



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

**DANIELA ALVES DE OLIVEIRA
Engenheira de Alimentos (UFSC 2001/1)
Mestre em Engenharia de Alimentos (UFSC 2010)**

**APLICAÇÃO DAS TECNOLOGIAS SUPERCRÍTICA E
CONVENCIONAIS PARA O REAPROVEITAMENTO DOS
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE MARACUJÁ (*Passiflora
edulis f. flavicarpa*)**

**FLORIANÓPOLIS
2015**

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

**APLICAÇÃO DAS TECNOLOGIAS SUPERCRÍTICA E
CONVENCIONAIS PARA O REAPROVEITAMENTO DOS
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE MARACUJÁ (*Passiflora
edulis f. flavicarpa*)**

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

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra R. S. Ferreira

DANIELA ALVES DE OLIVEIRA
Engenheira de Alimentos (UFSC 2001/1)
Mestre em Engenharia de Alimentos (UFSC 2010)

Florianópolis
2015

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

de Oliveira, Daniela Alves

Aplicação de Tecnologias Supercrítica e Convencionais para o Reaproveitamento dos Resíduos do Processamento do Maracujá (*passiflora edulis f. flavicarpa*); Daniela Alves de Oliveira; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira – Florianópolis, SC, 2015.

205 p.

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

Inclui Referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. semente de maracuja. 3. extratos de resíduos de maracuja. 4. fluidos supercríticos. 5. encapsulamento. 6. atividade antioxidante. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

**“APLICAÇÃO DAS TECNOLOGIAS
SUPERCRÍTICA E CONVENCIONAIS PARA O
REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DE MARACUJÁ (*Passiflora
edulis f. flavicarpa*)”**

Por

Daniela Alves de Oliveira

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

Prof.ª. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Orientadora

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof.ª. Dra. Sandra Regina Salvador
Ferreira

Prof.ª. Dra. Vera Maria Rodrigues

Prof.ª. Dra. Eliane Maria Zandonai
Michielin

Prof. Dr. Márcio José Rossi

Prof. Dr. Marcelo Lanza

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis, 2 de março de 2015.

*Aos meus pais, por todo o amor,
dedicação e incentivo...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e guiar meus passos ao longo do caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira pela orientação, dedicação, incentivo e carinho que muito contribuíram para a realização deste trabalho. À minha co-orientadora do estágio doutoral realizado no exterior, Carmen Gomes, pelo acolhimento, disponibilidade, importantes contribuições e amizade.

Ao PGEAL/UFSC, pela oportunidade de cursar o mestrado e o doutorado, e aos professores do PGEAL pelos importantes ensinamentos acadêmicos. Em especial, aos professores do LATEC pelas orientações técnicas e sugestões.

À relatora desta tese, Profa. Dr^a. Vera M. Rodrigues (UPF) e aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

À Capes pelo suporte financeiro.

À Extrair Óleos pela doação das matérias-primas.

Aos meus colegas da Pós-Graduação e amigos do LATEC, em especial às Latesquianas, pela convivência, momentos de descontração, ajuda e troca de experiências.

Thanks to my labmates at Texas A&M University, Andre, Cassie, Jecori, John, Kate, Paulo and Rummy for the welcome, help, patience and fun.

À aluna de iniciação científica, Mariana Angonese, pela agradável parceria e por toda a dedicação e eficiência durante dois anos

Às minhas queridas amigas, Pati, Nati, Marta, Kátia, Ana, Carol, Jana e Dani, pelo carinho, por todos os momentos sempre agradáveis que passamos juntas e por nossa amizade que independe da distância.

À minha amiga do coração, Elaine, por ouvir, divertir, apoiar, dividir...

À minha prima, Cacá, pelo incentivo, apoio, acolhimento, carinho e amizade.

Ao Mozart, pelo amor, carinho, respeito, companheirismo, ajuda e motivação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho.

E de maneira muitíssimo especial, aos meus pais, Elson e Isabel, pelo amor incondicional, educação, incentivo, compreensão... palavras não são capazes de expressar a gratidão e o amor que sinto.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) fresco e processado. Uma grande quantidade de sementes de maracujá ainda é subutilizada pelas indústrias de suco. Uma parte desse subproduto tem sido utilizada para produzir óleo devido ao seu alto teor de ácidos graxos insaturados. O novo resíduo gerado após a produção de óleo por prensagem a frio, a torta de semente, pode ainda ser uma fonte potencial de compostos bioativos (e.g., antioxidantes e antimicrobianos), porém a exposição à luz, ao oxigênio e ao calor pode causar sua degradação. A coprecipitação com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, como por exemplo o poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), pode ser usada para preservar compostos importantes. Este estudo pode ser dividido em duas partes principais. Na primeira, diferentes métodos de extração foram aplicadas às sementes e à torta de sementes de maracujá avaliando seu desempenho em termos de rendimento global de processo, teor de compostos fenólicos total (método de Folin-Ciocalteu), atividade antioxidante (metodologias DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoleico) e concentrações mínimas inibitória e bactericida dos extratos (CMI e CMB, respectivamente) contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua*. Os métodos de extração utilizados foram: extração supercrítica (ESC) com CO₂ puro (SC-CO₂) a 40 °C e 50 °C, pressões até 300 bar e 8 g CO₂/min; ESC com adição de 5 % de etanol (EtOH) ao CO₂ a 40 °C, 250 e 300 bar; e técnicas à baixa pressão – maceração (MAC) e extração assistida por ultrassom (UE) – com diferentes solventes orgânicos. Com base nos resultados de rendimento e de atividades biológicas, dois extratos (SC-CO₂/ 150 bar/40 °C de semente e MAC/EtOH-H₂O de torta) foram selecionados para a continuidade deste trabalho. Com intuito de proteger esses extratos de resíduos de maracujá (semente e torta) selecionados e preservar sua bioatividade, a segunda etapa visou a síntese de partículas de PLGA com os extratos por duas técnicas diferentes: emulsificação/evaporação do solvente (ESE, do inglês *emulsion/solvent evaporation*) e com antissolvente supercrítico (SAS, do inglês *Supercritical AntiSolvent*). Para os ensaios de SAS foram utilizados o extrato SC-CO₂/ 150 bar/40 °C de semente e o polímero PLGA 50:50 (razão lactídeo:glicolídeo). Seis condições operacionais foram selecionadas para a realização desses experimentos com base no estudo do comportamento de equilíbrio de fases dos sistemas contendo aqueles componentes com diclorometano como solvente e CO₂ como antissolvente. Nos experimentos de formação de partícula por ESE,

foram utilizados os dois extratos selecionados na primeira parte assim como duas composições diferentes de PLGA, com razão lactídeo:glicolídeo de 50:50 e de 65:35. Todas as amostras de partículas (SAS e ESE) foram analisadas em termos de tamanho por difusão dinâmica da luz (DLS), morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfil térmico por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e ação antimicrobiana (CMI e CMB). Além disso, a eficiência de encapsulamento e o comportamento de liberação *in vitro* foram determinados espectrofotometricamente correlacionando as absorvâncias das partículas a 294 nm às curvas analíticas de concentrações dos extratos. Essas análises indicaram a ocorrência efetiva de encapsulamento, liberação controlada e formato esférico na maior parte das amostras de partículas obtidas tanto por ESE quanto por SAS. Os tamanhos de partículas variaram entre 355 e 1498 nm, e a eficiência de encapsulamento entre 23,8 e 91 % para todos os ensaios. Por uma combinação entre os resultados de tamanho e morfologia de partículas e eficiência de processo, a temperatura de 35 °C parece ser mais indicada que 45 °C para a precipitação de extrato supercrítico de semente de maracujá com PLGA 50:50 por SAS. Enquanto os resultados da técnica ESE parecem indicar o PLGA 65:35 como mais adequado para a formação de partículas de extrato de semente de maracujá. Para o extrato de torta obtido por MAC/EtOH-H₂O a eficiência de encapsulamento foi bastante inferior ao do extrato supercrítico de semente, provavelmente por ser menos hidrofóbico e interagir menos com o PLGA. A inibição do crescimento dos microorganismos testados foi notadamente ampliada para ambos os extratos pelo encapsulamento por ESE com os dois tipos de PLGA (50:50 e 65:35), enquanto as amostras precipitadas por SAS não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, provavelmente devido à baixa solubilidade em meio aquoso.

Palavras chave: semente de maracuja, extratos de resíduos de maracuja, fluidos supercríticos, encapsulamento, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer and consumer of fresh and processed yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Large amounts of passion fruit seeds are still underutilized by juice industries. Part of it has been used to produce seed oil due to its high content of unsaturated fatty acids. The seed cake is the residue derived from the cold press of the seeds from oil production can still be a potential source of bioactive compounds such as antioxidants and antimicrobials. But exposure to oxygen, heat and light can cause loss or reduction of extracts bioactivities. Co-precipitation with biocompatible and biodegradable polymers, such as poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA), may be used to preserve important compounds. This study can be divided in two main parts. The first one applied different extraction techniques on passion fruit seeds and seed cake to evaluate their performances in terms of process global yield, total phenolic content (TPC) (Folin-Ciocalteu method), antioxidant activity (DPPH, ABTS, and β -carotene/linoleic acid bleaching methods) and minimum inhibitory and bactericidal concentrations of extracts (MIC and MBC, respectively) against *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. the extraction methods used were: supercritical fluid extraction (SFE) with pure CO₂ (SC-CO₂), conducted at 40 °C and 50 °C with pressures up to 300 bar and 0.5 kg_{CO2}/h; SFE with CO₂ added with 5 % ethanol (EtOH) at 40 °C, 250 and 300 bar and low pressure techniques (LPE) - cold maceration (MAC) and ultrasonic assisted extraction (UE) - using different organic solvents. Based on process global yield and extracts biological activities results combined, two extracts were selected to continue this study: the seed SC-CO₂/150 bar/40 °C and the cake MAC/EtOH-H₂O. The second part focused on the synthesis of PLGA particles of passion fruit by-products (seed and cake) extracts using two different techniques: the emulsion/solvent evaporation method (ESE) and the Supercritical AntiSolvent process (SAS). The SAS assays were performed with the seed SC-CO₂/150 bar/40 °C and the PLGA with a lactide to glycolide ratio of 50:50. Six conditions were selected to proceed these assays based on the phase equilibria behavior study of the systems containing those components with dichlorometane as solvent and CO₂ as antisolvent. On the ESE assays, the two extracts selected were used as well as two different lactide to glycolide (50:50 and 65:35) ratios on PLGA composition. All particles samples (SAS and ESE) were analyzed in terms of mean size using dynamic light scattering (DLS), morphology by scanning electronic microscope (SEM) or transmission

electron microscopy (TEM), thermal profile by differential scanning calorimetry (DSC) and antimicrobial efficiency (MIC and MBC). Also, their entrapment efficiency (EE) and release behavior were determined spectrophotometrically correlating the particles solutions absorbances at 294 nm to an analytical curve of the extract concentrations. These analysis indicated the effective occurrence of encapsulation, controlled release and spherical shape in most of the particles samples obtained by ESE and SAS. The particles size ranged from 355 to 1498 nm and the EE from 23.8 to 91 %. Combining the size, morphology and entrapment efficiency results, the temperature of 35 °C seems to be more suitable than 45 °C to the precipitation of the supercritical passion fruit seed extract with PLGA 50:50 by SAS. While the ESE results suggest the PLGA 65:35 as more suitable to the encapsulation of the passion fruit seed extract. For the MAC/EtOH-H₂O seed cake extract, the EE was much lower than the supercritical passion fruit seed extract, probably because it is less hydrophobic what reduces the interaction with PLGA. The ESE encapsulation with both PLGA enhanced the antimicrobial activity of both extracts, while the SAS particles did not inhibit the microorganism growth on the tested concentrations, what can be related to its low solubility in aqueous solutions.

Keywords: passion fruit seed, passion fruit residue extract, supercritical fluids, encapsulation, antioxidant activity, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação das regiões brasileiras na produção de maracujá.....	38
Figura 2. Constituição do fruto de maracujá.....	39
Figura 3. Estrutura química dos estilbenos (a) Piceatanol; (b) scirpusin B, um dímero do piceatanol; (c) resveratrol.....	42
Figura 4. Representação genérica do diagrama de fases de um componente puro.....	51
Figura 5. Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas.....	53
Figura 6. Etapas da cinética de extração supercrítica.....	57
Figura 7. Tipos de comportamentos de fases.....	65
Figura 8. Diagrama esquemático do processo SAS.....	75
Figura 9. Semente de maracujá (a) e torta de semente de maracujá (b) no recebimento, (c) semente de maracujá triturada pronta para extração.....	79
Figura 10. Picnômetro acoplado ao cilindro de gás hélio.....	81
Figura 11. (a) Equipamento de extração supercrítica e (b) Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.....	84
Figura 12. (a) Unidade experimental de equilíbrio de fases e (b) diagrama esquemático do aparato experimental para determinação de equilíbrio de fases.....	96
Figura 13. Célula de equilíbrio de volume variável.....	98
Figura 14. Pistão utilizado na célula de equilíbrio.....	99
Figura 15. Diagrama esquemático da unidade de formação de partículas com fluido supercrítico.....	103
Figura 16. Esquema do processo de formação de partículas por emulsificação e evaporação do solvente (ESE).....	104
Figura 17. Curva de extração com fluido supercrítico de semente de maracujá (eixo direito) e torta de semente (eixo esquerdo) a 250 bar, 40 °C e 8 ± 2 g CO ₂ /min.....	115
Figura 18. Curvas de ESC de semente de maracujá experimental e modeladas a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO ₂	118
Figura 19. Curvas de ESC de torta de semente de maracujá experimental e modeladas a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO ₂	119
Figura 20. Isotermas de rendimento da extração supercrítica de a) semente de maracujá e b) torta de semente de maracujá.....	127

Figura 21. Diagrama P-x para o sistema CO ₂ + diclorometano (DCM) + extrato de semente de maracujá (marcadores coloridos) e para o sistema CO ₂ + DCM, dados de Tsvintzelis et al. (2004) (marcadores pretos).	143
Figura 22. Equilíbrio líquido-líquido-vapor do do sistema CO ₂ + diclorometano + extrato supercrítico de semente de maracujá.....	145
Figura 23. Comportamento de fases do sistema etileno + metanol, exemplo de diagrama tipo V.....	146
Figura 24. Diagrama P-x para os sistemas (A) CO ₂ + diclorometano (DCM) + extrato de semente de maracujá e (B) CO ₂ + DCM + extrato de semente de maracujá + PLGA 50:50.....	148
Figura 25. Dados P-x de equilíbrio de fases para o sistema CO ₂ + diclorometano (DCM) + extrato de semente de maracujá para temperaturas de a) 35 °C e b) 45 °C e pontos experimentais de precipitação por SAS a a) 35 °C e b) 45 °C para o sistema CO ₂ + DCM + extrato de semente de maracujá + PLGA 50:50.....	149
Figura 26. Amostras de partículas formadas pelos processos: a) antissolvente supercrítico (SAS) e b) emulsificação/evaporação do solvente (ESE).....	150
Figura 27. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas de PLGA 50:50 com extrato supercrítico de semente de maracujá precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) nas condições a) SAS 1: 92,5% CO ₂ , 35 °C, 90 bar; b) SAS 2: 95 % CO ₂ , 35 °C, 90 bar; c) SAS 3: 95 % CO ₂ , 35 °C, 110 bar; d) SAS 4: 92,5 % CO ₂ , 45 °C, 90 bar; e) SAS 5: 92,5 % CO ₂ , 45 °C, 110 bar; f) SAS 6: 95 % CO ₂ , 45 °C, 110 bar.....	152
Figura 28. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras precipitadas pelo processo de emulsificação/evaporação do solvente (ESE) com a) extrato supercrítico de semente de maracujá e PLGA 50:50; b) extrato supercrítico de semente de maracujá com PLGA 65:35; c) extrato de maceração de torta de semente de maracujá com PLGA 50:50; d) extrato de maceração de torta de semente de maracujá com PLGA 65:35.....	154
Figura 29. Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (PLGA 50:50), extrato de semente de maracujá e amostras precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS).....	158
Figura 30. Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para os polímeros puros (PLGA 50:50 e PLGA 65:35), extrato supercrítico de semente de maracujá, extrato de torta de maceração com etanol e água (1:1, v/v) e amostras precipitadas pelo método emulsificação/evaporação do solvente (ESE).....	159

Figura 31. Perfil de liberação das partículas de PLGA 50:50 com extrato supercrítico de semente de maracujá precipitadas em diferentes condições pelo processo com antissolvente supercrítica (SAS).....	161
Figura 32. Perfil de liberação das partículas de PLGA 50:50 e PLGA 65:35 com extrato supercrítico de semente de maracujá e extrato de torta de semente de maceração com etanol e água (1:1, v/v) sintetizadas pelo processo de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).....	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição em ácidos graxos do óleo de semente de maracujá.....	40
Tabela 2. Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração a baixa pressão.....	46
Tabela 3. Temperatura e pressão críticas de misturas CO ₂ -etanol (calculado por Software SF-Solver, ISCO Inc., Lincoln, NE, USA).....	56
Tabela 4. Temperatura e pressão críticas e densidade de fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica.....	56
Tabela 5. Dados de umidade das matérias-primas.....	113
Tabela 6. Caracterização dea partícula fragmentos das matérias-primas e do leito de partículas formado para a extração supercrítica.....	114
Tabela 7. Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico de semente de maracujá e de torta de semente de maracujá realizada a 250 bar, 40 °C e 8 ± 2 g/min de CO ₂	116
Tabela 8. Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da extração supercrítica de semente de maracujá a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO ₂	119
Tabela 9. Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da extração supercrítica de torta de semente de maracujá a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO ₂	120
Tabela 10. Valores de rendimento global (X ₀) em base úmida obtidos para as extrações de semente de maracujá e torta de semente de maracujá, densidade do CO ₂ supercrítico em cada condição e índices de polaridade dos solventes.....	123
Tabela 11. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de semente de maracujá e torta de semente através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC ₅₀), e comparação com o BHT.....	129
Tabela 12. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e do BHT através do método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação para 1667 µg extrato/mL.....	132
Tabela 13. Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de semente e torta de semente de maracujá.....	134
Tabela 14. Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), para os extratos de semente e torta de semente de maracujá e o BHT.....	136

Tabela 15. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os extratos de semente e torta de semente de maracujá determinados pelo método de microdiluição para <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i>	139
Tabela 16. Tamanho de partículas de PLGA com extratos de resíduos de maracujá (semente e torta) precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) e pelo método de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).....	151
Tabela 17. Eficiência de encapsulamento (EE) de extratos de resíduos de maracujá (semente e torta) em PLGA pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) e pelo método de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).....	156
Tabela 18. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) equivalente de extrato para as partículas de PLGA 50:50 e PLGA 65:35 obtidas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente com extratos de semente e de torta de semente de maracujá determinados pelo método de microdiluição para <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i>	165

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- % AA: Percentual de atividade antioxidante
 Σ : somatório
 $\cdot\text{OH}$: Radical hidroxil
Abs: Absorbância
ABTS: 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA: Análise de variância
AOAC: Association of Analytical Communities
ASE: *Accelerated solvent extraction* - Extração acelerada com solvente
ASES: *Aerosol solvent extraction system* - Sistema de extração de solvente em aerossol
BHT: Butil-hidroxitolueno
Ca: Concentração
Ce: Concentração de extrato ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
 CE_{50} : Concentração efetiva a 50 %
CER: do inglês, *Constant extraction rate*
CMB: Concentração mínima bactericida
CMI: Concentração mínima inibitória
 CO_2 : Dióxido de carbono
CS: Cossolvente
DCM: Diclorometano
DCP: do inglês, *Diffusion-controlled period*
D_{ext}: Diluição das amostras
d_i: Diâmetro da peneira *i*
DLS: *dynamic light scattering* - difusão dinâmica da luz
DMSO: Dimetilsulfóxido
DO: densidade ótica
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazina
d_s: Diâmetro médio superficial das partículas
DSC: *Differential scanning calorimetry* - Calorimetria diferencial de varredura
EE: Eficiência de encapsulamento
 EC_{50} : Concentração equivalente a 50 % da atividade antioxidante
ELL: Equilíbrio líquido-líquido
ELLV: Equilíbrio líquido-líquido-vapor
ELV: Equilíbrio líquido-vapor
ESC: Extração supercrítica
ESE: emulsificação/evaporação do solvente
EtOAc: Acetato de etila
EtOH: Etanol

EtOH-H₂O: mistura de etanol e água (1:1, v/v)
FDA: *Food and Drug Administration*
FER: do inglês, *Falling extraction rate*
GAE: *Galic acid equivalent* - Equivalente de ácido gálico
GAS: *Gas antisolvent* - Gás antissolvente
GRAS: *Generally recognized as safe*
HIV: *human immunodeficiency virus* - vírus da imunodeficiência humana
H₂O: água
Hx: Hexano
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L: Líquido
LCEP: *Lower critical end point* - ponto crítico terminal inferior
M: Massa total de amostra
m: Massa
MAC: Maceração
M_{CER}: Taxa de extração na etapa CER
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
m_{EXT}: Massa de extrato
M_{Extrato}: Massa de extrato
m_f: Massa final de amostra
m_i: Massa inicial de amostra ou massa de amostra retida na peneira *i*
nm: Nanômetro
O/A: emulsão óleo em água
O₂: Oxigênio
O₂^{·-}: Radical superóxido
OH^{·-}: Radical hidroxila
p: Nível de significância
P: Pressão
PB: Ponto de bolha
P_c: Pressão crítica
PCA: *Precipitation with a compressed antisolvent* - Precipitação com antissolvente comprimido
PFE: *Pressurized fluid Extraction* - Extração por fluido pressurizado
PGA: poli(ácido glicólico)
PGSS: *Particles from gas saturated solutions* - Partículas a partir de soluções saturadas de gás
PLA: Poli(ácido lático)
PLE: *Pressure liquid extraction* - Extração com líquidos pressurizados
PLGA: Poli(lactídeo-co-glicolídeo)

PO: Ponto de orvalho
 PVA: Álcool polivinílico
 P-x: Pressão-composição
 Q_{CO_2} : Vazão de solvente
 RESS: *Rapid expansion of supercritical solutions* - Rápida expansão de soluções supercríticas
 R:: Radical alquila
 RO:: Radical alcoxi
 ROO:: Radical alquilperoxil
 S: Sólido
 SAS: *Supercritical antisolvent* - Antissolvente supercrítico
 SC: supercrítico
 SEDS: *Solution enhanced dispersion by supercritical fluids* - Dispersão da solução aumentada por fluidos supercríticos
 SFE: *Supercritical fluid extraction* - Extração com fluido supercrítico
 SFEE: *Supercritical fluid extraction of emulsions* - Extração supercrítica de emulsões
 SOX: Soxhlet
 SSI: *Supercritical solvent impregnation* - Impregnação por solvente supercrítico
 T: Temperatura
 t: Tempo de extração
 T_c : Temperatura crítica
 t_{CER} : Tempo de duração da etapa CER
 TEAC: *Trolox equivalent antioxidant capacity* - Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
 t_{FER} : Tempo de duração da etapa FER
 TFT: Teor de compostos fenólicos total
 TPB: *tryptose phosphate broth* - caldo triptose fosfato
 TSA: *tryptic soy agar* - ágar triptona de soja
 TSAYE: *tryptic soy agar yeast extract* - ágar triptona de soja enriquecido com extrato de levedura
 TSB: *tryptic soy broth* - caldo triptona de soja
 UCEP: *Upper critical end point* - ponto crítico terminal superior
 UE: extração assistida por ultrassom
 V: Vapor
 v: Volume
 x_{CO_2} : Fração mássica de dióxido de carbono
 X_0 : Rendimento global da extração
 Y_{CER} : Concentração de soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER

