada para 0°C. A solução de etileno glicol proveniente do banho termostático (BT1) circula em uma mangueira que envolve a bomba (1) (Maximator M111) garantindo que o CO<sub>2</sub> se mantenha no estado líquido. A bomba trabalha alimentada por ar comprimido filtrado mantido na pressão de 5 bar. A válvula globo (V1) (Tescom Cat nº 26-17610-24-161) é utilizada para regular a pressão de operação. O extrator (E) é constituído de um cilindro de aço inox encamisado de 31,6 cm de comprimento, 1,02 cm de raio, volume de 103,28 mL e extremidades rosqueadas. A linha que liga a bomba ao extrator bem como a linha após o extrator é mantida submersa em um banho termostático (BT2) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) programado para manter a temperatura constante em 65°C, de modo a evitar o congelamento da válvula micrométrica (V4). No início do processo de extração a válvula (V2) é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO<sub>2</sub> para o extrator. A temperatura do extrator é mantida constante na temperatura de extração desejada através de um banho termostático (BT3) (Thermo Haake, DC30-B30). Na saída do extrator é conectada uma válvula micrométrica (V4) para coleta de amostra. A válvula (V3) também conectada na saída do extrator auxilia a (V4) na despressurização do solvente. O rotâmetro (2) (ABB Automation Products 10 A 61) permite o controle do fluxo de solvente de 1,6 g/min a 41,6 g/min. O soluto é coletado em frasco âmbar (3) conectado após a (V4). A Figura 4.3 mostra o esquema do equipamento 2, utilizado no processo de extração de bagaço de maçã com CO<sub>2</sub> supercrítico. A foto do equipamento encontra-se apresentada na Figura IV do Anexo V.

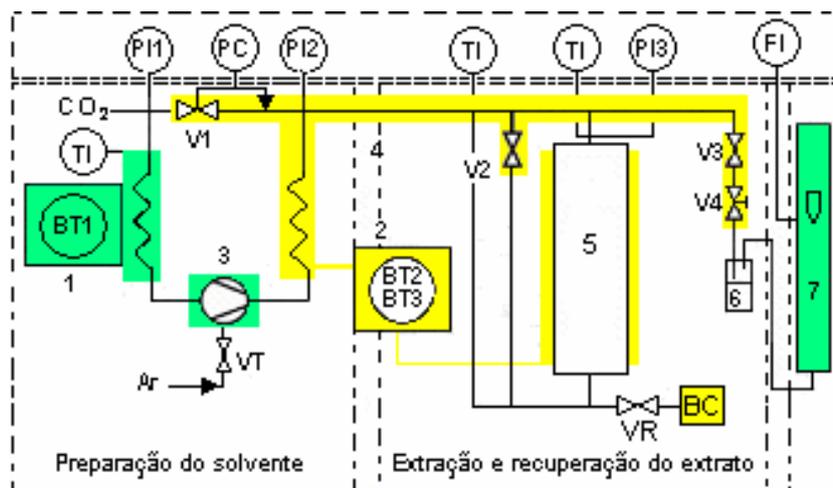


Figura 4.3 - Diagrama esquemático do equipamento de extração supercrítica 2.

Onde:

1 - Banho termostático

2 - Unidade de aquecimento

3 - Bomba de CO<sub>2</sub>

4 - Banho termostático

5 - Extrator

6 - Frasco coletor

7 - Medidor de fluxo (Kg CO<sub>2</sub>/h)

VT - Válvula de controle da frequência da bomba

V1 - Válvula da entrada do extrator

V2 - Válvula da entrada do extrator (Maximator Cat nº 3710.0104)

V3 - Válvula da saída do extrator (Sitec Shutoff valve 710.3010)

V4 - Válvula micrométrica (Sitec Microvalve 710.3012)

PI1 - Manômetro do cilindro (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10)

PI2 - Manômetro da bomba (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10)

PI3 - Manômetro do extrator (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10)

TI - Controladores de temperatura

VR - Válvula de retenção da bomba de co-solvente

BC - Bomba de co-solvente

Uma bomba de co-solvente (BC) foi acoplada ao Equipamento 2 de extração supercrítica, como mostra a Figura 4.3 para a adição de co-solvente junto ao CO<sub>2</sub> supercrítico. Uma válvula de

retenção (VR) foi colocada após a bomba de co-solvente para evitar que o solvente orgânico retorne para a bomba de CS se houver um aumento na pressão da bomba de CO<sub>2</sub> durante o experimento. A bomba de CS trabalha em uma faixa de vazão de solvente de 0,1 a 10 ml/min.

#### 4.5.3. Determinação do Rendimento Global ( $X_0$ )

Os experimentos de rendimento global foram realizados no equipamento de extração supercrítica 2 através da coleta do material extraído em um frasco de vidro âmbar previamente pesado, por um período de 3 horas de extração para as condições de temperatura de 30, 40 e 50 °C, pressões de 150, 200 e 250 bar e vazão fixa de  $5,0 \pm 0,4$  g/min. Os experimentos foram conduzidos por meio de um planejamento fatorial completo,  $3^2$ , para dois fatores (temperatura e pressão) e três níveis (-1, 0, +1) com uma replicação de acordo com a descrição do item 4.9. O tempo de extração foi definido através da observação da curva de extração obtida a 200 bar, 40°C e vazão de solvente de 5 g/min conforme explicado no item 5.1.1, sendo fixado em 3 horas e totalizando um consumo de 900 g de CO<sub>2</sub>.

Ao término de cada extração o frasco contendo o extrato coletado era pesado em balança analítica e armazenado em freezer doméstico a -18°C. Posteriormente, o rendimento global ( $X_0$ ) era calculado através da razão entre a massa de extrato ( $m_{\text{extrato}}$ ) obtida pela massa de bagaço de maçã ( $M_{\text{amostra}}$ ) utilizada para formar o leito conforme a equação (4.6).

$$X_0 = \frac{m_{\text{extrato}}}{M_{\text{amostra}}} \cdot 100 \quad (4.6)$$

Os experimentos de  $X_0$  para extração supercrítica com co-solvente foram realizados de forma aleatória no equipamento 2 para uma condição operacional fixa de 150 bar, 30°C e vazão de  $5,0 \pm 0,4$  g/min por um tempo de 3 horas de extração. Os solventes empregados foram etanol (P.A) nas concentrações de 5 e 10% (m/m) e acetona (P.A) na concentração de 5% (m/m). A quantidade de co-solvente necessária para a realização de cada ensaio foi calculada com base na massa de CO<sub>2</sub> consumida de 900 g que correspondem respectivamente aos volumes de etanol de 57 e 114 mL, e acetona de 57 mL. As concentrações de etanol e acetona utilizadas foram selecionadas visando a utilização de baixos volumes de solvente. Os extratos obtidos foram evaporados em evaporador rotatório (Fisatom, modelo 802) e pesados em balança analítica para a determinação do rendimento global através da equação (4.6).

Todos os experimentos de extração supercrítica para determinação de  $X_0$  do bagaço de maçã foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os extratos obtidos nas extrações de rendimento global foram utilizados para as análises referentes à determinação da atividade biológica dos extratos.

#### 4.5.4. Ensaio Cinético - Curvas de Extração

As curvas de extração do bagaço de maçã foram construídas através da massa de extrato acumulada em função do tempo de extração. Para determinação da curvas de extração dos extratos foram utilizados frascos de coleta previamente pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempos de 10, 20 e 30 minutos. Após a coleta do extrato, o frasco foi novamente pesado para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração.

Os ensaios cinéticos foram conduzidos nos dois equipamentos de extração supercrítica, utilizando  $\text{CO}_2$  puro nas condições de pressão de 150 e 200 bar, temperatura de 30, 40 e 50°C e vazão de  $1,20 \pm 0,15$  g/min (equipamento 1), bem como para as condições de pressão de 150, 200 e 250 bar, temperatura de 30, 40 e 50°C e vazão de  $5,0 \pm 0,4$  g/min (equipamento 2).

#### 4.6. Pré-análise: Preparo dos Extratos para Análise Quantitativa

Os extratos supercrítico, soxhlet e seqüencial, obtidos neste trabalho foram analisados quanto ao conteúdo de fenólicos, atividade antioxidante e composição química. No entanto para os extratos supercríticos foi necessária a introdução de algumas operações como fracionamento e separação antes da análise.

Inicialmente o solvente etanol demonstrou ser eficiente para a diluição dos extratos. As determinações de fenólicos e antioxidantes transcorreram conforme o esperado para os extratos obtidos via soxhlet e extração seqüencial, enquanto os extratos supercríticos na presença dos demais reagentes das análises, especificamente água que é utilizada na técnica de fenólicos e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico precipitou, liberando no sistema de reação grânulos esbranquiçados. Em determinações espectrofotométricas a ausência de turbidez no sistema é imprescindível, de forma que um outro caminho teve que ser tomado a fim de solucionar esse ocorrido. Testes foram realizados com diferentes solventes orgânicos líquidos na tentativa de selecionar um capaz de solubilizar o extrato e não gerar precipitados durante a reação. O hexano apresentou esta característica, provavelmente por apresentar a mesma polaridade do  $\text{CO}_2$ . No entanto a introdução de amostras apolares nos ensaios de fenólicos e  $\beta$ -caroteno (sistema aquoso), limitaria a técnica.

Desta forma, o extrato diluído em hexano foi fracionado com água, numa proporção (1:1) (v/v), centrifugado (Centrifugador Excelsa 3, Fanem LTDA, São Paulo) a 2000 rpm/min por 05 minutos, e depois separado através de funil de separação, as fases aquosa e orgânica.

A fase aquosa foi empregada para as análises de fenólicos e para o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico enquanto que as duas fases (orgânica e aquosa) foram utilizadas na técnica ABTS, uma vez que esta permite a quantificação de substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis.

A etapa de pré-análise foi realizada no Laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFSC, bem como as análises descritas no item 4.7 e 4.8.

#### 4.7. Determinação do Conteúdo Fenólico dos Extratos

Para a quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de bagaço de maçã e nas frações de ácidos fenólicos da amostra, foi empregado o método de Folin-Ciocalteu descrito por Budini et al. (1980). Este método está baseado na capacidade redutora do reagente em contato com compostos que contenham grupos capazes de serem oxidados. Este é um ensaio colorimétrico de oxi-redução que mede todas as moléculas fenólicas sem diferenciar entre ácido gálico, monômeros, dímeros, e compostos fenólicos grandes.

Para o ensaio retirou-se uma alíquota de 100  $\mu$ L do extrato e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu sob agitação, depois de 30 segundos foi adicionado 1,5 mL de solução de carbonato sódico a 20%. O balão foi completado com água destilada até o volume de 10 mL. A solução repousou por 2 horas à temperatura de 24°C ao abrigo da luz. Em seguida determinou-se a absorbância a 765 nm em espectrofotômetro Hewlet Packard modelo 8452 UV-VISIVEL.

Uma curva padrão de ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro) foi construída utilizando diferentes concentrações de ácido gálico (composto fenólico de referência) e encontra-se apresentada na Figura V do Anexo VI.

O conteúdo total de fenólicos pode então ser calculado através da equação (4.7):

$$\text{Fenólicos (mg GAE/100g}_{\text{Extrato}}) = \frac{C_1(\text{mg/L})}{C_2(\text{g/L})} \cdot 100 \quad (4.7)$$

Onde:  $C_1$  é a concentração de ácido gálico (mg/L) obtida na curva padrão a partir de um valor de absorvância conhecido e  $C_2$  é a concentração do extrato analisado (g/L). Os valores foram expressos em mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*) por 100g de extrato.

#### 4.8. Determinação da Atividade Antioxidante

##### 4.8.1. Método ABTS

A atividade antioxidante dos extratos e frações de ácidos fenólicos foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical monocation pré-formado ABTS<sup>+</sup> [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico)] (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) é gerado pela oxidação química do ABTS, e é reduzido na presença de antioxidante doador de hidrogênio (ex. flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides e antioxidantes do plasma). As influências de ambas as concentrações de antioxidantes e duração da reação na inibição da absorção do cátion radical são levadas em consideração quando se determina a atividade antioxidante. O método é aplicável para o estudo de soluções antioxidantes hidro e lipossolúveis, compostos puros e extratos de alimentos.

Utilizou-se o Trolox, vitamina E sintética; (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) como antioxidante referência, que foi preparado em etanol e estocado como solução padrão. O ABTS foi dissolvido em água até a concentração de 7,4 mM, e submetido à reação com 2,45 mM de persulfato de potássio para a formação do radical. A mistura ficou no escuro à temperatura ambiente de 12 a 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS<sup>+</sup> foi diluída em etanol até uma absorvância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425A para os tempos 0, 1, 4, 6 e 7 minutos após a adição da amostra na solução de ABTS<sup>+</sup>. A porcentagem de inibição do radical foi calculada através da equação (4.8).

$$\%Inibição = 1 - \left( \frac{Abs_f}{Abs_0} \right) \cdot 100 \quad (4.8)$$

Onde  $Abs_f$  é a absorvância após a adição da amostra ao radical ABTS para os tempos de 1, 4, 6 e 7 minutos e  $Abs_0$  é a absorvância do radical.

Uma curva padrão foi plotada em função do % de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox ( $\mu\text{M/mL}$ ) e encontra-se apresentada na Figura VI do Anexo VI.

Após a obtenção do % de inibição do respectivo extrato a atividade antioxidante (AA) foi calculada através da equação (4.9), com base na curva padrão de Trolox.

$$AA = \frac{C_a (\mu M / mL)}{C_e (g / mL)} \quad (4.9)$$

Onde;  $C_a$  é a concentração ( $\mu M/mL$ ) referente ao % de inibição obtido através da leituras espectrofotométricas do extrato no tempo de maior inibição e  $C_e$  é a concentração do extrato utilizada na técnica. Desta forma, os resultados foram expressos em  $\mu M$  TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) por g de extrato.

#### 4.8.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ Ácido linoléico

Este ensaio baseia-se na perda de cor do  $\beta$ -caroteno durante sua cooxidação com o ácido linoléico em uma emulsão aquosa, monitorada através do decréscimo da absorbância na região do visível. A adição de uma amostra contendo antioxidantes, antioxidantes individuais, ou extratos naturais resulta no retardo da perda de cor do  $\beta$ -caroteno.

A atividade antioxidante foi determinada *in vitro* pelo método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), empregando-se como substrato a solução de  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico, preparada com 30  $\mu L$  de  $\beta$ -caroteno + 60  $\mu L$  de ácido linoléico + 1,5 mL de clorofórmio + 12 gotas de Tween 40 como emulsificante e o solvente evaporado sob atmosfera de nitrogênio. A seguir adicionou-se 150 mL de água oxigenada (tratada com  $O_2$  por trinta minutos). A solução foi diluída até apresentar densidade ótica entre 0,6 e 0,7 na absorbância de 470 nm. Volumes de extratos na concentração de 200 ppm foram adicionados a 5 mL da solução de  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico. Este sistema foi mantido a 50°C, e medidas espectrofotométricas de absorbância a 470 nm foram monitoradas a cada trinta minutos, durante duas horas. Todas as determinações foram feitas em duplicata e acompanhadas por um controle sem antioxidante (branco) e outro com solução de BHT (butil-hidroxi-tolueno) na mesma concentração. Além disso, foi avaliado o sinergismo entre as amostras e o antioxidante sintético BHT, tendo as misturas a mesma concentração do extrato puro (200 ppm).

A atividade antioxidante foi calculada através da equação (4.10).

$$AA = 100 \cdot \left( 1 - \frac{abs_{extrato}^{t=0} - abs_{extrato}^t}{abs_{controle}^{t=0} - abs_{controle}^t} \right) \quad (4.10)$$

Onde:

AA: atividade antioxidante

$Abs_{extrato}^{t=0}$ : absorvância do extrato no início da reação (t=0);

$Abs_{controle}^{t=0}$ : absorvância do controle no início da reação (t=0);

$Abs_{extrato}^{t=t}$ : absorvância do extrato no tempo de reação para t=30,60,90 e 120 min;

$Abs_{controle}^{t=t}$ : absorvância do controle no tempo de reação t para t=30,60,90 e 120 min.

#### 4.9. Análise Estatística

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Tais ensaios são freqüentemente utilizados em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos e relações de variáveis de entrada (parâmetros) sobre variáveis de saída (respostas) (SANTOS, 2006).

Os resultados de rendimentos obtidos na ESC com CO<sub>2</sub> puro e nas extrações convencionais foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância com o auxílio do software *Statistica 6.0*.

A literatura tem mostrado com freqüência a influência da temperatura e pressão de processos no rendimento global ( $X_0$ ) dos extratos obtidos via extração supercrítica (MICHIELIN et al., 2005; CARVALHO JUNIOR et al., 2005; ZANCAN et al., 2002). Para avaliar a importância desses fatores, optou-se por empregar uma das técnicas utilizadas na modelagem de processos que é a metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*). Aplicou-se um planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup>, sendo temperatura (°C) e pressão (bar) as variáveis estudadas e representadas respectivamente por P e T, conforme apresentado na Tabela 4.1. Os efeitos das variáveis de processo (P e T) no rendimento ( $X_0$ ) foram avaliados de forma combinada, representando as interações entre temperatura e pressão.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata e de maneira aleatória. A superfície de resposta foi ilustrada através de gráfico tridimensional com o auxílio do módulo *Experimental Design*, do programa *Statistica 6.0*, apresentando a resposta como uma função de dois fatores e

mantendo-se constante as variáveis de processo como vazão de solvente, tempo de extração e massa de sólido.

*Tabela 4.1 - Variáveis e níveis de variação do planejamento fatorial 3<sup>2</sup>.*

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
T	30	40	50
P	150	200	250

Para os rendimentos obtidos através das extrações convencionais com duas replicações a ANOVA foi realizada considerando o tipo de extração como fator único. O teste de Tukey foi aplicado quando considerada significativa as diferenças entre as médias ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.10. Determinação do Perfil Químico**

O perfil de ácidos fenólicos da amostra de bagaço de maçã e dos extratos selecionados foi determinado pelo Laboratório de Lípidos da Universidade de São Paulo (USP-SP).

As amostras foram analisadas através de cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo Shimadzu, modelo GC 17<sup>a</sup>, equipado com detector de ionização de chama. As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por Dabrowski e Sosulski (1984), com modificações propostas por Moreira e Mancini Filho (2003). As condições de operação foram as seguintes: coluna semipolar DB5 (J & W<sup>®</sup>) medindo 30m x 0,25 mm com temperatura inicial de 150°C, isotérmica por três minutos; de 150°C para 300°C, aumentando 5°C/min. A temperatura da câmara de injeção foi de 250°C e a do detector foi de 300°C. Uma solução padrão foi preparada diluindo-se os 18 ácidos fenólicos em metanol, e uma alíquota desta solução foi adicionada ao padrão interno (ácido metil éster heptadecanóico) antes da injeção no cromatógrafo. A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos das amostras baseando-se num padrão interno e na concentração dos compostos da solução padrão.

#### 4.11. Modelagem Matemática

A modelagem das curvas de extração foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994) e Martínez et al. (2003) através do programa Mass Transfer desenvolvido por Correia et al. (2006) e disponível no LATESC.

Para a aplicação do modelo de transferência de massa de Sovová (1994), os parâmetros  $t_{cer}$ ,  $M_{CER}$  e  $Y_{CER}$  são necessários. Estes dados foram obtidos por meio do pacote estatístico SAS for Windows - versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e encontram-se apresentados no Anexo VII. O programa faz o ajuste simultâneo de duas retas à curva de extração obtida através da massa acumulada de soluto *versus* o tempo de extração. O valor de  $t_{CER}$  é obtido pelo ponto de interseção das duas retas e representa o tempo de duração da etapa de taxa constante de extração. O parâmetro  $M_{CER}$  (taxa de extração na etapa CER) é o valor da tangente da reta ajustada na etapa CER da curva de extração e a partir do mesmo obtêm-se o valor de  $Y_{CER}$  (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) através da equação (4.11).

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad (4.11)$$

A solubilidade ( $Y^*$ ), que pode ser representada pela inclinação das curvas de extração, na etapa de taxa constante de extração (CER) desde que o equilíbrio entre as fases sólida e fluida seja garantido, foi determinada experimentalmente através do método dinâmico de extração. A vazão utilizada para determinação da solubilidade experimental foi baseada no estudo feito por Danielski et al. (2007), que definiu a faixa de 0,9 g/min à 1,4 g/min para a solubilidade de oleoresinas em  $CO_2$  supercrítico, garantindo assim o tempo de contato entre as fases, necessário para alcançar o equilíbrio. Com os dados experimentais obtidos foram construídas as curvas de extração (massa acumulada de extrato *versus* massa acumulada de solvente utilizado). A curva de solubilidade foi realizada a 200 bar, 40°C e vazão de 1,20 g/min e construída através da massa de soluto acumulado *versus* a massa de solvente consumida. O ajuste de duas retas a esta curva foi realizado e a solubilidade do extrato de bagaço de maçã em  $CO_2$  supercrítico foi determinada a partir da inclinação da reta ajustada no período de taxa constante de extração (CER). Se a vazão de  $CO_2$  é adequada, esta inclinação corresponde ao valor de  $Y_{CER}$  (g soluto/g solvente) e é equivalente ao valor de  $Y^*$ , para a condição de temperatura e pressão específica quando o solvente está saturado com o soluto.

#### **4.12. Resumo dos Ensaio**

A Tabela 4.2 apresenta o resumo dos experimentos empregados para o estudo das propriedades antioxidantes do bagaço de maçã bem como o local de sua realização. Constam na Tabela 4.2 os procedimentos para caracterização da matéria-prima, as diferentes técnicas de obtenção dos extratos e as análises realizadas para cada extrato.

Tabela 4.2 - Resumo dos ensaios realizados com o bagaço de maçã.

Experimento			Análises				Tratamentos		
			Fenólicos	Atividade Antioxidante		Perfil Químico	Rend. (%)	Modelagem	Anova
				ABTS	$\beta$ -caroteno/ ác. linoléico				
Local de realização			LABQA	LABQA	LABQA	USP	LATESC	LATESC	LATESC
LABQA	Caracterização da amostra	Fração de AFL	x	x		x			
		Fração de AFES	x	x		x			
		Fração de AFEI	x	x		x			
LABQA	Extração Soxhlet	Hexano	x	x	x		x		x
		Acetona	x	x	x	x	x		x
		Etanol	x	x	x	x	x		x
		Água	x	x	x		x		x
LABQA	Extração Sequencial	Éter etílico	x	x	x		x		x
		Etanol	x	x	x		x		x
		Água	x	x	x		x		x
LATESC	ESC(CO <sub>2</sub> puro) [P(bar)/T(°C)/QCO <sub>2</sub> (g/min)]	150/30/5	x	x	x	x	x		x
		150/40/5	x	x	x		x	x	x
		150/50/5	x	x	x		x	x	x
		200/30/5	x	x	x		x		x
		200/40/5	x	x	x		x		x
		200/50/5	x	x	x		x	x	x
		250/30/5	x	x	x		x		x
		250/50/5	x	x	x		x		x
LATESC	ESC(CO <sub>2</sub> +CS) Tipo de solvente [P(bar)/T(°C)/CS(%)]	Etanol (150/30/5)	x	x	x		x		
		Etanol (150/30/10)	x	x	x		x		
		Acetona (150/30/5)	x	x	x	x	x		

LATESC - Laboratório Termodinâmica e Extração Supercrítica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

LABQA - Laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

USP - Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP/SP).

## 5. Resultados e Discussão

Para melhor compreensão dos resultados obtidos com as diferentes técnicas de extração e análises dos extratos de bagaço de maçã, o item 5 foi dividido em três partes:

Item 5.1 trata sobre os testes preliminares realizados para caracterização da matéria-prima e definição das condições de extração supercrítica do bagaço de maçã. Os itens 5.2 e 5.3 estão apresentados na forma de artigo da seguinte forma:

Item 5.2, apresentado com o título, “Avaliação de Extratos do Subproduto Agroindustrial de Maçã Obtidos por Técnicas de Extração a Baixa e Alta Pressão”, apresenta os dados referentes aos rendimentos da ESC com CO<sub>2</sub> puro e com co-solvente, e as extrações convencionais bem como a modelagem matemática das curvas de extração supercrítica do bagaço de maçã.