ε : Porosidade do leito

ρ_a : Massa específica aparente

ρ_{CO_2} : Massa específica do solvente supercrítico

ρ_r : Massa específica real

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
3.1. Maracujá.....	37
3.1.1. Semente de maracujá.....	39
3.2. Bioatividade do maracujá.....	40
3.3. Capacidade Antioxidante.....	43
3.4. Métodos de extração.....	45
3.4.1. Maceração.....	48
3.4.2. Extração assistida por ultrassom.....	49
3.4.3. Extração supercrítica (ESC).....	50
3.4.3.1. Fluidos Supercríticos.....	54
3.4.3.2. Curvas de extração.....	56
3.4.3.3. Modelagem Matemática.....	59
3.5. Equilíbrio de fases.....	61
3.5.1. Comportamento de fases de misturas.....	64
3.6. Formação de partículas.....	67
3.6.1. Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA).....	69
3.6.2. Processos de formação de partículas.....	70
3.6.2.1. Método emulsificação/evaporação do solvente.....	71
3.6.2.2. Formação de partículas utilizando fluidos supercríticos.....	72
3.7. Considerações a respeito do estado da arte.....	75
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.1. Matéria-prima vegetal.....	78
4.1.1. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis.....	79
4.1.2. Determinação do diâmetro médio de fragmentos.....	79
4.1.3. Densidade Real.....	80
4.2. Métodos de extração.....	82
4.2.1. Maceração (MAC).....	82
4.2.2. Extração assistida por ultrassom (UE).....	82
4.2.3. Extração supercrítica (ESC).....	83
4.2.3.1. Experimentos cinéticos – Curvas de extração e parâmetros cinéticos.....	86
4.2.3.2. Determinação das isotermas de rendimento.....	86
4.2.3.3. Emprego de cossolvente (CS).....	87

4.2.4. Tratamento dos extratos e eliminação do solvente.....	88
4.3. Modelagem Matemática.....	88
4.3.1. Densidade Aparente.....	89
4.3.2. Porosidade do leito fixo.....	90
4.4. Avaliação da qualidade dos extratos.....	90
4.4.1. Capacidade antioxidante pelo método de DPPH.....	90
4.4.2. Atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico..	91
4.4.3. Avaliação da inibição da oxidação pelo método ABTS.....	92
4.4.4. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT).....	93
4.4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	94
4.5. Determinação experimental do equilíbrio de fases.....	95
4.5.1. Aparato experimental.....	96
4.5.2. Procedimento experimental.....	99
4.6. Formação de partículas.....	101
4.6.1. Precipitação com antissolvente supercrítico.....	101
4.6.2. Síntese de partículas por emulsificação e evaporação do solvente.....	103
4.7. Análise das partículas obtidas.....	105
4.7.1. Tamanho de partículas.....	105
4.7.2. Caracterização da morfologia das partículas.....	105
4.7.3. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	106
4.7.4. Determinação da eficiência de encapsulamento.....	106
4.7.5. Estudo de liberação controlada.....	107
4.7.6. Avaliação da capacidade antimicrobiana das partículas.....	107
4.8. Análise estatística.....	108
4.9. Resumo de experimentos.....	108
5. RESULTADOS.....	113
5.1. Caracterização das matérias-primas e do leito de extração supercrítica.....	113
5.2. Cinética da extração com fluido supercrítico.....	114
5.3. Modelagem matemática das curvas de extração supercrítica.....	117
5.4. Rendimento global de extração.....	123
5.5. Atividade antioxidante pelo método de DPPH.....	128
5.6. Capacidade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. l	131
5.7. Capacidade antioxidante total pelo método ABTS.....	133
5.8. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT).....	135
5.9. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	139
5.10. Equilíbrio de fases do extrato supercrítico de semente de maracujá.....	142

5.11. Caracterização das partículas obtidas.....	150
5.11.1. Tamanho e morfologia das partículas.....	150
5.11.2. Eficiência de encapsulamento.....	155
5.11.3. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	157
5.11.4. Estudo do perfil de liberação.....	160
5.11.5. Avaliação da atividade antimicrobiana das partículas.....	164
6. CONCLUSÕES.....	167
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	169
REFERÊNCIAS.....	171
ANEXO I – MODELOS MATEMÁTICOS.....	199

1. INTRODUÇÃO

No Brasil ainda há poucos investimentos em tecnologias capazes de agregar valor à gigantesca quantidade de resíduos gerados pela agricultura e pela agroindústria nacionais, apesar de a maioria desses subprodutos apresentar potencial para reaproveitamento. Entretanto, com as exigências governamentais atuais para o tratamento dos resíduos gerados pelas indústrias, o que acarreta custos cada vez maiores para elas, aumenta a importância do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o reaproveitamento desses resíduos, ao mesmo tempo em que sejam ambientalmente seguras (limpas) e garantam a qualidade dos produtos.

Por outro lado, a demanda por um estilo de vida saudável, ou seja, por produtos compostos por ingredientes naturais que ofereçam benefícios para a saúde tem aumentado; fato que desperta um grande interesse das indústrias tanto de alimentos como de fármacos e cosméticos na obtenção e utilização de extratos vegetais que apresentem características funcionais (biológicas), com alto grau de pureza, uma vez que substâncias sintéticas, muitas vezes, são suspeitas de causar efeitos maléficis à saúde. O isolamento desses compostos naturais possibilita o aproveitamento integrado de resíduos gerados na agroindústria e podem resultar em novas alternativas empresariais, além de minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos.

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), com produção anual em torno de 330,8 mil toneladas e rendimento de 9,9 t/ha, e o maior exportador de suco concentrado (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; OLIVEIRA; REGIS; RESENDE, 2011). Cascas e sementes de maracujá, provenientes do processo de corte e extração da fruta para obtenção de suco e polpa, representam de 40 a 65 % dessa matéria-prima, sendo ainda atualmente, em grande parte, descartadas (OLIVEIRA; REGIS; RESENDE, 2011). Como este descarte representa um elevado montante, a necessidade de se implementar sistemas de aproveitamento desse resíduo industrial é de ordem não só econômica como ambiental, científica e tecnológica essencialmente quanto ao desenvolvimento de novos produtos e processos que agreguem valor a este subproduto.

A casca e as sementes do maracujá podem ser aproveitadas para a alimentação animal (OTAGAKI; MATSUMOTO, 1958), para a produção de pectina a partir da casca (LIRA FILHO, 1995) e extração de óleo comestível das sementes (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). Os frutos apresentam cerca de 4 a 12 % de sementes (FERRARI;

COLUSSI; AYUB, 2004; OLIVEIRA; REGIS; RESENDE, 2011), que por sua vez contêm aproximadamente 12 % de proteínas e 30 % de óleo (MALACRIDA; JORGE, 2012). O óleo extraído das sementes apresenta elevado teor de ácidos graxos insaturados (cerca de 87 %), com predominância do ácido linoleico, seguido de oleico (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; FERREIRA et al., 2011; MALACRIDA; JORGE, 2012).

Segundo a literatura, o extrato de semente de maracujá apresenta potencial antioxidante e presença de compostos fenólicos e carotenóides, que, em geral, estão associados à atividade antioxidante (FERREIRA et al., 2011), possibilitando assim uma alternativa de agregação de valor para esse material. Entre os compostos fenólicos presentes no óleo de maracujá, dois têm se destacado na literatura recente: scirpusin B e piceatannol. Estudos têm demonstrado que o piceatannol possui propriedades antitumorais contra diferentes tipos de câncer, como leucemia, próstata, mama, bexiga (FERRIGNI et al., 1984; KIM et al., 2009; LEE et al., 2009; VO et al., 2010; KUO; HSU, 2008), além de inibidor do anticorpo associado à doença de Alzheimer (VACIRCA et al., 2011). Enquanto a scirpusin B apresenta atividade antitumoral (WU et al., 2010), anti-HIV (YANG et al., 2005) e de vasorelaxação em artérias (SANO et al., 2011). Assim, o aproveitamento do resíduo industrial da produção de suco e polpa de maracujá representa fonte potencial desses compostos, o que aumenta seu potencial de utilização na área da saúde.

A qualidade e composição dos extratos de produtos naturais estão fundamentalmente relacionadas com a técnica de extração empregada na sua preparação. Métodos tradicionais de extração são largamente utilizados para a obtenção de extratos de diversas matrizes vegetais. Porém, essas técnicas geralmente envolvem altas temperaturas de processo, o que pode ocasionar a destruição de compostos termossensíveis e, além disso, os solventes orgânicos utilizados podem ser prejudiciais à saúde, havendo a necessidade de posteriormente separá-los do extrato e, assim, gerando resíduos nocivos ao meio ambiente (WANG; LIEN; YU, 2004).

O emprego de técnicas modernas para extração e isolamento de compostos de interesse, como a extração supercrítica (ESC), constitui uma alternativa muito atraente para o aproveitamento integrado de resíduos gerados na agroindústria, podendo resultar em novas alternativas empresariais, além de minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos. Essa tecnologia emprega gases

pressurizados como solventes e se destaca por possibilitar a obtenção de extratos isentos de solvente (tecnologia limpa) e reduzida degradação térmica, além de possibilitar o fácil controle da seletividade do processo para um grupo específico de compostos a serem extraídos através do ajuste de parâmetros como pressão e temperatura. A validação da ESC como alternativa viável para a obtenção de extratos a partir de plantas, de resíduos da agroindústria e de diversos produtos naturais está associada à atividade biológica dos extratos e por isso tem sido extensivamente empregada para a obtenção de extratos de alto valor agregado (DANIELSKI et al., 2005; KITZBERGER et al., 2007).

Scirpusin B e piceatannol possuem estrutura semelhante ao resveratrol, composto fenólico presente em uvas e vinhos, conhecido por seus benefícios à saúde e também por sua instabilidade quando exposto à luz e ao oxigênio (FILIP et al., 2003). Face ao exposto, torna-se necessária a consecução de investigações com vistas ao aprimoramento de técnicas de preservação desses compostos frente à degradação. A estabilidade de compostos frente à oxidação e degradação pode ser consideravelmente incrementada pelo encapsulamento dos mesmos em biopolímeros, assim como pode ser preservada sua atividade biológica e alterado seu sistema de liberação, ou seja, de absorção pelo organismo humano, havendo a possibilidade de reduzir sua dose aplicada. Ainda, o encapsulamento previne a perda de compostos voláteis, mascara sabores e odores desagradáveis e favorece a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meios hidrofílicos o que amplia sua gama de aplicação, uma vez que na indústria alimentícia a inclusão de compostos bioativos lipofílicos para o desenvolvimento de alimentos “saudáveis” é uma das maiores dificuldades a ser superada (GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011).

Há uma gama de biopolímeros naturais ou sintéticos que podem ser empregados como agentes encapsulantes de compostos bioativos por apresentarem biocompatibilidade e biodegradabilidade. O polímero utilizado como agente encapsulante exerce um papel importante na qualidade do produto encapsulado, uma vez que, além da proteção oferecida aos compostos encapsulados, o tipo de polímero é que estabelece como o composto encapsulado será liberado (MATTEA et al., 2009; FRANCESCHI et al., 2009). Entre os polímeros sintéticos, o grupo poliéster (*i.e.*, poli(ácido lático) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ácido glicólico) (PGA)) é de interesse da área biomédica devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Em particular, o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) é um polímero bioabsorvível bastante promissor por

sofrer degradação por hidrólise gerando produtos que são absorvidos pelo organismo, como o ácido láctico e o ácido glicólico. O uso do PLGA foi aprovado para tratamento terapêutico em humanos pelo FDA (Food and Drug Administration - órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos, medicamentos e cosméticos) (ANDERSON e SHIVE, 1997; ASTETE e SABLIOV, 2006).

Existem várias técnicas potencialmente úteis para a preparação de partículas poliméricas biodegradáveis. As características físicas das partículas (morfologia, tamanho e distribuição de tamanho de partículas) são afetadas pela técnica de produção utilizada bem como pelas condições de processo que incluem massa molecular do polímero, compostos ativos a serem encapsulados, solventes e outros componentes (surfactantes) usados, temperatura e pressão, entre outros (ASTETE e SABLIOV, 2006). Assim, o estudo de diferentes tecnologias visa o controle de tamanho e morfologia das partículas precipitadas, consecução de alta eficiência de encapsulamento, eliminação efetiva dos solventes líquidos das partículas, baixo custo de operação, controle de liberação e manutenção da atividade biológica do material encapsulado, entre outros.

O método emulsificação/evaporação de solvente envolve a preparação de uma solução orgânica contendo o polímero e o extrato/composto dissolvidos e a sua dispersão sob a forma de microgotas num meio de não-solvente (meio de suspensão) em que o polímero seja insolúvel e que seja imiscível com o solvente orgânico. Geralmente o meio de suspensão contém um emulsificante/estabilizante para manter a individualidade das gotas. Em seguida, ocorre a eliminação do solvente por evaporação, por isso este deve ter um ponto de ebulição bastante inferior ao do não-solvente. A água e o diclorometano são os não-solventes e solventes, respectivamente, mais utilizados. Podem ser utilizados diferentes tipos de emulsões, sendo as de óleo em água (O/A) vantajosas porque utilizam a água como não-solvente, ou seja, o processo é econômico, não necessita de reciclagem, as partículas são facilmente lavadas e raramente aglomeram. A grande limitação é a sua utilização para extratos/compostos hidrossolúveis. A granulometria das micropartículas pode ser controlada por diferentes parâmetros como viscosidade, velocidade de homogeneização e agente de suspensão utilizado (SILVA et al., 2003).

O uso de fluidos sub ou supercríticos na produção de partículas foi demonstrado por diversos pesquisadores como útil na modificação

das propriedades de materiais como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, cristalinidade e morfologia, devido às características de manipulação do poder solvente pelo ajuste das condições de temperatura e pressão do sistema e da alta difusividade que são peculiares dos fluidos nas proximidades do ponto crítico. Essas características também propiciam uma eficiente separação do solvente e do antissolvente das partículas após a precipitação, sendo possível, então, evitar resíduos de solventes no produto e oferecer um reaproveitamento potencialmente vantajoso do solvente e do antissolvente. O princípio básico da utilização de dióxido de carbono supercrítico como antissolvente reside no fato de que o soluto (extrato e polímero) seja completamente miscível no solvente orgânico e imiscível, ou pouco miscível no antissolvente e, ainda, que o solvente orgânico possua maior afinidade pelo antissolvente do que pelo soluto. Assim, quando a solução contendo o soluto é aspergida através de um fino bocal e posta em contato com o antissolvente em uma câmara de precipitação, a solubilidade do soluto no solvente orgânico é drasticamente reduzida, devido ao antissolvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico levando a precipitação do soluto na forma particulada (MARTÍN; COCERO, 2008; COCERO et al., 2009).

O conhecimento do comportamento de fases de extratos naturais em fluidos supercríticos é, dentre as relações termodinâmicas, um dos fatores mais importantes para o delineamento de processos de interesse de indústrias alimentícias e farmacêuticas, como por exemplo modelagem, otimização e projeto de processos de extração, separação, precipitação e encapsulamento com fluidos supercríticos (CHEN; CHANG; YANG, 2000). Dados de equilíbrio de fases em uma ampla faixa de temperatura e pressão fornecem informações sobre a solubilidade e a seletividade dos solutos no solvente supercrítico, o tipo de transição de fases e os limites em que o sistema se encontra em fase única, úteis para a determinação das condições operacionais adequadas para a coprecipitação/formação de partículas a alta pressão por técnicas como rápida expansão de soluções supercríticas (RESS), gás antissolvente (GAS), e antissolvente supercrítico (SAS), entre outros (REVERCHON; DELLA PORTA; FALIVENE, 2000; JUNG; PERRUT, 2001; TSIVINTZELIS et al., 2004; MARTÍN; COCERO, 2008; COCERO et al., 2009).

Um grande volume de suco de maracujá amarelo é produzido no Brasil, porém é pequeno o número de estudos encontrados na literatura abrangendo o reaproveitamento das sementes dessa fruta. E, apesar de serem conhecidos os benefícios da extração com CO₂ supercrítico para a

manutenção das propriedades de extratos e óleos essenciais, também são escassos os relatos na literatura de aplicação desta técnica à semente de maracujá e a seu resíduo após extração do óleo por prensagem a frio. Assim como são raros estudos abordando o encapsulamento de extratos de maracujá para preservação de seus compostos bioativos e, assim, propor formas de agregação de valor a esses subprodutos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de extratos naturais e encapsulados bioativos a partir sementes de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), assim como de torta de semente - resíduos agroindustriais da produção de suco e de óleo de semente dessa fruta, respectivamente -, com vista na otimização dos processos de extração e precipitação, avaliando sua eficácia na obtenção de produtos com destacada atividade antioxidante e/ou antimicrobiana.

2.2. Objetivos específicos

- a) Utilizar técnicas de extração à baixa pressão (maceração e extração assistida por ultrassom) com solventes orgânicos de diferentes polaridades para a obtenção de extratos de semente de maracujá e de torta de semente de maracujá;
- b) Avaliar o rendimento da ESC em função das condições de operação (temperatura e pressão) e comparação com as técnicas de extração a baixa pressão;
- c) Avaliar o efeito da adição de etanol como cossolvente na extração supercrítica de torta;
- d) Estudar a cinética de transferência de massa e modelagem das curvas de extração supercrítica da semente e do resíduo da semente de maracujá utilizando os seguintes modelos disponíveis na literatura: Sovová (1994), Martínez et al. (2003), Crank (1975), Tan e Liou (1989) e Gaspar et al. (2003);
- e) Avaliar a atividade antioxidante através dos métodos de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina) e ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) e do sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico para os diferentes extratos;
- f) Determinar o teor de compostos fenólicos dos diferentes extratos pelo método de Folin-Ciocalteu;
- g) Estudar o equilíbrio de fases de sistemas extrato + diclorometano + CO₂ e extrato + diclorometano + CO₂ + PLGA visando obter informações para o estabelecimento das condições (temperatura, pressão e composição) para a precipitação em meio supercrítico dos extratos;

- h) Precipitar o extrato de semente de maracujá obtido com dióxido de carbono supercrítico com biopolímero (PLGA 50:50) empregando-se a tecnologia antissolvente supercrítico (SAS);
- i) Aplicar a técnica de emulsificação/evaporação do solvente (ESE) para sintetizar partículas empregando-se dois tipos de PLGA (com diferentes proporções de co-polímeros) e dois tipos de extratos: de semente de maracujá obtido com dióxido de carbono supercrítico, e de torta de semente de maracujá obtido por maceração em mistura de etanol e água;
- j) Avaliar as características das partículas formadas em termos de tamanho por difusão dinâmica da luz (DLS), morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfil térmico por calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- k) Determinar a eficiência de coprecipitação/encapsulamento;
- l) Avaliar o perfil de liberação dos extrato contidos nas partículas;
- m) Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos coprecipitados (partículas).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Maracujá

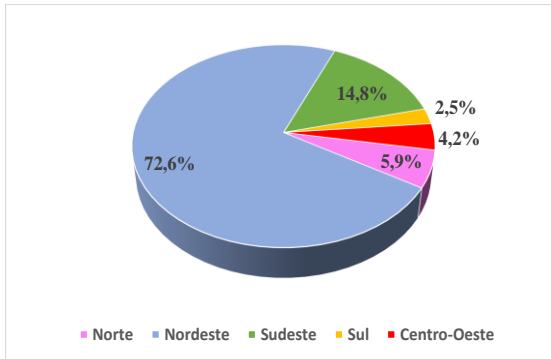
O maracujá pertence à família Passifloraceae, gênero *Passiflora* que por sua vez é formado de 24 subgêneros e 465 espécies. Dessas, entre 150 e 200 são originárias do Brasil (EMBRAPA, 2012).

O maracujá-amarelo ou maracujá-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) é um dos mais cultivados devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco. A planta é uma trepadeira lenhosa de grande vigor vegetativo, de caule cilíndrico ou ligeiramente anguloso. Os frutos são globosos ou ovóides, sua polpa é um tanto ácida e muito aromática. O maracujazeiro tem longo período de safra, variável de oito meses na região Sudeste do Brasil (dez meses na região Nordeste) até doze meses na região Norte (EMBRAPA, 2012).

O Brasil é o principal produtor e consumidor mundial de maracujá-amarelo há mais de duas décadas (MELETTI, 2011). Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália também se destacam como produtores, apesar de em quantidades bastante inferiores ao Brasil (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). A produção brasileira de maracujá cresceu de 409 mil a 776 mil toneladas entre 1996 e 2012. O avanço da produção resulta de um progresso tecnológico, que elevou a produtividade em todas as regiões geográficas. Os sucos concentrados representam a maior parcela da exportação, alcançam as melhores cotações e ganhos em divisas, e são, atualmente, comercializados mais intensamente com Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha, os quais importam 76 % do suco concentrado produzido no Brasil (MELETTI, 2011).

Segundo dados do IBGE, em 2012 a produção de maracujá no Brasil ultrapassou 776.000 toneladas e ocupa a nona posição em termos de participação percentual no total de frutas produzidas no país. O estado da Bahia é o maior produtor nacional de maracujá, responsável por quase metade da produção brasileira (IBGE, 2012). A Figura 1 apresenta a participação das regiões brasileiras na produção de maracujá.

Figura 1. Participação das regiões brasileiras na produção de maracujá.

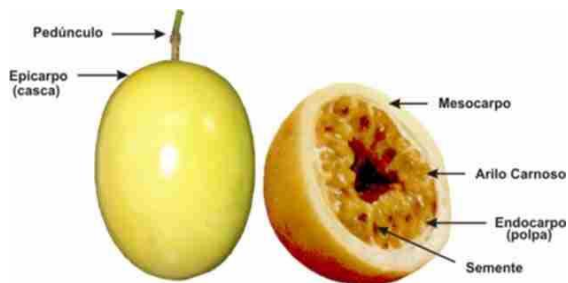


Fonte: IBGE (2012).

A maior importância econômica do fruto do maracujazeiro está no produto industrializado sob a forma de suco concentrado. Porém, essa produção de suco gera toneladas de resíduo, composto por cascas e sementes, que representam cerca de 50 e 12 % da matéria-prima, respectivamente. Esse resíduo se acumula em grandes quantidades nos pátios das indústrias processadoras de suco sendo, em grande parte, descartado. Atualmente, esses subprodutos são utilizados por produtores rurais na suplementação da alimentação animal, como ração para bovinos e aves, ainda sem muita informação técnica adequada. Como este volume representa inúmeras toneladas, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; OTAGAKI; MATSUMOTO, 1958).

A partir do mesocarpo (parte branca da casca) do fruto do maracujá (Figura 2) é possível se obter a pectina, que se encontra em proporções que chegam a alcançar 2 % (SOUZA; SANDI, 2001). A utilização da farinha da casca de maracujá no tratamento complementar da obesidade e diabetes realizada com animais em laboratório tem demonstrado o potencial do maracujá como alimento funcional (JUNQUEIRA-GUERTZENSTEIN, 2002).

Figura 2. Constituição do fruto de maracujá.



Fonte: Ceasa Minas (2014).

3.1.1. Semente de maracujá

As sementes, no maracujá, representam cerca de 4 a 12 % do peso total do fruto (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; OLIVEIRA; REGIS; RESENDE, 2011) e, segundo Tocchini (1994), podem ser boas fontes de óleo, carboidratos, proteínas e minerais, apesar do alto conteúdo de celulose e lignina que podem limitar seu uso na alimentação animal, principalmente dos monogástricos. As sementes contêm, aproximadamente, 10-12 % de proteínas, 23-30 % de óleo e 50-60 % de fibras (CHAU; HUANG, 2004; LIU et al., 2008; MALACRIDA; JORGE, 2012). O óleo extraído das sementes apresenta elevado teor de ácidos graxos insaturados (87,54 %), com predominância do ácido linoleico, com índice de iodo de 136,5 g I₂/100 g_{óleo}. O óleo de sabor agradável e odor suave compara-se ao óleo de algodão em valor nutritivo e digestibilidade. Esse óleo pode ser utilizado tanto na alimentação humana e animal, quanto na indústria de cosméticos, tintas, sabões, alimentos e outras (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; FERREIRA et al., 2011).

Em estudo de Couto (1996), a análise da composição química dos ácidos graxos determinados por cromatografia gasosa revelou a presença de 17,31 % de ácido oleico, 68,06 % de ácido linoleico, 10,41 % de ácido palmítico, 3,10 % de ácido esteárico e 0,38 % de ácido linolênico. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Ferrari, Colussi e Ayub (2004) na análise da composição química do óleo das sementes, que demonstraram elevado teor dos ácidos graxos insaturados linoleico e oleico, conforme apresentado na Tabela 1. A torta obtida após a extração do óleo apresenta alto teor de proteínas, fibras e carboidratos.

A indústria de cosméticos criou um novo nicho de mercado para as sementes de maracujá em formulações cosméticas (hidratantes, condicionadores, sabões, etc.), pois seu óleo fixo tem ação no tecido cutâneo impedindo a perda transepidérmica de água. Essa propriedade emoliente de óleos como de maracujá (*P. edulis* e *P. incarnata*) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) pode estar associada ao seu teor de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico (ômega-6), que têm função nutritiva participando em vários processos bioquímicos e fisiológicos de formação de epitélios (BLOISE, 2003; OLIVEIRA, 2003).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos do óleo de semente de maracujá.

Ácido graxo (%)	Óleo de semente de maracujá
C 14:0 (mirístico)	0,08
C 16:0 (palmítico)	12,04
C 18:0 (esteárico)	tr*
C 18:1 (oléico)	18,06
C 18:2 (linoléico)	68,79
C 18:3 (linolênico)	0,69
Σ saturados	12,46
Σ insaturados	87,54

tr* = traços.

Fonte: Ferrari, Colussi e Ayub (2004).

3.2. Bioatividade do maracujá

De acordo com o perfil de utilização de fitoterápicos pela população brasileira, a *Passiflora* está entre os mais utilizados. A *Passiflora edulis* é utilizada como sedativo, calmante, diurético, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antidiarréico, tônico e no tratamento da hipertensão, sintomas da menopausa, tosses, cólicas infantis e insônia, sendo a maioria desses efeitos fisiológicos atribuídos a compostos fenólicos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; ZERAIK et al., 2010; SANO et al., 2011).

O conhecido efeito contra ansiedade da *Passiflora* é atribuído principalmente aos flavonóides, crisina e BZF (benzoflavanóide)

(COSTA; TUPINAMBÁ, 2005). Observou-se em testes realizados em ratos que o extrato aquoso de *P. edulis f. flavicarpa* prolongou o tempo de sono induzido por barbitúrico, reduziu a temperatura corpórea, potencializou a ação da morfina, reduziu o efeito estimulante da anfetamina e induziu catatonia. A ação depressora estaria relacionada às frações alcalóidicas e, notadamente, as flavonoídicas (ZERAİK et al., 2010).

Subprodutos de frutas contêm elevadas quantidades de compostos bioativos que podem ter um efeito positivo para a saúde e contribuir para a prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes, entre outras (AYALA-ZAVALA et al., 2011). As variedades comerciais de maracujá são ricas em alcalóides, flavonóides e carotenóides, minerais e vitaminas A e C, substâncias responsáveis pelo efeito funcional em outros alimentos, notadamente por sua capacidade antioxidante (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; ZERAİK et al., 2010). Já foi reportado que a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é maior que a da vitamina C, assim como a combinação de substâncias antioxidantes com diferentes propriedades químicas pode ter um efeito sinérgico, proporcionando maior proteção para as células (SCALBERT et al., 2005; BLOMHOFF et al., 2006). Os flavonóides apresentam atividade antioxidante de diversas formas: atividades antirradical (-OH), antilipoperoxidação (R-, ROO-, RO-) e quelante de metais. Os flavonóides são potenciais antioxidantes contra a ação de radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio. A natureza química dos flavonóides depende da sua classe estrutural, do seu grau de hidroxilação, substituição e conjugação, e do grau de polimerização presente no composto (SENEVIRATHNE et al., 2009).

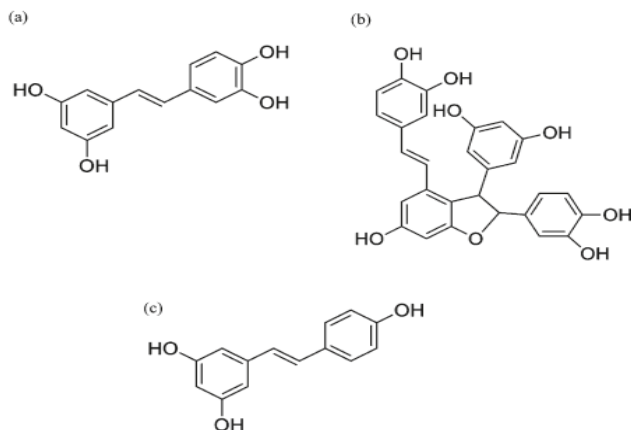
De acordo com Ferreira et al. (2011), o óleo de maracujá apresenta atividade antioxidante, com EC_{50} (que representa a concentração do extrato na qual se obtém uma inibição de 50 % da oxidação) de $5,7 \pm 0,1$ mg/mL para o óleo refinado e $7,1 \pm 0,2$ mg/mL para o óleo prensado a frio, determinado por DPPH. Essa atividade pode ser devida a presença de fenóis e carotenóides. Ainda, segundo os mesmos autores, o óleo de semente de maracujá também não apresentou toxicidade, avaliada pelo teste de letalidade de camarões.

Matsui et al. (2010) reportaram que as sementes de maracujá contêm dois estilbenos de estruturas bastante semelhantes, resveratrol e piceatanol, sendo esse último em grande quantidade. Sano et al. (2011) identificaram um outro componente importante da semente de maracujá, scirpusin B, também presente em elevada quantidade. De acordo com esses autores, 100 g de sementes secas contêm 570 mg e 360 mg de

piceatannol e scirpusin B, respectivamente. As estruturas desses compostos, juntamente com o resveratrol, são apresentadas na Figura 3.

O piceatanol (também conhecido como resveratrol monohidroxiado ou ainda 3,3',4,5'-tetrahidroxi-trans-estilbeno) pode ser sintetizado pela adição de um grupo hidroxil em um dos extremos da molécula de resveratrol (posição 30), como ocorre *in vivo* através da enzima CYP1B1 (POTTER et al., 2002; NDIAYE; KUMAR; AHMAD, 2011). As propriedades farmacológicas dessa substância, em especial seu efeito quimiopreventivo e antitumoral, antioxidante e anti-inflamatório sugerem seu potencial como aditivo bioativo em alimentos, fármacos e cosméticos (PIOTROWSKA; KUCINSKA; MURIAS, 2012). Yim et al. (2010), reportaram o efeito inibitório dose-dependente do piceatanol contra bactérias cariogênicas Gram-positivas, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. De acordo com Matsui et al. (2010), o piceatanol exerce um efeito positivo em cultura de células dérmicas, estimulando a síntese de colágeno e inibindo a melanogênese. Vacirca et al. (2011) sugeriram que o piceatannol é um inibidor específico do anticorpo ecto-F1-ATPase (ASabs) que teria um papel patogênico na doença de Alzheimer. Destacam-se ainda na literatura alguns estudos sobre as propriedades antitumorais dessa substância contra diferentes tipos de câncer, como leucemia (Ferrigni et al., 1984), próstata (KIM et al., 2009; LEE et al., 2009), mama (VO et al., 2009) e bexiga (KUO; HSU, 2008).

Figura 3. Estrutura química dos estilbenos (a) Piceatanol; (b) scirpusin B, um dímero do piceatanol; (c) resveratrol.



Fonte: Sano et al. (2011).

Para a scirpusin B, apesar de extraída pela primeira vez em 1978 por Nakajima et al. (1978), ainda há poucos estudos disponíveis, mas alguns já reportam atividade antitumoral contra câncer de mama (WU et al., 2010), anti-HIV (YANG et al., 2005) e sequestrante de ânion superperóxido (XIANG et al., 2005). Sano et al. (2011) referem-se a scirpusin B como forte antioxidante, com atividade maior que trolox (derivado da vitamina E solúvel em água), resveratrol e piceatanol a baixas concentrações, enquanto em concentrações maiores a atividade antioxidante seguiu a ordem trolox > scirpusin B > piceatanol > resveratrol. Esses autores relataram ainda efeito de vasorelaxação em artérias da scirpusin B maior que do piceatanol.

3.3. Capacidade antioxidante

Radical livre é uma molécula ou fragmento molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados, o que torna essa molécula extremamente reativa quimicamente (GALATO, 2004). Se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos, ou devido a fatores ambientais adversos, e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer danos profundos às células e tecidos do corpo humano (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Isso porque a interferência desses radicais nas reações metabólicas pode debilitar o sistema imunológico, alterar o sistema hormonal, acelerar o processo de envelhecimento e/ou favorecer o aparecimento e desenvolvimento de células cancerígenas (DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Já em produtos alimentícios os radicais livres podem atacar ligações insaturadas de moléculas lipídicas, proteínas, carboidratos e nucleotídeos, causando o desenvolvimento de rancidez, *off-flavors* (sabores residuais), e perda de valor nutritivo e de vida de prateleira dos produtos (LOULI; RAGOSSIS; MAGOULAS, 2004). Substâncias antioxidantes são a primeira defesa nessa área devido a sua habilidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, inibindo ou retardando a oxidação de outras moléculas pela interferência na formação desses radicais (iniciação) ou na propagação de reações oxidativas em cadeia, mas não podem eliminar produtos da oxidação que já tiverem sido produzidos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; CORTESI et al., 1999; LOULI; RAGOSSIS; MAGOULAS, 2004; VELIOGLU et al., 1998).

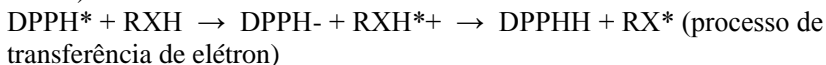
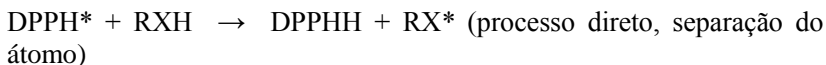
Os efeitos defensivos de antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais estão relacionados a quatro grandes grupos: ácidos ascórbico e fenólicos, como antioxidantes hidrofílicos, e tocoferóis e

carotenóides, como antioxidantes lipofílicos (KAUR e KAPOOR, 2001). Considerando isso, diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes para a prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre esses métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e métodos de sequestro de radicais livres, tal como DPPH· (2,2-difenil-1-picrilidrazina) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Geralmente, os alimentos são sistemas heterogêneos compostos por mais de uma fase, formando, muitas vezes, emulsões entre lipídios e água através da presença de agentes emulsificantes. Assim, método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico utiliza uma emulsão formada por esse sistema para avaliar a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, determinando a capacidade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas a 470 nm da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico que ocorre rapidamente na ausência de um composto antioxidante. O radical livre formado a partir do ácido linoleico, pela retirada de um átomo de hidrogênio de um de seus grupos metileno, ataca as moléculas de β -caroteno, o qual perde uma ligação dupla que caracteriza sua coloração laranja. (MATTHÄUS, 2002; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KATALINIC et al., 2010).

Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico, o método de sequestro de radicais livres de DPPH está baseado no descoloramento de uma solução composta por esses radicais estáveis à temperatura ambiente, de cor violeta, quando em presença de substâncias que podem ceder átomos de hidrogênio. Esse método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). No caso dos compostos fenólicos, a disponibilidade de grupos hidroxila faz com que sejam capazes de sequestrar radicais, como superperóxido e DPPH, através de uma simples transferência de elétrons (MENSOR et al., 2001). Ainda, o DPPH tem a vantagem de não ser afetado por certas reações secundárias dos compostos fenólicos como enzimáticas ou quelação de íons metálicos (OLIVEIRA et al., 2009). Quando o radical DPPH recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. Esse processo pode ocorrer de duas

maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron, como apresentado pelas reações a seguir.



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

Outro método bastante utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical monocatión 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico), ou ABTS⁺, que pode ser gerado pela oxidação do ABTS através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Através dessa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, o ABTS⁺ é convertido a uma forma não colorida, podendo-se, assim, medir a diminuição da formação do ABTS (descoloração) por espectrofotometria, expresso como porcentagem de inibição do radical ABTS⁺ (RE et al., 1999). É possível, então, determinar a quantidade de ABTS⁺ consumida devido à reação com amostras antioxidantes, que pode ser expressa em Trolox equivalentes (unidades de concentração). Esse valor foi designado como TEAC (do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, que significa capacidade antioxidante equivalente em Trolox), fornecendo uma estimativa da quantidade de radicais consumidos pelo antioxidante (CAMPOS; LISSI, 1997; BORGES et al., 2011). O resultado da determinação do TEAC é dependente do tempo de incubação e da taxa amostra quantificada (EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Esta dependência somada a pouca seletividade do ABTS⁺ na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem a limitação desse método (CAMPOS; LISSI, 1997).

3.4. Métodos de extração

Extração é uma das operações unitárias mais utilizadas na indústria de alimentos. É usada principalmente para obtenção de certos

componentes desejados, inicialmente retidos na matriz do alimento. As substâncias obtidas podem ser usadas como aditivos alimentares ou para produzir algum efeito específico na saúde humana (MOURE et al., 2001; PINELO; SINEIRO; NÚNEZ, 2006).

A técnica de extração empregada na obtenção de extratos de produtos naturais influencia diretamente sua qualidade e sua composição final. O procedimento de extração é determinado considerando a família de compostos a ser extraída e também se o objetivo da operação é quantitativo ou qualitativo. Os métodos de extração dependem de fenômenos de transfência de massa; logo, a renovação do solvente e a agitação são importantes na eficácia e duração do processo. O rendimento e a composição dos extratos dependem tanto do solvente utilizado como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, pois a solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies do sistema, função de sua polaridade - ou seja, diferentes substâncias serão extraídas de acordo com seu índice de polaridade e do solvente utilizado (BISCAIA, 2007; MOURE et al., 2001; ROCKENBACH et al., 2008). A Tabela 2 apresenta o índice de polaridade de alguns solventes normalmente utilizados na obtenção de extratos naturais.

Tabela 2. Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração a baixa pressão

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

Fonte: Phenomenex (2013).

Técnicas convencionais de extração com uso de solventes orgânicos, como maceração e Soxhlet, são comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia para a obtenção de variados extratos, e podem utilizar uma ampla variedade de solventes como metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, éter, etc. No entanto, essas técnicas requerem um alto custo energético e podem degradar substâncias termicamente sensíveis, pois podem utilizar altas temperaturas de extração ou de separação da mistura soluto-solvente,

dependendo da temperatura de ebulição do solvente. A etapa de recuperação do solvente após a extração é crucial devido a problemas econômicos e de segurança ambiental, mas, principalmente, pela possibilidade de haver resíduo do solvente no produto final. Na maioria das situações, tanto para fins sensoriais quanto para fins farmacológicos, o solvente residual é indesejável por sua toxicidade, sua capacidade reagente ou mesmo pela interferência no aroma e no extrato obtido (BISCAIA, 2007; CAMPOS, 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; LI; PORDESIMO; WEISS, 2004; MEZZOMO, 2008).

Diversos métodos e sistemas de solventes vêm sendo usados para a extração de compostos biologicamente ativos de matérias vegetais, mas encontrar um método único que seja adequado para aplicação a um grupo diverso de materiais não é uma tarefa fácil devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos componentes às condições de extração. Métodos alternativos às técnicas convencionais de extração vêm sendo cada vez mais utilizados, como a extração assistida por microondas, a extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico e extração com líquidos pressurizados. Essas técnicas são mais rápidas que as técnicas convencionais de extração, utilizam menor quantidade de solvente, diminuem a degradação da amostra, podem eliminar as etapas de limpeza ou *clean up* da amostra e de concentração antes das análises cromatográficas, melhorar a eficiência de extração e a seletividade, além de serem de fácil automação (JACQUES, 2005). O tipo de solvente, em função de sua polaridade, pode afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante. Quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, as extrações geralmente são realizadas utilizando água, alcoóis ou uma mistura deles, como é o caso dos ácidos fenólicos por serem compostos polares (BISCAIA, 2007; ROCKENBACH et al., 2008). Outra boa opção seria o acetato de etila por apresentar baixo ponto de ebulição, o que facilita sua remoção do extrato e sua reutilização, além de a possível presença de seu resíduo no extrato dificilmente ser considerada tóxica, por ser um típico componente de bebidas fermentadas em níveis de mg/L (LOULI; RAGOSSIS; MAGOULAS, 2004).

A extração que utiliza fluidos supercríticos como solventes tem sido uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, e seu emprego em processos industriais vem ganhando espaço continuado, principalmente devido aos fatores ambientais e de qualidade. Trata-se de um processo que, quando otimizado, proporciona

uma melhor seletividade e eficiência com menor risco de degradação térmica dos extratos e cujo solvente é facilmente removido no final da extração (GÓMEZ; OSSA, 2002; PEREIRA et al., 2004).

3.4.1. Maceração

A maceração é um processo estático em que a matéria-prima permanece em contato com um solvente orgânico por um determinado tempo, sob agitação ocasional. Realizada em temperatura ambiente, recipiente fechado, durante um período pré-estabelecido sem renovação do líquido extrator, esta é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos (VINATORU, 2001).

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

A maceração é comumente aplicada nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos diversos, juntamente com a extração Soxhlet com a diferença que neste último a matéria-prima é extraída através do solvente aquecido em refluxo contínuo. A maceração é o método escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pela presença de oxigênio e são solúveis à temperatura ambiente, em um solvente orgânico (MELECCHI, 2005).

Entre as desvantagens do processo estão a lentidão e a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da matéria-prima. A operação de maceração (estática ou dinâmica) pode repetir-se várias vezes, sendo o processo conhecido como maceração múltipla ou sequencial, utilizando diferentes solventes. Este processo é bastante empregado para extração em pequena escala, tanto na indústria química quanto farmacêutica (MELECCHI, 2005).

3.4.2. Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom é uma técnica relativamente nova, que se baseia na utilização de energia das ondas sonoras (vibrações mecânicas) transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana, ou seja, acima de 20,0 kHz. Apesar de, inicialmente, essa tecnologia ter sido desenvolvida para limpeza de materiais, atualmente vem sendo empregada numa ampla variedade de produtos, devido à simplicidade da técnica e do equipamento. Na última década, sua aplicação analítica teve um crescimento significativo, particularmente na preparação de amostras, por favorecer e acelerar a liberação de compostos, reações químicas e transformações físicas, como a emulsificação (FREITAS, 2007; MELECCHI, 2005; MA et al., 2008). Na indústria, dificilmente é aplicado como um processo isolado, mas, geralmente, como um coadjuvante, que auxilia no desempenho de outros processos para homogeneização e emulsificação de amostras, aceleração de reações, rompimento de estrutura celular e, conseqüentemente, tratamento de água e extração de substâncias, transesterificação para obtenção de biodiesel, dispersão de tinturas na indústria de tintas e pigmentos (ENGESOLUTIONS, 2010; UNIQUE, 2010).

As ondas sonoras se propagam na matéria através de ciclos de compressão e expansão, fazendo com que as moléculas do meio se aproximem e se afastem repetidas vezes. Essa variação na pressão do líquido empregado no processo gera cavitação, bolhas ou microfluxos o que causa mudanças físicas e químicas permanentes, como ruptura dos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Além disso, a agitação das moléculas provoca um aumento de temperatura que favorece a solubilidade e difusividade de compostos no meio. A associação desses fenômenos aumenta a transferência de massa e modifica o equilíbrio de fases diminuindo o tempo necessário para extração, se comparado com o mesmo processo na ausência de ultrassom. Contudo, o efeito do ultrassom no processo de extração depende da frequência e da potência do equipamento e do tempo empregado para a extração (LUQUE-GARCÍA;CASTRO, 2003; MELECCHI, 2005; MA et al., 2008).

Existem, basicamente, dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassonoras: banho e sonda. Apesar de os banhos serem mais utilizados, sua principal desvantagem se dá ao fato de o gerador de frequência ser preso no fundo de uma cuba e a onda se propagar em um líquido, gerando muita dispersão da energia ultrassônica e,

consequentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Nas sondas ultrassônicas o transdutor encontra-se fixado em sua extremidade, focando a energia na região do meio que contém a amostra, promovendo, assim, uma cavitação mais eficiente no líquido. Em ambos os aparelhos, a energia ultrassônica é produzida por uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas - transdutor piezoelétrico (ADAMS, 2002; LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003).

Entre as vantagens do uso do ultrassom para a obtenção de extratos naturais destacam-se: simplicidade do equipamento e economia no custo inicial; redução do tempo e da temperatura de extração; possibilidade de usar diferentes solventes e misturas assim como uma ampla gama de tamanhos de amostra; redução da quantidade de reagentes; seletividade e favorecimento de reações que não ocorrem em condições normais, com conseqüente aumento de rendimento e da eficiência de extração. Como desvantagens podem ser citadas sua inabilidade de renovação do solvente durante o processo, fazendo com que a capacidade de extração seja limitada pelo equilíbrio de fases, e a necessidade de filtração após a extração o que aumenta o tempo do processo e a possibilidade de perda ou contaminação do extrato durante a manipulação (ADAMS, 2002; MELECCHI, 2005; FREITAS, 2007).

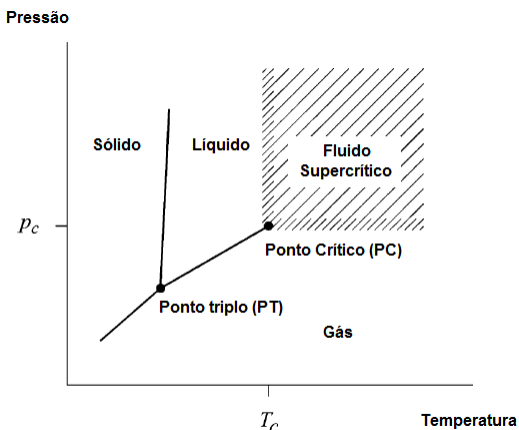
Assim como para a maceração, a extração assistida por ultrassom requer uma etapa posterior de eliminação do solvente, o que exige um grande dispêndio de energia e provoca prejuízo aos compostos termolábeis. Este tipo de extração produz resíduos prejudiciais ao meio ambiente, além de extratos com a possibilidade de não estarem totalmente livres do solvente orgânico empregado no processo. Outro fator a ser considerado é o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos por um tempo prolongado, que pode causar problemas à saúde humana do operador, além resultar em poluição ambiental devido à volatilização durante a etapa de concentração (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; MA et al., 2008).

3.4.3. Extração supercrítica

A extração supercrítica (ESC) é uma operação unitária de transferência de massa baseada no uso de fluidos a temperaturas e pressões acima dos valores críticos, conforme representado no diagrama de fases da Figura 4. A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada, na qual o

líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido (GÓMEZ e OSSA, 2002; FREITAS, 2007). A área em torno do ponto crítico de um componente (ou de uma mistura) pode ser chamada de “região crítica”, abrangendo condições sub e supercrítica. Caso uma dessas propriedades (pressão ou temperatura) se encontre abaixo do ponto crítico, diz-se que a substância está no estado subcrítico e, quando ambas estão acima dele, o fluido se encontra em estado supercrítico. Nessas condições de pressão e temperatura, as propriedades de um solvente são diferentes daquelas apresentadas no estado líquido ou gasoso, modificando-as drasticamente com pequenas variações de pressão e temperatura (BRUNNER, 1994).

Figura 4. Representação genérica do diagrama de fases de um componente puro.



Fonte: Brunner (1994).

Os fluidos em condições supercríticas apresentam propriedades físico-químicas intermediárias entre os estados gasoso e líquido, o que lhes confere um excepcional poder solvatante em função de sua alta difusibilidade, menor viscosidade e menor tensão superficial que em condições normais. Sua difusividade pode ser da ordem de até duas magnitudes maior do que a de líquidos, e a sua densidade possui valores próximos à densidade dos líquidos, o que facilita a transferência de massa e torna a extração mais rápida do que quando são utilizados líquidos em condições normais de temperatura e pressão. Além disso, a baixa viscosidade e a baixa tensão superficial permitem que o solvente supercrítico penetre facilmente na matriz vegetal, solubilizando o(s) componente(s) a serem extraídos. Outra característica importante é que

o poder solvatante pode ser controlado em função da pressão e da temperatura, uma vez que, na região do ponto crítico, pequenas alterações desses parâmetros podem provocar grandes mudanças na densidade do solvente determinando seu poder solvatante e sua seletividade. Alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa (BRUNNER, 1994; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; FERREIRA et al., 1999).

A extração supercrítica se destaca por representar uma tecnologia que permite a obtenção de extratos de alta qualidade e que minimiza danos ao meio ambiente, devido à ausência de solvente no produto final. Por essa razão, essa técnica vem se desenvolvendo e ganhando espaço continuamente em processos industriais nas últimas décadas. Assim, o emprego de fluidos supercríticos tem sido considerado uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, particularmente para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (MICHIELIN, 2009; PEREIRA et al., 2004).