O item 5.3, apresentado com o título “Recuperação de Polifenóis Antioxidantes de Extratos do Subproduto Agroindustrial de Maçã (*Malus communis*)” e apresenta os resultados referentes ao conteúdo de fenólicos, atividade antioxidante e perfil químico de ácidos fenólicos dos extratos selecionados bem como das frações obtidas da matéria-prima.

## 5.1. Testes Preliminares

Os testes preliminares foram realizados para caracterizar o bagaço de maçã utilizado como matéria-prima no presente estudo e definir alguns parâmetros do processo de ESC como a umidade da amostra, tamanho das partículas e quantidade de bagaço de maçã para formação do leito de extração e tempo de extração.

### 5.1.1. Ensaio Preliminares de ESC

Os testes iniciais de ESC foram realizados para definir as condições de extração supercrítica adequadas à extração de bagaço de maçã com CO<sub>2</sub> a alta pressão. Um ensaio foi realizado para definir o teor de umidade da amostra a ser utilizada em todos os experimentos de extração. Depois de determinar o conteúdo inicial de umidade do bagaço fresco,  $84,2 \pm 0,1\%$  (m/m), este foi conduzido para secagem em estufa a  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  e amostras secas nos tempos de 24 e 33 horas foram submetidas a ESC para avaliação da influência do teor de umidade da amostra no rendimento de extração. O ensaio foi conduzido no equipamento 1 de extração supercrítica (item 4.5.1) por meio da determinação do rendimento global de extração ( $X_0$ ). A condição operacional empregada foi de 150 bar,  $40^\circ\text{C}$ , vazão de  $0,6 \pm 0,1$  g/min e 6 horas de extração. O leito extrator foi formado por 27g de amostra, sendo o restante do volume completado com esferas de vidro. A amostra seca por 24 horas apresentou um teor de umidade de  $34,1 \pm 0,2$  (m/m) e rendimento de extração de 0,20%. Enquanto que a amostra seca por 33 horas apresentou um teor de umidade de  $11,5 \pm 0,2$  (m/m), e um rendimento de extração de 0,34%. Observa-se que a secagem realizada por 33 horas favoreceu o aumento de massa extraída, provavelmente devido a redução da umidade da amostra.

O tamanho das partículas de bagaço de maçã utilizadas para a formação do leito de extração foi referente a fração de -32/+80 mesh conforme explicado no item 4.1.3. Esta fração foi selecionada devido ao maior rendimento no peneiramento e por proporcionar uma compactação adequada e reprodutível do leito de extração supercrítica. Foram testadas as quantidades de 27 e 20 g de bagaço de maçã para formação do leito, sendo que se optou por fixar a quantidade de 20 g visando a economia da matéria-prima e do solvente supercrítico bem como a redução do tempo de extração. O volume ocupado pela massa de 20 g de bagaço de maçã foi calculado através da altura preenchida por esta massa e o raio do extrator. A quantidade de 20 g de bagaço de maçã ocupou  $23,72 \pm 0,02\%$  do volume total do extrator do equipamento 1 e  $32,10 \pm 0,02\%$  do equipamento 2, sendo que o restante do volume para ambos os extratores foram complementados com esferas de vidro.

O tempo de extração para os experimentos de rendimento global da ESC com CO<sub>2</sub> puro e ESC com co-solvente realizados na vazão de 5 g/min ficou definido em 3 horas resultando em um consumo de CO<sub>2</sub> de 900 g. A Figura 5.1 apresenta a curva de extração a 200 bar, 40°C e vazão de 5,0 g/min representada pela massa de extrato acumulado (g) *versus* o tempo de extração (min). Observa-se que após 3 horas de extração a curva já se apresenta estável com tendência à taxa de extração nula.

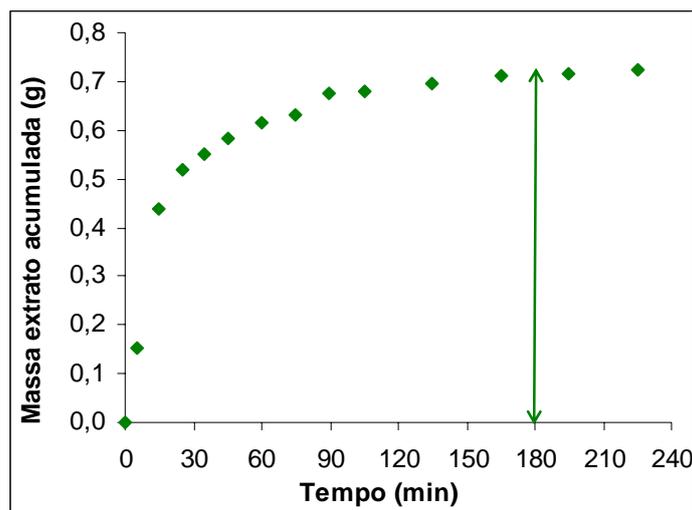


Figura 5.1 - Curva experimental da ESC do bagaço de maçã a 200 bar, 40°C e vazão de 5 g/min.

### 5.1.2. Caracterização da Matéria-Prima

O conteúdo de ácidos fenólicos presentes na amostra de bagaço de maçã utilizada neste estudo foi determinado pelo Laboratório de Lípidos, conforme mencionado no item 4.10, através das frações: ácidos fenólicos livres (AFL), ácidos fenólicos esterificados solúveis (AFES) e ácidos fenólicos esterificados insolúveis (AFEI) obtidos conforme explicado no item 4.1.4.

A Tabela 5.1 apresenta o resultado do perfil químico da amostra de bagaço de maçã. Os cromatogramas obtidos encontram-se apresentados no Anexo IX.

Na amostra foram detectados onze ácidos fenólicos, totalizando uma quantidade de 69,05 mg/g. Dentre as substâncias identificadas o ácido salicílico foi a substância majoritária, seguido dos ácidos protocatequínico e clorogênico. Juntos estes ácidos corresponderam a aproximadamente 93,4% da quantidade total de ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã. Segundo a Tabela 5.1 o bagaço de maçã utilizado apresenta compostos como os ácidos caféico, clorogênico e gálico que possuem atividade antioxidante comprovada, conforme explicado no item 3.1.1.

Tabela 5.1 - Composição química do bagaço de maçã (mg/g de amostra)<sup>(A)</sup>.

Composto	Frações		
	AFL	AFES	AFEI
Ácido Benzóico	-	0,19 ± 0,01	0,11 ± 0,02
Ácido Caféico	-	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Ácido Clorogênico	1,15 ± 0,40	-	-
Ácido Elágico	-	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Ácido Ferúlico	0,66 ± 0,90	-	-
Ácido Gálico	0,08 ± 0,08	0,06 ± 0,10	-
Ácido Gentísico	-	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Ácido Propilgalato	-	0,27 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Ácido Protocatequínico	1,72 ± 0,01	0,06 ± 0,09	0,05 ± 0,01
Ácido Salicílico	12,45 ± 0,8	47,42 ± 1,0	3,70 ± 0,10
Ácido Sináptico	0,63 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,01

<sup>(A)</sup> Os valores são médias ± o desvio padrão de determinações em triplicata.

Os flavonóides e ácidos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da maçã *in natura* bem como dos seus produtos derivados. A Tabela 5.1 mostra que muitos dos compostos que contribuem para a atividade biológica da fruta encontra-se remanescentes no bagaço, sendo que através de métodos adequados e viáveis de extração podem ser recuperados em forma de extratos concentrados permitindo um destino comercial aos subprodutos e gerando produtos de maior valor agregado.

## **5.2. Avaliação de Extratos do Subproduto Agroindustrial de Maçã Obtidos por Técnicas de Extração a Baixa e Alta Pressão.**

### **5.2.1. Introdução**

A moderna gestão agroindustrial preconiza a implantação de uma tecnologia limpa com um gerenciamento adequado dos resíduos produzidos em meio agrícola e nas indústrias processadoras de derivados. O crescimento da produção e processamento de maçãs no Brasil tem impulsionado estudos relativos à utilização do bagaço de maçã (SCHEMIN, 2003). Este bagaço é um resíduo industrial e é considerado o principal subproduto gerado pelo processamento de suco concentrado de maçã. É basicamente formado por uma mistura de casca, semente e mucilagem além de substâncias remanescentes da fruta *in natura* tais como os compostos fenólicos (flavonóides e derivados do ácido hidroxicinâmico), dentre outros que podem estar presentes em concentrações que permitam sua extração, trazendo vantagens econômicas e ambientais para as indústrias processadoras (PENG et al., 2005; LU e FOO, 2000). Os compostos fenólicos exibem variadas propriedades fisiológicas, tais como antiinflamatória, antitumoral, antioxidante, cardioprotetora, vasodilatadora e antiarterogênica devido a sua habilidade de capturar prótons e elétrons responsáveis pela oxidação lipídica (BALASUNDRAM et al., 2006; CIESLIK, et al., 2006). A extração supercrítica (ESC) é uma técnica de extração que dentre outras se destaca pela alta seletividade, uso de baixas temperaturas, habilidade de produzir extratos livre de solvente, gerando produtos de alta qualidade além de proteger o meio ambiente. Em comparação com as extrações que utilizam solventes orgânicos líquidos, os fluidos supercríticos apresentam uma alta difusividade, baixa densidade e preservam o extrato contra a degradação oxidativa dos compostos bioativos (GRIGONIS et al., 2005; WOOD et al., 2006). Em alguns casos a ineficiência do CO<sub>2</sub> supercrítico em dissolver substâncias de maior polaridade, pode ser corrigida pela adição de co-solventes, também denominados de modificadores, que são comumente compostos polares (LANG e WAI, 2001). O objetivo deste trabalho foi a avaliação das condições de extração do bagaço de maçã e rendimento de processo bem como da modelagem das curvas experimentais de ESC utilizando os modelos de transferência de massa de Sovová e Martínez.

### **5.2.2. Materiais e Métodos**

A amostra utilizada neste trabalho foi o resíduo da produção de suco de maçã concentrado e clarificado obtido da Fischer Sucos<sup>®</sup> (Videira, SC, Brasil), conforme descrito no item 4.1.

O rendimento das extrações convencionais soxhlet e seqüencial, realizadas em triplicata com solventes de diferentes polaridades foi determinado conforme descrito no item 4.2.

A determinação dos valores de rendimento global ( $X_0$ ), definido pela quantidade de soluto extraído pelo solvente, para condições estabelecidas de pressão e temperatura, bem como com a utilização de co-solvente foi conduzida no equipamento ESC 2 (item 4.5.2), sob pressões de 150, 200 e 250 bar, temperaturas de 30, 40 e 50°C e vazão de 5,0 g/min, por um período de 3 horas. O leito fixo foi formado com  $(20,0 \pm 0,5)$  g de bagaço de maçã seco e triturado, conforme descrito no item 4.5.3. A amostra ocupou 32,1% do volume total do extrator e o restante do volume foi complementado com esferas de vidro. A ESC com co-solvente foi realizada a 150 bar e 30°C, vazão de  $\text{CO}_2$  de 5,0 g/min utilizando os co-solventes etanol e acetona em concentrações de 5 e 10% (m/m), conforme descrito no item 4.5.3.

Curvas de extração supercrítica do bagaço de maçã foram obtidas conforme descrito no item 4.5.4 e a modelagem matemática segundo o item 4.11 com o auxílio do programa Mass Transfer, desenvolvido por Correia et al. (2006) e disponível no LATECSC. A determinação do diâmetro das partículas de bagaço de maçã utilizadas na formação do leito de extração foi realizada conforme o item 4.3.1 e calculada segundo Gomide (1983). A densidade real ( $d_r$ ) e a densidade aparente ( $d_a$ ) foram calculadas conforme descrito no item 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente. A porosidade total do leito de extração foi obtida a partir dos valores da densidade real e aparente, conforme descrito no item 4.3.4. Para a modelagem das curvas de extração do bagaço de maçã foram utilizados dois modelos de transferência de massa baseados no balanço de massa do leito de extração: o modelo apresentado por Sovová (1994) e Martínez et al. (2003), conforme explicado no item 3.7 e nos Anexos I e II.

Os resultados de rendimento para as diferentes técnicas de extração foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, com o auxílio do software *Statistica 6.0*. O teste de Tukey foi aplicado para avaliar as diferenças significativas ao nível de 5% entre os pares de médias dos tratamentos. Para avaliar a influência das variáveis de processo temperatura e pressão no rendimento global da extração supercrítica empregou-se a metodologia de superfície de resposta (RSM), *Response Surface Metodology*, conforme descrito no item 4.9.

### 5.2.3. Resultados e Discussão

**Rendimento das Extrações Convencionais.** A Tabela 5.2 apresenta os resultados dos rendimento obtidos nas extrações soxhlet e seqüencial utilizando os solventes hexano, éter etílico, acetona, etanol e água deionizada.

Em ordem decrescente de rendimento para extração soxhlet, temos o extrato etanólico ( $37,3 \pm 0,8\%$ ), seguido dos extratos aquoso ( $28,8 \pm 0,4\%$ ), acetônico ( $9,2 \pm 0,1\%$ ) e de hexano ( $4,8 \pm 0,7\%$ ). Os extratos mostraram diferenças estatísticas. O elevado rendimento do etanol demonstra a presença de compostos na faixa de sua polaridade (5,2), possivelmente extraídos também na fração aquosa, uma vez que a composição química das plantas é extremamente complexa, e muito freqüentemente permite a extração concomitante de vários tipos de substâncias de polaridade similar ou próxima.

Tabela 5.2 - Rendimento das extrações convencionais do bagaço de maçã.

Solvente	Polaridade*	Rendimento (%) (m/m) <sup>(A)</sup>	
		Soxhlet	Seqüencial
Hexano	0,0	$4,8 \pm 0,7^a$	-
Éter etílico	2,8	-	$6,7 \pm 0,1^e$
Acetona	5,1	$9,2 \pm 0,1^b$	-
Etanol	5,2	$37,3 \pm 0,8^c$	$3,7 \pm 0,1^f$
Água	9,0	$28,8 \pm 0,4^d$	$12,5 \pm 0,1^g$

Letras diferentes na mesma coluna implicam em diferença significativa entre os extratos.

<sup>(A)</sup> Os valores são médias  $\pm$  o desvio padrão de determinações em triplicata.

\* Byers (2006).

Os extratos obtidos via extração seqüencial também mostraram diferenças estatísticas. O maior rendimento obtido com esta técnica foi do extrato aquoso ( $12,5 \pm 0,1\%$ ) seguido do etílico ( $6,7 \pm 0,1\%$ ) e etanólico ( $3,7 \pm 0,1\%$ ). A utilização do éter etílico como o primeiro solvente extrator pode ter facilitado a solubilização dos compostos mais polares nas etapas seguintes. O maior rendimento do extrato aquoso pode ser atribuído a extração de grupos de alto peso molecular, tais

como açúcares e mucilagens que segundo Chen et al. (1988) são encontrados numa concentração de 14g/100g no bagaço de maçã.

Ainda na Tabela 5.2 podemos observar que a extração seqüencial apresentou rendimentos inferiores aos encontrados na extração soxhlet quando se utilizou os solventes água e etanol. Tal comportamento pode ser argumentado pelo fato de que a extração seqüencial é uma técnica que busca esgotar a matriz vegetal ao utilizar uma seqüência de solventes em ordem crescente de polaridade evitando a saturação do líquido extrator, além de ser realizada à temperatura ambiente, em um curto intervalo de tempo (1 hora). Em contrapartida a extração soxhlet torna-se mais eficiente uma vez que faz uso de temperaturas referentes ao ponto de ebulição do solvente empregado, acelerando a velocidade de extração e é aplicada por um intervalo de tempo de 6 horas.

Através dos métodos convencionais de extração utilizados para a obtenção de extratos de bagaço de maçã, pode-se observar que a possibilidade de renovação do solvente durante a extração favorece a velocidade de dissolução das substâncias, uma vez que o solvente não se satura, bem como da agitação, que abrevia consideravelmente a duração do processo extrativo. Observou-se também que o aumento da temperatura favorece a solubilização do soluto e são mais rápidos que aqueles realizados à temperatura ambiente, contudo o calor compromete a qualidade do extrato em decorrência da instabilidade de muitas substâncias.

Os valores de rendimento determinados através dos extratos convencionais possibilitaram a seleção do co-solvente a ser empregado na ESC. O solvente etanol foi selecionado devido ao maior rendimento de extração dentre os demais solvente polares testados (Tabela 5.2), enquanto que o solvente acetona apresentou o melhor resultado de atividade antioxidante, conforme descrito no item 5.3.3.

**Rendimento Global da ESC com CO<sub>2</sub> Puro.** A Tabela 5.3 apresenta o rendimento global da ESC do bagaço de maçã com CO<sub>2</sub> puro, em função das diferentes condições de temperatura (°C), pressão (bar) e densidade do CO<sub>2</sub> (g/min<sup>3</sup>) no período de 3 horas de extração para uma vazão fixa de solvente de 5,0 g/min.

Conforme observado na Tabela 5.3 o maior rendimento obtido para ESC do bagaço de maçã foi de  $4,1 \pm 0,1\%$  para a condição de 250 bar e 50°C. Os resultados também indicam um aumento no rendimento de processo conforme o aumento da pressão para as temperaturas estudadas de 30, 40 e 50°C, devido ao aumento da densidade do solvente supercrítico, conforme explicado no item 3.6.1

O efeito da temperatura na taxa de extração, a uma pressão constante, é devido a dois mecanismos: um aumento na temperatura do processo aumenta a solubilidade devido ao aumento da pressão de vapor do soluto e reduz a solubilidade devido à diminuição da densidade do solvente (FERREIRA et al., 1999). Conforme a Tabela 5.3 pode-se observar que a 150 bar o rendimento diminui de  $3,1 \pm 0,3\%$  para  $1,9 \pm 0,2\%$  quando se aumenta a temperatura de extração de  $30^\circ\text{C}$  para  $50^\circ\text{C}$ , devido a diminuição da densidade de solvente de  $0,835$  para  $0,701 \text{ g/cm}^3$ . O comportamento de diminuição do rendimento com o aumento da temperatura é observado para as extrações realizadas a 200 bar.

Tabela 5.3 - Rendimento global ( $X_0$ ) da ESC de bagaço de maçã com  $\text{CO}_2$  puro para diferentes condições de operação.

Pressão (bar)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	$\rho_{\text{CO}_2}$ ( $\text{g/cm}^3$ )*	$X_0$ % (m/m)
150	30	0,835	$3,1 \pm 0,3$
200		0,891	$3,3 \pm 0,2$
250		0,914	$3,4 \pm 0,3$
150	40	0,781	$2,8 \pm 0,1$
200		0,840	$3,1 \pm 0,1$
250		0,880	$3,6 \pm 0,1$
150	50	0,701	$1,9 \pm 0,2$
200		0,785	$2,9 \pm 0,1$
250		0,834	$4,1 \pm 0,1$

\*Angus et al. (1976).

Contudo, observa-se um comportamento contrário para a pressão de 250 bar, onde o aumento da temperatura de  $30^\circ\text{C}$  para  $50^\circ\text{C}$  ocasiona um aumento no rendimento de  $3,4 \pm 0,3\%$  para  $4,1 \pm 0,1\%$ . Este aumento no rendimento com a temperatura deve-se ao aumento da pressão de vapor do soluto que supera o efeito da diminuição da densidade do solvente, e promove uma maior solubilização do soluto no solvente supercrítico. Este comportamento é conhecido como fenômeno de retrogradação que representa a influência da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente na solubilidade do fluido supercrítico e no rendimento global da ESC.

A Figura 5.2 apresenta as isotermas de rendimento global da ESC de bagaço de maçã em função da pressão de operação conforme os dados da Tabela 5.3. As isotermas mostram um ponto

de inversão entre 200 e 250 bar, representando a região de retrogradação. Portanto, de acordo com os resultados da Tabela 5.3 e Figura 5.2, o efeito da densidade do solvente na solubilização da oleoresina de bagaço de maçã é dominante na faixa de pressão de 150 e 200 bar, enquanto que a pressão de vapor é o principal efeito no processo de solubilização acima do ponto de inversão, para as temperaturas estudadas.

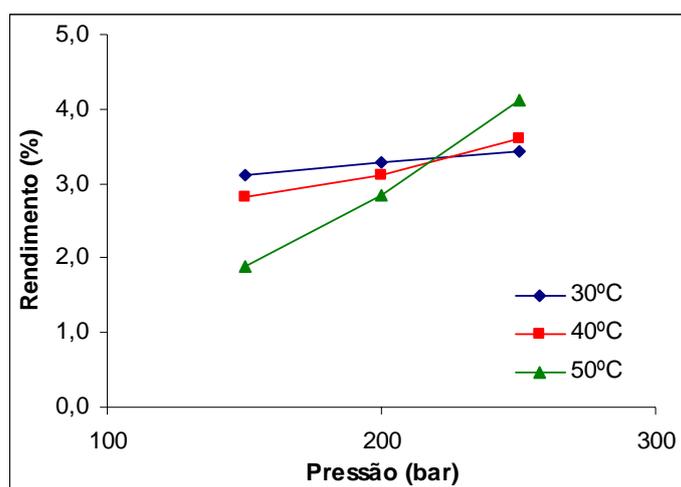


Figura 5.2 - Inversão das isotermas de rendimento para ESC de bagaço de maçã.

Michielin et al. (2005) observaram que a inversão das isotermas (30 e 40°C) para a oleoresina de cavalinha ocorreu entre 120 e 150 bar. Genena (2005) visualizou o efeito de inversão das isotermas para estudos com extrato de alecrim (30, 40 e 50°C) na pressão de 165 bar. Segundo Danielski et al. (2007) a inversão das isotermas de 20 e 30°C para o extrato de oleoresina de cavalinha ocorre a 170 bar.

Para avaliar os efeitos das variáveis temperatura (30, 40 e 50°C) e pressão (150, 200 e 250 bar) no rendimento global de ESC de bagaço de maçã foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, conforme descrito no item 4.9.

Segundo a ANOVA tanto a temperatura quanto a pressão tiveram efeito significativo no rendimento global da ESC do bagaço de maçã ao nível de 5%, demonstrando uma influência das variáveis avaliadas, temperatura e pressão bem como a combinação dos efeitos para os níveis estudados neste trabalho. A Figura 5.3 apresenta o comportamento do rendimento global em função da pressão e temperatura de extração através do gráfico de superfície de resposta.

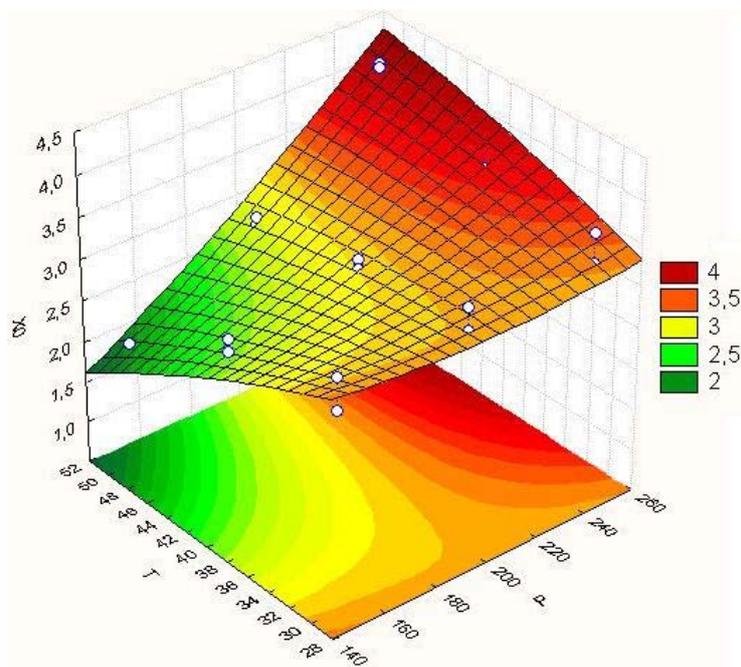


Figura 5.3 - Superfície de resposta do rendimento global da ESC de bagaço de maçã para diferentes condições de temperatura e pressão.