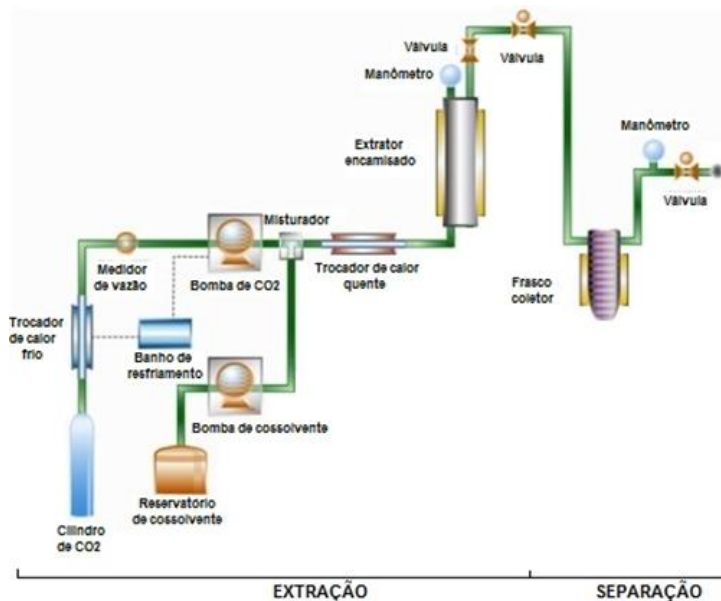
A tecnologia supercrítica permite a extração de compostos ativos de plantas com uma melhor reprodução de aromas do que as operações convencionais. A degradação térmica de compostos sensíveis pode ser reduzida por permitir operar em temperaturas mais baixas, enquanto a ausência de luz e oxigênio previne reações de oxidação e degradação, o que constitui uma grande vantagem para a extração de antioxidantes, garantindo a conservação de suas propriedades biológicas. Os materiais processados por fluidos supercríticos não necessitam de uma etapa à parte para esterilização, uma vez que o gradiente de pressão na saída do extrator pode gerar extratos livres de microrganismos vivos e de esporos (ADIL et al., 2007; CORTESI et al., 1999; DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Depois de extraídos os compostos de interesse, a matriz pode ser usada em outras aplicações como alimentação animal, por exemplo, por não possuir resíduo de solvente (MEZZOMO, 2008).

A extração de matrizes sólidas com fluido supercrítico, esquematicamente representada na Figura 5, consiste, basicamente, de duas etapas: extração e separação da mistura soluto/solvente.

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

transferência de massa no processo é o equilíbrio da concentração de solutos entre as fases sólida e fluida (BRUNNER, 1994; MICHIELIN, 2009).

Figura 5. Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas



Fonte: Waters (2013) adaptado por Benelli (2014).

A transferência de massa entre as fases depende de muitos fatores como tipo e estrutura do material vegetal, grau de maturação, tratamento da matéria-prima anterior a extração, etc. Além disso, o leito de sólidos pode formar diferentes geometrias e tamanhos de fragmentos que ainda podem sofrer alterações durante o processo. Dessa forma, uma grande variedade de parâmetros é relevante para a modelagem da transferência de massa no substrato sólido. As substâncias podem estar adsorvidas na superfície externa, na superfície dos poros, no interior do sólido ou no interior das células das plantas. Cada uma dessas diferentes distribuições tem alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

Segundo Brunner (1994), a extração de compostos solúveis de um material vegetal consiste em vários e consecutivos passos:

- 1) A matriz vegetal absorve o solvente supercrítico, inchando a estrutura das células, as membranas celulares e os canais intercelulares

são dilatados, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua;

2) Em paralelo, ocorre a dissolução dos compostos do extrato que podem ser extraídos pelo solvente;

3) Ocorre a transferência por difusão dos compostos solubilizados de dentro do sólido até a sua superfície;

4) Os compostos solubilizados atingem a superfície externa;

5) Os compostos solubilizados são transportados da superfície para o seio do solvente supercrítico e são, subseqüentemente, removidos com o solvente.

3.4.3.1. Fluidos Supercríticos

Na prática, a maior parte das extrações com fluidos supercríticos são realizadas com gás carbônico por uma série de razões. Além de apresentar pressão e temperatura críticas relativamente baixas (73,8 bar e 31,1 °C), o CO₂ é inerte, atóxico, não inflamável, de custo relativamente baixo, facilmente disponível em alta pureza, inodoro e pode ser prontamente removido do produto final, sem deixar resíduos. Isso porque, devido sua alta volatilidade, ele se dissipa totalmente no final da extração, após a descompressão, sendo possível ainda reciclá-lo. Assim, a extração de compostos naturais com dióxido de carbono supercrítico resolve eficazmente as questões associadas às altas temperaturas e ao uso de solventes orgânicos empregados em extrações convencionais. Além disso, esses extratos podem ser considerados naturais e até mesmo obter o *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*), uma designação do FDA (*Food and Drug Administration*) para substâncias consideradas seguras para adição em alimentos (ADIL et al., 2007; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; MELECCHI, 2005; MICHIELIN, 2009; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Todas essas características fazem o CO₂ parecer o solvente ideal, porém sua principal desvantagem é a apolaridade, o que torna a utilização desse componente puro não apropriada para extração de compostos polares e matrizes com alto poder de retenção, fazendo-se necessário a utilização de modificadores (em pequenas quantidades) para aumentar seu poder de solvatação (CORTESE et al., 1999; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Dependendo do tipo da matriz sólida e da afinidade do soluto com a matriz, um solvente modificador (ou cossolvente) pode influenciar a extração de três modos:

- a) Aumentar a solubilidade do soluto no fluido supercrítico como resultado das interações soluto/modificador na fase fluida;
- b) Facilitar a dessorção do soluto – as moléculas de modificadores polares são capazes de interagir com a matriz e competir com o soluto pelos poros da matriz;
- c) Alterar o processo de difusão do soluto na matriz e favorecer a penetração do fluido supercrítico no interior da matriz quando o modificador a dilata (CASAS et al., 2007).

A adição de cossolventes orgânicos como etanol, metanol, acetona, entre outros solventes polares, aumenta o poder de solvatação do CO₂ e o rendimento da extração quando há componentes polares a serem extraídos. Por ser permitido como solvente em indústrias de alimentos e por, em muitos casos, melhorar a extração de compostos bioativos, o etanol é bastante utilizado (ADIL et al., 2007). Quando um cossolvente é adicionado ao CO₂, a temperatura crítica da mistura resultante é elevada limitando sua quantidade a ser usada, como pode ser observado na Tabela 3 (ADIL et al., 2007). Além disso, o cossolvente deve ser removido do produto final e, mesmo utilizado em poucas quantidades, requer o uso do calor e, conseqüentemente, apresenta as mesmas desvantagens de necessidade pós-processamento e possível degradação de compostos termolábeis das extrações com solventes orgânicos.

Tabela 3. Temperatura e pressão críticas de misturas CO₂-etanol (calculado por Software SF-Solver, ISCO Inc., Lincoln, NE, USA).

Concentração de etanol (%)	T_c (°C)	P_c (bar)
0	31,1	73,8
5	42,5	73,2
10	53,7	72,7
14	62,8	72,2
17	69,5	71,9
20	76,1	71,5
100	243,3	61,3

Fonte: Adil et al. (2007).

Outras substâncias que também demonstram, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades solventes são utilizadas para extração de compostos de plantas entre outros materiais. O propano e o óxido nitroso (N₂O) também apresentam temperaturas e pressões críticas que ainda podem ser consideradas moderadas (97 °C / 42 bar e

36 °C / 72 bar, respectivamente) e com bons rendimentos de extração (POURMORTAZAVI; HAJMIRSADEGHI, 2007; FREITAS, 2007). Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão (N₂O), toxicidade, inflamabilidade (propano), e propriedades físicas adversas (*e.g.*, água, cujo ponto crítico é acima de 374 °C e 220 bar), poucos deles são usados comercialmente (FREITAS, 2007). A Tabela 4 apresenta uma lista dos fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica, e os valores de temperatura e pressão críticas e densidade.

Tabela 4. Temperatura e pressão críticas e densidade de fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica.

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

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

Fonte: Hierro e Santa-Maria (1991).

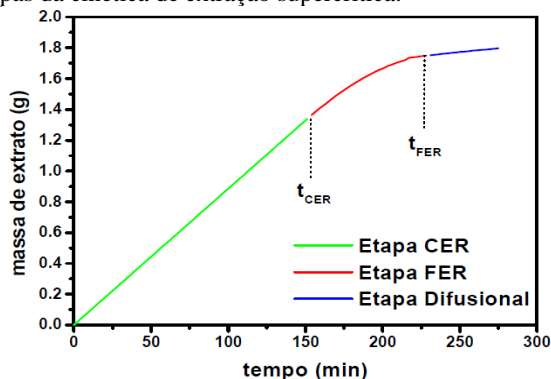
3.4.3.2. Curvas de extração

A curva de extração é calculada pela quantidade acumulada de extrato - obtida após despressurização - em função do tempo, sendo uma resposta ao fluxo de solvente entrando no extrator. A curva resposta depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração. Devido à influência de vários fatores no

resultado dessa curva, seu uso para comparação de extrações de diferentes materiais e de diferentes equipamentos é limitado, mas as informações que ela pode fornecer são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

De acordo com a literatura, essas curvas são geralmente divididas em três etapas, ilustradas na Figura 6, e são determinadas pela massa total de óleo extraído em função do tempo de extração (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA; MEIRELES, 2002):

Figura 6. Etapas da cinética de extração supercrítica.



Fonte: Martínez (2005).

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

2) Etapa FER (do inglês, *Falling Extraction Rate*), quando a resistência à transferência de massa aumenta incluindo, além do efeito convectivo na fase fluida, o efeito difusional na fase sólida devido ao esgotamento do extrato em sua superfície, sendo a quantidade de extrato no solvente supercrítico menor que a concentração de equilíbrio. Até o final desta etapa, a extração geralmente atinge mais de 70 % do rendimento total da extração;

3) Etapa difusional ou etapa de taxa de extração nula, onde taxa transferência de massa é controlada principalmente pelo fenômeno

difusivo na parte interna do sólido (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999).

A curva de extração pode ser utilizada na determinação de parâmetros de processo, como tempo ideal de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica e determinação da solubilidade, como também na modelagem da transferência de massa do sistema, predição, ampliação de escala e determinação da viabilidade técnica e econômica do processo (SILVA, 2004; FERREIRA et al., 1999; REVERCHON; DE MARCO, 2006; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Empiricamente, uma das formas de se determinar a solubilidade de um composto puro num fluido supercrítico é através da realização da extração supercrítica de um meio inerte, como areia ou cerâmica, impregnado com o composto de interesse em concentração conhecida. Além de dados sobre a solubilidade do composto no fluido supercrítico, esse procedimento fornece também informação sobre a recuperação do extrato após despressurização. Devido à grande demanda de tempo necessária para a realização desses experimentos, alguns pesquisadores propuseram modelos matemáticos fundamentados em teorias e equações de estado para estimar a solubilidade de vários compostos. A solubilidade do soluto é, geralmente, função da densidade do solvente. À temperatura constante, a solubilidade aumenta com o incremento da pressão, como resultado direto do aumento da densidade do solvente. Em baixas pressões, um aumento da temperatura leva a uma diminuição da solubilidade devido à redução da densidade do solvente; enquanto o oposto é observado a altas pressões pois o efeito da pressão de vapor do soluto passa a ser dominante (FERREIRA et al., 1999; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007). Esse efeito oposto pode provocar uma inversão das isotermas de rendimento, chamado *crossover*, e já foi relatado por vários autores (CAMPOS, 2005; KITZBERGER et al., 2009; MICHIELIN et al., 2005). Sendo assim, a vantagem de conduzir extrações a pressões elevadas é devida ao favorecimento à transferência de massa que por sua vez está relacionada ao incremento da solubilidade (CASAS et al., 2007).

A vazão de solvente é um parâmetro relevante quando o processo é controlado pela resistência externa à transferência de massa ou pelo equilíbrio, ou seja, a quantidade de fluido supercrítico introduzida no extrator determina a velocidade de extração. Por outro lado, na maior parte dos casos de extração em matrizes sólidas, o processo é controlado

pela resistência interna à transferência de massa. Para reduzir essa resistência e aumentar o rendimento de extração, pode-se reduzir o tamanho do material sólido, com a finalidade de aumentar a área de contato entre o sólido e o solvente, diminuindo, desta forma, a distância que o soluto percorre no interior do sólido poroso. Sovová, Kucera e Jez (1994) estudaram o efeito da moagem de sementes de uva sobre a velocidade de extração do óleo, demonstrando que a redução do tamanho dos fragmentos aumenta a área superficial e libera o soluto do interior das sementes, implicando um aumento da velocidade de extração, especialmente na etapa CER, e maiores rendimentos ao final da extração. Porém, a redução da granulometria do sólido não pode ser realizada de forma indefinida, pois sólidos muito pequenos tendem a formar aglomerados e interromper a passagem do solvente pelo leito, além de proporcionar perda de compostos voláteis. De um modo geral, são utilizados fragmentos com diâmetro médio entre 0,25 e 2 mm (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ, 2005; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

3.4.3.3. Modelagem Matemática

A otimização das condições operacionais usadas durante a extração supercrítica é de grande importância para avaliar a viabilidade econômica da técnica, uma vez que o investimento inicial na construção de uma unidade extratora de alta pressão é elevado. A modelagem matemática é necessária para generalizar as informações experimentais para aplicação em diferentes materiais e para interpolar ou extrapolar essas condições experimentais a novas condições de processo, sendo bastante útil para a ampliação de escala do processo, de laboratorial para piloto e industrial, através da simulação das curvas globais de extração. Por isso, várias propostas de modelos matemáticos para a extração supercrítica são apresentadas na literatura (MARTÍNEZ et al., 2003; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

A distribuição inicial do soluto na matriz sólida influencia a seleção dos possíveis modelos matemáticos. As substâncias a serem extraídas podem estar livres na superfície da matriz sólida, localizadas dentro dos poros ou ainda distribuídas no interior das células do material vegetal, sendo que cada uma dessas descrições corresponde a diferentes modelos. Os resultados experimentais também contribuem para a seleção do modelo e podem evidenciar a influência de diferentes resistências à transferência de massa ou a existência de condições de equilíbrio. Até mesmo pode ser observada a transição entre diferentes

mecanismos de transferência de massa, ou seja, entre o efeito convectivo na fase fluida e o efeito difusional na fase sólida (REVERCHON, 1997; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

No entanto, um modelo não deve ser um mero instrumento matemático, mas sim descrever o fenômeno físico do processo; faz-se necessário, para isso, observações experimentais e conhecimento da estrutura do sólido. A validação dos modelos matemáticos sem nenhuma correspondência física com o material e com o processo estudado é limitada, mesmo que possam ser utilizados para ajustar alguns dados experimentais. Três diferentes abordagens têm sido propostas para a modelagem matemática do processo de extração supercrítica de matrizes vegetais (REVERCHON; DE MARCO, 2006):

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

Devido à complexidade do fluxo no leito fixo, foram desenvolvidas também correlações semi-empíricas para descrever a transferência de massa do soluto entre as fases sólida e fluida. Conceitualmente, o coeficiente de transferência de massa – que é função da densidade, viscosidade, difusividade, porosidade do leito, tamanho dos fragmentos da matriz sólida e vazão do solvente – pode ser usado para descrever as condições cinéticas do sistema. O mecanismo de transferência de massa da extração à alta pressão de misturas complexas, como é o caso de óleos essenciais, ainda não é completamente conhecido. A maioria dos modelos disponíveis na literatura trata o extrato como uma substância pura, apesar do fato dele poder conter vários compostos de natureza química diferentes. Sendo assim, as dificuldades em modelar sistemas complexos residem no número elevado de componentes na mistura e em estabelecer as interações entre os componentes do extrato, o solvente e a fase sólida (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 2003). A principal diferença entre os diversos modelos encontrados na literatura reside na interpretação dada para os fenômenos e na possibilidade de negligenciar alguns deles (MARTÍNEZ et al., 2003).

3.5. Equilíbrio de fases

Um estudo termodinâmico de equilíbrio de fases é necessário para correlacionar e prever dados experimentais de misturas binárias, ternárias e multicomponentes, para, assim, viabilizar um projeto mais adequado e flexível de equipamentos empregados em processos e na definição de suas variáveis operacionais. O estudo do comportamento de fases da mistura a ser processada leva ao conhecimento da região ou das condições em que ocorre uma ou mais fases em equilíbrio o que permite reduzir o número de experimentos para se determinar as condições ótimas de precipitação/encapsulamento de determinado extrato e/ou substância em meio supercrítico. Informações experimentais sobre o equilíbrio de fases à alta pressão são importantes para processos de separação de compostos envolvendo misturas, mesmo quando modelos termodinâmicos são utilizados para prever o comportamento de fases desses sistemas uma vez que dados experimentais são necessários para ajustar os parâmetros de interação dos modelos (DOHRN; BRUNNER, 1995; LANZA, 2008).

O equilíbrio de fases termodinâmico pode apontar certos limites para a transferência de massa entre diferentes fases, as quais estão envolvidas em diversos processos, inclusive na extração com fluido supercrítico. O equilíbrio de fases revela a composição das fases no equilíbrio, incluindo a solubilidade dos compostos extraídos no solvente supercrítico e a solubilidade do solvente supercrítico na fase pesada; as quantidades das fases em equilíbrio; a distribuição dos componentes individuais entre as fases em equilíbrio e a variação dessas quantidades com temperatura e pressão e a concentração dos vários componentes (BRUNNER, 1994). É nesta diferença na composição das fases em equilíbrio (dado de solubilidade) ou na taxa de transferência de massa dos constituintes da mistura que se baseiam muitas operações unitárias como destilação, adsorção, separação por membranas e também os processos envolvendo fluidos supercríticos (CARVALHO Jr, 2004; ROSSO, 2009).

Geralmente, o equilíbrio de fases (ou a separação de fases) de um sistema ocorre somente dentro de certa faixa de temperatura; para cada temperatura existe uma faixa de composição na qual a separação é possível (LANZA, 2008). No caso de sistemas contendo fluidos supercríticos o equilíbrio pode ser drasticamente afetado por uma pequena quantidade de cossolvente, especialmente em casos em que existem interações específicas entre o soluto e o cossolvente, sendo que

essas interações são um fator importante para o aumento da solubilidade (ZHONG et al., 1997).

O equilíbrio de fases a altas pressões pode ser determinado por diferentes metodologias experimentais, apresentados e discutidos em diversos trabalhos na literatura, como por exemplo, Dohrn e Brunner (1995), McHugh e Krukoni (1994), entre outros. A seleção da técnica mais adequada depende basicamente de três fatores: custo, propriedades físico-químicas dos componentes envolvidos e condições de operação dos experimentos (LANZA, 2004). As técnicas usadas para esta investigação podem ser classificadas de acordo com o método empregado para analisar a composição das fases ou de acordo com a maneira pela qual uma fase se desloca em relação à outra (DOHRN e BRUNNER, 1995; DARIVA, 2000; ROSSO, 2009).

O Quadro 1 apresenta algumas características dos principais métodos experimentais para determinação do equilíbrio de fases, como aplicações indicadas, vantagens e desvantagens do método.

A principal característica do método estático sintético, utilizado no presente estudo, está no fato da célula de equilíbrio, uma vez carregada com uma mistura de composição global conhecida previamente, permanecer fechada até que o equilíbrio seja estabelecido. Neste método, a composição das fases em equilíbrio é determinada indiretamente, sem a necessidade de amostragem (uma das vantagens do método), preservando o sistema contra distúrbios na pressão. O conceito do método é aumentar a pressão do sistema, levando-se a uma única fase e posteriormente manipular a pressão até o surgimento de uma segunda fase, detectada visualmente através da formação de bolhas ou turvamento da solução. Com isso, é possível localizar a região de transição de fases e traçar as curvas de bolha e/ou orvalho para sistemas líquido-vapor, líquido-líquido e sólido-fluido. Desta forma, o valor da pressão no instante em que ocorre ponto de orvalho ou de bolha para certa temperatura corresponde à condição em que a composição global do sistema é igual à composição da fase vapor ou líquida, respectivamente. Como outras vantagens do método estático sintético têm-se: procedimento experimental simplificado e utilização de pequenas quantidades de solvente e soluto em cada experimento, o que permite reduzir os custos experimentais (LANZA, 2004; ROSSO, 2009).

Quadro 1. Considerações gerais sobre os métodos experimentais de equilíbrio de fases a alta pressão.

Método	Aplicações	Vantagens	Desvantagens
Dinâmico Extrativo	<ul style="list-style-type: none"> - Determinação de solubilidade de sólidos e líquidos muito viscosos em solventes pressurizados. - Extração ou fracionamento de componentes de fases pesadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade de construção e operação. - Detecção de baixos valores de solubilidade. - Baixo custo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicação restrita a sistemas bifásicos. - Apenas a fase leve é analisada.
Dinâmico Contínuo	<ul style="list-style-type: none"> - Sistemas envolvendo compostos termolábeis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo tempo de residência na zona de temperatura elevada. - Análise de ambas as fases. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicável somente ao equilíbrio fluido-fluido. - Flutuação na pressão. - Não indicado para regiões próximas ao ponto crítico da mistura. - Alto custo de construção. - Alto consumo de compostos.
Estático Sintético	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer sistema envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido ou sólido-fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dispensa amostragem. - Não há perturbação do sistema. - Custo de construção relativamente baixo. - Operação simples. - Identificação do tipo de equilíbrio e transição. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil aplicação a sistemas multifásicos.
Estático Analítico	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer sistema envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido ou sólido-fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicado tanto a sistemas bifásicos quanto a sistemas multifásicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Prevê amostragem, o que pode ocasionar perturbações ao sistema. - Não recomendado para regiões próximas ao ponto crítico da mistura. - Alto custo de operação.
Com Recirculação	<ul style="list-style-type: none"> - Sistemas envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução no tempo de equilíbrio. - Amostragem mais fácil e segura, reduzindo a possibilidade de perturbação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo total do equipamento. - Alta complexidade de operação.

Fonte: Lanza (2004); Rosso (2009).

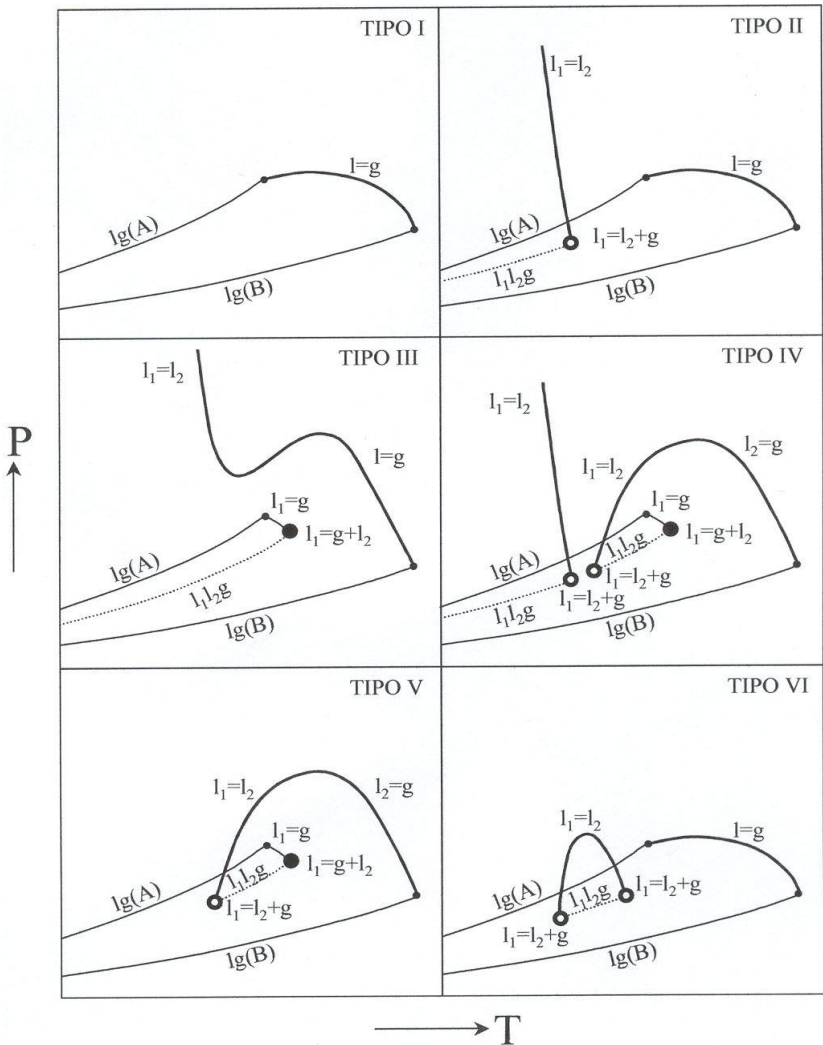
3.5.1. *Comportamento de fases de misturas*

O comportamento de fases depende fortemente das interações energéticas, da diferença de tamanho e de polaridade entre as moléculas envolvidas no sistema (BENDER, 2008). Misturas contendo muitos componentes são frequentemente encontradas em sistemas reais, como extratos de plantas. A diferença entre misturas multicomponentes e misturas complexas é arbitrária. Uma mistura multicomponente é uma mistura contendo mais de três componentes, onde todos os compostos são identificados, enquanto que uma mistura complexa é uma mistura contendo mais de três componentes, onde o número total de compostos é desconhecido e muitos dos compostos não são identificados (BRUNNER, 1994).

Em alguns casos, a concentração da maioria dos componentes pode ser pequena quando comparada à concentração do composto principal e, então, o estudo do comportamento de fases pode considerar unicamente os componentes principais. O uso de compostos individuais para representação de equilíbrios de fases de sistemas complexos depende do propósito para o qual os dados obtidos serão utilizados. Por outro lado, em alguns processos envolvendo misturas multicomponentes, os compostos minoritários são os componentes de interesse e a sua distribuição nas fases em equilíbrio é importante, como por exemplo, para a concentração desses compostos durante a extração (BRUNNER, 1994).

Há uma diversidade de comportamentos de fases reportados na literatura cuja classificação é apresentada por Prausnitz, Lichtenthaler e Azevedo (1999) com base em estudo de Scott e van Konynenburg (1970) (mais detalhado em van Konynenburg e Scott (1980)), que identificou cinco tipos básicos que podem ser descritos qualitativamente a partir da equação de van der Waals, e de Rowlinson e Swinton (1982) que introduziram um sexto tipo comumente encontrado em sistemas envolvendo água e que só pode ser descrito usando funções potenciais. Na Figura 7 são apresentados os seis tipos de diagramas de fases, cuja complexidade aumenta em função da maior assimetria molecular entre os componentes presentes no sistema (diferença de tamanho, polaridade e funcionalidade molecular). À exceção do Tipo I, todos os diagramas apresentam a ocorrência de imiscibilidade líquido-líquido.

Figura 7. Tipos de comportamentos de fases.



l_1 e l_2 : fases líquidas de diferentes composições; l_1l_2g : equilíbrio trifásico; $l_1=l_2$: equilíbrio líquido-líquido (ELL); $l=g$: equilíbrio líquido-vapor (ELV); $l_1=l_2+g$ e $l_1=g+l_2$: pontos críticos terminais.

Fonte: Bender (2008)

Na Figura 7, cada fase líquida de diferente composição é identificada como l_1 ou l_2 e o equilíbrio trifásico é indicado como l_1l_2g . Os pontos críticos $l=g$ representam a curva formada por todos os pontos onde coexistem uma fase líquida e uma fase gasosa com a mesma composição. Da mesma forma, $l_1=l_2$ corresponde à curva de equilíbrio entre duas fases líquidas. Os pontos indicados por $l_1=g+l_2$ indicam a coexistência de uma fase líquida e de uma fase gasosa de igual composição em equilíbrio com uma outra fase líquida. Por outro lado, $l_1=l_2+g$ são pontos onde existem duas fases líquidas críticas (de igual composição) em equilíbrio com uma fase gasosa. Em ambos os casos, há o desaparecimento de uma das fases líquidas no equilíbrio trifásico devido a variações de temperatura. São chamados pontos críticos terminais e não se deve confundir com o ponto crítico de solução. O ponto a partir do qual um aumento de temperatura provoca esse desaparecimento corresponde ao ponto crítico terminal superior (UCEP, *Upper Critical End Point*). Se, ao contrário, uma das fases líquidas desaparece com uma diminuição da temperatura, o ponto em questão é chamado ponto crítico terminal inferior (LCEP, *Lower Critical End Point*). As linhas pontilhadas na Figura 7 representam as curvas de pontos críticos das soluções. Cada ponto sobre a linha é o ponto crítico para uma mistura de composição fixada.

Com base na compilação de Prausnitz, Lichtenthaler e Azevedo (1999) e adaptação de Bender (2008), os tipos de diagrama podem ser descritos brevemente como:

✓ Tipo I: obtido quando os fluidos da mistura binária possuem natureza química similar. Apenas poucos sistemas envolvendo substâncias polares são conhecidos por exibirem comportamento do Tipo I.

✓ Tipo II: similar ao tipo I, exceto que, a baixas temperaturas há a presença de uma imiscibilidade líquido-líquido em algumas composições, surgindo uma linha crítica adicional.

✓ Tipo III: caso de misturas com ampla imiscibilidade em que o eixo da linha crítica do equilíbrio líquido-líquido é deslocado para temperaturas mais elevadas, podendo interceptar com a linha crítica do equilíbrio líquido-vapor, dividindo-o em dois ramos. O primeiro começa no ponto crítico do componente mais volátil, $l_1=g$, terminando no ponto $l_1=g+l_2$ onde as fases líquida (rica no componente mais volátil) e gasosa têm a mesma composição. O segundo ramo corresponde à linha $l_1=l_2$ em altas pressões terminando no ponto crítico do componente menos volátil. Portanto, os diagramas de tipo III se caracterizam por resultar da

interseção de regiões de coexistência de fases e por apresentarem uma linha divergente de pontos críticos.

✓ Tipo IV: ocorre quando a linha dos pontos críticos do diagrama de fases do tipo III se curva de modo a interceptar a curva de equilíbrio trifásico l_1l_2g . Assim, esses diagramas resultam também da interseção de regiões de coexistência de fases e se caracterizam por exibirem uma linha crítica que parte do ponto crítico do composto menos volátil e converge para a linha de equilíbrio trifásico com uma transição contínua de $l-g$ a $l-l$.

✓ Tipo V: semelhante ao diagrama do Tipo IV, porém com o ponto crítico terminal de baixa temperatura oculto devido à presença de uma fase sólida, o que dificulta sua visualização experimentalmente.

✓ Tipo VI: comportamento observado em sistemas binários onde os compostos possuem algum grau de associação. Existe, neste caso, uma região de imiscibilidade líquido-líquido com uma linha crítica que começa em um ponto crítico inferior terminal e converge para um ponto crítico superior terminal. A linha crítica $l = g$ é semelhante àquela exibida pelos diagramas do Tipo I.

3.6. Formação de partículas

Nas últimas décadas, os setores de agricultura, medicina, farmácia e biotecnologia têm demonstrado grande interesse por micro/nanotecnologia, ou seja, pelo estudo de estruturas em escalas micro e nanométrica, seus processos de obtenção e sua caracterização. Os recentes avanços tecnológicos na área de nanomateriais, principalmente no campo farmacêutico, fizeram a nanotecnologia emergir para a indústria de alimentos como uma solução inovadora para agregar funcionalidades e melhorar a qualidade e segurança de alimentos, não somente na forma de novos ingredientes como também através do desenvolvimento de novos materiais para embalagens e ferramentas de detecção de qualidade (THIES, 1996; MOHANRAJ; CHEN, 2006).

De modo geral, substâncias reduzidas a tamanhos muito pequenos transpõem barreiras biológicas mais facilmente, apresentando maior bioabsorção e transporte celular (JONG; BORM, 2008). Porém, partículas em escalas micro e nanométricas apresentam elevada área superficial, o que em alguns casos pode acelerar a degradação de compostos presentes (MEZZOMO, 2012).

Nas partículas compostas por material polimérico, as substâncias ativas podem estar dissolvidas, recobertas, absorvidas ou quimicamente ligadas, podendo também ser chamadas de coprecipitados, ou encapsuladas, nesse caso chamadas de cápsulas (RANJIT; BAQUEE, 2013). O encapsulamento pode ser descrito como um processo para envolver materiais (sólidos, gotículas de líquidos ou gases) com uma capa inerte que, por sua vez, os isola e protege do meio externo (GHOSH, 2006). Além de proteger esses materiais de reações de deterioração por um maior período de tempo, o enpasulamento proporciona outros benefícios potenciais como prevenir a perda de compostos voláteis, mascarar odores e sabores desagradáveis, imobilizar proteínas e enzimas e liberação controlada (GHOSH, 2006; GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011). Assim, a combinação de nanotecnologia e encapsulamento surgiu como uma solução viável para gerar sistemas de liberação controlada com propriedades específicas. Porém, há dificuldades a ser superadas na produção de partículas como potencial toxicidade relativa ao polímero empregado ou a resíduos de solventes orgânicos, capacidade de encapsulamento em função da solubilidade em água dos materiais, ampliação de escala, agregação de partículas, entre outras (MOHANRAJ; CHEN, 2006; JONG; BORM, 2008; TIWARI; TAKHISTOV, 2012).

Muitos sistemas de encapsulamento têm sido elaborados a partir de polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, não tóxicos e financeiramente convenientes. Partículas sintetizadas com polímeros geralmente apresentam maior estabilidade para armazenamento por períodos de tempo mais longos e especificidade de liberação com ação localizada (TIWARI; TAKHISTOV, 2012). Além de proteger os compostos encapsulados, o tipo de polímero utilizado exerce outro importante papel na qualidade do produto final, uma vez que é ele que estabelece como o composto encapsulado será liberado em função de sua composição, forma de interação com o material encapsulado e com o meio de liberação, características de superfície, como carga e permeabilidade, entre outros (MOHANRAJ; CHEN, 2006; FRANCESCHI et al., 2008b).

Em geral, polímeros sintéticos apresentam alta pureza e reprodutibilidade, quando comparados aos polímeros naturais, e são concebidos com funcionalidades específicas, que podem ainda ser alteradas pela adição de outros ligantes no momento da produção das partículas (ANDERSON; SHIVE, 1997). Entre os polímeros sintéticos, o grupo poliéster (*i.e.*, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ϵ -caprolactona)

(PCL), poli(ácido glicólico) (PGA)) é de interesse da área biomédica e alimentícia devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Em particular, o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), por ser bioabsorvível, uma vez que hidrolisa em ácido láctico e o ácido glicólico, e por ser aprovado para tratamento terapêutico em humanos pelo FDA (*Food and Drug Administration* - órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos, medicamentos e cosméticos) (ANDERSON; SHIVE, 1997; ASTETE; SABLIOV, 2006). Por essa razão, esse polímero foi escolhido para ser utilizado neste estudo e mais informações são apresentadas a seguir.

3.6.1. Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)

O poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), um copolímero de poliácido láctico (PLA) e poliácido glicólico (PGA), é um dos biomateriais mais estudados entre disponíveis para liberação controlada de compostos. Devido a um carbono α assimétrico, o polímero PLA pode ser produzido em forma cristalina ou amorfa, porém suas propriedades físico-químicas permanecem praticamente inalteradas, enquanto o PGA apresenta estrutura cristalina. O PLGA pode ser processado em praticamente qualquer forma e tamanho e é capaz de encapsular moléculas de uma ampla faixa de tamanho (WU; WANG, 2001). Em água, esse polímero biodegrada por hidrólise de suas ligações éster, o que provoca alterações de suas propriedades com o tempo, como temperatura de transição vítrea (T_g) e peso molecular, influenciando a liberação e a velocidade de degradação dos compostos incorporados (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

As propriedades físicas do PLGA são função de diferentes fatores como peso molecular, razão entre os monômeros de ácido láctico e glicólico na cadeia polimérica, superfície de exposição e temperatura de armazenamento (HOUCHIN et al., 2009). Devido à presença de grupos metílicos no PLA, sua maior proporção na cadeia do PLGA diminui a hidrofiliabilidade deste fazendo com que absorva menos água e seja degradado mais lentamente. Além disso, a proporção entre os monômeros afeta também o grau de cristalinidade e a temperatura de fusão do PLGA. Ao aumentar a razão PLA/PGA, reduz-se a T_g e a velocidade de hidratação e de hidrólise levando, conseqüentemente, a uma degradação mais lenta, com exceção da razão 50:50 que apresenta degradação mais rápida entre todos os tipos de PLGA disponíveis comercialmente (HOUCHIN et al., 2009; MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Quanto ao peso molecular, seu aumento está relacionado com cadeias poliméricas maiores que requerem mais tempo para degradar (PARK, 1994).

A liberação de compostos a partir de partículas formadas por esses polímeros pode ocorrer por difusão através da matriz polimérica, por erosão desse material polimérico - uma vez que a velocidade de penetração de água na matriz é maior que a de degradação do polímero-, ou pela combinação desses dois mecanismos. Além disso, o aumento da disponibilidade de grupos terminais carboxílicos resultantes da biodegradação autocatalisam o processo (ANDERSON; SHIVE, 1997; MAKADIA; SIEGEL, 2011). Geralmente, duas fases podem ser observadas na cinética de liberação de partículas com PLGA: um pico inicial seguido de uma liberação progressiva dos compostos particulados. A fase inicial é função principalmente da solubilidade, concentração e hidrofobicidade do composto contido na matriz polimérica. Na segunda fase, a água que penetra na matriz começa a hidrolisar o polímero e a sua degradação gradativa favorece o aparecimento de novos caminhos para a difusão dos compostos a serem liberados até a erosão completa da matriz.

O PLGA está entre os polímeros de maior interesse em pesquisas biomédicas envolvendo o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos (WU; WANG, 2001), mas pode ter importantes aplicações na área alimentícia, o que tem levado a um aumento de estudos nesse sentido (GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011; HILL; TAYLOR; GOMES, 2013; SILVA et al., 2014b).

3.6.2. Processos de formação de partículas

Um dos objetivos do estudo e desenvolvimento de sistemas particulados é controlar características que determinam sua funcionalidade e suas propriedades de aplicação como tamanho e distribuição de tamanho, morfologia da partícula e propriedades de superfície para proporcionar boa resistência mecânica, alta eficiência de encapsulamento, maior absorção celular, fácil manipulação, baixo custo de operação, permeabilidade e difusão adequadas, controle de liberação e manutenção da atividade biológica do material encapsulado, entre outros (LIN; NG; WIBOWO, 2007; MARTÍN et al., 2010; RANJIT; BAQUEE, 2013). Essas características são afetadas, não somente pelo

tipo de polímero utilizado, mas também pela técnica de produção e condições de processo utilizadas (ASTETE; SABLIOV, 2006).

As técnicas de formação de partículas incluem processos químicos, como a inclusão molecular ou polimerização interfacial; técnicas físico-químicas, como coacervação; e processos físicos, como *spray drying*, co-cristalização, extrusão ou leito fluidizado (MARTÍN et al., 2010). No presente estudo serão empregadas duas técnicas de formação de partículas, por emulsificação/evaporação do solvente e com dióxido de carbono supercrítico como antissolvente, apresentadas a seguir.

3.6.2.1. Método emulsificação/evaporação do solvente

O método de emulsificação e evaporação do solvente (ESE) tem sido frequentemente empregado, face à simplicidade dos procedimentos envolvidos e a possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Nessa técnica, o composto de interesse e o polímero são dissolvidos ou dispersos em um solvente com ponto de ebulição bastante inferior ao solvente da fase externa (geralmente aquosa) contendo um estabilizante da dispersão para manter a individualidade das gotas. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulamento, o fármaco e o polímero devem ter baixa solubilidade na fase externa. Após emulsificação, o solvente da fase interna é removido pelo uso de calor, ou ainda, pela evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela aplicação de pressão reduzida. As microesferas formadas podem ser lavadas com solvente adequado para a eliminação de materiais não encapsulados e separadas por filtração ou centrifugação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; WATTS; DAVIES; MELIA, 1990).

Podem ser utilizados diferentes tipos de emulsões, sendo as de óleo em água (O/A), indicadas para compostos mais hidrofóbicos, vantajosas porque utilizam a água como não-solvente, ou seja, o processo é econômico, não necessita de reciclagem, as partículas são facilmente lavadas e raramente aglomeram. Para materiais mais hidrofílicos, a formação de partículas pode ser realizada por meio de uma emulsão inversa (A/O), na qual um solvente polar contendo o fármaco e o polímero são emulsionados em uma fase oleosa, como o óleo mineral. É possível, ainda, a obtenção de uma emulsão múltipla (A/O/A), em que a fase aquosa contendo o material a ser precipitado é

disperso em uma solução do polímero no solvente volátil, e essa emulsão resultante (A/O) é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; WATTS; DAVIES; MELIA, 1990).

A granulometria das micropartículas pode ser controlada por vários parâmetros (viscosidade, velocidade de agitação e tipo de estabilizante e solventes utilizados). A homogeneização da emulsão constitui uma etapa determinante do processo uma vez que o tamanho final das partículas depende do tamanho das gotas formadas aqui, e que uma dispersão insuficiente das fases resulta em partículas maiores e com grande distribuição de tamanho. A ultrassonificação e os microfluidizadores podem ser utilizados para se obter gotas com tamanhos bastante reduzidos (SILVA et al., 2003; MAINARDES; EVANGELISTA, 2005). Concentrações mais elevadas de polímero podem levar ao aumento da viscosidade da fase interna, resultando em sua baixa dispersibilidade na fase externa e, conseqüentemente, maiores tamanhos de partícula. Assim como, concentrações insuficientes de estabilizante podem gerar gotas mais frágeis com tendência a coalescência, originando partículas maiores (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005).

Ao final do processo é obtida uma suspensão coloidal aquosa de partículas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das partículas no meio, assim como problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas. Esses problemas são minimizados através da secagem sob condições adequadas das suspensões ou liofilização (remoção da água na forma de gelo através de sublimação) das mesmas empregando-se um crioprotetor (e.g., trealose) para evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões, tornando-as ressuspendíveis. Esse efeito crioprotetor ou lioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das partículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas e evitando que cristais de gelo rompam as partículas e agreguem durante o congelamento (ASTETE; SABLIOV, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

3.6.2.2. Formação de partículas utilizando fluidos supercríticos

Com intuito de controlar as características das partículas, também têm sido propostas técnicas baseadas em fluidos supercríticos, no sentido de explorar as características de manipulação do poder solvente

e da alta difusividade que são peculiares dos fluidos nas proximidades do ponto crítico que é efetuado pela manipulação da temperatura e/ou pressão do sistema. A literatura vem mostrando a viabilidade de utilização de fluidos sub ou supercríticos como solventes ou antissolventes na produção de partículas, geralmente com processo em estágio único e ambientalmente aceitável (FAGES et al., 2004). A obtenção de partículas com tamanho, distribuição de tamanho e morfologia controlados empregando fluidos supercríticos ocorre como função de parâmetros operacionais como: natureza do solvente e do material de interesse, pressão, temperatura, concentração do material a ser precipitado e agente encapsulante na solução precipitante, razão entre as vazões de solução precipitante e antissolvente, tempo de residência no reator e aditivos empregados (cossolvente, catalisador, tensoativos) (AYMONIER et al., 2006; REVERCHON; CAPUTO; DE MARCO, 2003). A alta solubilidade da maioria dos solventes orgânicos em fluidos supercríticos permite uma eficiente separação do solvente e do antissolvente das partículas após a precipitação, o que resulta em produtos de alta pureza, isentos de solventes, e, ainda, possibilita o reaproveitamento do solvente e do antissolvente (MIGUEL et al., 2006). O uso do SC-CO₂, principal fluido supercrítico utilizado, propicia meio inerte apropriado para processar facilmente substâncias oxidáveis e a possibilidade de processar moléculas termossensíveis devido suas baixas temperatura e pressão críticas (KALOGIANNIS; MICHAÏLOF; PANAYIOTOU, 2006; MIGUEL et al., 2008; COCERO et al., 2009).

Os processos supercríticos de formação de partículas podem ser classificados de acordo com a função do fluido supercrítico no processo: solvente, antissolvente, cossolvente ou soluto, ou ainda como gás propelente (COCERO et al., 2009). As técnicas de recristalização que empregam fluidos pressurizados como solvente são RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions* - Rápida Expansão de Soluções Supercríticas) e SSI (*Supercritical Solvent Impregnation* - Impregnação por Solvente Supercrítico); como soluto é o método PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions* - Partículas a partir de Soluções Saturadas de Gás); e como antissolvente são os métodos SFEE (*Supercritical Fluid Extraction of Emulsions* - Extração Supercrítica de Emulsões, também chamado de SAS de Emulsão) e GAS (*Gas Antisolvent* - Gás Antissolvente), bem como suas variações como SAS (*Supercritical Antisolvent* - Antissolvente Supercrítico), PCA (*Precipitation with a Compressed Antisolvent* - Precipitação com Antissolvente Comprimido), ASES (*Aerosol Solvent Extraction System* - Sistema de Extração de Solvente em Aerossol), SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by*

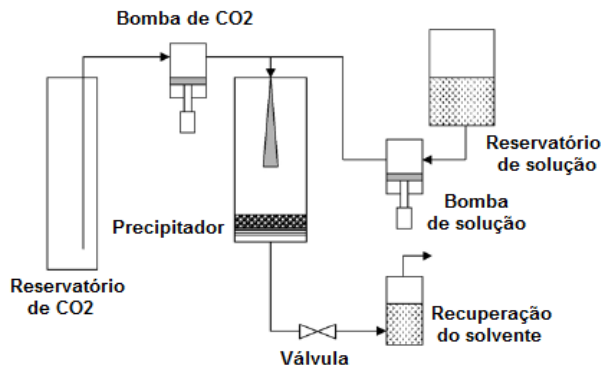
Supercritical Fluids - Dispersão da Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos), em que a diferença entre as técnicas está no modo como o antissolvente e a solução orgânica contendo o material a ser precipitado são colocados em contato (YEO; KIRAN, 2005; COCERO et al., 2009; FRANCESCHI et al., 2009). Na literatura são encontrados diversos trabalhos com uma ampla revisão sobre dos fundamentos e aplicações dos processos de precipitação e encapsulamento que utilizam fluidos supercríticos, entre eles os trabalhos de Jung e Perrut (2001), Yeo e Kiran (2005), Martín e Cocero (2008) e Cocero et al. (2009).

O princípio básico dos métodos antissolvente, em especial da metodologia SAS, reside no fato de que os solutos (extrato e polímero) sejam completamente miscíveis no solvente orgânico e imiscíveis ou muito pouco miscíveis no antissolvente e, ainda, que o solvente orgânico possua maior afinidade pelo antissolvente do que pelos solutos. Assim, quando a solução contendo os solutos é posta em contato com o antissolvente, a solubilidade dos solutos no solvente orgânico é drasticamente reduzida, devido ao antissolvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico levando a precipitação do soluto na forma particulada (YEO; KIRAN, 2005; MARTÍN; COCERO, 2008; COCERO et al., 2009). A solução é aspergida através de um fino bocal em uma câmara de precipitação já carregada com o antissolvente e em condições de temperatura e pressão já estabilizadas e constantes, mantendo-se a adição constante do antissolvente. Após a injeção de todo o volume de solução, o antissolvente continua a fluir por mais alguns instantes visando a secagem das partículas geradas e remoção do solvente orgânico residual. Então a câmara é depressurizada e é feita a retirada do material precipitado, normalmente depositado sobre um filtro colocado no fundo da câmara para evitar que as partículas sólidas sejam arrastadas pela tubulação para fora da câmara precipitadora (FRANCESCHI, 2009). A Figura 8 apresenta um diagrama esquemático do processo SAS.

Com técnica SAS é possível fazer encapsulamento, quando as partículas finais apresentam uma fina camada de polímero recobrimo o material de interesse, ou coprecipitação simultânea dos compostos de interesse e de seu carreador (*e.g.*, polímero) formando compósitos desses materiais. Para isso pode ser utilizada única solução em que todos os materiais em suspensão ou, quando o agente encapsulante e a substância ativa não são solúveis no mesmo solvente, é possível preparar diferentes soluções, uma para cada substância, e submeter

ambas à precipitação simultânea (KALOGIANNIS; MICHAÏLOF; PANAYIOTOU, 2006; COCERO et al., 2009).

Figura 8. Diagrama esquemático do processo SAS.



Fonte: Martín e Cocero (2008).