Analisando a Figura 5.3 observa-se que a região de maior rendimento, representada na cor vermelha escura, foi atingida ao empregar uma pressão de 250 bar e temperatura de 50°C. Para observar a dependência dos fatores, pressão e temperatura do rendimento no processo de extração supercrítica, uma equação polinomial de segunda ordem foi utilizada para ajustar as variáveis codificadas que são representadas pela equação (5.1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (5.1)$$

Sendo, Y a resposta experimental ( $X_0$ ),  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ , e  $\beta_{ij}$  os coeficientes de regressão;  $X_i$  e  $X_j$  as variáveis codificadas (T e P). Expandindo o modelo, para os efeitos linear e quadrático dos termos, podê-se obter a equação:

$$X_0 = 9,35 - 0,0401 \cdot P + 3,33e^{-5} \cdot P^2 - 0,1506 \cdot T - 6,8e^{-4} \cdot T^2 + 9,45e^{-4} \cdot T \cdot P \quad (5.2)$$

Os rendimentos das extrações convencionais, em geral, foram superiores aos obtidos nas extrações supercríticas, possivelmente devido a apolaridade do  $\text{CO}_2$ . Através do modelo de superfície de resposta foi possível observar que a região mais favorável à maximização dos valores de rendimento para os níveis estudados está entre (0 e +1).

**Rendimento da ESC com Co-solvente.** Como os resultados de rendimento da extração por soxhlet foram superiores aos da ESC consideramos a utilização de um solvente orgânico como co-solvente na extração supercrítica de bagaço de maçã, a fim de melhorar o rendimento global, ampliando o espectro de compostos da matriz sólida solubilizados pelo solvente. O CO<sub>2</sub> por ser apolar extrai preferencialmente compostos apolares, deste modo a adição de um co-solvente com característica polar junto a ESC faz com que compostos polares que antes não eram extraídos pelo CO<sub>2</sub> supercrítico passem a ser solubilizados pelo solvente (CO<sub>2</sub> + CS).

A ESC com co-solvente foi realizada a 150 bar, 30°C e vazão de 5,0 g/min por 3 horas, totalizando um consumo de solvente de 900 g. A seleção do etanol para co-solvente foi baseado nos resultados de rendimento de extração, e para a acetona foi devido aos resultados de atividade antioxidante obtidos no extrato acetônico da técnica soxhlet, apresentados respectivamente no item 5.2 e 5.3.

Para aumentar a polaridade do fluido supercrítico o solvente etanol de polaridade 5,2 (Byers, 2006) foi utilizado como co-solvente nas concentrações de 5 e 10% (m/m) e a acetona de polaridade 5,1 (Byers, 2006) foi testada apenas a 5% (m/m).

A Tabela 5.4 apresenta os resultados dos rendimentos obtidos na ESC com os co-solventes etanol e acetona.

*Tabela 5.4 - Rendimento da ESC de bagaço de maçã com co-solvente.*

<b>P(bar)/T(°C)</b>	<b>Co-Solvente</b>	<b>X<sub>0</sub></b> <b>% (m/m)</b>
150/30	CO <sub>2</sub> + 5% Etanol	3,28
	CO <sub>2</sub> + 10% Etanol	3,36
	CO <sub>2</sub> + 5%Acetona	3,14

Conforme observado na Tabela 5.4 o rendimento da extração, aumentou com o aumento da concentração de etanol. O mesmo comportamento foi observado por Almeida (2006), ao utilizar o etanol como co-solvente na ESC de hortelã (*Mentha spicata* L.). Este comportamento é um indicativo de que houve quebra nas interações soluto-matriz sólida e a substituição pelo co-solvente nos sítios ativos da matriz. As moléculas do solvente orgânico competem com os sítios ativos da

matriz para interagir com os compostos. Quanto mais moléculas de solvente disponíveis, mais interações matriz-compostos podem ser quebradas e desta forma as substâncias presentes na matéria-prima são solubilizadas pelo co-solvente (ALMEIDA, 2006).

O rendimento da ESC do bagaço de maçã a 150 bar e 30°C aumentou de 3,1% quando obtido com CO<sub>2</sub> puro, para 3,28% ao adicionar 5% de etanol e 3,14% com a adição de 5% de acetona, demonstrando uma maior eficiência do etanol na solubilização de compostos da amostra. Os diferentes grupos funcionais dos co-solventes selecionados podem ter influenciado no rendimento de extração.

De acordo com Campos (2005) que estudou a ESC adicionada de co-solvente etanol para extração de óleo de bagaço de uva, o etanol possui em suas moléculas o grupo –OH o que as torna capazes de formar ligações de hidrogênio entre si. A solvatação do soluto pelo solvente somente é possível devido ao rompimento das ligações de hidrogênio do soluto.

**Estudo Cinético da ESC do Bagaço de Maçã.** A Tabela 5.5 apresenta os resultados obtidos na caracterização do leito de partículas formado com 20 g de bagaço de maçã. Tal massa ocupou um volume de  $32,85 \pm 0,02 \text{ cm}^3$  no extrator do equipamento 1 e  $33,12 \pm 0,02 \text{ cm}^3$  do equipamento 2, sendo que o restante do volume para ambos os extratores foi complementado com esferas de vidro. As Informações da Tabela 5.5 foram utilizadas para a modelagem dos dados experimentais.

*Tabela 5.5 - Características do leito de partícula.*

	<i>Diâmetro médio (cm)</i>	<i>Densidade real (g/cm<sup>3</sup>)</i>	<i>Densidade aparente (g/cm<sup>3</sup>)</i>	<i>Porosidade do leito</i>
<b>Bagaço de maçã</b>	0,043	$1,403 \pm 0,001$	0,61	0,56

O efeito da vazão do CO<sub>2</sub> na ESC do bagaço de maçã pode ser observado na Figura 5.4 para a condição de 200 bar, 40°C e vazões de 1,20 e 5,0 g/min, obtidas respectivamente no equipamento 1 e 2 de extração supercrítica. Observa-se um aumento na taxa de extração com o aumento da vazão do solvente na primeira parte da curva que corresponde a etapa de taxa constante de extração (CER).

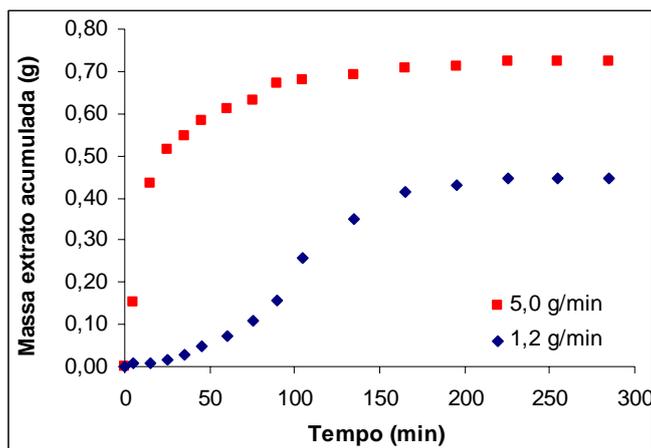


Figura 5.4 - Influência da vazão do  $\text{CO}_2$  na ESC do bagaço de maçã.

A maior disponibilidade de solvente no extrator por unidade de tempo proporciona um maior gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, ocasionando uma maior taxa de transferência de massa. Segundo Jochmann (2000), o aumento no rendimento da extração com o aumento da vazão deve-se a maior velocidade com que o solvente escoar no leito, diminuindo a espessura do filme que envolve a partícula sólida e conseqüentemente a resistência à transferência de massa.

Michielin et al. (2005) observaram efeito similar para a extração de oleoresina de cavalinha em  $\text{CO}_2$  supercrítico para as vazões de 1,11 e 2,84 g/min.

A Figura 5.5 apresenta o comportamento das curvas de extração obtidas a temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , pressões de 200 e 250 bar, e vazão de 5,0 g/min.

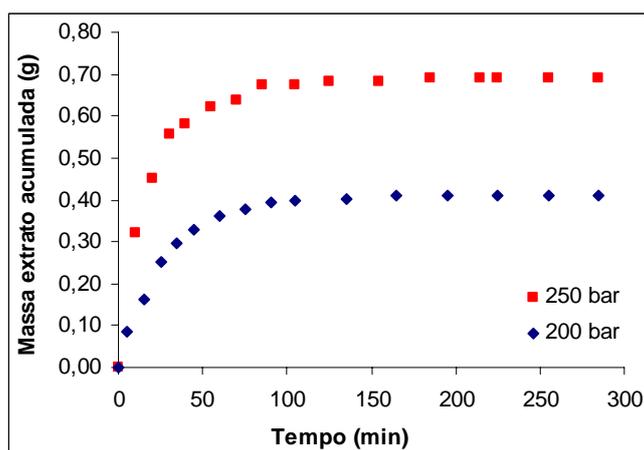


Figura 5.5 - Influência da pressão na ESC de bagaço de maçã.

Pode-se observar que quando se aumenta a pressão à temperatura constante ocorre um aumento da taxa de extração em todas as etapas do processo, devido ao aumento da densidade que a

200 bar é de 0,891 g/cm<sup>3</sup>, para 0,914 g/cm<sup>3</sup>, que reflete no poder de solvatação do CO<sub>2</sub> supercrítico. Desta forma para as maiores pressões temos os maiores rendimentos.

A Figura 5.6 apresenta o comportamento das curvas de extração obtidas a 150 bar, temperaturas de 30, 40 e 50°C e vazão de solvente de 1,20 g/min.

Segundo Jochmann (2000), a temperatura influencia o poder de solvatação do solvente supercrítico mediante dois mecanismos, o primeiro devido a redução da densidade do solvente com o aumento da temperatura e o segundo com relação ao aumento da pressão de vapor do soluto (ou volatilidade) com o aumento da temperatura.

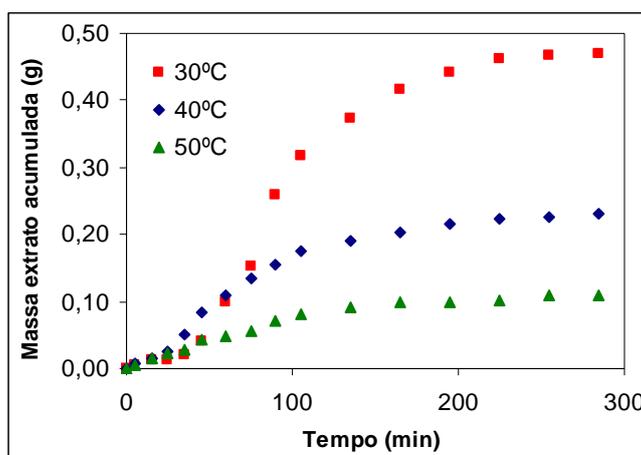


Figura 5.6 - Influência da temperatura na ESC de bagaço de maçã.

Estes dois efeitos são contrários e promovem a inversão das isotermas de rendimento que para a ESC de bagaço de maçã ocorreu entre 200 e 250 bar como apresentado na Figura 5.2. O efeito dominante sobre a solubilidade do soluto para pressões abaixo deste ponto é o da densidade do solvente enquanto que acima dele, o efeito da pressão de vapor do soluto prevalece sobre a solubilidade, conforme pode ser observado na Figura 5.6, onde o maior rendimento de extração, para a pressão de 150 bar é obtido na menor temperatura, ou seja de 30°C.

**Modelagem Matemática.** Para a modelagem das curvas de extração do bagaço de maçã foram utilizados dois modelos de transferência de massa baseados no balanço de massa do leito de extração: o modelo apresentado por Sovová (1994) e Martínez et al. (2003). As equações dos modelos utilizados são apresentadas no item 3.7. com detalhamento nos Anexos I e II.

A aplicação dos modelos exige o conhecimento de alguns parâmetros de processo como densidade do solvente (Tabela 5.3), densidade do sólido, porosidade do leito (Tabela 5.5), altura e

raio do leito de extração, solubilidade ( $Y^*$ ), fração de soluto extraível ( $x_0$ ), conteúdo total de soluto presente na fase sólida ( $O$ ) e massa total de sólido presente no extrator ( $m_t$ ).

A solubilidade foi calculada conforme o item 4.11 para a condição de 200 bar e 40°C e o valor obtido de  $3,1 \times 10^{-3}$  g de extrato/g de  $\text{CO}_2$  foi utilizado para a modelagem das curvas de extração. A altura e o raio do leito de extração foram 9,4 e 1,05 cm para o equipamento de extração supercrítica 1 e de 10,5 e 1,02 cm para o equipamento 2. O conteúdo total de soluto presente na fase sólida ( $O$ ) foi determinado considerando que o rendimento obtido no final de cada curva de extração corresponde a 90% do total de soluto presente na matriz sólida (FERREIRA, 1996; KITZBERGER, 2005). A fração de soluto extraível ( $x_0$ ) foi obtida pela razão do conteúdo total de soluto presente na fase sólida ( $O$ ) corrigido para 100% pela massa inerte ( $N$ ), conforme apresentado no Anexo I.

Os parâmetros  $t_{\text{CER}}$  (tempo de duração da etapa CER),  $M_{\text{CER}}$  (taxa de extração na etapa CER) que corresponde ao valor da tangente da reta ajustada na etapa CER da curva de extração e  $Y_{\text{CER}}$  (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) necessários para a aplicação do modelo de Sovová foram determinados utilizando o pacote SAS for Windows - versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), conforme descrito no item 4.11 e são apresentados Tabela 5.6. As curvas ajustadas pelo SAS para a determinação dos parâmetros  $t_{\text{CER}}$ ,  $M_{\text{CER}}$  e  $Y_{\text{CER}}$ , estão disponíveis no Anexo VII.

Os coeficientes de transferência de massa para a fase sólida ( $K_{xa}$ ) e fluida ( $K_{ya}$ ) e a razão mássica de soluto de difícil acesso ( $X_k$ ), ajustados pelo modelo de Sovová, são apresentados na Tabela 5.6, bem como os parâmetros ajustáveis,  $b$  e  $t_m$  do modelo LM em função das condições de pressão ( $P$ ), temperatura ( $T$ ) e vazão de  $\text{CO}_2$  ( $Q_{\text{CO}_2}$ ) utilizadas para a obtenção das curvas de ESC do bagaço de maçã.

Conforme a Tabela 5.6 podemos observar que o valor da constante  $K_{Y_a}$  aumenta com o aumento da vazão de solvente, o que era de se esperar pois  $K_{Y_a}$  é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, o qual é diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido, que por sua vez aumenta com o aumento da vazão de solvente.

Os valores obtidos para o coeficiente de transferência de massa na fase sólida ( $K_{x_a}$ ) foram inferiores aos coeficientes de transferência de massa na fase fluida ( $K_{y_a}$ ) indicando uma maior influência do processo convectivo na ESC do bagaço de maçã.

Tabela 5.6 - Parâmetros para a aplicação dos modelos de Sovová e Martínez.

P/T/Q <sub>CO2</sub> (bar/°C/g/min)	t <sub>CER</sub> (min)	M <sub>CER</sub> x 10 <sup>3</sup> (g/min)	Y <sub>CER</sub> x 10 <sup>3</sup> (g/g)	X <sub>k</sub> x 10 <sup>2</sup> (g/g)	k <sub>Ya</sub> x 10 <sup>2</sup> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>xa</sub> x 10 <sup>2</sup> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>m</sub> (min)	b x 10 <sup>2</sup> (min <sup>-1</sup> )
150/40/1,2	101,8	1,84	1,76	0,17	3,49	0,51	64,96	4,11
150/50/1,2	114,4	0,76	0,80	0,20	1,26	0,47	65,58	3,4
200/50/5,0	60,2	5,72	1,71	0,81	10,60	0,75	51,809	54,7

Na Tabela 5.6 nota-se também que o aumento da vazão de solvente de 1,2 g/min para 5,0 g/min propiciou o aumento da taxa de extração, reduzindo o período de taxa constante de extração (CER) devido ao aumento do parâmetro M<sub>CER</sub> (taxa de extração na etapa CER) e conseqüente diminuição do valor de t<sub>CER</sub> (tempo de duração da etapa CER).

O modelo de Martínez forneceu o melhor ajuste para os dados experimentais, conforme pode ser observado na Tabela 5.7, que apresenta os erros médios quadráticos (MSE) para os modelos avaliados nas diferentes condições estudadas.

Tabela 5.7 - Erros médios quadráticos obtidos nos modelos empregados.

P/T/QCO2 (bar/°C/g.min)	Sovová X 10 <sup>3</sup>	LM (Martínez) X 10 <sup>3</sup>
150/40/1,20	0,13	0,10
150/50/1,20	0,12	0,02
200/50/5,0	0,97	0,40

O modelo de Sovová não representou bem as curvas experimentais da ESC de bagaço de maçã, uma vez que a etapa CER, que é controlada pela convecção não está bem definida. O comportamento do modelo para a etapa CER deve-se provavelmente ao valor de solubilidade utilizado, uma vez que este varia com as condições de operação.

A Figura 5.7, obtida a 150 bar, temperaturas de 40 e 50°C e vazão de 1,2 g/min, e Figura 5.8, obtida a 200 bar, 50°C e vazão de 5,0 g/min, apresentam os dados experimentais obtidos para a ESC do bagaço de maçã bem como as curvas ajustadas para os dois modelos utilizados.

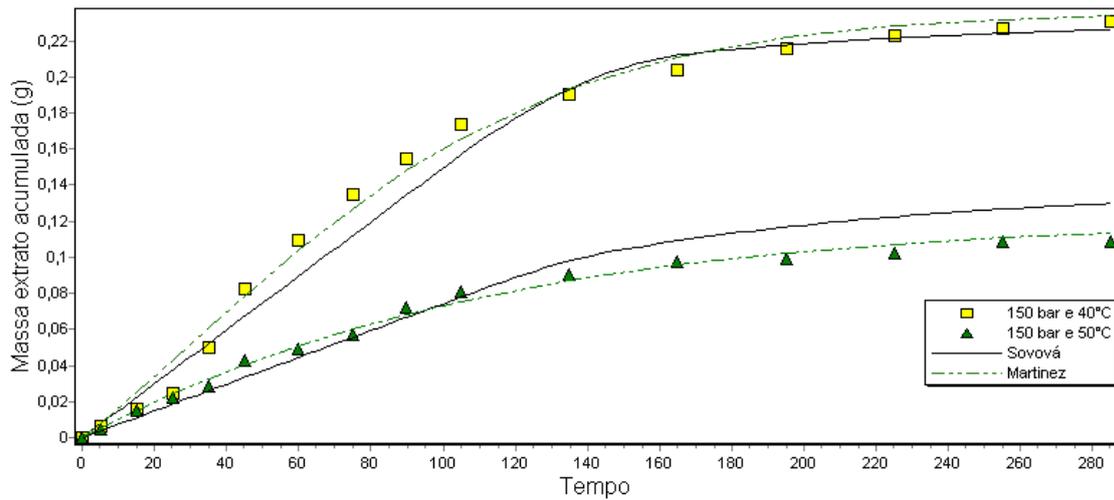


Figura 5.7 - Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de bagaço de maçã para a condição de 150 bar, temperaturas de 40 e 50°C, e vazão de 1,20 g CO<sub>2</sub>/min.

Observa-se na Figura 5.7 e Figura 5.8 que o modelo de Sovová não representou bem os dados experimentais referentes à etapa CER, apresentando desta forma, erros médios quadráticos maiores que aos atribuídos ao modelo de Martínez.

Campos (2005), observou que um melhor ajuste do modelo de Sovová foi promovido pela melhor definição da etapa de taxa constante de extração (CER) para as curvas da ESC de bagaço de uva ao utilizar uma vazão de 11,67 g/min e  $x_0$  obtido diretamente das curvas para a condição de 150 bar e 40°C.

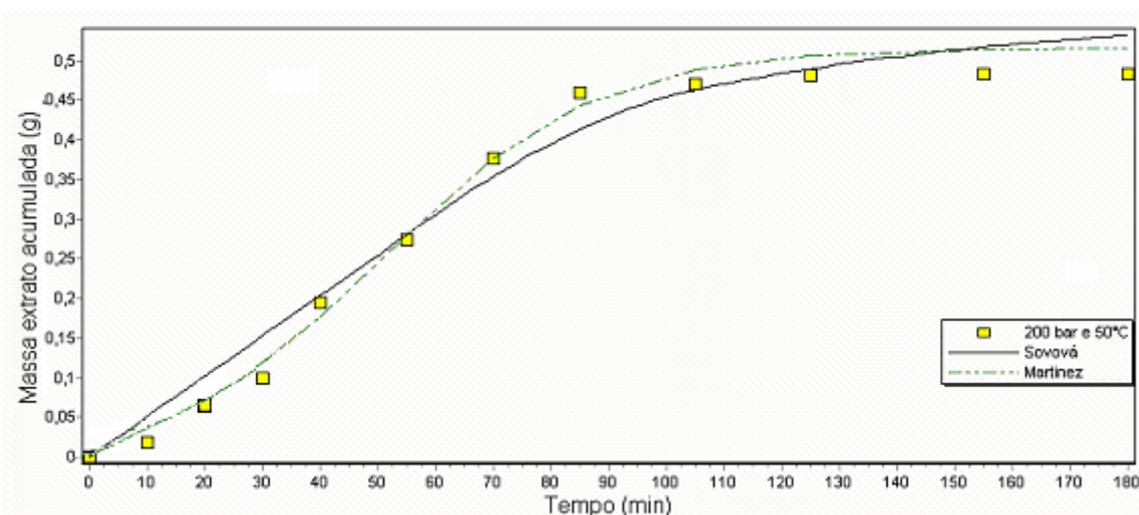


Figura 5.8 - Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de bagaço de maçã para a condição de 200bar, 50°C e vazão de 5,0 g CO<sub>2</sub>/min.

O modelo de Martínez et al. (2003) forneceu um melhor ajuste para os dados experimentais apresentados na Figura 5.7 e Figura 5.8. Segundo Sousa et al. (2005) os modelos com dois parâmetros ajustáveis são hábeis para obter os melhores ajustes dos dados experimentais, mas a razão para estes resultados não deve ser limitada somente ao número de parâmetros, mas também a uma boa identificação das etapas de extração. Embora o modelo de Sovová explique os fenômenos de transporte que ocorrem durante o processo de extração, este apresentou os maiores desvios entre os resultados experimentais e modelados em todas as condições utilizadas.

**Conclusão.** Os resultados observados em termos de rendimento mostraram que os compostos do bagaço de maçã são eficientemente extraídos pelo etanol, bem como pela água, solventes polares que possibilitam a extração de grupos de maior peso molecular, tais como açúcares, mucilagens e agliconas. Os efeitos da temperatura e pressão no rendimento de extração foram investigados para os extratos de bagaço de maçã obtidos por extração supercrítica, e demonstraram significativos ao nível de 5%. A condição de ESC à 250bar e 50°C, foi a mais eficiente, provavelmente favorecida pelo efeito de retrogradação promovida pelos fluidos supercríticos. A adição dos co-solventes etanol e acetona a 5 e 10% (m/m) permitiu um aumento de rendimento da ESC a 150 bar e 30°C quando comparado ao valor obtido para esta condição utilizando CO<sub>2</sub> puro, contudo estes valores não foram maiores aos obtidos pelas técnicas à baixa pressão. O modelo Logístico possibilitou um melhor ajuste dos dados experimentais das curvas da ESC do bagaço de maçã. A modelagem matemática das curvas de extração a partir dos dados experimentais é necessária à predição do processo de extração em outras escalas e condições operacionais.