Os mecanismos que controlam a formação de partículas pelo processo SAS são complexos, pois envolvem um efeito combinado de dinâmica dos fluidos (meio de aspersão), transferência de massa, cinética de nucleação e termodinâmica (equilíbrio de fases do sistema a alta pressão) (REVERCHON; CAPUTO; DE MARCO, 2003). Já a eficiência de encapsulamento desse processo depende de diversos parâmetros, em particular da concentração inicial da substância ativa e do material de cobertura (agente encapsulante) e da afinidade entre esses dois materiais. Se existir alta afinidade entre os materiais é possível incorporar o núcleo (substância ativa) no carreador em um estado amorfo. Se não existir afinidade, pode ocorrer a precipitação segregada dos materiais (YEO; KIRAN, 2005). Também, a concentração inicial da substância ativa e do agente encapsulante pode interferir ou determinar a morfologia das partículas obtidas (COCERO et al., 2009).

3.7. Considerações a respeito do estado da arte

A tendência das indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética atualmente é desenvolver produtos seguros e com qualidade, tanto para a saúde dos consumidores quanto para o meio ambiente, para atender a um mercado cada vez mais exigente. Com isso, métodos alternativos de

extração e preservação de compostos de interesse na forma de nutracêuticos, fármacos e cosméticos estão surgindo.

Outra tendência do mercado é o aproveitamento de resíduos com intuito de minimizar seu impacto ambiental, podendo, ao mesmo tempo, agregar valor a esses subprodutos. A composição das sementes de maracujá, conforme relatado anteriormente, faz com que esse subproduto da produção de polpa e suco dessa fruta tenha grande potencial para reaproveitamento e agregação de valor. Em parte isso já acontece com a produção de óleo de semente de maracujá, mas ainda em pouca quantidade considerando o volume de sementes resultante de toda a produção nacional de sucos. Por sua vez, o processo de obtenção desse óleo gera um novo resíduo, a torta, que também pode apresentar potencial de utilização para a obtenção de compostos de interesse.

Considerando que a maioria dos compostos ativos apresenta sensibilidade térmica, a precipitação destes em micropartículas poliméricas pode conferir estabilidade e proteção a estes materiais bioativos de interesse, garantindo que mantenham suas propriedades no produto final, após o processamento industrial e exposição a condições adversas que possam causar degradação dos mesmos. Uma das áreas mais desenvolvidas desta tecnologia diz respeito à produção de fármacos. Mas, segundo alguns autores, um futuro promissor está reservado para a área alimentícia e nutracêutica na produção de compostos com alto valor agregado e pureza. Assim sendo, a precipitação/encapsulamento desses materiais é uma alternativa bastante atraente do ponto de vista tecnológico e econômico.

A motivação para a realização do presente trabalho se baseou no potencial de aproveitamento que os resíduos da produção de suco e de óleo de semente oferecem, aliado ao fato de serem encontrados poucos estudos na literatura envolvendo extração supercrítica de óleo de semente de maracujá e, até o momento, nada ter sido encontrado sobre o reaproveitamento da torta. Assim como, a falta de dados na literatura, até o presente, sobre equilíbrio de fases de sistemas contendo óleo de semente de maracujá e estudos de precipitação/encapsulamento desse material, especialmente em meio supercrítico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A seguir estão apresentados e descritos o material e os métodos utilizados neste trabalho. Inicialmente foram realizadas análises de caracterização das matérias-primas, semente de maracujá e torta de semente de maracujá, como seu teor de umidade e substâncias voláteis, a avaliação do diâmetro médio de seus fragmentos e testes cinéticos para estabelecer as condições de operação de extração supercrítica para a determinação do rendimento global de extrato (X_0).

Foram realizadas operações de extração com solventes orgânicos em ambas as matérias-primas para verificar a influência do método e dos solventes usados no rendimento de extração e nas atividades biológicas dos extratos, e comparar esses resultados com os das extrações supercríticas em diferentes condições de temperatura e pressão.

Com base nos resultados de rendimento e de atividades biológicas, dois extratos foram selecionados para a realização dos experimentos de formação de partículas com polímero. O PLGA foi escolhido por ser um biopolímero comumente empregado no encapsulamento de produtos naturais, devido sua degradação por hidrólise gerando produtos que são absorvidos pelo organismo, como o ácido láctico e o ácido glicólico, o que levou a sua aprovação pelo FDA. Foram utilizados dois tipos de PLGA, com diferentes pesos moleculares e razões entre os copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico, 50:50 e 65:35. Também foram aplicadas duas técnicas diferentes de síntese de partículas: com antissolvente supercrítico (SAS) e por emulsificação/evaporação do solvente (ESE), para avaliar a influência das técnicas, dos extratos e dos polímeros nas propriedades das partículas formadas, na eficiência de encapsulamento e no perfil de liberação.

Com a finalidade de serem obtidas informações sobre o comportamento do sistema contendo extrato e solvente em meio supercrítico, sem e com a adição do polímero, visando operações precipitação, foram realizados ensaios de equilíbrio de fases termodinâmico.

A caracterização das matérias-primas, as extrações, a avaliação das atividades antioxidantes dos extratos e a determinação do seu conteúdo total de compostos fenólicos foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica - LATESC, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - EQA/UFSC, assim como os experimentos

de equilíbrio de fases e de formação de partículas com tecnologia supercrítica. Os ensaios de síntese de partículas utilizando a técnica por emulsificação/evaporação do solvente (ESE) foi realizada na Universidade Texas A&M (EUA), juntamente com as análises de caracterização das partículas formadas por ambos os métodos, estudo de liberação controlada dos extratos coprecipitados e avaliação de atividade antimicrobiana de extratos e partículas, conforme projeto de estágio doutoral no exterior (PDSE/CAPES nº 14219/2013-01).

4.1. Matéria-prima vegetal

Os resíduos do processamento de suco de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) – semente – e da obtenção de óleo de semente de maracujá – torta de semente –, apresentados na Figura 9, foram cedidos pela empresa Extrair Óleos Naturais localizada no estado do Rio de Janeiro. Por sua vez, essa empresa coletou as sementes em uma indústria de polpa do Espírito Santo no dia 11 de maio de 2012. A coleta e limpeza das sementes ocorreram no mesmo dia, para então serem secas em temperatura de até 60 °C em um secador rotativo. O processo de limpeza das sementes foi submetido a registro de patente pela empresa que não pôde dar mais detalhes. A torta é proveniente do óleo extraído no dia 14 de maio de 2012.

No recebimento, separou-se uma amostra de cada matéria-prima para a determinação do teor de umidade do material (conforme subseção 4.1.1.) e o restante foi acondicionado em sacos plásticos de polietileno, em porções de aproximadamente 2 kg para facilitar o manuseio, e armazenado em freezer doméstico (Freezer 250, Brastemp, São Paulo/SP) à temperatura de aproximadamente -18 °C até o momento da utilização.

Como as sementes de maracujá recebidas já estavam secas e limpas, o único pré-tratamento necessário foi a moagem, feita em liquidificador doméstico (Black & Decker, SP, Brasil), momentos antes das extrações. Enquanto para a torta de semente de maracujá, por já se tratar de um pó seco, não houve necessidade de pré-tratamento. A Figura 9 apresenta fotos das matérias-primas, (a) semente de maracujá e (b) torta de semente de maracujá, no recebimento e também da (c) semente de maracujá triturada logo antes da extração.

Figura 9. Semente de maracujá (a) e torta de semente de maracujá (b) no recebimento, (c) semente de maracujá triturada pronta para extração.



4.1.1. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis

O teor de umidade e substâncias voláteis presentes na matéria-prima foi determinado pela metodologia 925.09 da AOAC (2005) fundamentada na perda de umidade e substâncias voláteis da amostra submetida a 105 °C. Brevemente, 5 g de cada amostra foi medida - em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) - em cápsula de alumínio previamente aquecida em estufa (E.L. 003, Odontobrás, Ribeirão Preto/SP, Brasil) a 105 °C, resfriada em dessecador e medida sua massa. Em intervalos de tempo as cápsulas eram retiradas da estufa, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se essas operações de aquecimento e resfriamento até massa constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi empregada a Equação 1.

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

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

Este procedimento foi aplicado nas matérias-primas in natura, assim que recebidas, sendo realizado em triplicata para cada material e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

4.1.2. Determinação do diâmetro médio de fragmentos

O diâmetro médio de fragmentos das matérias-primas foi determinado através do cálculo proposto por Gomide (1983). Para isso, foram medidos 100 g de amostra em balança com precisão de 0,01 g

(BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e utilizadas peneiras da série Tyler de mesh -18/+80, sendo o conjunto agitado por 30 minutos. Com as frações retidas em cada peneira foi calculado o diâmetro médio de fragmentos conforme as Equações 2 e 3 (GOMIDE, 1983).

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

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

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

4.1.3. Densidade Real

A densidade real (ρ_r) foi determinada utilizando-se o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos através da técnica de picnometria em gás Hélio, com o uso do equipamento Accu Pyc II 1340 da Micromeritics (Figura 10). A utilização dessa técnica proporciona boa precisão nos resultados, visto que o gás Hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar suas características, determinando o volume verdadeiro de um sólido, por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido. Normalmente, é utilizado o gás hélio por ser inerte, além de penetrar facilmente nos poros da amostra devido ao pequeno tamanho dos seus átomos (MOURA; FIGUEIREDO, 2002).

Figura 10. Picnômetro acoplado ao cilindro de gás hélio.



O picnômetro de Hélio é constituído por duas câmaras de volumes conhecidos: a câmara onde se coloca a amostra e a câmara de expansão, ligadas por uma válvula (válvula de expansão). Antes do início da análise, a amostra colocada na respectiva câmara é sujeita a um processo de desgaseificação que consiste em repetidas purgas com hélio, para remoção de impurezas e umidade que eventualmente possa conter. Depois que todo o sistema é levado à pressão atmosférica, a câmara de expansão é isolada pelo fechamento da válvula de expansão (operação realizada automaticamente pelo equipamento) e a câmara que contém a amostra é pressurizada até uma pressão P_1 . Em seguida, a válvula de expansão é aberta (operação também realizada automaticamente pelo equipamento) e, conseqüentemente, ocorre uma redução de pressão para P_2 . Admitindo comportamento ideal do gás hélio, o volume do sólido pode ser calculado a partir da Equação 4 (SMITH, 1996).

$$P_1(V_a - V_s) = P_2(V_a - V_s + V_e) \quad (4)$$

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

A principal vantagem deste método está na sua capacidade para medir apenas o volume da amostra descontando o volume de todos os poros. A partir da determinação do volume do sólido pode-se determinar

a sua densidade real, sendo esse resultado calculado pelo *software* do equipamento.

4.2. Métodos de extração

Foram utilizados processos de extração à baixa pressão pelos métodos maceração (MAC) e extração assistida por ultrassom (UE), para comparar os resultados de rendimento, atividade biológica e composição dos extratos de semente de maracujá e dos extratos de torta de semente de maracujá obtidos com os diferentes métodos.

4.2.1. Maceração (MAC)

A extração utilizando o processo de maceração foi realizada à temperatura ambiente mantendo-se a proporção amostra-solvente igual à 1:5 (m/m). A amostra, medida em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e o solvente foram colocados em frasco âmbar. Os frascos foram fechados e mantidos ao abrigo da luz por 7 dias, sendo agitados uma vez ao dia. Os solventes utilizados foram hexano (Hx), acetato de etila (EtOAc), etanol (EtOH) e uma mistura de etanol e água (1:1, v/v) (EtOH-H₂O), em ordem crescente de índice de polaridade (Reichardt, 1994). Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (DVR 1400, Dosivac, Buenos Aires, Argentina) em funil de Buchner com papel-filtro e o filtrado recolhido em Kitasato.

Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (conforme item 4.2.4.) e armazenados em freezer doméstico (Freezer 250, Brastemp, São Paulo/SP) a -18 °C. As extrações foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.2. Extração assistida por ultrassom (UE)

A técnica utilizada para a extração assistida por ultrassom foi adaptada da metodologia descrita por Freitas (2007), utilizando 3 g de amostra, com 50 mL de solvente em temperatura ambiente por 45 minutos. Foram utilizados os mesmos solventes empregados na maceração (seção 4.2.1.). Essas extrações foram realizadas em duplicata em aparelho de ultrassom Ultrasonic cleaner, modelo USC-200 de frequência 40 kHz e potência de 60 W.

O balão, contendo a mistura de amostra e solvente, foi selado com filme plástico para evitar a evaporação do solvente e submetido ao tratamento em banho indireto com ultrassom através do uso de uma lavadora ultrassônica (USC-700/55 kHz, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba/SP, Brasil). Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (DVR 1400, Dosivac, Buenos Aires, Argentina) em funil de Buchner com papel-filtro, sendo o filtrado recolhido em Kitasato.

Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (4.2.4.) e armazenados em freezer doméstico (Freezer 250, Brastemp, São Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. As extrações foram feitas em duplicata e o resultado de rendimento foi expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.3. Extração supercrítica (ESC)

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

Os experimentos cinéticos (curvas de extração), detalhados no item 4.2.3.1., foram realizados através do método dinâmico de extração, caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999; DANIELSKI et al., 2007). A partir desse método pode-se determinar o percentual de soluto extraível do material sólido para essa determinada condição de processo, assim como definir o tempo total de extração a ser utilizado nos ensaios de determinação do rendimento global de extração, descritos no item 4.2.3.2.

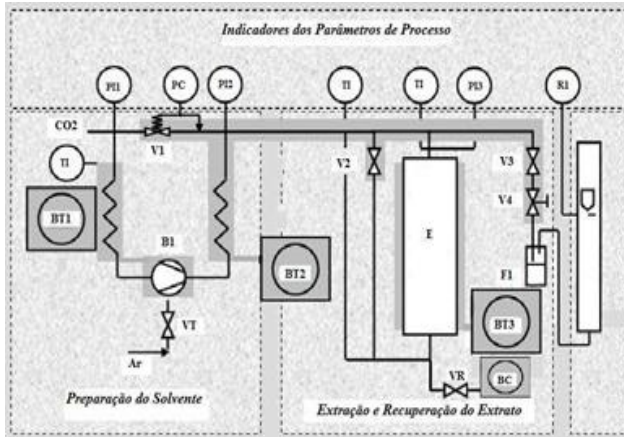
A Figura 11(a) apresenta a unidade de extração supercrítica, descrita por Zetzi, Brunner e Meireles (2003), desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha, que é utilizada no LATESC, enquanto a Figura 11(b) apresenta um esquema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

Figura 11. (a) Equipamento de extração supercrítica e (b) Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.

(a)



(b)



E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas de entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro; PI2: Manômetro de controle da bomba; PI3: Manômetro de controle do extrator; TI: Controladores de temperatura; BC: Bomba de cossolvente; VR: Válvula de retenção da bomba de cossolvente.

Fonte: Zetzl, Brunner, Meireles (2003) adaptado por Kitzberger (2005).

O fluido utilizado foi o CO₂ com 99,9 % de pureza (no presente trabalho chamado de CO₂ puro) que provém de um cilindro equipado com tubo pescador (White Martins Ltda., Joinville/SC, Brasil). A tubulação de solvente, na qual é inserido o CO₂, é imersa em um banho termostático (BT1) (C10 - K10, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o solvente (CO₂) esteja no estado líquido antes de sua entrada na

bomba (B1) (M111, Maximator, Niedersachsen, Alemanha). A bomba trabalha alimentada por ar comprimido filtrado. A pressão de operação da unidade supercrítica é regulada através da pressão de ar comprimido alimentado, uma vez que a bomba opera em uma razão 1:130 ($P_{ar} \cdot P_{sistema}$). Durante o funcionamento, a bomba encaminha o CO₂ pressurizado à tubulação de extração, passando pelo extrator (E) em direção ascendente, que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 31,6 cm de comprimento, 2,012 cm de diâmetro interno e volume de 103,3 mL, com extremidades rosqueadas. A tubulação que liga a bomba ao extrator, bem como a tubulação após o extrator, é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (BT2) (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da tubulação e das válvulas agulha (V3 e V4) durante a despressurização da mistura soluto/solvente e diminuir a possibilidade de recristalização/precipitação de extrato na tubulação, causando entupimento. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (BT3) (DC30-B30, Thermo Haake, Alemanha). No início do processo de extração, a válvula (V2) (10-11NFA, HIP, Erie, PA, USA) é mantida fechada e, após a pressurização do solvente, é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A válvula (V3) (10-11NFA-V, HIP, Erie, PA, USA) também conectada na saída do extrator auxilia a V4 (10-11NFA, HIP, Erie, PA, USA) na despressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o extrato é coletado em frascos âmbar (F1) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (R1) (10A61ABB, Automation Products), regulado por V3 e V4. As pressões do cilindro (PI1), da bomba (PI2) e do extrator (PI3) são monitoradas por manômetros (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10).

4.2.3.1. Experimentos cinéticos – Curvas de extração e parâmetros cinéticos

Os experimentos cinéticos para a obtenção da curva de extração e definição do tempo total de extração - a ser empregado nos ensaios de avaliação do rendimento - foram realizados para cada matéria-prima, semente de maracujá triturada e torta de semente de maracujá, utilizando 10 g da matéria-prima. A coleta de cada extrato foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados e massa coletada foi medida em balança analítica, para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração. As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa de CO₂ consumido, ou ainda pelo rendimento de extração *versus* a razão massa de solvente por massa de amostra (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; MICHIELIN, 2009).

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro a uma vazão de solvente de 8 ± 2 g/min, 250 bar de pressão e 40 °C de temperatura. Os parâmetros cinéticos foram considerados para avaliar a cinética das extrações e calculados conforme Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009). Através de regressões lineares com melhores ajustes aos dados experimentais, as curvas de extração foram divididas nas três etapas de extração, conforme item 3.4.3.2., para serem determinados os tempos de cada um dos períodos de extração. A partir daí, considerando quando a etapa difusiva foi alcançada, definiu-se o tempo total de extração usado na sequência nos experimentos de rendimento global. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas de velocidade constante e decrescente de extração, respectivamente. A taxa de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com auxílio de uma planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} .

4.2.3.2. Determinação das isotermas de rendimento

Os ensaios para a determinação das isotermas de rendimento foram conduzidos conforme procedimento descrito por Michielin et al. (2005). O rendimento global de extrato (X_0) é a quantidade de soluto extraível presente na matriz sólida referente a uma dada condição de extração. A influência da pressão e da temperatura no rendimento global

da ESC foi avaliada com as seguintes condições de operação: pressões de 150, 250 e 300 bar, temperaturas de 40 e 50 °C e vazão fixa de solvente de 8 ± 2 g/min .

O tempo de extração foi definido através da observação das curvas de extração obtidas a 250 bar, 40 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min conforme explicado no item 4.2.3.1. e fixado em 2,5 horas para a semente de maracujá e em 3 horas para a torta de semente. Como descrito no item 5.2., após esses tempos, as extrações se encontram na etapa difusional em que a extração é quase nula.

As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na tubulação de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro (na entrada de solvente, antes da matéria-prima).

Os frascos com os extratos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -18 °C até a realização dos ensaios de avaliação da qualidade dos extratos. O rendimento global (X_0) foi calculado através da razão entre a massa de extrato (m_{extrato}) obtida e a massa de matéria-prima (m_{mp}) utilizada para formar o leito conforme a Equação 5.

$$X_0 = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{mp}}} .100 \quad (5)$$

Com os resultados de rendimento obtidos para cada condição de temperatura e pressão, foi construído um gráfico de X_0 versus pressão, obtendo-se as isotermas de rendimento da extração supercrítica da semente e da torta de semente de maracujá.

4.2.3.3. Emprego de cossolvente (CS)

Devido à torta de semente de maracujá ser uma matéria-prima com baixo teor de lipídios, que são mais facilmente extraídos pelo CO_2 , foram realizados ensaios com adição de cossolvente ao CO_2 com esse material a fim de avaliar a influência provocada pela adição de cossolvente no rendimento da ESC de torta. Foram selecionadas duas condições de pressão (250 e 300 bar), uma temperatura (40 °C) e os demais parâmetros, vazão de CO_2 e tempo de extração, não foram alterados.

Para a adição de cossolvente junto à extração supercrítica, são acopladas ao equipamento uma bomba de cossolvente (BC) e uma válvula de retenção (VR), para evitar que solvente orgânico, CO_2 ou

extrato retornem para a BC se houver um aumento na pressão da bomba de CO₂ durante o experimento, conforme apresentado na Figura 11(b). A bomba de cossolvente (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) trabalha numa faixa de vazão de 0,1 a 10 mL/min.

Foi utilizado como cossolvente o álcool etílico (P.A.) em fração mássica de 5 % (m/m) em relação à massa total de CO₂ empregada na extração supercrítica. Esse solvente foi selecionado com base nos resultados de rendimento das extrações à baixa pressão e em dados da literatura que relatam o uso deste solvente como cossolvente (CASAS et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Os extratos obtidos ao final da extração foram submetidos à etapa de eliminação do solvente orgânico descrito no item 4.2.4. As extrações com emprego de cossolvente foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.4. Tratamento dos extratos e eliminação do solvente

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

4.3. Modelagem matemática

A modelagem da curva de extração (massa de extrato acumulada *versus* tempo de extração, construída com os dados dos experimentos cinéticos a 250 bar, 40 °C e 8 ± 2 g de CO₂/min), foi realizada com o objetivo de avaliar a influência dos parâmetros de operação e da abordagem fenomenológica de cada modelo no ajuste às curvas experimentais de ESC de semente e de resíduo de semente (torta) de maracujá. Foram aplicados os modelos de Crank (1975), de Tan e Liou (1989), de Gaspar et al. (2003), de Sovová (1994) e de Martínez et al. (2003), cujas equações estão apresentadas no Anexo III. Para isso, foi utilizado o *software* Mass Transfer, desenvolvido por Correia et al.

(2006) no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC/EQA-UFSC), que utiliza o método da máxima verossimilhança para minimizar a soma dos quadrados dos desvios calculados (KITZBERGER et al., 2009).

Para a aplicação dos modelos são necessárias algumas considerações e o conhecimento de parâmetros das matérias-primas, do leito de extração e do processo, obtidos experimentalmente ou estimados. As características do leito de extração foram determinadas conforme itens 4.3.1 e 4.3.2. Como a fase supercrítica é tratada como uma solução infinitamente diluída, a densidade do sistema (extrato/CO₂) foi considerada como a densidade do solvente puro, calculada a partir da equação de Angus, Armstrong e De Reuck (1976), baseada em dados experimentais para amplas faixas de temperatura e pressão. Os parâmetros foram medidos diretamente ou calculados a partir de dados experimentais, com exceção da solubilidade do extrato que foi considerada como sendo igual à solubilidade do ácido linoleico determinada por Chen, Chang e Yang (2000), uma vez que esse é reportado como sendo o composto majoritário do óleo de semente de maracujá produzido por extração supercrítica (LIU et al., 2009).

Para a modelagem das curvas de extração do óleo de semente de maracujá utilizando o modelo logístico (LM), considerou-se que o extrato seja representado por um único grupo de compostos (pseudo componente) devido a informações limitadas sobre o perfil de composição do extrato com o tempo de processo e a dificuldade de identificar todos os compostos presentes no extrato.

4.3.1. Densidade aparente

A densidade aparente (ρ_a) é a relação entre a massa de amostra utilizada para formar o leito de sólidos e o volume do extrator, incluindo assim apenas os poros do leito e não os poros do interior da partícula. A densidade aparente foi determinada pela razão entre a massa de amostra ($m_{amostra}$) e o volume ocupado por esta no extrator (V_{leito}) conforme a Equação 6.

$$\rho_a = m_{amostra} / V_{leito} \quad (6)$$

4.3.2. Porosidade do leito fixo

Para formar o leito fixo de extração foi utilizado aproximadamente 10 g de matéria-prima. A porosidade (ε) do leito foi determinada através da Equação 7, que relaciona a densidade real (ρ_r) e a densidade aparente (ρ_a). Tal parâmetro é utilizado nas equações dos modelos de transferência de massa utilizados, apresentados no Anexo III.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (7)$$

4.4. Avaliação da qualidade dos extratos

A qualidade dos extratos de semente de maracujá e de torta de semente de maracujá obtidos, tanto pelas extrações supercríticas quanto extrações a baixa pressão, foi avaliada em termos de atividades antioxidante e antimicrobiana e teor de compostos fenólicos total.