### 5.3. Recuperação de Polifenóis Antioxidantes de Extratos do Subproduto Agro-industrial de Maçã (*Malus communis*)

#### 5.3.1. Introdução

A Investigação das atividades funcionais e farmacológicas, tais como, antioxidante, anti-tumoral, hipoglicêmica, hipocolesterolêmica, cardioprotetora e vasodilatadora de subprodutos agroindustriais tem sido o escopo de diversas pesquisas no mundo inteiro (LU e FOO, 1999; PESCHEL et al., 2005; BALASUNDRAM et al., 2006, CAMPOS, 2005; BAGGIO, 2006; FREITAS, 2006). Tal interesse deve-se ao fato de que muitos dos produtos residuais do beneficiamento de grãos de café, da produção de sucos, vinhos, cerveja, dentre outros, têm se demonstrado como fontes potenciais de compostos bioativos. Diversas substâncias bioativas em alimentos funcionais tem sido relatadas pelo seu benefício à saúde. Podem ser citados os isoprenóides (exemplos: carotenóide e tocoferóis), proteínas (aminoácidos, folato e colina) ácidos graxos (ômega-3 e esfingolípídeos), carboidratos (oligossacarídeos e ácido ascórbico), minerais (Ca, Se, K, Cu e Zn) e os compostos fenólicos (PIMENTEL et al., 2005). Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas e contribuem para o sabor, aroma e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. O grupo é constituído pelas cumarinas, taninos, ligninas, antocianinas, isoflavonas e flavonóides (CARVALHO et al., 2003). Muitos dos compostos fenólicos são constituintes de óleos voláteis e alguns são aromatizantes tradicionais como o aldeído cinâmico (na canela) e a vanilina, de amplo emprego na indústria de alimentos. Derivados de ácidos fenólicos têm exibido atividade antioxidante, como o ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico e seus ésteres. Essas evidências têm sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos possam ser retardadas pelos compostos fenólicos através da ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta ou por meio de suplementação. Alguns compostos fenólicos são amplamente utilizados na indústria farmacêutica como substância ativa ou adjuvante, como o ácido salicílico e guaiacol e, na indústria de alimentos como antioxidantes (CARVALHO et al., 2003). Os flavonóides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ou radical peróxido, atuando por sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Alguns flavonóides são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Esta atividade é o resultado de um

conjunto de propriedades, tais como atividade quelante de ferro, atividade sequestrante de radicais livres, inibição das enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase. Assim, os flavonóides podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

As técnicas para a extração de componentes ativos de substratos naturais evoluíram consideravelmente nos últimos anos. O processo de extração de matérias-primas por diversos solventes, como por exemplo, o hexano, os álcoois metílico e etílico, a acetona, passou a ser muito usado. O problema com os solventes é o fato de ser praticamente impossível remover todo o solvente residual sem um grande dispêndio de energia e custos; além disso, o solvente pode provocar alterações químicas nas moléculas (DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Um método seguro para extração de matrizes vegetais é a extração supercrítica (ESC). Esta técnica permite recuperar os aromas voláteis de vários tipos e não somente óleo volátil, de modo bastante eficiente. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO<sub>2</sub> é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nesta temperatura, o CO<sub>2</sub> atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO<sub>2</sub> retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES et al., 2003). O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antioxidante, o teor de polifenóis e identificar os ácidos fenólicos de extratos obtidos do bagaço de maçã, bem como avaliar a eficiência e seletividade das técnicas de extração utilizadas.

### 5.3.2. Materiais e Métodos

A amostra utilizada neste trabalho foi o resíduo da produção de suco de maçã concentrado e clarificado obtido da Fischer Sucos<sup>®</sup> (Videira, SC, Brasil), conforme descrito no item 4.1.

Os extratos de bagaço de maçã foram obtidos através de técnicas convencionais como a extração soxhlet e seqüencial, e através da extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> como solvente. As extrações soxhlet e seqüencial foram realizadas utilizando solventes de diferentes polaridades conforme descrito no item 4.2. Os extratos supercríticos foram obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico e CO<sub>2</sub> supercrítico com os co-solventes etanol e acetona, conforme descrito no item 4.5.3.

Os extratos obtidos por ESC com e sem co-solvente foram separadas nas fases aquosa e orgânica, conforme descrito no item 4.6.

O conteúdo de fenólicos foi determinado, através do método de Folin-Ciocalteu, sendo os valores expressos em mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*) por 100g de extrato, conforme descrito no item 4.7.

Os extratos foram submetidos a análise da atividade antioxidante pelo método de descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup> com persulfato de potássio e os resultados expressos em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), conforme descrito no item 4.8.1. O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi empregado para a avaliação da atividade antioxidante. Os extratos foram acompanhados por um controle sem antioxidante (branco) e outro com solução do antioxidante sintético BHT. O sinergismo entre as amostras e o BHT, também foi avaliado conforme descrito no item 4.8.2.

A identificação dos ácidos fenólicos dos extratos foi realizada com base nos tempos de retenção dos ácidos padrões através de cromatógrafo Shimadzu, modelo GC 17<sup>a</sup>, equipado com detector de ionização de chama, conforme descrito no item 4.10.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa *Statistica 6.0*. Aplicou-se análise de variância (ANOVA) para os extratos supercríticos determinados em duplicata e os extratos convencionais determinados em triplicata, sendo que as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey. Diferenças entre médias a um nível de 5% ( $P < 0,05$ ) foram consideradas significativas.

### 5.3.3. Resultados e Discussão

**Ácidos Fenólicos do Bagaço de Maçã.** Segundo Croft (1998), os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. Tais compostos de ligação, muitas vezes atuam como interferentes à quantificação e qualificação de matrizes vegetais. A separação dos ácidos fenólicos dos demais constituintes de uma amostra vegetal pode ser realizada ao empregar misturas de solventes orgânicos líquidos com diferentes polaridades, e através do ajuste do pH dos meios, conforme o proposto por Krygier et al. (1982) e também aplicado a este trabalho.

Desta forma, a quantidade total de ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã seco foi avaliada por meio de três frações de ácidos fenólicos. Após a eliminação de proteínas, polipeptídeos e ácidos graxos por meio de fracionamento, conforme descrito no item 4.1.4, os ácidos fenólicos livre, esterificado solúvel e insolúvel foram obtidos, e submetidos ao teste de Folin-Ciocalteu e do

radical ABTS. A quantidade dos compostos fenólicos totais, bem como a atividade antioxidante para as três frações estão representadas na Tabela 5.8.

As frações totalizaram um conteúdo de fenólicos de  $2.494 \pm 8$  mg/100g (GAE) e atividade antioxidante total de  $87 \pm 9$   $\mu$ M/g (TEAC). A fração de ácidos fenólicos de ésteres solúveis apresentou a maior atividade antioxidante, demonstrando que aproximadamente 66% do conteúdo fenólico do bagaço de maçã encontra-se intimamente ligada às cadeias de proteínas e polipeptídeos da estrutura celular da fruta.

Tabela 5.8 - Atividade antioxidante e conteúdo fenólico total das frações de bagaço de maçã.

Frações	Fenólicos <sup>(A)</sup>	ABTS <sup>(B)</sup>
<b>AFL<sup>x</sup></b>	623 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2
<b>AFES<sup>y</sup></b>	1.643 $\pm$ 7	54 $\pm$ 5
<b>AFEI<sup>z</sup></b>	228 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2

<sup>(A)</sup> Os compostos fenólicos são expressos em equivalente ácido gálico (mg/100g de extrato).

<sup>(B)</sup> Atividade antioxidante é expressa em equivalente Trolox (TEAC) em  $\mu$ M/g de extrato.

x, y, z Ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis, respectivamente.

Os valores são as médias  $\pm$  o desvio padrão de determinações em triplicata.

Segundo Shahidi e Naczh (2004), a maior parte dos fenólicos das maçãs estão situados no parênquima da fruta, ou seja, cerca de 64,9%. Misturas de solventes de polaridade moderada, como o metanol, acetona e água promoveram o rompimento das estruturas facilitando a liberação dos fenólicos antioxidantes.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) entre o conteúdo de polifenóis totais e a atividade antioxidante quantificado nas frações do bagaço de maçã foi de 0,987, indicando uma correlação linear positiva entre a atividade antioxidante e a propriedade redox dos fenólicos contidos nas frações do bagaço de maçã. O gráfico de correlação encontra-se apresentado no Anexo VIII. Apesar de não terem sua atividade antioxidante estudada extensivamente como a dos flavonóides, os ácidos fenólicos são importantes antioxidantes de frutas (AZUMA et al., 2000).

**Conteúdo Fenólico dos Extratos de Bagaço de Maçã.** A complexidade dos extratos vegetais requer uma ampla investigação da afinidade das classes de polifenóis formadores da matriz

vegetal pelos vários solventes de extração disponíveis. Sabe-se que as maçãs contêm vários compostos fenólicos, além de vitamina C, que são dotados de capacidade antioxidante. Como os fenólicos de plantas constituem um dos maiores grupos de compostos com extenso espectro de polaridade, e que agem como antioxidantes primários ou eliminadores de radicais, foi adequado determinar seu conteúdo total em todos os extratos de bagaço de maçã.

Os valores do conteúdo de compostos fenólicos dos extratos de bagaço de maçã obtidos através das extrações convencionais e ESC com CO<sub>2</sub> puro e com co-solvente, à uma vazão de 5,0 gCO<sub>2</sub>/min estão representados na Tabela 5.9.

Segundo Cieslik et al. (2006), o conteúdo de fenólicos da maçã pode variar entre 905 e 1030 mg/100g (GAE).

Tabela 5.9 - Fenólicos de extratos de bagaço de maçã obtidos por diferentes técnicas de extração.

ESC [P(bar)/T(°C)]	Fenólicos	ESC + Co- Solvente	Fenólicos	Extração Soxhlet	Fenólicos
150/30	64,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	Etanol 5%	100,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	Hexano	36 ± 8 <sup>a</sup>
200/30	43,4 ± 1,5 <sup>b</sup>	Etanol 10%	115,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	Acetona	61 ± 7 <sup>a</sup>
250/30	32,5 ± 0,5 <sup>c</sup>	Acetona 5%	169 ± 1 <sup>c</sup>	Etanol	402 ± 18 <sup>b</sup>
150/40	58 ± 1 <sup>d</sup>			Água	88 ± 16 <sup>a</sup>
200/40	42,0 ± 0,5 <sup>b</sup>			Extração Seqüencial	Fenólicos
250/40	29,5 ± 0,5 <sup>e</sup>			Éter etílico	45 ± 13 <sup>a</sup>
150/50	52,5 ± 0,5 <sup>f</sup>			Etanol	378 ± 15 <sup>b</sup>
200/50	38,7 ± 0,5 <sup>g</sup>			Água	64 ± 12 <sup>a</sup>
250/50	27,0 ± 0,5 <sup>e</sup>				

Para uma mesma técnica, valores dentro de uma coluna seguidos por letras iguais não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os compostos fenólicos são expressos em equivalente ácido gálico (mg /100g de extrato).

Dentre as diferentes técnicas de extração empregadas nota-se uma variação entre (27,0 ± 0,5 e 402 ± 18) mg/100g, GAE sendo o maior e menor valor atribuído ao extrato etanólico obtido via soxhlet, e ao extrato supercrítico obtido à 250 bar e 50°C, respectivamente. Pôde-se observar que o

conteúdo de fenólicos diminuiu com o aumento da pressão de extração passando de  $64,5 \pm 0,5$  mg/100g GAE a 150 bar e 30°C, para  $32,5 \pm 0,5$  mg/100g GAE a 250 e 30°C. O conteúdo de fenólicos obtido no extrato hexanólico ( $36 \pm 8$ ) mg/100g GAE foi compatível com os extratos supercríticos obtidos entre pressões de 200 e 250 bar, para as três temperaturas estudadas. Este fato sugere uma eficiência aproximada dos solventes CO<sub>2</sub> e hexano na extração de tais compostos, provavelmente pelo fato de ambos serem apolares e possuírem afinidade por substâncias altamente lipofílicas, lipídeos e óleos voláteis.

Lu e Foo (1998), ao analisarem o extrato hexanólico da semente do bagaço de maçã através de cromatografia gasosa concluíram que as mesmas são constituídas por aproximadamente 81% de ácidos graxos, dos quais o ácido linoléico (51,2%) é o ácido graxo majoritário.

A adição dos co-solventes etanol em concentrações de 5 e 10% (m/m), e acetona à 5% (m/m), favoreceu a extração de polifenóis aos extratos supercríticos obtidos à condição de pressão e temperatura de 150 bar e 30°C. Comparando-se os valores do conteúdo de fenólicos utilizando CO<sub>2</sub> puro ( $64,5 \pm 0,5$  mg/100g GAE) ao obtido empregando acetona a 5% (m/m),  $169 \pm 1$  mg/100g GAE, é possível observar um aumento de 2,6 vezes na quantidade de polifenóis extraídos. Contudo ao empregar 10% (m/m) de co-solvente etanol, observou-se que o conteúdo de fenólicos extraído foi de somente 1,8 vezes maior.

Murga et al. (2002) observaram que através do ajuste da quantidade de co-solvente etanol, uma maior variedade de compostos fenólicos contidos na semente de uva pode ser extraída através de CO<sub>2</sub> supercrítico, contudo o tipo de co-solvente empregado pode modificar este comportamento. Um sistema multicomponente caracteriza-se acima de tudo por sua complexidade.

A inserção do co-solvente acetona em CO<sub>2</sub> supercrítico, possivelmente favoreceu a extração de flavonóides, devido ao grupo carbonila (C=O), característica do grupo das cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres e aldeídos (MORRISON e BOYD, 1996). A carbonila também se encontra nas diversas classes de compostos fenólicos da maçã como os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico, além dos flavonóides, representado pelo núcleo flavilium (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003), conforme apresentado na Figura 5.9.

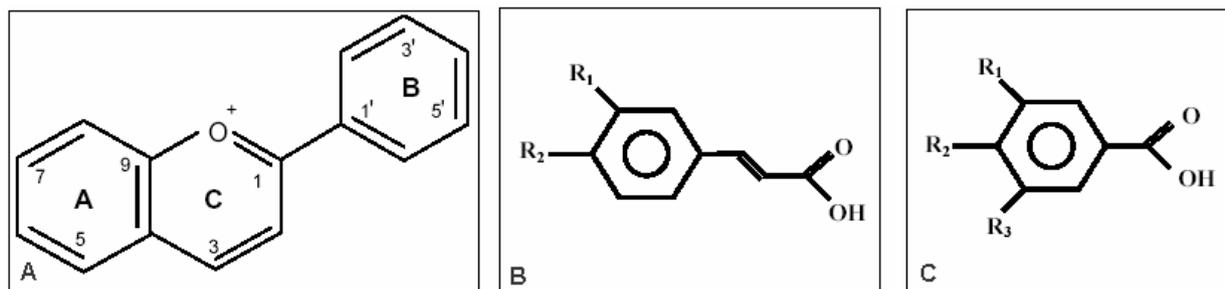


Figura 5.9 - Grupo carbonila representado pelas estruturas químicas genéricas A: núcleo flavilium, B: hidoxicinamatos e C: hidroxibenzoatos.

Peschel et al. (2005), analisaram o conteúdo de fenólicos do bagaço de maçã seco e obtiveram respectivamente para os extratos soxhlet de hexano, acetona, etanol e água:  $31,93 \pm 3,50$ ,  $27,97 \pm 0,76$ ,  $41,56 \pm 0,88$  e  $46,0 \pm 1,85$  mg/g (GAE). Os valores do conteúdo de fenólico obtidos por Peschel et al. (2005) foram superiores aos apresentados por este trabalho, contudo é importante salientar que os maiores valores estiveram representados também pelos solventes de polaridade moderada. Muito provavelmente o conteúdo de fenólicos tenha sido afetado por fatores como variedade, maturidade, estação de colheita, tipo de processamento, e origem geográfica da fruta (SHAHIDI e NACZH, 2004). Ao avaliar as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias de fenólicos obtidas pelos extratos via técnica convencional de extração, é possível observar que os extratos de hexano, acetona e água não diferiram estatisticamente entre si, bem como os extratos aquoso e etéreo da extração sequencial.

**Atividade Antioxidante Pelo Método ABTS.** A Tabela 5.10 apresenta os valores da atividade antioxidante dos extratos do bagaço de maçã mensuradas com relação a capacidade de seqüestro de radicais pelo radical  $ABTS^{*+}$ . Os extratos supercríticos sem e com co-solvente foram obtidos na vazão de  $5,0 \text{ g CO}_2/\text{min}$ .

Este método mede a habilidade da amostra em seqüestrar o radical  $ABTS^{*+}$ , comparada com uma quantidade padrão de Trolox, e é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de antioxidantes doadores de hidrogênio e de antioxidantes terminadores de cadeias (RE et al., 1999). Este método não se apresentou somente como sendo rápido e confiável, mas também como tendo a vantagem de ser um método aplicável aos sistemas hidrofílico e lipofílico.

Os valores de atividade antioxidante determinados para todos os extratos de bagaço de maçã estão apresentados na Tabela 5.10. Esses valores se referem ao somatório do total antioxidante

medido separadamente na fração orgânica e aquosa dos extratos supercríticos tratados conforme o descrito no item 4.6.

Os valores de atividade antioxidante variaram entre  $2,2 \pm 0,5$  e  $49,5 \pm 0,5$   $\mu\text{M/g}$  TEAC e são referentes aos extratos aquoso da extração seqüencial e extrato acetônico da extração soxhlet, respectivamente.

Tabela 5.10 - Atividade antioxidante pelo método ABTS de extratos de bagaço de maçã

ESC [P(bar)/T(°C)]	Atividade Antioxidante	ESC + Co- Solvente	Atividade Antioxidante	Extração Soxhlet	Atividade Antioxidante
150/30	$9,1 \pm 0,5^a$	<b>Etanol 5%</b>	$11,3 \pm 0,5^a$	<b>Hexano</b>	$10,6 \pm 0,5^a$
200/30	$7,7 \pm 0,5^b$	<b>Etanol 10%</b>	$15,5 \pm 0,5^b$	<b>Acetona</b>	$49,5 \pm 0,5^b$
250/30	$7,3 \pm 0,3^b$	<b>Acetona 5%</b>	$16,9 \pm 0,5^c$	<b>Etanol</b>	$27,4 \pm 0,5^c$
150/40	$8,9 \pm 0,5^c$			<b>Água</b>	$14,4 \pm 0,5^d$
200/40	$7,3 \pm 0,5^b$			<b>Extração Seqüencial</b>	Atividade Antioxidante
250/40	$6,8 \pm 0,5^b$			<b>Éter etílico</b>	$7 \pm 1^a$
150/50	$8,5 \pm 0,5^c$			<b>Etanol</b>	$14,6 \pm 0,5^b$
200/50	$7,3 \pm 0,5^b$			<b>Água</b>	$2,2 \pm 0,5^c$
250/50	$6,2 \pm 0,5^b$				

Para uma mesma técnica, valores dentro de uma coluna seguidos por letras iguais não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Atividade antioxidante é expressa em equivalente Trolox (TEAC) em  $\mu\text{M/g}$  de extrato.

A atividade antioxidante do bagaço de maçã foi analisada por Lu e Foo (2000), através do método DPPH. Dez polifenóis do bagaço de maçã previamente isolados exibiram um  $\text{EC}_{50}$  que variou entre 0,06 e 0,60, sendo o maior e menor valores atribuídos à procianidina B2 e a floridzina, respectivamente. Os autores concluíram que a atividade antioxidante do bagaço de maçã do estudo foi considerada boa, todavia substâncias isoladas tendem a apresentar comportamento diferenciado quando na presença de outras substâncias químicas.

Analisando a Tabela 5.10 observa-se que para a extração supercrítica os valores da capacidade antioxidante variaram entre  $6,2 \pm 0,5$  e  $9,1 \pm 0,5$   $\mu\text{M/g}$  TEAC sendo que o aumento da

pressão de extração influenciou a redução da capacidade antioxidante dos extratos, o que está de acordo com a Tabela 5.9 onde mostra uma redução na quantidade de polifenóis com o aumento da pressão de extração.

Ao se analisar os resultados obtidos pelos extratos supercríticos adicionados dos co-solventes etanol (5% e 10% [m/m]) e acetona 5% (m/m), podemos observar uma atividade antioxidante mais acentuada,  $16,9 \pm 0,5 \mu\text{M/g TEAC}$  para o extrato obtido com acetona a 5% (m/m). Estes valores correspondem a praticamente duas vezes o valor de antioxidantes obtidos com  $\text{CO}_2$  puro. A aplicação de solventes orgânicos líquidos e polares em baixas concentrações na extração supercrítica é um procedimento comumente empregado quando se pretende aumentar não somente o rendimento de extração, mas também quando se deseja obter classes de compostos polares, como os polifenóis (GRIGORIS et al. 2005). Para este trabalho, tal recurso permitiu uma maior solubilização de compostos polares como visto através dos valores ilustrados na Tabela 5.9 e Tabela 5.10. Admite-se uma maior solubilização de flavonóides pelo uso da acetona como co-solvente conforme observado na Tabela 5.9, o que conseqüentemente influenciou na capacidade antioxidante do extrato. Um efeito positivo para extração de compostos com potencial antioxidante foi evidenciado para o extrato soxhlet de acetona ( $49,5 \pm 0,5 \mu\text{M/g TEAC}$ ), uma vez que apresentou o maior valor antioxidante dentre as demais técnicas utilizadas. Lu e Foo (1999), isolaram e identificaram no bagaço de maçã liofilizado extraído com acetona 70%, polifenóis de baixo peso molecular denominados epicatequina, floridzina, floretina, ácido caféico e quercetina. Para a quercetina têm-se atribuído propriedades: antiviral, antioxidante, antiinflamatória, anti-hemorrágica e antitumoral, conforme descrito no item 3.1.1. Todos os extratos convencionais apresentaram-se significativamente diferentes ao nível de 5%. O extrato aquoso da técnica seqüencial apresentou o menor valor ( $2,2 \pm 0,5 \mu\text{M/g TEAC}$ ), enquanto que o extrato aquoso do método soxhlet forneceu uma atividade antioxidante de  $14,4 \pm 0,5 \mu\text{M/g TEAC}$ . Provavelmente, esta diferença seja devido ao mecanismo de extração da técnica seqüencial que consiste no esgotamento total do sólido pelos solventes empregados em ordem crescente de polaridade, logo as substâncias com polaridade intermediária tendem a se solubilizar no primeiro solvente utilizado, influenciando os teores de sólidos dos extratos posteriores.

**Atividade Antioxidante No Sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.** O ensaio do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi conduzido por um tempo total de duas horas, sendo que medidas da absorbância do controle, extrato, BHT (antioxidante sintético comercial) e sinergismo (extrato +

BHT) foram monitoradas a cada 30 min. A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% foi aplicada apenas aos valores médios obtidos com os extratos, conforme observado na Tabela 5.11, onde estão apresentados os valores da atividade antioxidante de todos os extratos de bagaço de maçã, testados uma concentração de 200 ppm.

Os extratos supercríticos obtidos na pressão de 150 bar para as três temperaturas testadas apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante frente aos extratos obtidos nas demais condições operacionais de extração. O extrato supercrítico obtido à 150 bar e 30°C apresentou a maior atividade do grupo,  $13,26 \pm 0,46\%$ , seguido dos extratos obtidos à 150 bar e temperaturas de 40°C,  $11,52 \pm 0,56\%$  e 50°C,  $12,97 \pm 0,53\%$ .

Ao avaliar as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias da atividade antioxidante obtidas pelos extratos supercríticos é possível observar que os extratos obtidos à 150 bar/30, 40 e 50°C e a 200 bar /40 e 50°C diferiram estatisticamente dos demais extratos do grupo.

A Figura 5.10 apresenta o comparativo entre as atividades antioxidantes dos extratos com a atividade do butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o sinergismo. O sinergismo permite avaliar a partir da associação de um antioxidante sintético com um natural, se o comportamento antioxidante é similar ao obtido apenas pelo antioxidante sintético. Constatando-se um efeito positivo, a recomendação na redução do antioxidante sintético nos alimentos pode ser possível.

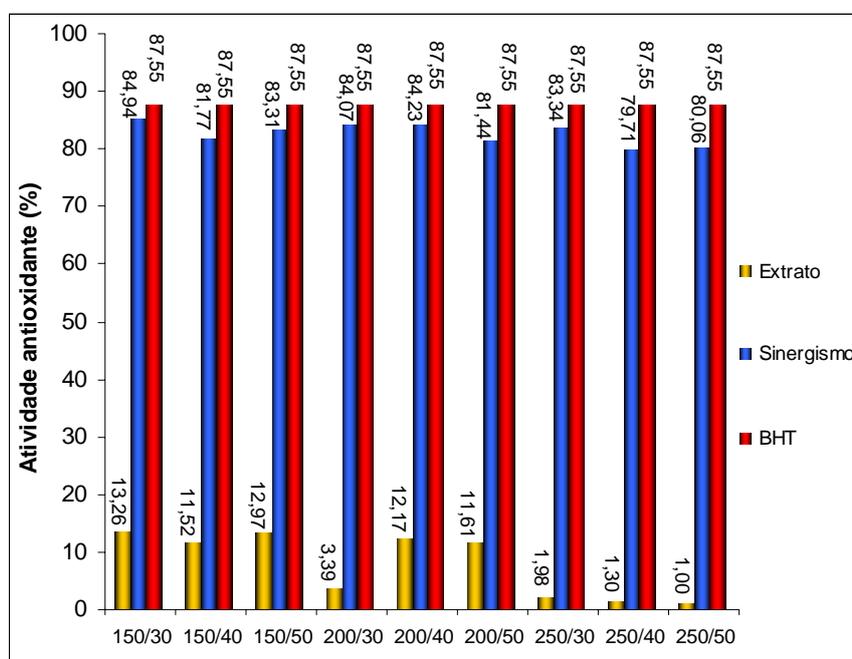


Figura 5.10- Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos extratos supercríticos, BHT e sinergismo

Tabela 5.11 - Atividade antioxidante (%) através dos sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico de extratos de bagaço de maçã obtidos por diferentes técnicas de extração.

Extração Supercrítica (CO <sub>2</sub> puro)					Extração Soxhlet				
P/T (bar/°C)	Tempo de reação (min)				Solvente	Tempo de reação (min)			
	30	60	90	120		30	60	90	120
150/30	32,73 ±	16,87 ±	13,64 ±	13,26 ±	Hexano	36,0 ±	12,17 ±	6,16 ±	5,03 ±
	1,43	1,03	0,65	0,46 <sup>a</sup>		1,84	0,81	0,63	0,56 <sup>a</sup>
200/30	27,72 ±	6,53 ±	5,05 ±	3,39 ±	Acetona	41,75 ±	15,71 ±	8,44 ±	7,43 ±
	1,91	1,10	0,57	0,31 <sup>b</sup>		1,29	1,03	0,91	0,60 <sup>b</sup>
250/30	28,59 ±	8,17 ±	2,94 ±	1,98 ±	Etanol	35,10 ±	12,48 ±	6,63 ±	5,22 ±
	1,64	1,30	0,47	0,24 <sup>b</sup>		1,87	1,06	0,29	0,22 <sup>a,b</sup>
150/40	33,02 ±	15,03 ±	11,72 ±	11,52 ±	Água	43,31 ±	17,58 ±	9,59 ±	8,51 ±
	1,62	1,22	0,80	0,56 <sup>a</sup>		2,27	1,64	0,97	0,77 <sup>b</sup>
200/40	51,04 ±	16,04 ±	13,41 ±	12,17 ±					
	2,74	1,96	1,50	1,21 <sup>a</sup>					
250/40	29,92 ±	7,66 ±	2,36 ±	1,30 ±					
	2,68	1,65	0,87	0,52 <sup>b</sup>					
150/50	41,72 ±	16,25 ±	13,58 ±	12,97 ±					
	2,51	1,20	0,81	0,53 <sup>a</sup>					
200/50	35,27 ±	15,77 ±	12,02 ±	11,61 ±					
	1,90	1,16	0,90	0,66 <sup>a</sup>					
250/50	28,34 ±	7,11 ±	1,65 ±	1,00 ±					
	1,06	0,80	0,68	0,45 <sup>b</sup>					
Extração Supercrítica (CO <sub>2</sub> + Co-Solvente)					Extração Seqüencial				
Solvente % (m/m)	Tempo de reação (min)				Solvente	Tempo de reação (min)			
	30	60	90	120		30	60	90	120
Etanol 5%	38,60 ±	17,21 ±	13,14 ±	12,16 ±	Éter etílico	35,82 ±	8,23 ±	4,50 ±	2,46 ±
	2,85	1,76	0,51	0,35 <sup>c</sup>		2,53	1,25	0,83	0,76 <sup>c</sup>
Etanol 10%	49,61 ±	23,82 ±	14,95 ±	13,32 ±	Etanol	41,05 ±	9,60 ±	4,75 ±	3,37 ±
	1,59	0,92	0,79	0,59 <sup>c</sup>		1,44	0,82	0,44	0,31 <sup>c</sup>
Acetona 5%	34,45 ±	15,42 ±	12,24 ±	12,01 ±	Água	48,37 ±	8,79 ±	6,05 ±	5,27 ±
	1,96	1,45	0,76	0,59 <sup>c</sup>		2,66	1,90	1,12	0,93 <sup>c</sup>

Para uma mesma técnica, valores dentro de uma coluna seguidos por letras iguais não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Todos os extratos supercríticos demonstraram uma atuação inferior a do BHT, sendo que o maior sinergismo, foi obtido pelo extrato obtido à 150 bar e 30°C, 84,94%, seguido do extrato obtido a 200 bar e 40°C, 84,23%. Ainda na Tabela 5.11 observa-se uma variação da atividade antioxidante dos extratos supercríticos com o tempo. A redução da atividade é expressiva após uma hora de reação do sistema. Tal característica demonstra uma baixa estabilidade das possíveis substâncias antioxidante do extrato, uma vez que não foram suficientemente capazes de neutralizar ou retardar a descoloração do  $\beta$ -caroteno promovida pelo radical linoleato e outros radicais formados no sistema, sob a condição de temperatura de 50°C.

Para os extratos supercríticos com co-solvente, determinados sob condição operacional de 150 bar e 30°C, pode-se observar através da Figura 5.11 que a maior atividade antioxidante, 13,32%, foi obtida ao empregar etanol em uma concentração de 10% (m/m) e que o maior sinergismo foi resultante da combinação do BHT com o extrato supercrítico adicionado de acetona 5% (m/m), de forma que isoladamente o BHT mostrou ser mais potente em neutralizar os radicais formado no sistema e assim evitar a perda de cor do  $\beta$ -caroteno. Os extratos supercríticos com co-solvente não apresentaram diferenças estatísticas, conforme observado na Tabela 5.11.

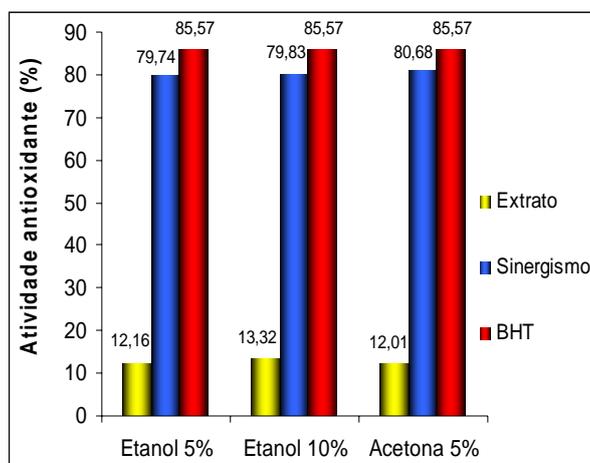


Figura 5.11 - Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico dos extratos supercríticos com co-solvente, BHT e sinergismo.

Todos os extratos obtidos por meio de técnicas convencionais de extração, soxhlet e seqüencial, apresentaram atividade antioxidante inferior as atividades apresentadas para todos ESC com co-solvente, bem como para os extratos supercríticos obtidos a 150 bar/30, 40 e 50°C, e 200 bar/ 40 e 50°C. De acordo com os dados da Tabela 5.11 e da Figura 5.12 observa-se para os extratos soxhlet que o maior sinergismo foi promovido pela extrato acetônico, 86,19%, seguido dos extratos etanólico, 85,83%, aquoso, 84,2% e de hexano, 82,6%.

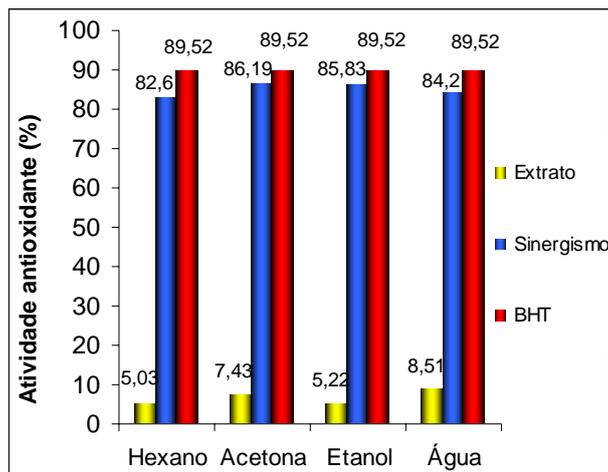


Figura 5.12 - Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos extratos soxhlet.

Ao analisar as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na atividade antioxidante dos extratos soxhlet pôde-se observar que os extratos aquoso e acetônico diferiram estatisticamente do extrato de hexano. O extrato de éter etílico obtido pela técnica seqüencial apresentou o maior sinergismo, de seu grupo, 86,42%, conforme observado na Figura 5.13. Sendo que os extratos desta técnica não apresentaram diferenças estatísticas.

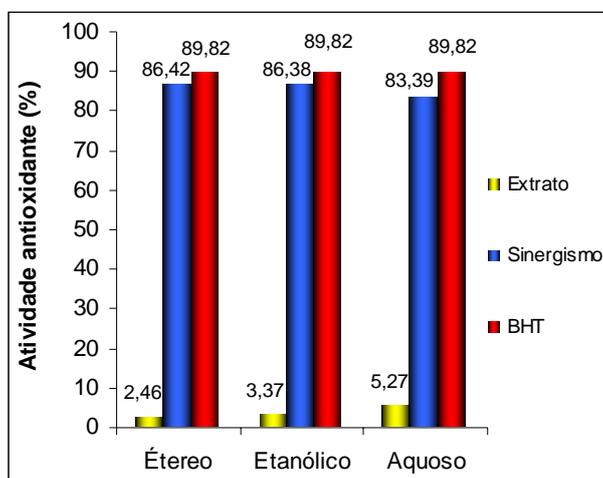


Figura 5.13 - Gráfico de valores do % antioxidante, através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos extratos seqüenciais.

Todos os extratos convencionais demonstram uma pequena capacidade em neutralizar ou retardar o efeito dos radicais liberados a 50°C, como o linoleato que é produzido pela esterificação do ácido linoléico.

Sob uma óptica geral, foi possível observar que a atividade antioxidante dos extratos testado no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, apresentaram baixa estabilidade quando comparado ao antioxidante sintético butil-hidroxi-tolueno. Os extratos supercríticos apresentaram percentuais de atividade antioxidante superiores aqueles obtidos pelos demais extratos.

**Perfil Químico de Extratos do Bagaço de Maçã.** A Tabela 5.12, apresenta o conteúdo de ácidos fenólicos identificados por cromatografia gasosa com ionização de chama. Foram selecionados os extratos supercríticos obtidos com CO<sub>2</sub> puro e com o emprego de 5% (m/m) de acetona, ambos obtidos na condição de 150 bar, 30°C e vazão de solvente de 5 g/min, bem como os extratos acetônico e etanólico da técnica soxhlet. Os cromatogramas referentes aos extratos selecionados encontram-se apresentados no Anexo IX.

Como pode ser observado na Tabela 5.12 o perfil químico dos extratos apresentaram compostos como os ácidos caféico,  $p$ -cumárico, ferúlico, protocatequínico e clorogênico, os quais possuem atividade biológica comprovada (LU e FOO, 1999, 2000; SROKA e CISOWSKI, 2003), conforme explicado no item 3.1.1. A substância majoritária dos extratos supercríticos com CO<sub>2</sub> puro e co-solvente, foi o ácido sináptico seguido do ácido clorogênico. As substâncias minoritárias foram o ácido caféico e salicílico, respectivamente para os extratos supercríticos com CO<sub>2</sub> puro e com 5% (m/m) de acetona. Diferentemente das frações, o ácido salicílico foi identificado nos extratos supercríticos em uma pequena quantidade enquanto que nos extratos acetônico e etanólico o mesmo ácido não foi identificado, significando que para o bagaço de maçã a atividade biológica dos extratos não é função somente da quantidade ou presença deste ácido. No extrato supercrítico com acetona 5% (m/m) os ácidos sináptico e caféico foram encontrados em concentrações maiores que aquelas presentes no extrato supercrítico com CO<sub>2</sub> puro.

A Tabela 5.12 apresenta que no extrato etanólico soxhlet foram identificados 13 ácidos fenólicos, elucidando a razão pela qual este apresentou o maior conteúdo de fenólicos dentre os outros extratos (Tabela 5.9). Todavia, é pertinente observar que embora a quantidade de ácidos fenólicos tenha influenciado a resposta quantificada pelo teste de Folin-Ciocalteu, este grupo de compostos não foi o único a influenciar a atividade antioxidante dos extratos, uma vez que no extrato acetônico, que apresentou uma maior atividade antioxidante pelo método ABTS (Tabela 5.10) foram identificados somente 8 ácidos fenólicos.

Tabela 5.12 - Composição química de extratos do bagaço de maçã (mg/g de extrato)<sup>(A)</sup>.

Composto	Extrato	Extrato	Soxhlet	Soxhlet
	Supercrítico*	Supercrítico*	(Acetona)	(Etanol)
	(CO <sub>2</sub> puro)	(CO <sub>2</sub> + acetona 5%)		
Ácido Benzóico	-	-	0,40 ± 0,02	0,56 ± 0,06
Ácido Caféico	0,43 ± 0,01	0,60 ± 0,03	-	-
Ácido Clorogênico	13,2 ± 0,1	10,0 ± 1,0	0,80 ± 0,03	0,30 ± 0,07
Ácido Elágico	7,30 ± 0,07	6,0 ± 0,8	0,70 ± 0,05	0,40 ± 0,01
Ácido Ferúlico	1,41 ± 0,04	1,40 ± 0,25	-	-
Ácido Gálico	-	-	0,26 ± 0,02	2,52 ± 0,02
Ácido Gentísico	-	-	-	0,070 ± 0,002
Ácido o-cumárico	-	-	-	0,17 ± 0,01
Ácido p-cumárico	-	-	-	0,35 ± 0,02
Ácido Propilgalato	6,4 ± 0,1	6,1 ± 0,4	0,60 ± 0,04	1,41 ± 0,11
Ácido Protocatequínico	-	-	0,74 ± 0,05	2,02 ± 0,03
Ácido Quínico	1,17 ± 0,01	0,90 ± 0,07	0,50 ± 0,03	2,67 ± 0,20
Ácido Salicílico	1,15 ± 0,02	0,76 ± 0,003	-	-
Ácido Sináptico	13,6 ± 1,0	16,6 ± 0,8	1,2 ± 0,9	0,70 ± 0,03
Ácido t-cinâmico	-	-	-	0,10 ± 0,01
Ácido Vanílico	-	-	-	0,40 ± 0,02
Total (mg/g)	44,66	42,27	5,1	11,6

<sup>(A)</sup> Os valores são médias ± o desvio padrão de determinações em triplicata.

\* Condição operacional de obtenção do extrato supercrítico: 150 bar, 30°C e Q<sub>CO<sub>2</sub></sub> de 5,0 g/min.

Segundo a Tabela 5.12, a ESC realizada a 150 bar e 30°C utilizando CO<sub>2</sub> puro e com 5% (m/m) de acetona promoveu a obtenção de um maior número e quantidade de compostos químicos,

44, 66 mg/g e 42,27 mg/g, respectivamente; quando comparada com o extrato convencional da técnica soxhlet realizada com acetona (5,1 mg/g).

A avaliação da atividade antioxidante individual dos compostos é necessária para assegurar a real contribuição de cada um para a capacidade seqüestradora de radicais dos extratos. Salienta-se também, que não somente os ácidos fenólicos contribuem para a atividade antioxidante total de um extrato vegetal, mas as interações entre os múltiplos compostos fenólicos (flavonóides + ácidos fenólicos), e que a determinante para sua habilidade de capturar radicais ou doar elétrons é a estrutura química da substância, e que no caso dos ácidos fenólicos depende do número e posições do grupo hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila.

**Conclusão.** Os polifenóis responsáveis pela capacidade antioxidante da maçã podem ser encontrados no bagaço de maçã. Os compostos fenólicos são caracterizados como polares, contudo alguns destes compostos apresentam uma ampla faixa de polaridade podendo também ser solubilizadas por CO<sub>2</sub> supercrítico. A resposta antioxidante pode variar conforme o tipo de método selecionado, uma vez que cada um busca avaliar aspectos diferenciados das possíveis substâncias antioxidantes. Segundo a análise de perfil químico, os ácidos caféico, sinápico e clorogênico; compostos com atividade antioxidante comprovada, foram alguns dos ácidos fenólicos identificados estando em maior concentração no extrato supercrítico que nos extratos acetônico e etanólico obtido pelo método soxhlet de extração. O emprego dos solventes etanol e acetona favoreceu a solubilização de um maior número de ácidos fenólicos. O uso de 5% (m/m) de acetona como co-solvente na extração supercrítica realizada a 150 bar, 30°C promoveu um aumento de compostos fenólicos extraídos, modificando o perfil antioxidante do extrato. O extrato acetônico obtido pelo método soxhlet apresentou uma melhor resposta antioxidante no método ABTS, enquanto que os extratos supercríticos obtidos nas menores pressões demonstraram um maior efeito de proteção para o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

## 6. Conclusão

Neste trabalho foi realizado o estudo da extração do bagaço de maçã (*Malus communis*), através de diferentes técnicas de extração (ESC com CO<sub>2</sub> puro e CO<sub>2</sub> com co-solvente, e técnicas convencionais) e diferentes solventes visando a avaliação do rendimento de extração, atividade antioxidante, conteúdo fenólico e perfil químico dos diferentes extratos. A avaliação dos respectivos parâmetros possibilitou as seguintes conclusões:

Os extratos obtidos através de técnicas convencionais de extração proporcionaram rendimentos superiores aos obtidos através da ESC com CO<sub>2</sub> puro e com co-solvente, com exceção ao extrato etanólico obtido através da extração seqüencial, que apresentou um rendimento de extração inferior ao da ESC na condição de 250 bar e 50°C.

O extrato supercrítico obtido na condição operacional de 250 bar, 50°C e vazão de 5,0 g<sub>CO2</sub>/min possibilitou o maior rendimento de extração dentre os extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico puro e com co-solvente.

O emprego de 5 e 10% (m/m) de etanol bem como de 5% (m/m) de acetona a 150 bar e 30°C como co-solvente possibilitou o aumento do rendimento de processo quando comparada a mesma condição operacional realizada com CO<sub>2</sub> puro, contudo seus valores não foram superiores aos obtidos através das técnicas convencionais.

A região de retrogradação dos ESC de bagaço de maçã foi observada entre 200 e 250 bar, demonstrando que abaixo desta região o efeito dominante na solubilização dos componentes da amostra foi o da densidade, enquanto que acima deste observou-se uma maior influência da pressão de vapor dos componentes do bagaço de maçã.

O modelo que melhor se ajustou às curvas experimentais da ESC de bagaço de maçã foi o modelo de Martínez, possivelmente devido aos parâmetros ajustáveis  $b$  e  $t_m$ . Para o sistema bagaço de maçã/CO<sub>2</sub> supercrítico o efeito convectivo é dominante, pois os valores apresentados pelo coeficiente de transferência de massa na fase fluida ( $K_{y_a}$ ) foram superiores aos valores apresentados pelo coeficiente de transferência de massa na fase sólida ( $K_{x_a}$ ).

Os extratos supercríticos obtidos com co-solvente apresentaram um maior conteúdo de compostos fenólicos, quando comparado aos valores dos extratos supercríticos obtidos com CO<sub>2</sub> puro.

Dentre os extratos supercríticos com co-solvente, aquele adicionado de 5% (m/m) de acetona apresentou uma maior eficiência de solubilização dos compostos fenólicos, possivelmente devido a

presença do grupo carbonila, que permitiu uma maior interações entre os compostos fenólicos do bagaço de maçã com o solvente acetona.

O comportamento antioxidante dos extratos avaliados através dos métodos ABTS e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico demonstrou-se divergente, possivelmente devido à variedade dos grupos de compostos extraídos através das diferentes técnicas de extração e especificidade da metodologia de análise.

Compostos com propriedade antioxidante podem ser extraídos através de tecnologia supercrítica com e sem o emprego de co-solvente.

Embora os polifenóis responsáveis pela capacidade antioxidante da maçã possam ser encontrados no bagaço, a possibilidade de utilização deste resíduo vegetal como fonte de antioxidantes naturais depende de outras respostas como viabilidade comercial, biodisponibilidade no organismo humano, bem como do potencial antioxidante de outros subprodutos agroindustriais.

## 7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, P. P. **Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão.** Florianópolis, 2006. 114 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

ALMOSNINO, A. M.; BELIN, J. M. Apple pomace: an enzyme system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 12, p. 893-898, 1991.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. International thermodynamic tables of the fluid state. Carbon Dioxide. **Pergamon Press**, v.3, 1976.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis of International, Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática.** 2.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, 1999. 415p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/portugues/mensagens/imprensa/2732006/mensagensabpm2732006-imprensanacional.htm>> Acesso em: 10 Janeiro 2007.

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

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657-6662, 2003.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; NAKAYAMA, M.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAOKA, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5496-5500, 2000.

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*coffea arabica* L.) como provável fonte de substâncias bioativas.** Florianópolis, 2006. 77p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC.

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

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Cadeia produtiva da maçã: produção, armazenagem, comercialização, industrialização e financiamentos do BRDE na região sul do Brasil. Porto Alegre: BRDE, 2005. 65 p.

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

BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n.1, p. 47-53, 1997.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. 1. reimpressão. São Paulo. Editora Varela, 1995. 145p.

BORGES, M. F. M.; SILVA, F. A. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22(1), p. 94-103, 1999.

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

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4841-4844, 2001.

BRUNNER, G. **Gás Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, Springer, 1994. 387p.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>. Acesso em 05 de Novembro de 2006.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática**. Florianópolis, 2005. 138p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CARVALHO, J. C. T.; GROSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. p. 519-535. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2003. 1097p.

CARVALHO JÚNIOR, R. N. **Obtenção do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinallis*): determinação das isotermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos e do equilíbrio**

**de fases.** Campinas, 2004. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

CARVALHO JÚNIOR, R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 197-204, 2005.

CHEN, H.; RUBENTHALER, G. L.; SCHANUS, E. G. Effect of apple fiber and cellulose on the physical properties of wheat flour. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 1, p. 304-305, 1988.

CIESLIK, E.; GREDA, A.; ADAMUS, W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 94, p. 135-142, 2006.

CORRÊA, N. C. F.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F. Mass transfer Modeling Supercritical Extraction from Solid Material. **Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Meeting on High Pressure Chemical Engineering**. Hamburg, Germany, 2001.

CORREIA, J.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. **Estudo de modelos de transferência de massa para processos de extração supercrítica.** Florianópolis, 2006. 31p. Relatório de iniciação científica (PIBIC-CNPQ). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

CURTI, F. **Efeito da maçã gala (*Malus domestica* Bork) na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos.** Piracicaba, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo.

DABROWSKI, K. J.; SOSULSKI, F. Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 123-127, 1984.

DANIELSKI, L.; CAMPOS, L. M. A. S.; BRESCIANI, L. F. V.; HENSE, H.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO<sub>2</sub> and composition profile. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46 (2), p. 99-106, 2007.