4.4.1. Capacidade antioxidante pelo método de DPPH

A técnica descrita por Mensor et al. (2001) se baseia na reação por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, do extrato em análise em concentrações crescentes, 5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL, com uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mMol/L, com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo/SP). Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH pode ser calculado convertendo-se a absorbância em percentual de atividade antioxidante (% AA), conforme a Equação 8.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \cdot 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \quad (8)$$

Os valores obtidos para % AA são plotados em um gráfico de % AA versus concentração. O ajuste dos pontos foi feito por regressão. A partir da regressão, obteve-se um valor conhecido como EC₅₀, que

representa a concentração do extrato na qual se obtém uma inibição de 50 % da oxidação. Desse modo, quanto menor o valor de EC_{50} , menor a concentração de extrato necessária para se ter uma maior atividade e, conseqüentemente, maior o potencial antioxidante do extrato (MENSOR et al., 2001). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC_{50}) e atividade antioxidante (% AA) para os extratos analisados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.4.2. Atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico

Pela metodologia utilizada, descrita por Matthäus (2002), inicialmente são preparadas duas emulsões, uma com adição de β -caroteno e outra sem (branco). Para a emulsão de β -caroteno, em um balão de 100 mL, foram medidos 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween-20 e 3,34 mg de β -caroteno. A este balão adicionou-se 1 mL de clorofórmio e agitou-se bem até a completa solubilização das partículas de β -caroteno. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo (Fisatom, Mod. 550 e 802, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a 40 °C. Logo após foram adicionados 100 mL de água destilada na mistura, agitando vigorosamente para formar uma solução estável. A emulsão de branco foi preparada com 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween-20 e 100 mL de água destilada, e também agitada vigorosamente. As duas emulsões foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até a realização das análises.

Um alíquota de 5 mL da solução de β -caroteno foi adicionada à 200 μ L do extrato, sendo que cada um dos extratos a ser testado foi diluído em etanol P.A. na concentração final de 1667 mg/L. Imediatamente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo/SP) em comprimento de onda de 470 nm com respectivas soluções de branco, constituídas de 5 mL de emulsão de branco e 200 μ L do extrato. Os tubos foram imediatamente imersos em banho termostatizado (Biomatic Aparelhos Científicos Ltda., Porto Alegre/RS, Brasil) a 50 °C durante 2 horas de reação. Em paralelo, foi realizado também o controle do teste, em que a amostra foi substituída por etanol. A taxa de descoloração da solução de β -caroteno foi determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm e após 120 minutos, e os resultados de atividade antioxidante (% AA) calculados pela Equação 9 e expressos como média \pm desvio padrão.

$$AA\% = 1 - \left\{ \left[\frac{(Abs_{t:120} - Abs_{t:0})}{Abs_{controle:120} - Abs_{controle:0}} \right] .100 \right\} \quad (9)$$

4.4.3. Avaliação da inibição da oxidação pelo método ABTS

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999). Utilizou-se o Trolox, vitamina E sintética (6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA) como antioxidante referência, que foi preparado em etanol e estocado como solução padrão. Para a análise, o reagente ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi dissolvido em água até a concentração de 7,0 mMol/L, e submetido à reação com 2,45 mMol/L 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⁺ foi diluída em etanol até uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 754 nm. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo/SP), 6 minutos após a adição da amostra na solução de ABTS⁺. A partir das leituras realizadas a porcentagem de inibição do radical foi calculada através da Equação 10:

$$\% \text{ inibição} = 1 - \left[\frac{Abs_f}{Abs_0} \right] .100 \quad (10)$$

onde: Abs_f é a absorbância após a adição da amostra ao radical ABTS para o tempo de 6 minutos e Abs₀ é a absorbância do radical.

Uma curva padrão foi plotada em função da porcentagem de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox (μMol/mL). Após a obtenção do percentual de inibição do respectivo extrato, a atividade antioxidante (AA) foi calculada através da Equação 11 com base na curva analítica de Trolox.

$$AA = \left[\frac{C_a}{C_e} \right] \quad (11)$$

onde: C_a é a concentração (μMol/mL) referente ao percentual de inibição obtido através das leituras espectrofotométricas do extrato e C_e é a concentração do extrato utilizada na técnica. Dessa forma, os

resultados foram expressos em μM TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) por g de extrato.

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

A determinação do conteúdo total de compostos fenólicos presente nos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração a partir de ambas as matérias-primas foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Rossi e Singleton (1965). Esse método é utilizado para medir o teor de compostos fenólicos total em produtos naturais, tendo como mecanismos a reação de oxirredução (ROGINSKY; LISSI, 2005). A reação com o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstícos e fosfomolibdicos, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorbância na faixa visível do espectro a 765 nm.

Para interpretar os resultados é necessário preparar uma curva analítica de absorbância (ABS) *versus* concentração de ácido gálico (mg/L), com o objetivo de representar a absorbância da amostra frente à concentração da curva padrão. Para isto, dissolve-se 0,5 g de ácido gálico em H_2O destilada de modo a obter uma solução de concentração 5 g/L de ácido gálico. A partir desta solução estoque, são preparadas, em balões volumétricos de 100 mL, soluções de concentrações crescentes de 0, 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferido para estes 100 μL de cada uma das diluições, ao quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após 30 segundos e antes de 8 minutos após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por 2 horas, para que a reação ocorresse. A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo/SP) e o branco realizado com água destilada.

Os valores de absorbância obtidos para cada um dos extratos foram correlacionados com a curva analítica de ácido gálico, e o teor de compostos fenólicos total (TFT) foi determinado através da Equação 12. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg EAG/g de extrato, como média \pm desvio padrão.

$$\text{TFT} \left(\text{mg} \frac{\text{GAE}}{\text{g}_{\text{extrato}}} \right) = \left[\frac{(\text{GAE} \cdot 1000)}{D_{\text{extrato}}} \right] \quad (12)$$

onde GAE: do inglês *Gallic Acid Equivalent*, ou equivalente em ácido gálico, é obtido através da curva analítica (mg GAE/L); e D_{extrato} : diluição das amostras (mg_{extrato}/L).

4.4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

Com base nos resultados de rendimento, atividade antioxidante e TFT, os extratos de semente e de torta de semente de maracujá obtidos pelas extrações supercríticas a 40 °C (todas condições de pressão e cossolvente) e pela mistura de solventes EtOH-H₂O (1:1, v/v) por MAC e UE foram selecionados para serem submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana. A concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de resíduos de maracujá foi determinada por método de microdiluição em caldo (BRANDT et al., 2010) com *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Listeria innocua* (NRRL/USDA B33076) obtidas da coleção de culturas do Food Microbiology Laboratory da Texas A&M University (College Station, TX, USA). Essas espécies representam bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, respectivamente, de ocorrência comum em alimentos. *E. coli* e *L. innocua* foram ressuscitadas em caldo triptona de soja (TSB - *tryptic soy broth*) e caldo triptose fosfato (TPB - *tryptose phosphate broth*), respectivamente, por duas transferências idênticas em sequência, cada uma incubada aerobiamente por 24 h a 35 °C. As culturas bacterianas foram mantidas em tubos com ágar inclinado de triptona de soja (TSA - *tryptic soy agar*) e de triptona de soja enriquecido com 0,6 % de extrato de levedura (TSAYE), respectivamente, a 4 °C por no máximo 3 meses. As transferências a partir das inclinações foram similares às de ressuscitação para preparação dos microorganismos e no momento das análises diluídas em série em caldo TSB ou TPB com o dobro da concentração para um inóculo inicial de 5,0 log₁₀ CFU/mL. Esse inóculo foi enumerado por espalhamento em placa de TSA ou TSAYE, de acordo com o microorganismo, e incubado por 24 h a 35 °C.

Os ensaios para a determinação de CMI utilizaram placas de microdiluição de 96 poços esterilizadas (MicroWell, NUNC, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Mass., U.S.A.). Os extratos foram dissolvidos em uma solução de 10 % (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido) em água (0,2 µm filtrada) para facilitar sua solubilização sem inibir o

crescimento microbiano (SMÂNIA et al., 1999). As soluções iniciais de extratos foram preparadas com concentração de 16 mg de extrato/mL de solução de DMSO e, após diluições em série, as concentrações finais analisadas estavam entre 8000 e 125 µg/mL. Controles positivos (de crescimento) foram preparados com inóculo e a solução estéril de DMSO 10 % para garantir que esta não tinha efeito antimicrobiano. Controles negativos foram preparados com as mesmas soluções de extratos, em todas as concentrações, e os caldos estéreis com concentração dobrada para formar a linha de base para as leituras de densidade ótica (DO). Após a preparação das placas, elas foram cobertas com um filme de poliéster com propriedades de isolamento e resistência térmica (mylar plate sealer, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, U.S.A.), agitadas suavemente e sua DO inicial (0 h) medida espectrofotometricamente a 630 nm (VERSA max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). As placas foram então incubadas a 35 °C e agitadas suavemente antes da leitura feita após 24 h para observar se houve inibição. Cada poço que apresentou diferença $\leq 0,05$ na DO a 630 nm foi considerado com crescimento inibido pela solução de extrato e a CMI a menor concentração de extrato que inibiu esse crescimento. Todos os poços que apresentaram inibição tiveram sua capacidade bactericida testada por espalhamento de 0,1 mL de cada poço em placas de TSA ou TSAYE incubadas por 24 h a 35 °C. Se nenhum crescimento foi observado, a concentração testada foi considerada bactericida e a menor concentração de cada amostra com esse efeito é determinada como a concentração mínima bactericida (CMB) (HILL; TAYLOR; GOMES, 2013).

4.5. Determinação experimental do equilíbrio de fases

Entre os extratos de semente de maracujá obtidos por extração com CO₂ supercrítico, foi selecionado, pela combinação dos resultados de rendimento, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante (método de descoloração do β-caroteno), o da condição de 150 bar e 40 °C para ser submetido a medidas experimentais de equilíbrio de fases. Como a determinação do equilíbrio de fases tem por objetivo definir as condições a serem utilizadas em ensaios posteriores de precipitação/formação de partículas pela tecnologia SAS, o solvente primário na solução precipitante foi diclorometano P.A. (DCM), devido a seu poder solvente para o extrato e para o polímero a baixas temperaturas, e pela sua alta solubilidade em CO₂ supercrítico nas condições operacionais testadas. O polímero empregado foi o PLGA

50:50 (Mw 28000 a 38000 g/mol, Resomer[®] RG 503, terminação ester, Evonik, Darmstadt, Germany).

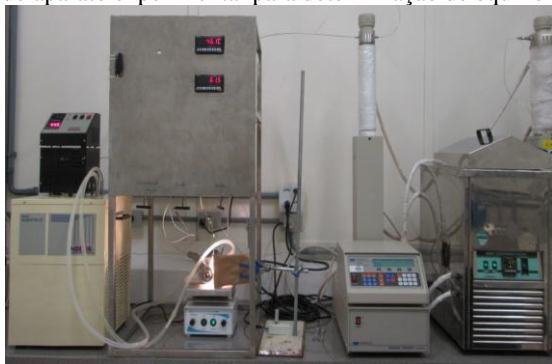
Com base em experiência anterior do grupo de pesquisas do LATEC em equilíbrio de fases e formação de partículas (MEZZOMO et al., 2012; BENELLI et al., 2014), o extrato foi dissolvido em diclorometano P.A. com uma proporção de 1:125 (m/v) para formar o sistema multicomponente, ou pseudoternário, extrato de semente de maracujá + diclorometano + CO₂. Além deste, o sistema formado por CO₂ + extrato de semente de maracujá + PLGA 50:50 + diclorometano, solubilizado na razão 1:3:125 (m/m/v), também foi submetido à determinação experimental do equilíbrio de fases, para avaliar a influência da adição do polímero no comportamento de fases do sistema.

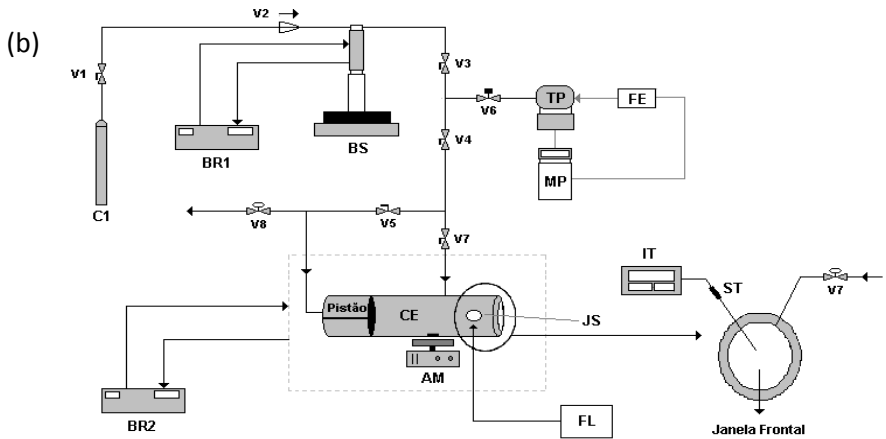
4.5.1. Aparato experimental

As medidas experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões foram conduzidas em uma célula de volume variável com visualização, baseada no método estático sintético, descrito detalhadamente por Fornari, Alessi e Kikic (1990) e Dohrn e Brunner (1995). A Figura 12 apresenta (a) o equipamento utilizado e (b) um diagrama esquemático do aparato experimental. As Figuras 13 e 14 mostram mais detalhadamente a célula de equilíbrio utilizada para a realização desses experimentos e o pistão que é inserido nessa célula e cujo movimento provoca a variação do volume do sistema.

Figura 12. (a) Unidade experimental de equilíbrio de fases e (b) diagrama esquemático do aparato experimental para determinação de equilíbrio de fases.

(a)





Fonte: Lanza (2004) adaptado por Rosso (2009).

Onde:

C1: Reservatório de solvente (CO_2), com tubo pescador.

V1: Válvula de via única (15-41AF1, HIP, USA).

V2: Válvula de agulha (15-11AF1, HIP, USA), permite o fluxo do solvente do cilindro para a bomba.

BR1: Banho de ultratermostático de recirculação 1, ajustado para a temperatura de $5\text{ }^\circ\text{C}$ (Q214M2, QUIMIS, SP/Brasil)

BS: Bomba de seringa (260HP Teledyne Isco, Lincoln/NE/EUA) com capacidade do cilindro interno de 260 mL, pressão de trabalho de $0,7$ a $655,2 \pm 0,5$ bar. Esta bomba permite a quantificação da massa de fluido deslocada para o interior da célula de equilíbrio bem como permite a pressurização e despressurização do sistema à medida que o solvente é deslocado.

JS e Janela Frontal: A célula possui duas janelas de safira (Swiss Jewel Company, USA), sendo uma **Janela Frontal** ($d = 25,4$ mm e espessura = $9,52$ mm) para visualização do interior da célula e outra lateral (**JS**) ($d = 15,87$ mm e espessura = $4,76$ mm) para a entrada de luz.

V3, V4, V5: Válvulas de esferas (SSH83PF2, SWAGELOK, SP/Brasil).

V6: Válvula de alívio (SS-4R3A, SWAGELOK, SP/Brasil).

V7: Válvula de alimentação (15-11AF1, HIP, USA).

V8: Válvula de descarga (15-11AF1, HIP, USA).

BR2: Banho termostático de recirculação 2, ajustado para cada temperatura dos experimentos de equilíbrio de fases (MBTC99-20, Microquímica, SC/Brasil).

IT: Indicador de temperatura (N1500, NOVUS, RS/Brasil).

TP: Transdutor de pressão (LD 301-511, SMAR, Huba Control, Wurenlos/Denmark).

MP: Monitorador de pressão (N1500, NOVUS, RS/Brasil).

AM: Agitador magnético (753A, FISATOM, SP/Brasil), para acelerar o alcance do equilíbrio.

FL: Fonte de luz. Foi utilizado um feixe de luz branca na janela lateral da célula de equilíbrio para iluminar o interior da célula e auxiliar a visualização das transições de fases.

CE: Célula de equilíbrio de volume variável. Consiste em um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL, encamisado, possuindo um diâmetro interno de 17,0 mm, diâmetro externo (com camisa) de 82,1 mm e comprimento de 172,1 mm. Contém uma janela frontal para visualização e uma janela de safira lateral (JS) para entrada de luz. No interior da célula existe um pistão que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com o termopar tipo Y (ST) e outra com a válvula de alimentação (V7) – conexões 1/4 NPT x 1/16 OD, São Paulo, Brasil. A célula é envolta por uma camisa conectada a um banho termostático (BR2) cuja função é manter a temperatura desejada na célula. O fundo da célula é ligado ao sistema por uma conexão do tipo HIP (Linden Erie, EUA) (fechamento e conexão com a válvula V5).

Figura 13. Célula de equilíbrio de volume variável.



Figura 14. Pistão utilizado na célula de equilíbrio.



4.5.2. Procedimento experimental

O procedimento experimental para a realização de medidas de equilíbrio de fases a altas pressões utilizando o aparato experimental descrito no item 4.5.1., é baseado na metodologia descrita por Benelli et al. (2014). Inicia com o carregamento do cilindro da bomba, na pressão de 60 bar, com dióxido de carbono proveniente do reservatório (cilindro de CO₂). A temperatura do banho de recirculação (BR1) foi ajustada a 5 °C e a pressão no cilindro da bomba regulada para 100 bar, aguardando a estabilização do sistema. Essas condições se fazem necessárias para manter o solvente (CO₂) como líquido comprimido e fornecer uma medida precisa do volume deslocado (CO₂ que deve ser adicionado à célula de equilíbrio). As válvulas V3 e V4 são então abertas e a pressão elevada através da bomba, pressurizando todo o sistema.

Enquanto a pressão estabiliza, procede-se a montagem da célula de equilíbrio. Primeiramente, a montagem do pistão é efetuada, assegurando que o fechamento das extremidades do pistão seja realizado de forma que este possa deslizar pelo interior da célula e não permita a passagem de volume do fundo para frente e vice-versa. Posteriormente, a célula é fechada e conectada à unidade de determinação de equilíbrio de fases.

Na metodologia estática sintética deve-se conhecer a composição global do sistema em estudo. Neste trabalho, o procedimento experimental foi aplicado para os seguintes sistemas:

- (A) Extrato de semente de maracujá + diclorometano (DCM) + CO₂, com razão extrato:DCM igual à 1:125 (m/v);
- (B) Extrato + PLGA 50:50 + DCM + CO₂, com razão extrato:polímero:DCM igual à 1:3:125 (m/m/v);

A escolha dos sistemas para realizar os experimentos de equilíbrio de fases está baseada na possibilidade de serem realizados experimentos de precipitação posteriores, em meio supercrítico.

Assim, para cada composição, uma quantidade de solução com extrato ou com extrato + PLGA 50:50 dissolvidos em diclorometano, referente aos sistemas descritos anteriormente, é pesada em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão de 0,0001 g, e, em seguida, colocada dentro da célula de equilíbrio através da conexão de alimentação, utilizando-se uma seringa com agulha.

Em seguida, a célula de equilíbrio é conectada à unidade experimental através das linhas que contêm as válvulas V5, V7 e o termopar, sendo mantidas fechadas. Assim que o sistema estabilizar (fluxo da bomba estável em $\pm 0,001$ mL/min), a válvula V7 é aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, na quantidade pré-estabelecida para fornecer a composição mássica desejada dentro da célula de equilíbrio. A massa de solvente (CO_2) a ser adicionada é computada com base no decréscimo do volume interno da bomba, sendo necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba. Após a alimentação, a pressão do sistema é reduzida até 60 bar e a válvula de esfera V5 é aberta para permitir que o solvente entre em contato com o fundo do pistão. O sistema formado deve ser continuamente agitado e, nesse instante, inicia-se a agitação por meio de um agitador magnético localizado abaixo da célula de equilíbrio. O sistema de aquecimento é acionado para que a temperatura do sistema alcance a temperatura do experimento. Neste trabalho, foram realizadas determinações experimentais do equilíbrio de fases para frações mássicas de CO_2 entre 60 e 98,8 %, em ensaios isotérmicos a temperaturas de 35, 45 e 55 °C.

Quando a temperatura necessária para a realização da medida experimental de cada uma das composições é estabelecida, a pressão é aumentada com o auxílio da bomba seringa, utilizando o CO_2 com fluido pneumático, até a visualização de uma única fase no interior da célula de equilíbrio. Neste momento o sistema é deixado em repouso, por aproximadamente 10 minutos até que seja atingido o equilíbrio.

Mantendo-se a temperatura constante e a solução sob agitação, inicia-se a despressurização lenta do sistema (3,5 bar/min) através da diminuição gradativa da pressão pela bomba, sendo mantida até a transição de fases, ou seja, o surgimento incipiente de uma segunda fase (turbamento ou formação de bolhas na solução) por observação visual.

Nesse instante, a diminuição da pressão deve ser interrompida e aguarda-se alguns instantes para a estabilização do sistema e identificação do tipo de transição e da interface entre as fases segregadas. Nesse ponto, anota-se o valor da pressão e, em seguida, pressuriza-se novamente o sistema para repetir o procedimento. Este procedimento de aumento de pressão, até que se forme uma fase, e redução da pressão, ocorrendo a transição de fases, é realizado no mínimo em duplicata para cada condição experimental de temperatura e composição, visando-se avaliar a repetibilidade da determinação experimental e obter um valor médio da pressão de transição a temperatura e composição global constantes.

Após a realização das medidas experimentais a pressão é reduzida até 60 bar (pressão de vapor do solvente) para a descarga do sistema. Fecha-se a válvula V4 para evitar que qualquer soluto residual entre na câmara do transdutor de pressão, e também a válvula V3 por medida de segurança. Abre-se lentamente a válvula V8 para descarregar o solvente remanescente. Nesse momento, dentro da célula existe uma fase vapor contendo praticamente solvente puro. Mantendo a válvula V8 aberta e as válvulas V3 e V4 fechadas, a válvula V7 é aberta lentamente para o descarregamento do solvente como fase vapor. Após esse procedimento, segue-se com a desmontagem e limpeza da célula de equilíbrio.

4.6. Formação de partículas

Com base nos resultados de rendimento e de atividades biológicas, dois extratos foram selecionados para a realização dos experimentos de formação de partículas com o polímero PLGA por duas técnicas diferentes: com antissolvente supercrítico (SAS) e por emulsificação/evaporação do solvente (ESE). Na primeira foram aplicados o extrato supercrítico e o PLGA 50:50 (razão entre os copolímeros de ácido lático e ácido glicólico), enquanto na segunda, além desses, foram aplicados um extrato obtido a baixa pressão e o PLGA com razão de copolímeros de 65:35, para avaliar a influência das técnicas, dos extratos e dos polímeros nas propriedades das partículas formadas, na eficiência de encapsulamento e no perfil de liberação.

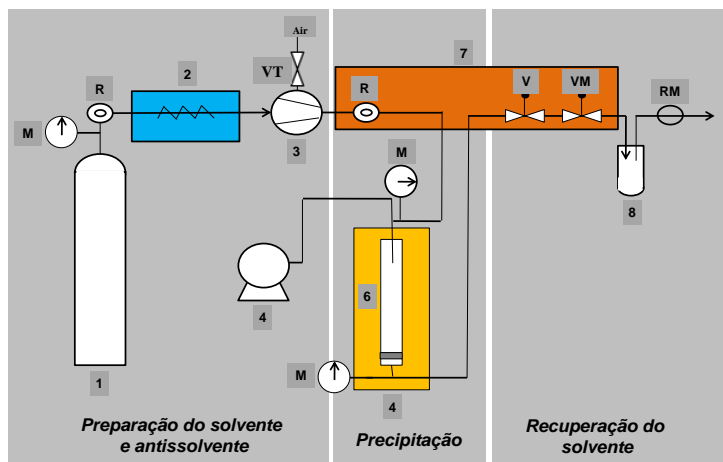
4.6.1. Precipitação com antissolvente supercrítico

A unidade de extração supercrítica apresentada na Figura 11 do item 4.2.3. foi adaptada por Mezzomo et al. (2015) para a realização de

experimentos de formação de partículas, conforme apresentado na Figura 15. As modificações feitas incluem a inversão da entrada e saída do leito de extração, que passa a ser célula de precipitação; a inserção de um bocal de tubos concêntricos posicionado no topo do vaso de precipitação por onde é feita a alimentação de solução pelo tubo interno e de CO₂ pelo tubo exterior; e a inclusão de um filtro poroso de tamanho 1 µm posicionado na saída da câmara de precipitação, utilizado para coletar as partículas de precipitado. Uma bomba de líquidos (M111, Maximator, Alemanha) e uma bomba de cromatografia líquida (Constametric 3200 P/F, Thermo Separation Processs, Japão) são usadas para alimentar o sistema com CO₂ supercrítico e solução orgânica precipitante. As duas correntes (CO₂ e solução) são misturadas através do bocal de tubos concêntricos. Assim, devido à alta solubilidade dos solventes orgânicos em CO₂ supercrítico, o solvente presente na solução precipitante é rapidamente solubilizado pelo CO₂ e as partículas são depositadas nas paredes da câmara de precipitação e no filtro posicionado na saída. Quando o fluxo de CO₂ + solvente passa pela válvula de despressurização, essa mistura é separada, sendo o solvente orgânico coletado em um frasco e o CO₂ descartado para o sistema de ventilação. As condições de temperatura e pressão são monitoradas utilizando instrumentos diretamente conectados ao vaso de precipitação, enquanto que a vazão de CO₂ é controlada utilizando um rotâmetro em pressão atmosférica, com precisão de medição de ± 2 g/min.