DECKER, E. A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 396-407, 1997.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DONNELLY, J. K.; ROBINSON, D. S. Invited review. Free radical in foods. **Free Radical Research**, v. 22, p. 147-176, 1995.

DOWNING, D. L. Apple cider. Processed apple products. **New York: Van Nostrand Reinhold**, p. 169-187, 1989.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUARIA E EXTENSAO RURAL DE SANTA CATARINA. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Maça**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. 94p.

FERREIRA, S. R. S. **Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino**. Campinas, 1996. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper Nigrum L.*) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**. v.14, n.3, p. 235, 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, n. 4, p. 263-269, 2002.

FREITAS, G. L. **Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare L.*) e no bagaço de brassagem**. Florianópolis, 2006. 86p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC.

GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C. MCPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juice. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471-474, 2000.

GENENA, A. K. **Estudo da extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) quanto a sua ação antioxidante**. Florianópolis, 2005. 174p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

GIL, M. I. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 4581-4589, 2000.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**, v. 1, p. 13-43. São Paulo, 1983.

GRIGONIS, D.; VENSKUTONIS, P. R.; SIVIK, B.; SANDAHL, M.; ESKILSSON, C. S. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 223-233, 2005.

HAMID, A. A.; SHAH, Z. M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of Centella asiatica (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, p. 465-469, 2002.

HANG, Y. D. Production of fuels and chemicals from apple pomace. **Food Technology**, v. 41, n. 3, p. 115-117, 1987.

HU, M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). **Food Chemistry**, v. 76, p. 327-333, 2002.

JEWELL, W. J.; CUMMINGS, R. J. Apple pomace energy and solids recovery. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 407-410, 1984.

JEONG, M.; CHESNEY, D. J. Investigation of modifier effects in supercritical CO<sub>2</sub> extraction from various solid matrices. **Journal of Supercritical Fluid**, v. 16, p. 33-42, 1999.

JIMÉNEZ, A.; SELGA, A.; TORRES, J. L.; JULIÀ, L. Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3ols. **Org. Lett**, v. 6, p. 4583-4586, 2004.

JOCHMANN, A. **Extração Supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*)**. Florianópolis, 2000. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K., KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 68-75, 2003.

KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L. Y. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In. LINSKENS, H. F. & JACKSON, J. F. **Analyses of plant waste materials: Molecular methods of plant analyses**, 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1999. 214p.

KITZBERGER, C. S. G. **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO<sub>2</sub> a Alta Pressão**. Florianópolis, 2005. 142p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC. KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 334-336, 1982.

LANCASTER, J. E. Regulation of skin color in apples. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 10, p. 487-502, 1992.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical Fluid extraction in herbal and natural product studies-practical review. **Talanta**, v. 53, p. 771-782, 2001.

LARANJINHA, J. A. N.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon LDL oxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 487-492, 1994.

LARANJINHA, J. A. N.; VIEIRA, O.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. Inhibition of metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent LDL lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 395-402, 1996.

LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, p. 187-1997, 1997.

LU, Y.; FOO, L. Y. Constitution of some chemical components os apple seed. **Food Chemistry**, v. 61, p. 29-33, 1998.

LU, Y.; FOO, L. Y. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 64, p. 511-518, 1999.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81-85, 2000.

MARCO, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARTÍNEZ, J. **Estudo de modelos de transferência de massa na interface sólido-fluido durante processos de extração supercrítica**. Campinas, 2002. 140p. Dissertação de Mestrado. Progrma de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemical Research**. v. 42, n.5, p.1057-1063, 2003.

MAYPRO: Disponível em:<<http://maypro.com/product/Applephenon/index.html>> Acesso em: 08 de Janeiro de 2007.

MICHIELIN, E. M. Z. **Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*)**. Florianópolis, 2002. 92p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

MICHIELIN, E.M.Z; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131-138, 2005.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci**. v. 84, p. 407-412, 1993.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire – Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v.25, p. 31-46, 2003.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. 13.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1510p.

MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 (9), p. 3890-3897, 2000.

MURGA, R.; SANZ, M. T. , BELTRAN, S.; CABEZAS, J. L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 113-121, 2002.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples : application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 331-339, 2003.

NGADI, M. O.; CORREIA, L. R. Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed. **Journal of Food Science**, n. 3, p. 667-670, 1992.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 34, p. 109-157, 1994.

PELLEGRINI, P.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2812-2819, 2003.

PENG, Y.; LIU, F.; PENG, Y.; YE, J. Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, n. 92, p. 169-175, 2005.

PEREIRA, C. G. **Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.). cidrão (*Aloysia triphylla* L'Hérit. Britton) e manga (*Mangifera indica* L.) por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processos, caracterização e atividade antioxidante dos extratos**. Campinas, 2005. 225p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137-150, 2005.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PIMENTEL, C. V. M.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 1.ed. São Paulo. Editora Varela, 2005. 95p.

POLIAKOFF, M.; KING, P. Phenomenal fluids. **Nature**, v. 412, p. 125, 2001.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PROTEGGENTE, A. R.; PANNALA, A. S.; PAGANGA, G.; VAN BUREN, L.; WAGNER, E.; WISEMAN, S.; VAN DE PUT, F.; DACOMBE, C.; RICE-EVANS, C. A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Res**, v. 36, p. 217-233, 2002.

RAUPP, D. da S.; CREMASCO, A. C. V.; CALDI, C. M.; MARQUES, S. H. de P.; BANZATTO, D. A. Polpa refinada de maçã promove arraste via fecal de nutrientes ingeridos na dieta. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, v. 10, p. 77-83, 2004.

RAYMUNDO, M. S. **Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro em Extratos de Algas Marinhas**. Florianópolis, 2003. 110p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (*Chlorophyta*) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.

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

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

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

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.

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

SANTOS, E. **Avaliação das propriedades tecnológicas de tripas naturais submetidas ao tratamento com soluções emulsificantes.** Florianópolis, 2006. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

SAUDE&LAR: Disponível em:  
<[http://www.saudelar.com/edicoes/2001/marco/principal.asp?send=casa\\_prato.htm](http://www.saudelar.com/edicoes/2001/marco/principal.asp?send=casa_prato.htm)> Acesso em: 12 de Janeiro de 2007.

SCHEMIN, M. H. C. **Obtenção de pectina alimentícia a partir de bagaço de maçã.** Curitiba, 2003. 78p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós - Graduação em Tecnologia de Alimentos, UFPR.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32 (1), p. 67- 103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals.** Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.

SHOJI, T.; AKAZOME, Y.; IKEDA, K. M. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 959-967, 2004.

SIMIONI, F. J. **Cadeia agroindustrial da maçã: competitividade e reestruturação diante do novo ambiente econômico.** Florianópolis, 2000. Dissertação Mestrado em Economia, Universidade Federal de Santa Catarina.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. p. 467-595. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2003. 1097p.

SINGH, P. C.; SINGH, R. K. Choosing an appropriate bioseparation Technique. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 49-58, 1996.

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

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. p. 289-326. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2003. 1097p.

SOUSA, E.M.R.D.; MARTÍNEZ, J.; CHIAVONE-FILHO, O.; ROSA, P.T.V.; DOMINGOS, T. MEIRELES, M.A.A. 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, p. 325-333, 2005.

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

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, 41, 753-758, 2003.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase is atherogenicity. **New England Journal of Medicine**, v.320, p. 915-924, 1989.

STEINBRECHER, U. P.; ZHANG, H.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 155-168, 1990.

STURZA, R. C. M. C. **Aproveitamento biotecnológico dos resíduos provenientes da extração do suco de maçã por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 1995. 81 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

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

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 321-325, 2001.

VILLAS-BOAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, p. 38-42, 2001.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 2800-2802, 1995.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1067-1075, 1998.

VINSON, J. A.; SU, X. H.; ZUBIK, I.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 5315-5321, 2001.

VON GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalanthus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT and BHA, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 632-638, 1997.

WIKIPEDIA: Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ma%C3%A7%C3%A3>> Acesso em: 10 de outubro de 2006.

WILLIAMSON, G.; FAULKNER, K.; PLUMB, G. W. Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. **European Journal of Cancer Prevention**, v.7, p. 17-21, 1998.

WOOD, J. A.; BERNARDS, M. A.; WAN, W.; CHARPENTIER, P. A. Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 40-47, 2006.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C. Brazilian apple production: a few years later. **Fruit Processing**, v. 12, p. 472-475, 2000.

WURTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 28, p. 743-745, 1990.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4083-4089, 2001.

YODA, S. K. **Estudo da cinética da extração dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana bertonii* com mistura CO<sub>2</sub> + água**. Campinas, 2001. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J. MEIRELES, M.A.A. **Extraction of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 24, p. 57-76, 2002.

ZIAKOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. **J. Liq. Chromatogr. R. T**, v. 25, p. 3017, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. p. 577-614. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2003. 1097p.

## 8. Anexos

### Anexo I - Equações para Aplicação do Modelo Descrito por Sovová (1994).

De acordo com Sovová (1994) citado por Martínez (2002) no pré-tratamento da amostra a moagem e trituração são processos indispensáveis a fim de aumentar a superfície de contato entre sólido e o solvente, bem como de diminuir o caminho difusivo, já que o soluto a ser extraído está contido no interior da célula muito bem protegido pela parede celular. Embora este tratamento vise a liberação de todo soluto, sabe-se que as paredes celulares não se rompem completamente de forma que parte do soluto permanece protegido, sendo de difícil acesso ao solvente. Desta forma, pode-se dividir a quantidade total de soluto disponível em duas partes, sendo uma de fácil e outra de difícil acesso. Esta interpretação interfere na forma do termo que se refere à transferência de massa interfacial da equação de balanço de massa.

O modelo de Sovová (1994) descreve um leito cilíndrico de extração supercrítica, através do qual um solvente escoar na direção axial, com velocidade  $U$ . O solvente entra puro no extrator, e sua temperatura e pressão são mantidas constantes ao longo do processo. O leito é homogêneo quanto ao tamanho das partículas sólidas e à distribuição inicial do soluto. Considera-se a existência de células intactas e células rompidas formando o leito. Dessa forma, o soluto se apresenta sob duas condições: soluto de fácil acesso e o soluto de difícil acesso. Durante o processo de extração o soluto de fácil acesso é extraído primeiro, sendo seguido pelo soluto de difícil acesso, e a partir de então se inicia a fase final de extração descrita como etapa difusiva. O processo pode então ser dividido em três etapas (PEREIRA, 2005; MARTÍNEZ, 2002). As equações simplificadas do balanço de massa são:

$$U \frac{\partial y}{\partial h} = \frac{J(x, y)}{\rho_f} \quad (\text{fase fluída}) \quad (\text{I})$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{-J(x, y)}{\rho_s (1 - \varepsilon)} \quad (\text{fase sólida}) \quad (\text{II})$$

Onde:  $x(\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}})$  e  $y(\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}})$  são as razões mássicas de soluto (concentração) nas fases sólida e fluída respectivamente,  $t$  é o tempo (s),  $h$  é a coordenada axial (m),  $u$  é a velocidade superficial do solvente (m/s),  $\rho_s$  ( $\text{kg}_{\text{sólido}}/\text{m}^3$ ) e  $\rho_f$  ( $\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$ ) são as densidades da fase sólida e

fluida respectivamente,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $J(x,y)$  é a taxa de transferência de massa interfacial ( $\text{kg/m}^3 \cdot \text{s}$ ).

O teor inicial de óleo no sólido (O) é dividido em duas etapas: óleo de fácil acesso (P), encontrado na superfície do sólido, e óleo de difícil acesso (K), presente no interior das células. Por sua vez, a concentração de soluto na fase sólida é descrita através do teor de sólidos totais livre de soluto, ou sólido inerte (N), através das seguintes relações:

$$x_0 = \frac{O}{N}; x_k = \frac{K}{N}; x_p = \frac{P}{N} \quad (\text{III})$$

As condições iniciais de contorno para as equações diferenciais de balanço de massa são as seguintes:

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad (\text{IV})$$

$$y(h, t = 0) = 0 \quad (\text{V})$$

$$y(h = 0, t) = 0 \quad (\text{VI})$$

Onde:  $x$  é a concentração na fase sólida;  $y$  é a concentração na fase solvente;  $h$  é a posição do leito de sólidos (m);  $t$  é o tempo de extração (s) e  $x_0$  é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida (g/g).

Para resolver as equações (I) e (II), Sovová (1994) adotou as seguintes variáveis adimensionais:

$$z = \frac{k_{Ya}}{U} h \quad (\text{VII})$$

$$\tau = \frac{k_{Ya} \cdot \rho_f \cdot Y^*}{(1 - \varepsilon) \cdot \rho_s \cdot x_k} t \quad (\text{VIII})$$

$$r = \frac{x}{x_k} \quad (\text{IX})$$

$$Y = 1 - \frac{y}{Y^*} \quad (\text{X})$$

Onde:  $z$  uma coordenada adimensional,  $\tau$  é o adimensional do tempo,  $k_{Ya}$  é o coeficiente de transferência de massa na fase fluida em  $s^{-1}$ ,  $r$  é a concentração adimensional na fase sólida,  $Y^*$  é a concentração de equilíbrio em g/g,  $x_k$  é a razão mássica de soluto de difícil acesso em g/g,  $Y$  é a concentração normalizada de soluto na fase solvente.

Com base nas equações intermediárias para a aplicação do modelo, este permite a descrição das curvas de extração para as três etapas do processo:

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

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

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

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

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

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

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

Para o modelo de Sovová, a quantidade  $Z$  é um parâmetro para o período CER, uma vez que é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida ( $k_{Ya}$ ) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER.

$$Z = \frac{N \cdot k_{Ya} \cdot \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s} \quad (XIV)$$

Para a solução do modelo, é necessário o conhecimento dos seguintes parâmetros (YODA, 2001):

$M_{CER}$  = taxa de extração na etapa CER (kg/s);

$Y_{CER}$  = razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kgextrato/kg  $CO_2$ );

$t_{CER}$  = duração da etapa CER (s).

Esses parâmetros podem ser obtidos pelo ajuste simultâneo de duas retas sob a curva de extração (massa de óleo acumulada versus tempo de extração) com o auxílio do pacote estatístico SAS. O parâmetro  $M_{CER}$  é o valor da tangente ao período CER e a partir do mesmo obtêm-se o valor de  $Y_{CER}$  através da equação:

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

Onde:  $Q_{CO_2}$  é a vazão do solvente (kg/s).

Outras definições e restrições são descritas nas equações a baixo:

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

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

$$W = \frac{N \cdot k_{Xa}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon)} = k \frac{Z \cdot Y^*}{x_k} \quad (XVIII)$$

$$t_{\text{FER}} = t_{\text{CER}} + \frac{N}{Q_{\text{CO}_2} \cdot W} \ln \left[ \frac{x_k + (x_0 - x_k) \cdot \exp(W \cdot x_0 / Y^*)}{x_0} \right] \quad (\text{XIX})$$

onde:  $m_{\text{extr}}$  é a massa de extrato (kg),  $t_{\text{CER}}$  é a duração da etapa constante de extração (s),  $N$  é a massa de matéria-prima livre de soluto (kg),  $Y^*$  é a solubilidade (kg/kg),  $Q_{\text{CO}_2}$  é a vazão média do solvente (kg/s),  $t_{\text{FER}}$  é o período de taxa decrescente de extração (s),  $X_0$  é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida,  $X_k$  é a razão mássica de soluto no interior de células intactas.

Os parâmetros  $K_{Y_a}$  e  $K_{X_a}$  são respectivamente os coeficientes de transferência de massa da fase fluida e fase sólida ( $s^{-1}$ ), sendo definidos pelas equações:

$$k_{Y_a} = \frac{M_{\text{CER}}}{\rho_{\text{CO}_2} \cdot S \cdot H \cdot \Delta \bar{Y}} \quad (\text{XX})$$

$$k_{X_a} = \frac{k_{Y_a} \cdot \rho_{\text{CO}_2} \cdot A Y}{\rho_s \cdot \Delta X} \quad (\text{XXI})$$

Onde:  $M_{\text{CER}}$  é a taxa de extração no período CER (kg/s),  $\rho_{\text{CO}_2}$  é a densidade do solvente ( $\text{kg/m}^3$ ),  $S$  é a área de seção transversal do leito ( $\text{m}^2$ ),  $H$  é o comprimento do leito (m),  $\Delta Y$  e  $\Delta X$  são respectivamente as médias logarítmicas para as razões mássicas de soluto na fase fluida e fase sólida e  $\Delta Y$  é a diferença na razão mássica do leito durante o período de taxa constante de extração (kg óleo/kg  $\text{CO}_2$ ).

Logo:

$$\Delta \bar{Y} = \frac{Y_{\text{CER}}}{\ln \left[ Y^* / (Y^* - Y_{\text{CER}}) \right]} \quad (\text{XXII})$$

Onde:  $\Delta \bar{Y}$  é a concentração média logarítmica na fase fluida, (g/g),  $S$  é a área de seção transversal do leito ( $\text{m}^2$ ),  $H$  é o comprimento do leito (m).

$$\Delta Y = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} \cdot S \cdot H \cdot k_{Ya}} \quad (XXIII)$$

De forma que:

$$\Delta X = \frac{(X_P + X_K)}{2} \quad (XXIV)$$

Sendo  $\Delta X$ , a concentração média na fase sólida (g/g).

## Anexo II - Equações para Aplicação do Modelo Descrito por Martínez et al. (2003).

Martínez et al. (2003) consideram que o extrato é uma mistura de diversos compostos ou grupo de compostos de similar estrutura química. Neste modelo, as equações de balanço de massa apresentam termos relacionados a fenômenos de transporte que podem ocorrer durante o processo de extração (CARVALHO JUNIOR, 2004; PEREIRA, 2005).

O modelo LM se baseia no balanço de massa no leito de extração, considerando um leito cilíndrico com comprimento  $H$  muito maior que o diâmetro, no qual o solvente escoia na direção axial com velocidade  $U$ ; a matéria-prima está distribuída uniformemente ao longo do leito e a temperatura, a pressão e as propriedades físicas de ambas as fases são mantidas constantes durante toda a extração (CAMPOS, 2005; GENENA, 2005).

O balanço de massa no leito de extração, na fase fluida, pode ser simplificado e apresenta-se da seguinte forma:

$$U \frac{\partial y}{\partial h} = \frac{J(x, y)}{\rho_f} \quad (\text{XXV})$$

Onde:  $x(\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}})$  e  $y(\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}})$  são as razões mássicas de soluto (concentração) nas fases sólida e fluida respectivamente,  $t$  é o tempo (s),  $h$  é a coordenada axial (m),  $U$  é a velocidade superficial do solvente (m/s),  $\rho_f$  ( $\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$ ) é a densidade da fase fluida e  $J(x,y)$  é a taxa de transferência de massa interfacial ( $\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ).

A equação da condição de contorno é dada por:

$$y(h = 0, t) = 0 \quad (\text{XXVI})$$

O termo de transferência de massa interfacial, representado como  $J(X,Y)$ , pode ser interpretado de diferentes formas. Aqui foi definido como uma função  $S$  que depende da composição do extrato ao longo do processo. A equação logística, freqüentemente aplicada para modelos de crescimento de população, foi escolhida para descrever a variação da composição do extrato, e uma de suas soluções foi incorporada dentro do termo de transferência de massa interfacial, representado na equação (XXVII) :

$$J(x, y) = S = \sum_{i=1}^n S_i \quad (\text{XXVII})$$

Sendo:

$$S_i(t) = \frac{A_i b_i \exp[b_i(t_{mi} - t)]}{\{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]\}^2} \quad (\text{XXVIII})$$

Onde: A, b e  $t_m$  são parâmetros do modelo e o subscrito i corresponde a um único composto do soluto ou grupo de compostos com características semelhantes.

A integração da equação (XXV) com as condições de contorno da equação (XXVI) nos da a equação (XXIX), que corresponde a taxa de massa do extrato na fase fluida:

$$y(h = H, t) = \frac{H}{u\varepsilon} \sum_{i=1}^n S_i \quad (\text{XXIX})$$

Onde: H é o comprimento total do leito de extração, u é a velocidade intersticial do solvente ( $\text{m}^3/\text{s}$ ) e  $\varepsilon$  é a porosidade total do leito de extração.

A equação (XXX) trata-se de uma segunda condição de contorno que após ser integrada na equação (XXIX) pode-se obter a equação (XXXI).

$$m(h = H, t) = 0 \quad (\text{XXX})$$

$$m(h = H, t) = \int_0^t y Q_{CO_2} dt = \frac{Q_{CO_2} H}{u\varepsilon} \sum_{i=1}^n \int_0^t S_i dt \quad (\text{XXXI})$$

Para um grupo de compostos simples, a curva de extração pode ser representada pela equação (XXXII) que mostra o resultado da integração da função S.

$$m(h = H, t) = \frac{Q_{CO_2} H A_i}{u \varepsilon} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[b_i(t_m - t)]} - \frac{1}{1 + \exp[b_i t_m]} \right\} \quad (\text{XXXII})$$

A princípio o modelo logístico possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis  $A_i$ ,  $b_i$  e  $t_{mi}$ . Se a composição do óleo tiver sido determinada experimentalmente, é possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos:

$$m_{totali} = \frac{\%m_t}{100} = x_{0i}m_t \quad (\text{XXXIII})$$

Onde:  $m_t$  é a massa total de sólidos na coluna de extração,  $x_0$  é a razão mássica inicial de soluto extraível e  $m_{totali}$  é a massa total de cada grupo de composto.

Desta forma, o modelo pode ser reduzido a dois parâmetros ajustáveis,  $b$  e  $t_m$ , e a massa de cada grupo de compostos representada pela equação (XXXIV).

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

Se o soluto for considerado como um pseudocomponente, a massa de soluto pode ser descrita como:

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{m_0}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (\text{XXXV})$$

Sendo:  $m_0 = x_0 \cdot m_t$

Onde:  $m_{ext}$  é a massa de óleo extraída (g),  $m_0$  é massa inicial total de óleo (soluto) no leito de extração(g),  $t$  é o tempo de extração (s),  $b$  e  $t_m$  são parâmetros ajustáveis do modelo LM expressos em ( $s^{-1}$ ) e (s), respectivamente. O parâmetro  $t_m$  corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou um máximo (CAMPOS, 2005; MARTÍNEZ et al., 2003).

**Anexo III - Método de Obtenção de Ácidos Fenólicos de Matrizes Vegetais.**

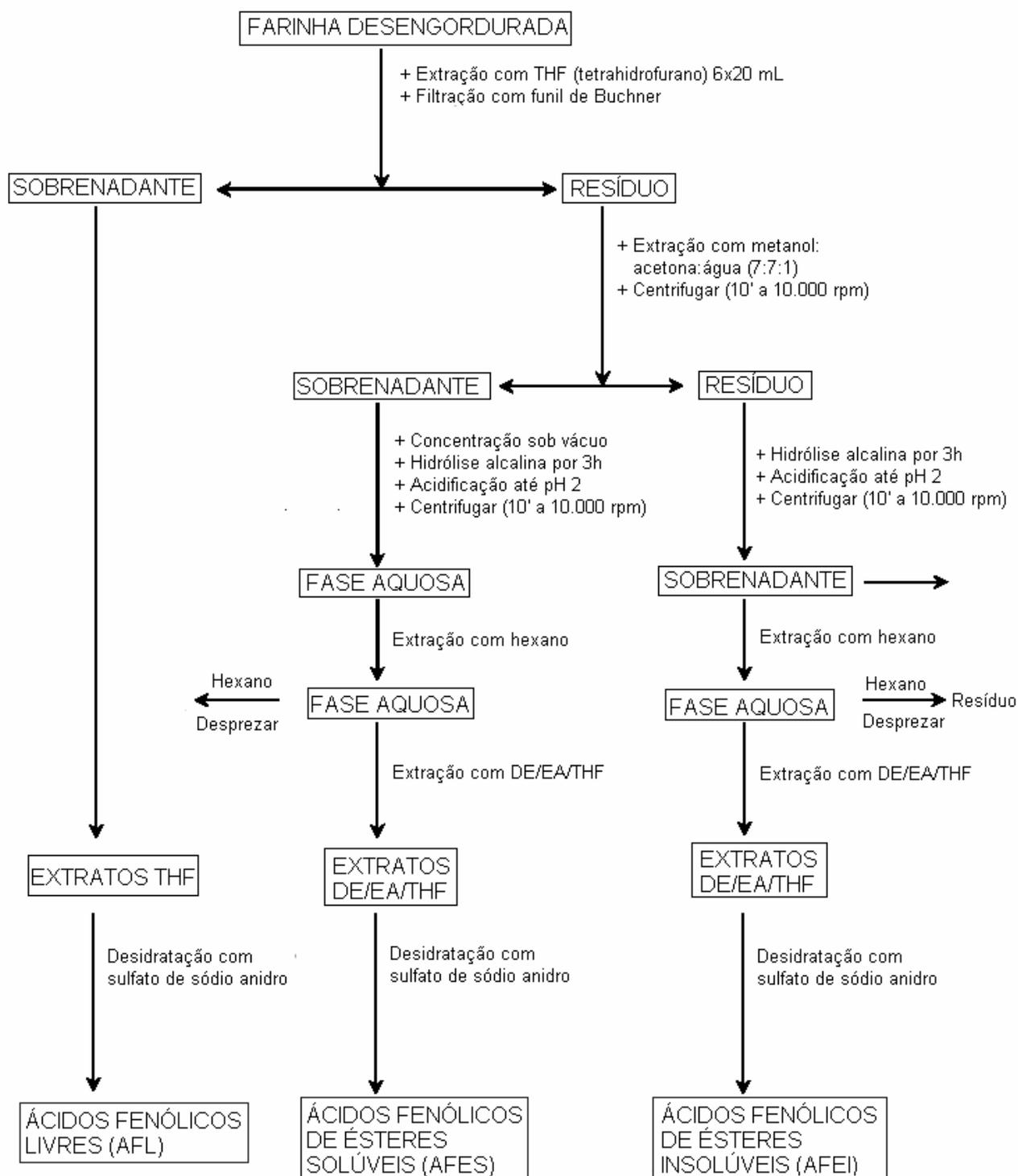
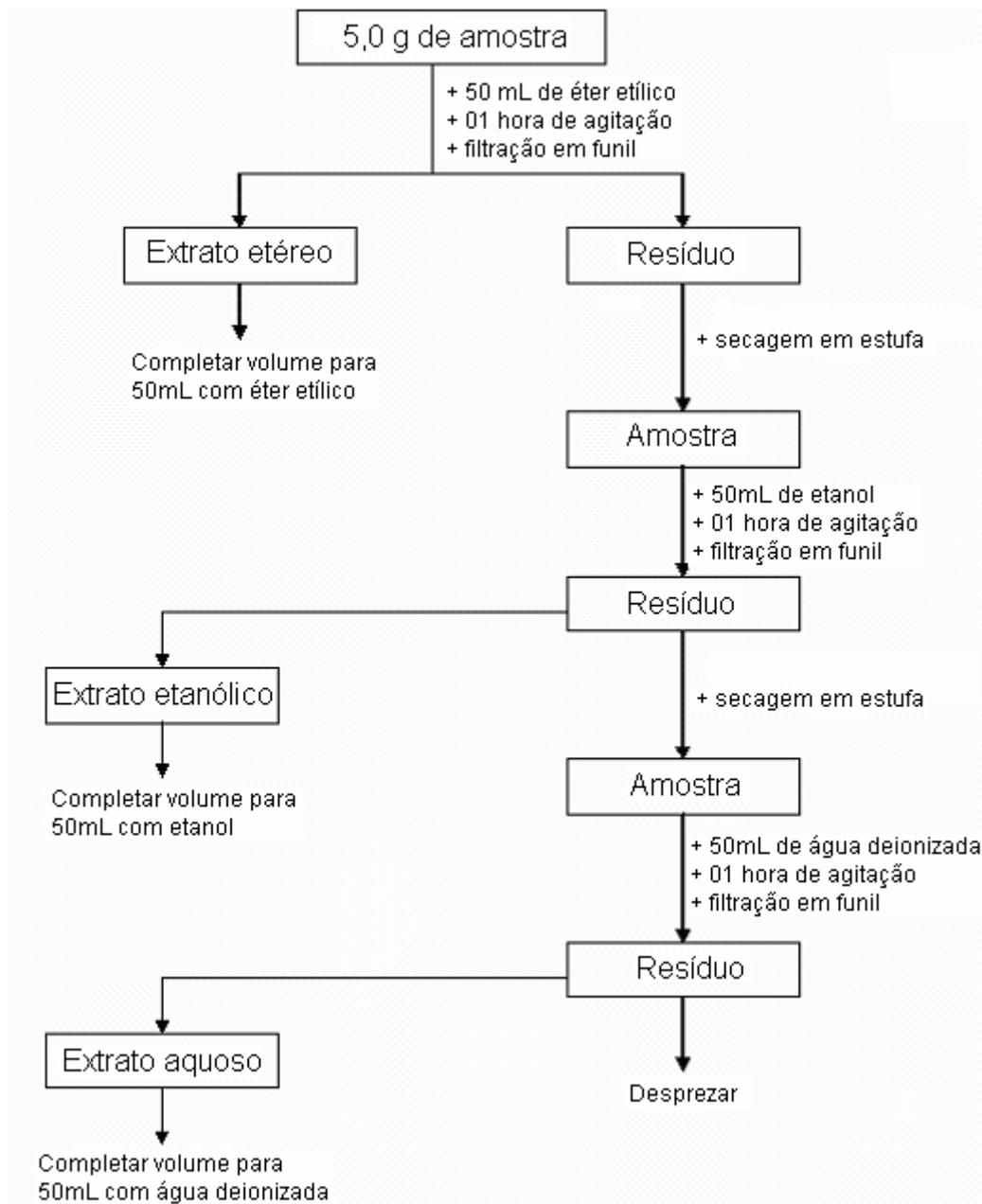


Figura I - Processo de extração dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis

**Anexo IV - Procedimento de Obtenção de Extratos Sequenciais.**

*Figura II - Processo de extração seqüencial.*

**Anexo V - Fotos das Unidades de Extração Supercrítica do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC).**



*Figura III - Equipamento de extração 1.*



*Figura IV - Equipamento de extração 2, acoplado a bomba de co-solvente.*

## Anexo VI - Curvas de Calibração

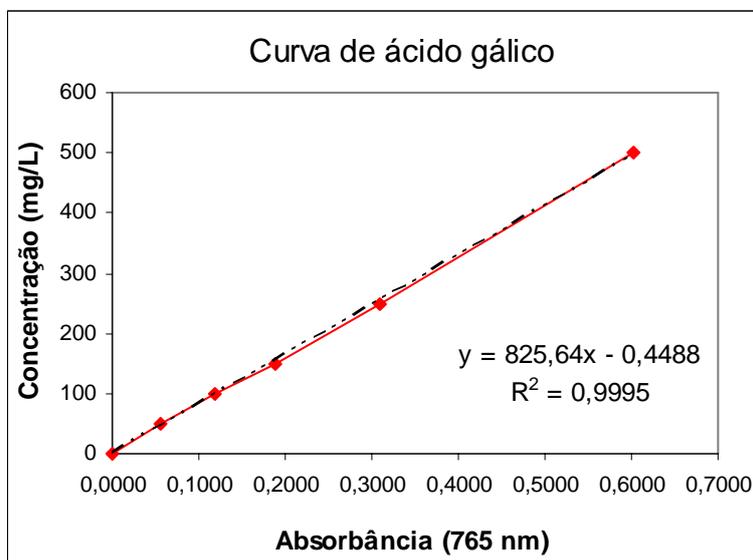


Figura V - Curva padrão de ácido gálico utilizada na análise do conteúdo de fenólico dos extratos e frações de bagaço de maçã.

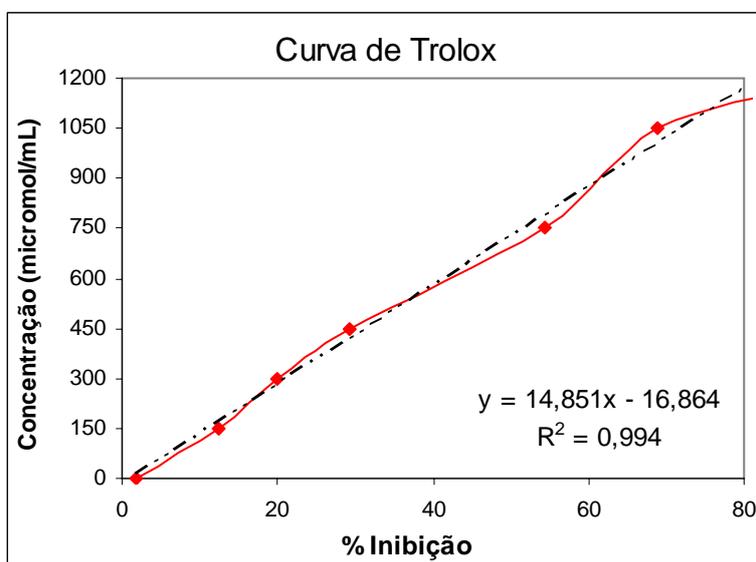


Figura VI - Curva padrão de Trolox utilizada na análise da atividade antioxidante pelo método ABTS dos extratos e frações de bagaço de maçã.

## Anexo VII - Curvas de Extração Ajustadas pelo SAS.

Ensaio bagaço de maçã: 40oC, 150 bar

The NLIN Procedure  
Dependent Variable mext  
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase					Sum of
Iter	b0	b1	b2	knot1	Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	210.0	0.0949
1	0.0153	0.00122	-0.00110	60.7925	0.0822
2	-0.00773	0.00186	-0.00143	99.7445	0.00157
3	-0.00724	0.00184	-0.00153	101.9	0.000623
4	-0.00724	0.00184	-0.00153	101.8	0.000623

NOTE: Convergence criterion met.

### Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	4
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.001399
Object	0.000533
Objective	0.000623
Observations Read	16
Observations Used	16
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	0.3726	0.0931	717.11	<.0001
Residual	12	0.000623	0.000052		
Uncorrected Total	16	0.3732			
Corrected Total	15	0.1122			

### The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.00724	0.00397	-0.0159	0.00142
b1	0.00184	0.000081	0.00166	0.00202
b2	-0.00153	0.000093	-0.00173	-0.00133
knot1	101.8	4.9505	91.0139	112.6

### Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.7965869	0.6956979	0.3469907
b1	-0.7965869	1.0000000	-0.8733484	-0.6764000
b2	0.6956979	-0.8733484	1.0000000	0.3185049
knot1	0.3469907	-0.6764000	0.3185049	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	-0.00724	0.007238
2	5	0.0066	0	0.00196	0.004636
3	15	0.0161	0	0.02037	-0.004268
4	25	0.0248	0	0.03877	-0.013972
5	35	0.0503	0	0.05718	-0.006876
6	45	0.0827	0	0.07558	0.007120
7	60	0.1091	0	0.10319	0.005913
8	75	0.1350	0	0.13079	0.004207
9	90	0.1544	0	0.15840	-0.003999
10	105	0.1740	0	0.18111	-0.007114
11	135	0.1907	0	0.19047	0.000229
12	165	0.2035	0	0.19983	0.003671
13	195	0.2154	0	0.20919	0.006214
14	225	0.2232	15	0.21854	0.004657

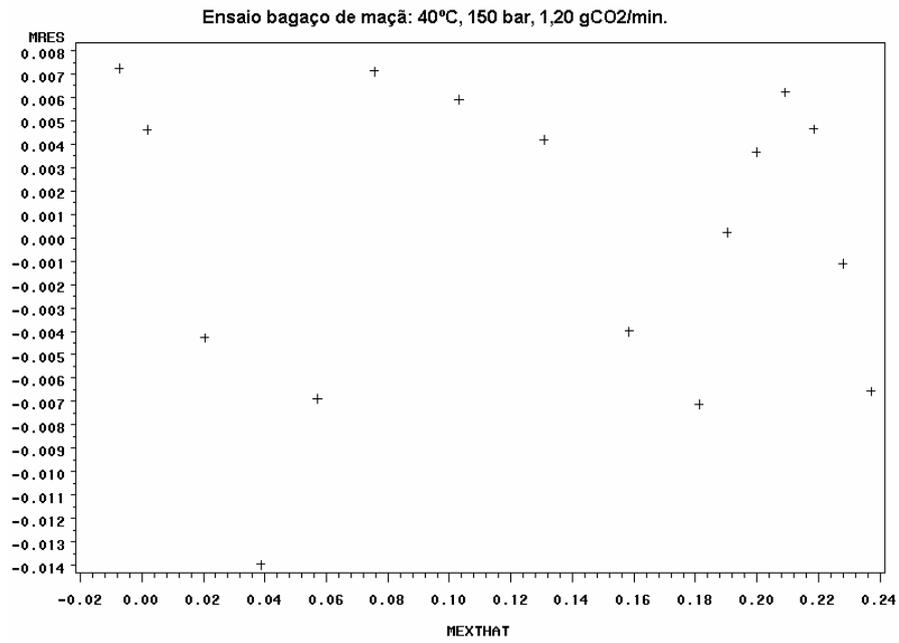


Figura VII - Gráfico SAS da dispersão para ESC a 150 bar, 40°C e 1,20 gCO<sub>2</sub>/min.

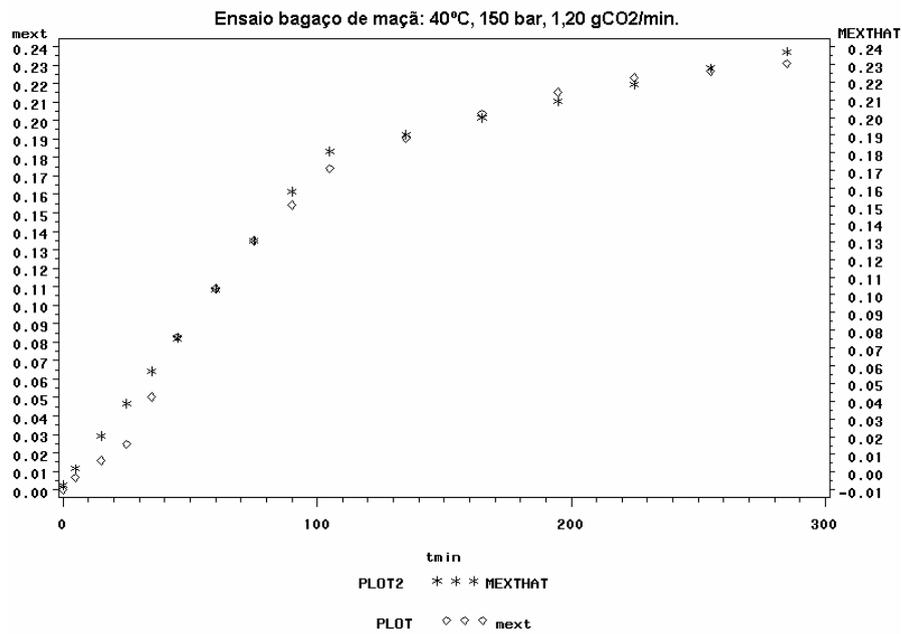


Figura VIII - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 150 bar, 40°C e 1,20 gCO<sub>2</sub>/min

Ensaio bagaço de maçã: 50oC, 150 bar

The NLIN Procedure  
 Dependent Variable mext  
 Method: Gauss-Newton

Iterative Phase					
Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	210.0	0.0190
1	0.0109	0.000546	-0.00045	140.5	0.000928
2	0.00468	0.000698	-0.00060	123.0	0.000161
3	0.00257	0.000763	-0.00064	113.7	0.000075
4	0.00257	0.000763	-0.00064	114.4	0.000074

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	4
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.005836
Object	0.014432
Objective	0.000074
Observations Read	16
Observations Used	16
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	0.0823	0.0206	1208.00	<.0001
Residual	12	0.000074	6.166E-6		
Uncorrected Total	16	0.0824			
Corrected Total	15	0.0224			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.00257	0.00130	-0.00027	0.00541
b1	0.000763	0.000023	0.000713	0.000813
b2	-0.00064	0.000030	-0.00071	-0.00058
knot1	114.4	4.3061	105.0	123.7

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.7984299	0.6039947	0.2828632
b1	-0.7984299	1.0000000	-0.7564781	-0.5675451
b2	0.6039947	-0.7564781	1.0000000	-0.0164519
knot1	0.2828632	-0.5675451	-0.0164519	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	.MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	0.00257	-.002570525
2	5	0.0046	0	0.00638	-.001784753
3	15	0.0153	0	0.01401	0.001286791
4	25	0.0226	0	0.02164	0.000958335
5	35	0.0286	0	0.02927	-.000670121
6	45	0.0426	0	0.03690	0.005701423
7	60	0.0491	0	0.04834	0.000758739
8	75	0.0568	0	0.05978	-.002983946
9	90	0.0723	0	0.07123	0.001073370
10	105	0.0809	0	0.08267	-.001769314
11	135	0.0903	0	0.09224	-.001942857
12	165	0.0979	0	0.09579	0.002114286
13	195	0.0995	0	0.09933	0.000171429
14	225	0.1023	15	0.10287	-.000571429
15	255	0.1083	45	0.10641	0.001885714
16	285	0.1083	75	0.10996	-.001657143

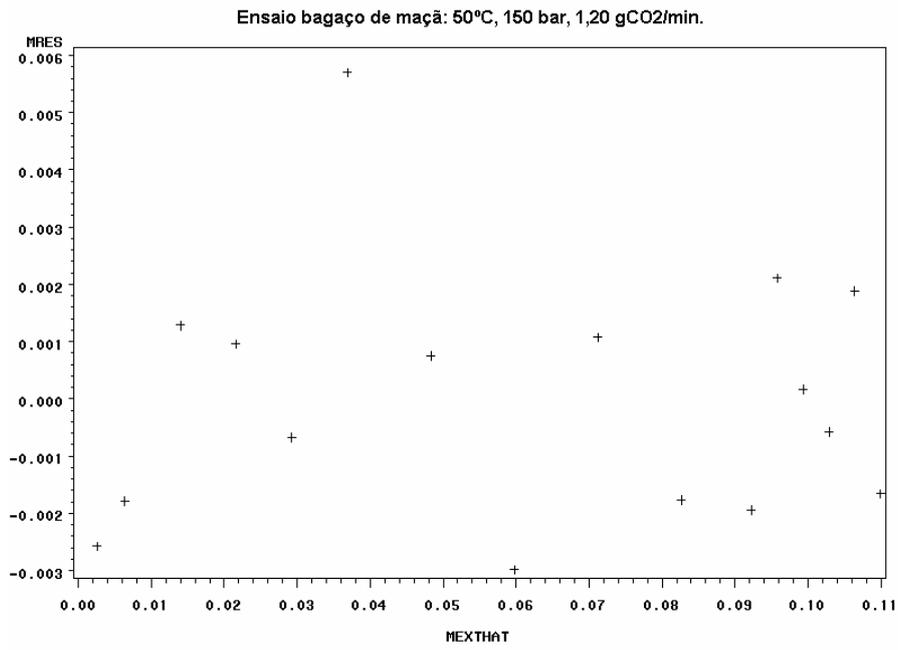


Figura IX - Gráfico SAS da dispersão para ESC a 150 bar, 50°C e 1,20 gCO<sub>2</sub>/min.

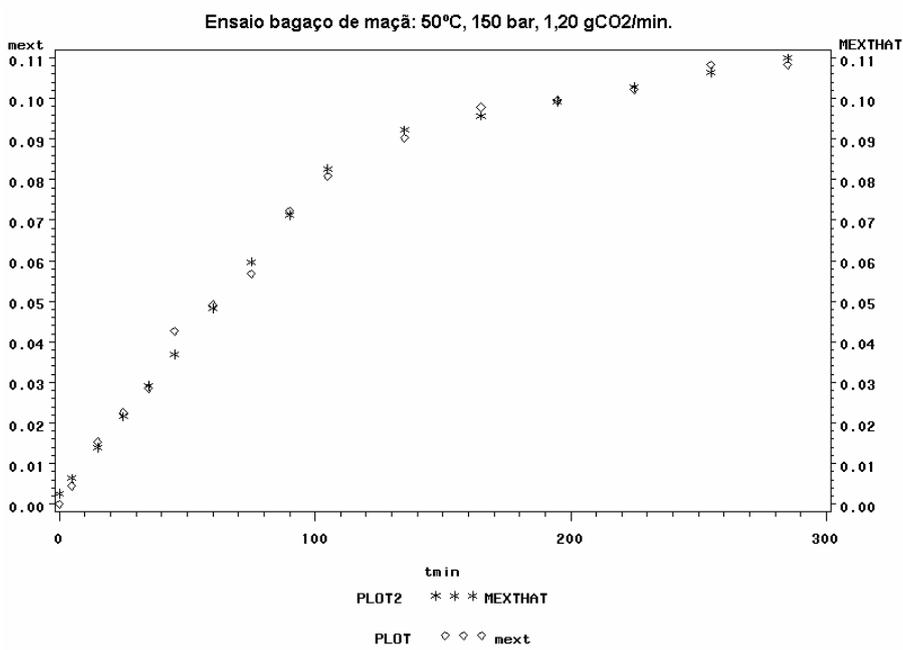


Figura X - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 150 bar, 50°C e 1,20 gCO<sub>2</sub>/min.

Ensaio bagaço de maçã: 50oC, 200 bar

The NLIN Procedure  
Dependent Variable mext  
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase					Sum of
Iter	b0	b1	b2	knot1	Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	210.0	1.4513
1	-0.00498	0.00137	-0.00102	53.1657	1.3739
2	-0.0138	0.00351	-0.00302	153.4	0.1167
3	0.000107	0.00450	-0.00450	84.9680	0.0909
4	-0.0329	0.00559	-0.00550	91.2214	0.00353
5	-0.0358	0.00572	-0.00568	89.4920	0.00315
6	-0.0358	0.00572	-0.00568	89.5449	0.00315

NOTE: Convergence criterion met.

#### Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	6
Subiterations	2
Average Subiterations	0.333333
R	2.614E-8
PPC	1.021E-9
RPC(knot1)	0.000591
Object	0.000229
Objective	0.003151
Observations Read	16
Observations Used	16
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	2.3346	0.5836	699.35	<.0001
Residual	12	0.00315	0.000263		
Uncorrected Total	16	2.3377			
Corrected Total	15	0.5541			

#### The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0358	0.00985	-0.0572	-0.0143
b1	0.00572	0.000207	0.00527	0.00617
b2	-0.00568	0.000229	-0.00617	-0.00518
knot1	89.5449	2.9433	83.1321	95.9577

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8135390	0.7360399	0.3122597
b1	-0.8135390	1.0000000	-0.9047383	-0.6289915
b2	0.7360399	-0.9047383	1.0000000	0.3102846
knot1	0.3122597	-0.6289915	0.3102846	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	-0.03578	0.035777
2	10	0.0185	0	0.02146	-0.002959
3	20	0.0641	0	0.07869	-0.014595
4	30	0.0998	0	0.13593	-0.036131
5	40	0.1954	0	0.19317	0.002233
6	55	0.2735	0	0.27902	-0.005521
7	70	0.3770	10	0.36488	0.012125
8	85	0.4598	25	0.45073	0.009071
9	105	0.4708	45	0.47749	-0.006685
10	125	0.4810	65	0.47845	0.002554
11	155	0.4837	95	0.47989	0.003812
12	185	0.4837	125	0.48133	0.002370
13	215	0.4837	155	0.48277	0.000929
14	225	0.4837	165	0.48325	0.000448
15	255	0.4837	195	0.48469	-0.000993
16	285	0.4837	225	0.48613	-0.002435

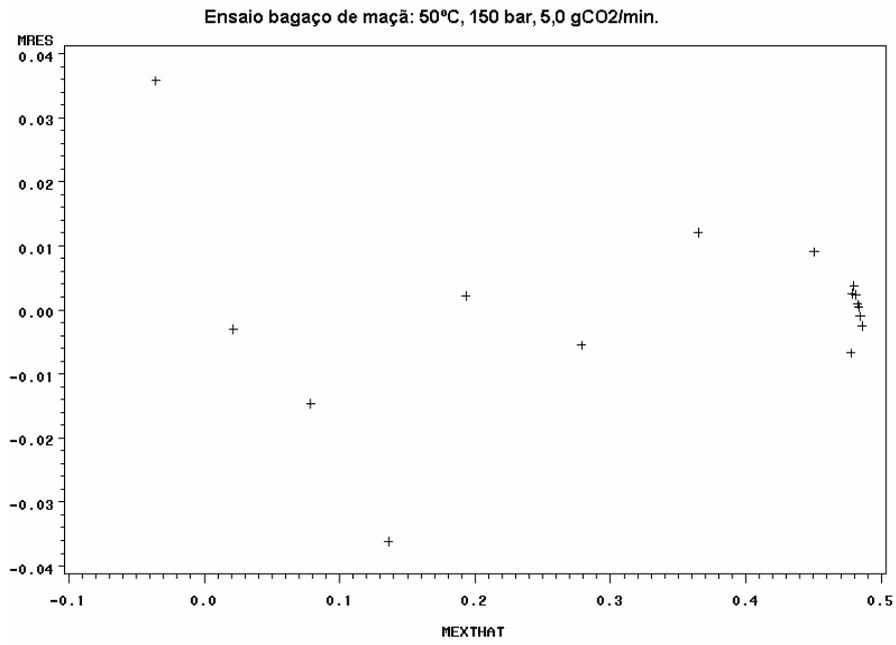


Figura XI - Gráfico SAS da dispersão para ESC a 200 bar, 50°C e 5,0 gCO<sub>2</sub>/min.

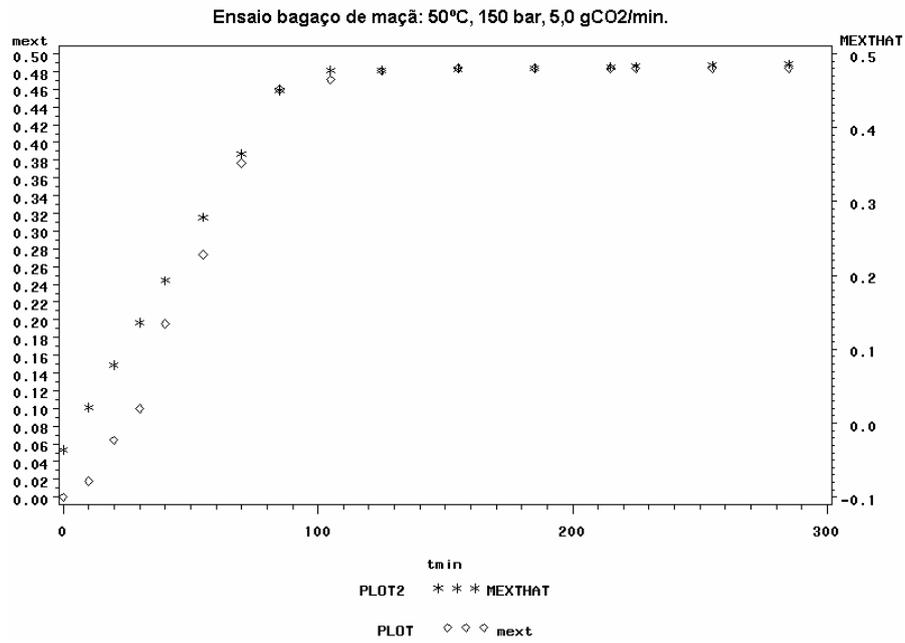


Figura XII - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 200 bar, 50°C e 5,0 gCO<sub>2</sub>/min

Ensaio bagaço de maçã: 40oC, 200 bar

The NLIN Procedure  
Dependent Variable mext  
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase					
Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	210.0	0.6373
1	-0.0299	0.00173	-0.00147	89.9627	0.4949
2	-0.0175	0.00181	-0.00087	172.9	0.1096
3	-0.0430	0.00288	-0.00270	140.5	0.0386
4	-0.0482	0.00302	-0.00274	153.1	0.0220
5	-0.0482	0.00302	-0.00274	152.9	0.0220

NOTE: Convergence criterion met.

#### Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	5
Subiterations	1
Average Subiterations	0.2
R	3.447E-7
PPC(knot1)	5.612E-8
RPC(knot1)	0.001163
Object	0.000052
Objective	0.022028
Observations Read	16
Observations Used	16
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	1.2618	0.3155	95.93	<.0001
Residual	12	0.0220	0.00184		
Uncorrected Total	16	1.2838			
Corrected Total	15	0.5503			

#### The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0482	0.0211	-0.0942	-0.00233
b1	0.00302	0.000310	0.00235	0.00370
b2	-0.00274	0.000548	-0.00393	-0.00155
knot1	152.9	18.4120	112.8	193.0

#### Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.7900447	0.4474776	0.3255812
b1	-0.7900447	1.0000000	-0.5663953	-0.6108611
b2	0.4474776	-0.5663953	1.0000000	-0.1861388
knot1	0.3255812	-0.6108611	-0.1861388	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	-0.04824	0.048244
2	5	0.0044	0	-0.03313	0.037526
3	15	0.0072	0	-0.00289	0.010091
4	25	0.0115	0	0.02734	-0.015844
5	35	0.0357	0	0.05758	-0.021880
6	45	0.0475	0	0.08782	-0.040315
7	60	0.1155	0	0.13317	-0.017668
8	75	0.1270	0	0.17852	-0.051521
9	90	0.1557	0	0.22387	-0.068174
10	105	0.3506	0	0.26923	0.081373
11	135	0.3981	0	0.35993	0.038168
12	165	0.4112	0	0.41748	-0.006280
13	195	0.4287	0	0.42601	0.002690
14	225	0.4420	15	0.43454	0.007460
15	255	0.4452	45	0.44307	0.002130
16	285	0.4456	75	0.45160	-0.006000

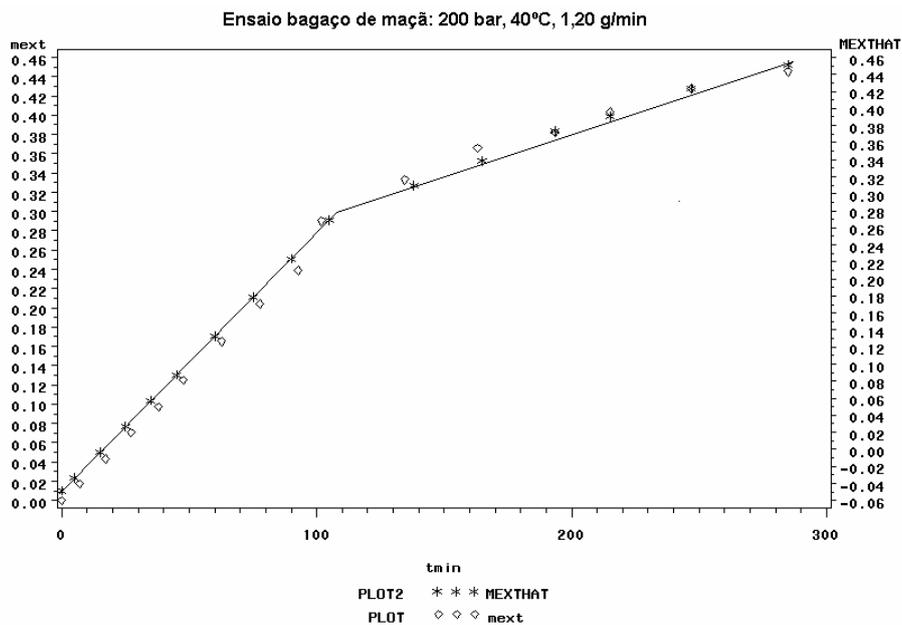


Figura XIII - Gráfico SAS de ajuste para ESC a 200 bar, 40°C e 1,20 gCO<sub>2</sub>/min utilizada para obtenção do valor de solubilidade (3,1 x 10<sup>-3</sup> g de extrato/g de CO<sub>2</sub>) empregado na aplicação do modelo de Sovová.

**Anexo VIII - Gráfico de Correlação.**

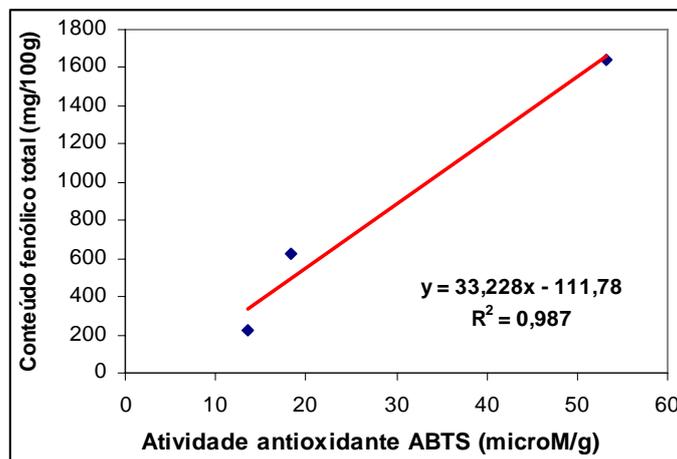


Figura XIV - Correlação entre o índice de polifenóis totais (GAE) das frações de bagaço de maçã e atividade antioxidante determinada pelo método ABTS.

### Anexo IX - Cromatogramas Obtidos nas Análises de Cromatografia Gasosa das Frações e Extratos do Bagaço de Maçã.

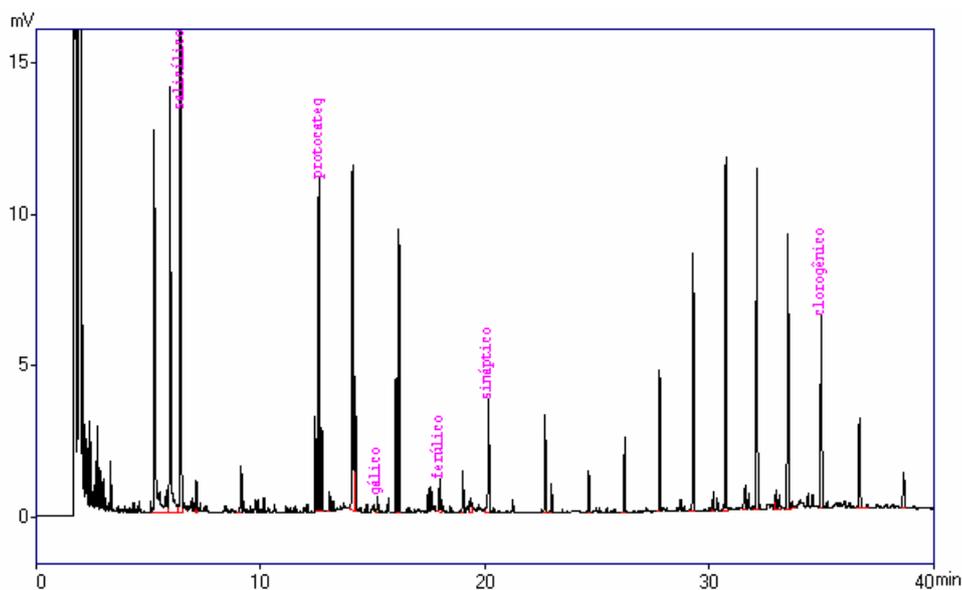


Figura XV - Cromatograma referente aos compostos identificados na fração de ácido fenólico livre (AFL) do bagaço de maçã.

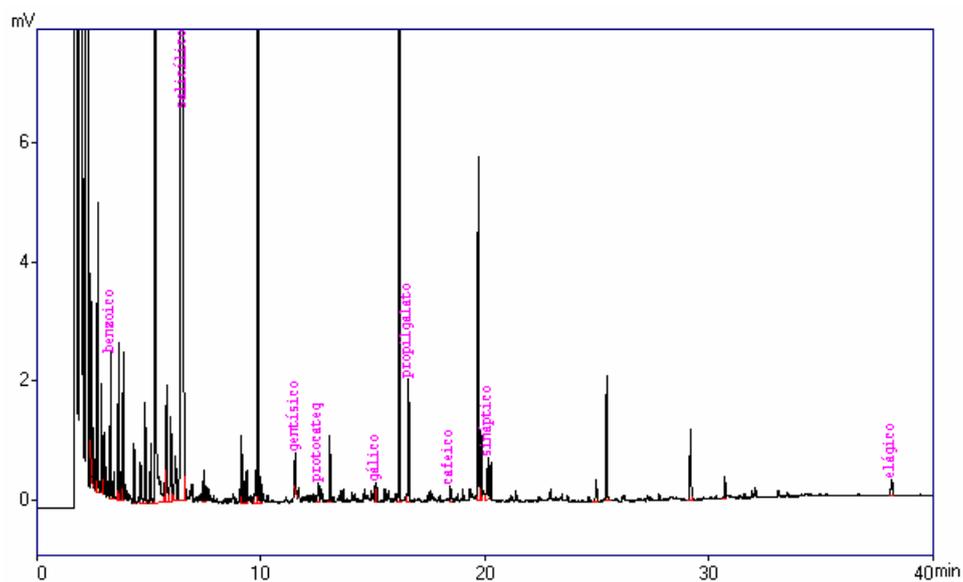


Figura XVI - Cromatograma referente aos compostos identificados na fração de ácido fenólicos esterificado solúvel (AFES) do bagaço de maçã.

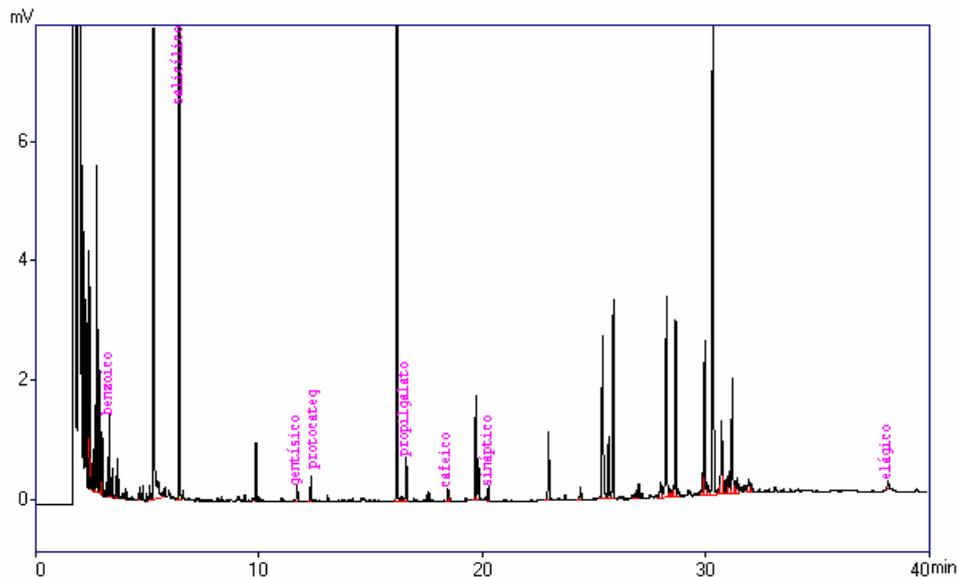


Figura XVII - Cromatograma referente aos compostos identificados na fração ácido fenólico esterificado insolúvel (AFEI) do bagaço de maçã.

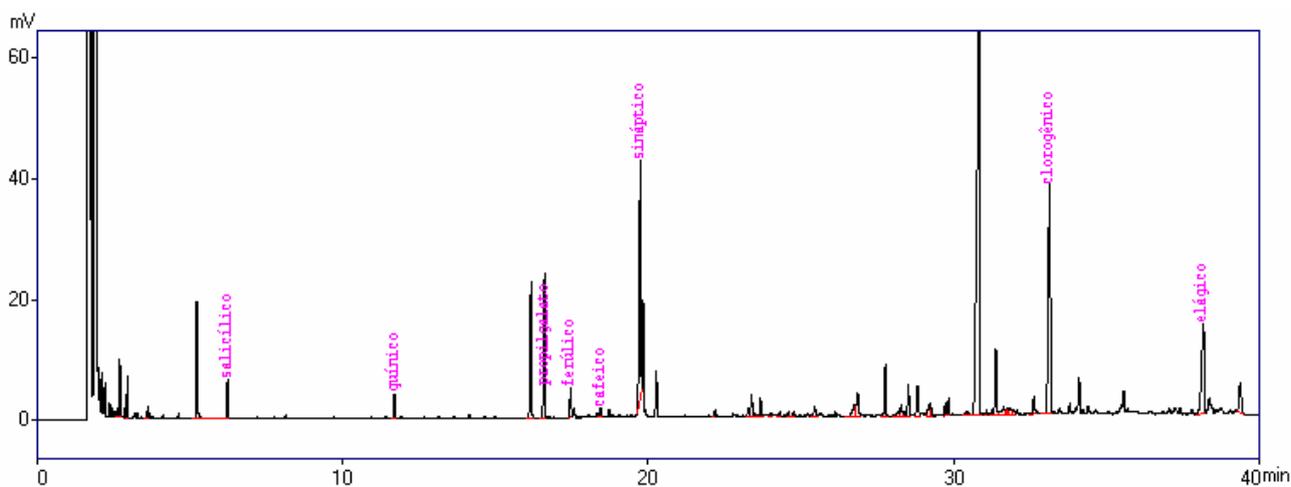


Figura XVIII - Cromatograma referente aos compostos identificados no ESC obtido com CO<sub>2</sub> puro a 150 bar, 30°C e vazão de 5,0 g/min.

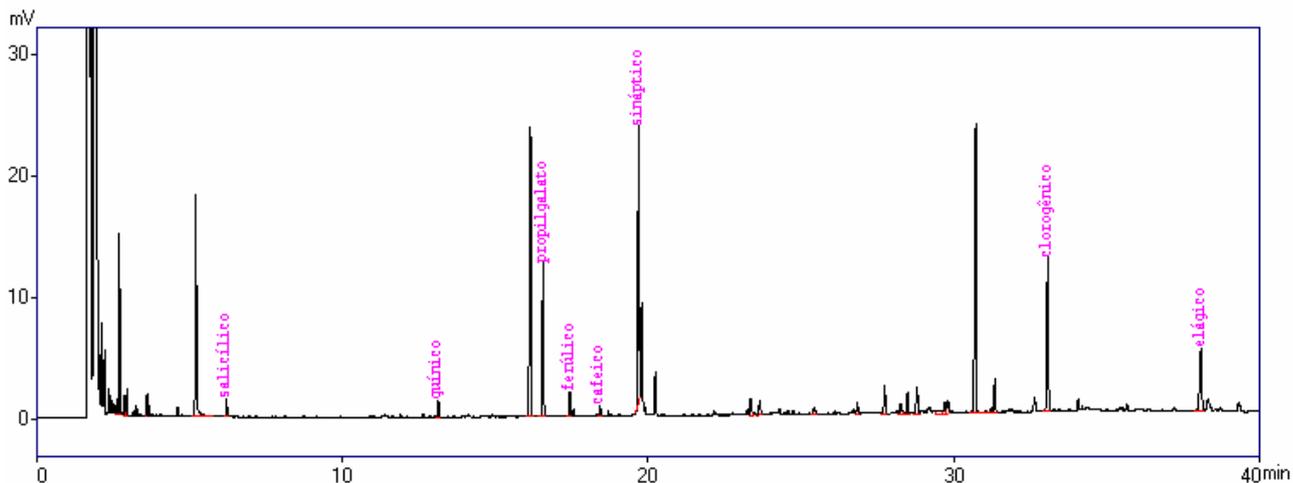


Figura XIX - Cromatograma referente aos compostos identificados no ESC obtido com (CO<sub>2</sub> + 5% de acetona) a 150 bar, 30°C e vazão de 5,0 g/min.

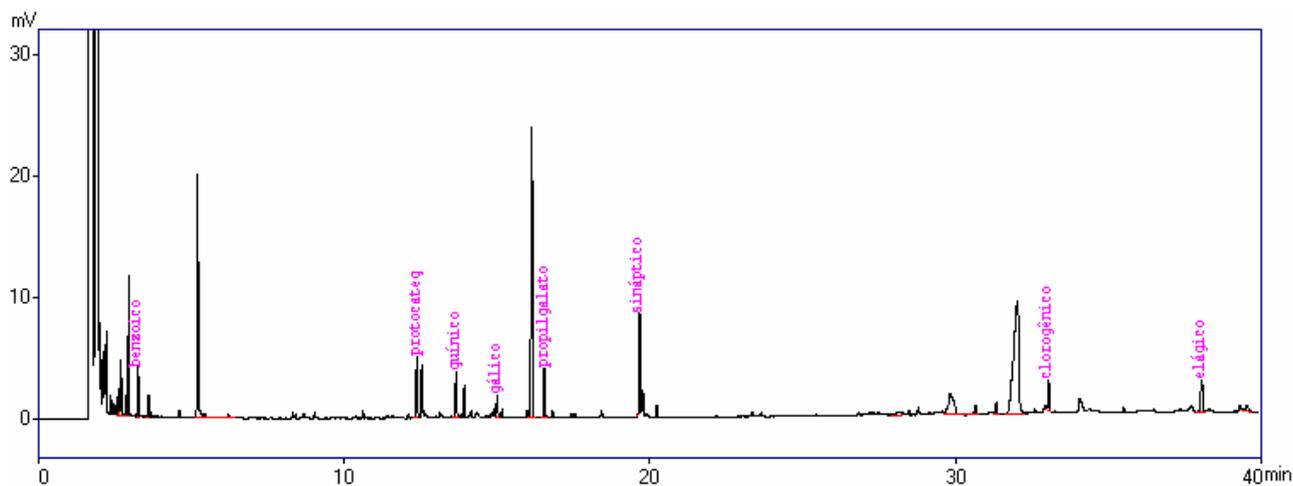


Figura XX - Cromatograma referente aos compostos identificados no extrato soxhlet de acetona.

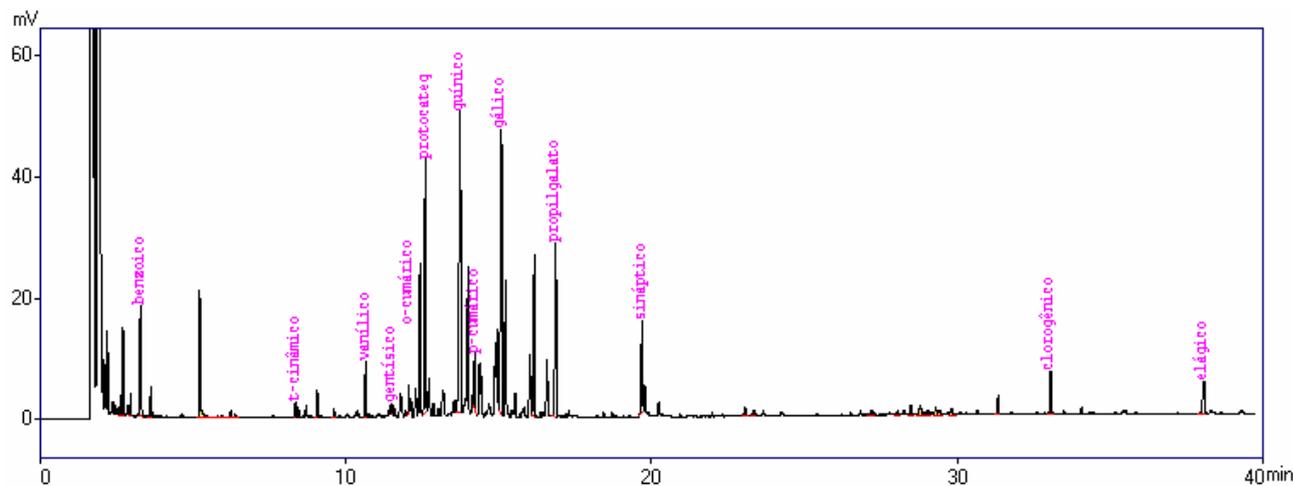


Figura XXI - Cromatograma referente aos compostos identificados no extrato soxhlet de etanol.