Os experimentos iniciaram pelo bombeamento de CO₂ puro na câmara de precipitação e pelo ajuste das condições de operação desejadas (temperatura, pressão e fração mássica de CO₂) até alcançar a estabilidade dos parâmetros. Depois, cerca de 20 mL de diclorometano (DCM) puro foram injetados a uma vazão de 1 mL/min para o sistema entrar em equilíbrio. Então, aproximadamente 40 mL de solução de precipitação (1:3:125, m/m/v, extrato:PLGA:DCM, conforme utilizado nos experimentos de equilíbrio de fases) foram alimentados no sistema, na vazão desejada (de acordo com a fração mássica de CO₂ empregada). Por fim, novamente CO₂ puro é bombeado na célula durante 20 min com a finalidade de garantir a secagem total das partículas. Subsequentemente a descompressão, as partículas precipitadas são coletadas e armazenadas a -18 °C até a realização das análises de caracterização das partículas.

Figura 15. Diagrama esquemático da unidade de formação de partículas com fluido supercrítico



1: Cilindro CO₂; 2: Banho termostático frio, circuito de refrigeração do CO₂; 3: Bomba de CO₂ (intensificadora) alimentada por ar comprimido; 4: Bomba HPLC (alimentação da solução de precipitação); 5: Banho termostático quente para a câmara de precipitação; 6: Câmara (célula) de precipitação; 7: Banho termostático quente para as válvulas; 8: Recuperação do solvente orgânico; M: Manômetro; R: Regulator de pressão; RM: Rotâmetro; V: Válvula; VM: Válvula micrométrica; VT: Válvula de controle da frequência da bomba
 Fonte: Mezzomo et al. (2015).

A precipitação de extrato supercrítico de semente de maracujá por SAS foi realizada nas seguintes condições operacionais, definidas a partir dos resultados do estudo de comportamento de fases dos sistemas: 1) 92,5% CO₂/35 °C/90 bar, 2) 95 % CO₂/35 °C/90 bar, 3) 95 % CO₂/35 °C/110 bar, 4) 92,5 % CO₂/45 °C/90 bar, 5) 92,5 % CO₂/45 °C/110 bar, 6) 95 % CO₂/45 °C/110 bar.

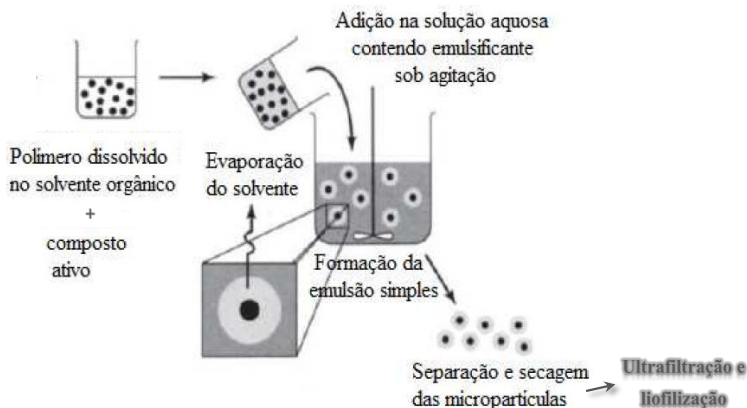
4.6.2. Síntese de partículas por emulsificação e evaporação do solvente (ESE)

A técnica de emulsificação e evaporação do solvente (ESE), descrita por Gomes, Moreira e Castell-Perez (2011), foi aplicada a dois tipos de extratos: de torta de semente de maracujá obtido por maceração em mistura de etanol e água (1:1, v/v) e de semente de maracujá obtido com CO₂ supercrítico a 150 bar e 40 °C. Com cada extrato foram

utilizados dois tipos de uso mais comum de PLGA (poli-DL-ácido láctico-co-ácido glicólico) com diferentes massas moleculares e proporções de copolímeros, PLGA 50:50 e PLGA 65:35 (Mw 40000 a 75000 g/mol, P2066, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., U.S.A.), para avaliar a influência dessas variáveis nas características das partículas formadas.

A Figura 16 ilustra o processo formação de partículas por ESE com emulsão simples O/A.

Figura 16. Esquema do processo de formação de partículas por emulsificação e evaporação do solvente (ESE).



Fonte: Adaptado de Mathiowitz, Kreitz e Peppas (1999).

Resumidamente, uma solução de 50 mg de PLGA em 2 mL de diclorometano (VWR International, West Chester, Pa., USA) com 16 % (relativo a quantidade de PLGA) de cada extrato separadamente foi preparada, constituindo a fase orgânica. A fase aquosa (20 mL) foi preparada com 0,5 % (m:v) de PVA (álcool polivinílico com grau de hidrólise de 98 % a 99 % e média de Mw 30000 a 50000 g/mol, 363138, Sigma-Aldrich) como surfactante no processo de emulsão em água previamente filtrada usando um filtro de 0,2 μm (Anotop 10, Whatman, Piscataway, N.J., U.S.A.). A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa em gotículas e essa mistura homogeneizada por 2 min a 95000 rpm (Ultra-Turrax T25 basic Ika® -Works Inc., Wilmington, N.C., U.S.A.) para formar uma emulsão óleo em água (o/a). Em seguida, a emulsão O/A foi colocada em um banho gelado com ultrassom a 2 °C e 35 W de potência (Cole Parmer 8890 ultrasonic cleaner, Vernon Hills,

Ill., USA) por 30 min. O diclorometano foi evaporado em rotaevaporador (Buchi R-210 Rotavapor, Buchi Co., New Castle, Del., U.S.A.) sob vácuo (ZIGONEANU; ASTETE; SABLIOV, 2008). Partículas controle foram preparadas da mesma forma, porém sem adicionar extrato ao solvente orgânico. Após a síntese, as nanopartículas foram purificadas por ultrafiltração (Millipore Co., Kankakee, Ill., U.S.A. equipado com membrana de 10 kDa Pellicon XL-Millipore) para remover o excesso de surfactante (PVA) e extrato não encapsulado. A ultrafiltração foi realizada com pressão interna de 30 psi, pressão externa de 10 psi e adição de 200 mL de água sendo 50 mL do retentado coletado. Após a ultrafiltração, as nanopartículas foram mantidas a - 20 °C até o momento da liofilização a - 50 °C sob vácuo de 5 mtorr ($9,67 \times 10^{-5}$ psi) (Labconco Freeze Dry-5 unit, Labconco, Kansas City, Mo., U.S.A.). D(+) trealose 98 % (West Chester, Pa., USA) foi adicionada a suspensão de nanopartículas antes do pré-resfriamento a uma razão de 1:1 (m:m) relativo a quantidade de PLGA. Por fim, as amostras liofilizadas foram estocadas em dessecador acondicionado em freezer (- 20 °C) até seu uso posterior (ASTETE; SABLIOV, 2006).

4.7. Análise das partículas de PLGA com extratos de maracujá obtidas

4.7.1. Tamanho de partículas

As medidas de tamanho das partículas obtidas por todos os ensaios de SAS e ESE foram realizadas por difusão dinâmica da luz (ZetaSizer Nano-ZS90, Malvern, UK) com concentração de partículas de 1 mg/mL de água filtrada (0,2 µm). A análise foi realizada em triplicata, com ângulo de dispersão de 90°, índice de refração de 1,590 e temperatura de 25 °C.

4.7.2. Caracterização da morfologia das partículas

A morfologia das partículas sintetizadas por ESE foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (FEI Morgagni, FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA), sendo uma gota de partículas liofilizadas ressuspensas (1 mg/mL) em água filtrada (0,2 µm) colocada em uma grelha de cobre recoberta com um filme de carbono de 300 mesh e tingida com ácido fosfotúngstico (2 %) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pa., U.S.A.) para proporcionar contraste. O excesso de líquido foi removido com papel filtro após 1 min e a amostra foi

deixada secar antes da visualização com ampliação de até 110.000 vezes. Por não serem solúveis em água houve dificuldade para aderir as partículas formadas por SAS na grelha de cobre recoberta com filme de carbono, e, por isso, elas foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM 6390LV-JEOL, USA), sendo as amostras aderidas à superfície do suporte e recobertas por uma fina camada de ouro para permitir a reflexão da luz e consequente avaliação das partículas.

4.7.3. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As partículas precipitadas e os extratos de resíduos de maracujá utilizados para a formação de partículas foram submetidos à análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) (Perkin-Elmer DSC 6 com ISOTEMP 1028P, Fischer Scientific, Pittsburg, PA, USA). As amostras precipitadas foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio em temperaturas de -2 °C a 442 °C, com aquecimento de 20 °C/min. As análises de DSC foram realizadas com o intuito de serem obtidas informações sobre a interação entre os polímeros e os extratos, bem como estimar modificações de composição, grau de cristalinidade e temperatura de fusão causadas pelos processos de formação de partículas.

4.7.4. Determinação da eficiência de encapsulamento

A determinação da eficiência de encapsulamento (EE) de cada ensaio de SAS e de ESE se baseou no método descrito por Silva et al. (2014b), com algumas adaptações. Resumidamente, foi dissolvido 1 mg de amostra de partículas em 1 mL de uma mistura de acetonitrila e água (95:5, v/v), em triplicata. As soluções de partículas foram colocadas em banho ultrassom (35 W, Cole Parmer 8890 ultrasonic cleaner, Vernon Hills, Ill., USA) por 10 minutos e deixadas em solução por 8 h, ao abrigo da luz, com agitação periódica em vórtex durante 1 min. Depois disso, cada solução passou por um filtro seringa (tamanho de poro 0,2 µm, Acrodisc, Pall Life Sciences, Port Washington, N.Y., U.S.A.) antes das leituras em espectrofotômetro de UV visível (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Madison, WI, USA) a 294 nm. A quantidade de extrato contida nas partículas foi determinada através da correlação com uma curva analítica preparada com diferentes concentrações dos

extratos. A eficiência de encapsulamento é expressa como a porcentagem de extrato aprisionado nas nanopartículas em relação à quantidade inicial de extrato utilizada na formação das partículas.

4.7.5. Estudo de liberação controlada dos extratos encapsulados

Cada amostra de partículas foi dissolvida no meio de liberação (tampão fosfato), a uma concentração de 4 mg/mL de solução salina tampão de fosfato (PBS, 0,15 M, pH 7,4), e essa solução dividida em alíquotas de 1,5 mL em eppendorfs. O estudo de liberação controlada dos extratos encapsulados *in vitro* foi realizado a 37 °C e 100 rpm (banho agitado Orbit shaker, Lab Line Instruments, Melrose Park, Ill., USA), similar ao descrito por Zigoneanu, Astete e Sabliov (2008). Em intervalos de tempo predeterminados, uma amostra foi retirada, filtrada (filtro 0,2 µm Acrodisc) e as concentrações determinadas conforme item 4.7.4. Os resultados foram expressos em porcentagem de extrato liberado em relação à quantidade real contida nas partículas considerando os resultados de eficiência de encapsulamento.

4.7.6. Avaliação da capacidade antimicrobiana das partículas de PLGA com extratos

A concentração mínima inibitória (CMI) de todas as partículas formadas por ambos os métodos foi determinada conforme descrito no item 4.4.5 com *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Listeria innocua* (NRRL/USDA B33076). Da mesma forma como feito para os extratos, diferentes concentrações de soluções das amostras de partículas foram inseridas em cada poço da microplaca juntamente com o inóculo microbiano em caldo de concentração dupla. As partículas foram dissolvidas em água 0,2 µm filtrada. As concentrações finais equivalentes de extratos analisadas foram calculadas considerando a quantidade inicial de extratos utilizados para formar as partículas, assim como os resultados de eficiência de encapsulamento obtidos, sendo entre 4642 e 946 µg/mL para as partículas geradas pelo processo SAS com extrato supercrítico de semente de maracujá; numa faixa de 261 e 41 µg/mL para as partículas formadas pelo método ESE com extrato de torta de maceração com a mistura de etanol e água (1:1, v/v); e entre 105 e 746 µg/mL para as amostras dos ensaios de precipitação por ESE com extrato supercrítico de semente. Foram preparados controles negativos com as mesmas concentrações de soluções de partículas e caldo estéril para formar a linha de base para as leituras e controles positivos

contendo inóculo e água destilada ou partículas controle (formadas sem a presença dos extratos para garantir que os demais materiais envolvidos na formação das partículas não têm efeito inibitório sobre o crescimento microbiano). Aqui também a DO a 630 nm das placas foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação a 35 °C, seguindo todo o restante do procedimento descrito em 4.4.5.

4.8. Análise estatística

Os resultados de rendimento de extração, atividade antioxidante avaliada por três métodos (DPPH, descoloração do β -caroteno e ABTS), teor de fenólicos total, tamanho de partículas precipitadas e eficiência de encapsulamento foram estatisticamente analisados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância com o auxílio do software Minitab 17. Se, segundo a ANOVA existiu diferença significativa ao nível de 5 % de significância entre as médias dos tratamentos, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos.

4.9. Resumo de experimentos

Os Quadros 2 e 3 apresentam o resumo dos ensaios realizados para os extratos de resíduos de maracujá (semente e torta de semente) obtidos, incluindo as diferentes técnicas de extração empregadas, rendimento e análises de atividade biológica, bem como a determinação de equilíbrio de fases, ensaios de precipitação por diferentes métodos e análises das partículas produzidas.

Quadro 2 - Resumo dos ensaios realizados (x) para os extratos de resíduos de maracujá.

Condições de extração	Material	X ₀	Cin/ MM	TFT	DPPH	β	ABTS	CMI	EF	SAS	ESE	CP
Maceração												
MAC/ EtOH-H ₂ O	Semente	x		x	x	x	x	x				
MAC/ EtOH	Semente	x		x	x	x	x					
MAC/ EtOAc	Semente	x		x	x	x	x					
MAC/ Hx	Semente	x		x	x	x	x					
MAC/ EtOH-H ₂ O	Torta	x		x	x	x	x	x			x	x
MAC/ EtOH	Torta	x		x	x	x	x					
MAC/ EtOAc	Torta	x		x	x	x	x					
MAC/ Hx	Torta	x		x	x	x	x					
Extração assistida por ultrassom												
UE/ EtOH -H ₂ O	Semente	x		x	x	x	x	x				
UE/ EtOH	Semente	x		x	x	x	x					
UE/ EtOAc	Semente	x		x	x	x	x					
UE/ Hx	Semente	x		x	x	x	x					
UE/ EtOH-H ₂ O	Torta	x		x	x	x	x	x				
UE/ EtOH	Torta	x		x	x	x	x					
UE/ EtOAc	Torta	x		x	x	x	x					
UE/ Hx	Torta	x		x	x	x	x					
Extração supercrítica												
40/150/CO ₂	Semente	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
40/250/CO ₂	Semente	x	x	x	x	x	x	x				

Quadro 3 - Resumo dos ensaios realizados (x) de caracterização das partículas formadas a partir de extratos de resíduos de maracujá.

Ensaio de precipitação		Tm	Morf	DSC	EE	Lib	CMI
Antissolvente supercrítico (SAS) com PLGA 50:50 e extrato supercrítico de semente obtido a 150 bar e 40 °C							
1) 92,5% CO ₂ /35 °C/90 bar		x	x	x	x	x	x
2) 95 % CO ₂ /35 °C/90 bar		x	x	x	x	x	x
3) 95 % CO ₂ /35 °C/110 bar		x	x	x	x	x	x
4) 92,5 % CO ₂ /45 °C/90 bar		x	x	x	x	x	x
5) 92,5 % CO ₂ /45 °C/110 bar		x	x	x	x	x	x
6) 95 % CO ₂ /45 °C/110 bar		x	x	x	x	x	x
Emulsificação/Evaporação do solvente (ESE)							
Extrato semente ESC 150 bar/40 °C PLGA 50:50		x	x	x	x	x	x
Extrato semente ESC 150 bar/40 °C PLGA 65:35		x	x	x	x	x	x
Extrato maceração torta EtOH-H ₂ O PLGA 50:50		x	x	x	x	x	x
Extrato maceração torta EtOH-H ₂ O PLGA 65:35		x	x	x	x	x	x

Tm: caracterização de tamanho de partículas por difusão dinâmica da luz; Morf: análise de morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou de varredura (MEV); DSC: determinação do perfil térmico por calorimetria diferencial de varredura; EE: eficiência de encapsulamento; Lib: estudo do perfil de liberação do extrato a partir das partículas; CMI: avaliação da capacidade antimicrobiana das partículas.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das matérias-primas e do leito de extração supercrítica

Com a finalidade de caracterizar as matérias-primas a serem utilizadas neste estudo, e também o leito fixo formado para o processo de extração supercrítica, foram realizadas algumas análises preliminares. Essas caracterizações são de primordial importância para os estudos cinéticos e para a avaliação das taxas de transferência de massa do processo de extração com CO₂ supercrítico através da modelagem matemática.

Inicialmente foram determinados os teores de umidade e substâncias voláteis das matérias-primas, apresentados na Tabela 5 em base úmida (BU), sendo descartada a necessidade de secagem para a realização das extrações

Tabela 5. Dados de umidade das matérias-primas.

Matéria-prima	Umidade (% BU)
Semente de maracujá	8,50 ± 0,09
Torta de semente de maracujá	6,26 ± 0,06

Após definida a condição de umidade da matéria-prima, realizou-se a determinação do diâmetro médio dos fragmentos das matérias-primas, que foi calculado de acordo com as Equações 2 e 3. A matriz sólida foi avaliada visualmente após a extração com fluido supercrítico, na qual se observou coloração homogênea tanto na direção radial quanto na direção longitudinal, indicando que não houve formação de caminhos preferenciais na passagem do CO₂ através do leito de extração (MARTÍNEZ, 2005).

Nos experimentos de rendimento global utilizou-se, aproximadamente, 10 g de amostra para a formação do leito. Essa quantidade de amostra foi escolhida com intuito de se obter quantidade de extrato suficiente para a posterior realização das análises de qualidade do extrato. O volume ocupado pela massa de cada matéria-prima no extrator foi calculado através da altura preenchida dentro do leito, sendo igual a $9,5 \pm 0,4 \text{ cm}^3$ e $12 \pm 1 \text{ cm}^3$, respectivamente. O restante do volume do leito foi preenchido com esferas de vidro

separadas da matéria-prima pela adição de algodão, para evitar sua mistura e mantendo constante a altura do leito durante a extração.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para o diâmetro médio de partícula; a densidade aparente e real do sólido e a porosidade do leito.

Tabela 6. Caracterização dea partícula fragmentos das matérias-primas e do leito de partículas formado para a extração supercrítica.

	Diâmetro médio (mm)	Densidade aparente ρ_a (g/cm³)	Densidade real ρ_r (g/cm³)	Porosidade do leito (ϵ)
Semente de maracujá	0,49 ± 0,07	1,06 ± 0,09	1,3249 ± 0,0002	0,2015
Torta de semente de maracujá	0,25 ± 0,04	0,86 ± 0,03	1,4325 ± 0,0003	0,3966

5.2. Cinética da extração com fluido supercrítico

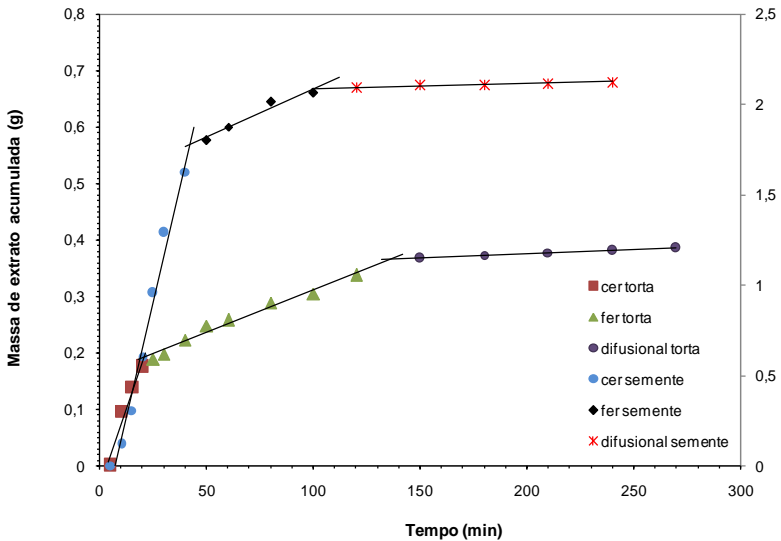
A cinética de extração de solutos a partir de produtos naturais como sementes, folhas e outros materiais, consiste na retirada do soluto dos poros ou da matriz celular para a fase solvente (fluido supercrítico) através de mecanismos de transferência de massa. O soluto está ligado à matriz sólida por forças químicas ou físicas, e passa para a fase solvente por dissolução ou desorção. Então, a mistura soluto/solvente se difunde para a superfície do sólido e se move através de um filme estagnado ao seu redor para a fase fluida (GOTO et al., 1998).

O estudo da cinética da extração supercrítica de ambas as matérias-primas foi realizado preliminarmente e utilizada como base para a definição do tempo de extração a ser utilizado posteriormente nos experimentos de rendimento. Para isso empregou-se uma condição de pressão de 250 bar, temperatura de 40 °C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min. Os dados obtidos para ambas as matérias-primas estão apresentados na Figura 17.

Para a determinação do rendimento global de extração (X_0) com fluido supercrítico é necessário fixar um tempo de extração para verificar a influência das condições de temperatura e pressão empregadas. Esse tempo é definido com base nas etapas da curva de extração. No início da extração, na etapa CER (do inglês, *Constant*

Extraction Rate), a superfície das matérias-primas se encontra completamente envolta por uma camada de soluto, fazendo com que o processo seja caracterizado pela transferência de massa por convecção entre a superfície do sólido e o solvente. Após a etapa CER, ocorre a etapa FER (do inglês, *Falling Extraction Rate*), em que a velocidade de extração diminui devido à exaustão da camada superficial de soluto. Então, o processo difusional na matriz sólida começa a exercer maior influência sobre a transferência de massa que a convecção na fase fluida, pois o solvente encontra espaços livres para penetração na matriz sólida, solubilização do soluto e posterior difusão da mistura soluto-solvente para a superfície dos fragmentos. A última etapa (DCP) ou etapa difusional apresenta extração quase nula, onde a inclinação da curva diminui e o traçado se aproxima assintoticamente do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível. Assim, para a determinação de X_0 , o tempo de extração deve assegurar que esta última etapa seja alcançada (FERREIRA; MEIRELES, 2002).

Figura 17. Curva de extração supercrítica de semente de maracujá (eixo direito) e torta de semente (eixo esquerdo) a 250 bar, 40 °C e 8 ± 2 g CO₂/min.



CER: do inglês, *Constant extraction rate*; FER: do inglês, *Falling extraction rate*; DCP: do inglês, *Diffusion-controlled period*.

Através de regressão linear dos dados obtidos das curvas de extração apresentadas na Figura 17, chega-se aos parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER) e M_{CER} (taxa de extração da etapa CER), apresentados na Tabela 7, e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER). Pela análise desses dados e do comportamento da curva de extração do soluto com o tempo, apresentada na Figura 17, pode-se observar que a partir de 150 min (2,5 h) de extração para a semente de maracujá e 180 min (3 h) para a torta garante-se que a etapa difusiva seja alcançada, sendo esses tempos fixados para todos os experimentos de determinação de X_0 devido à extração da maior parte de soluto disponível. No experimento realizado com a semente de maracujá, em 2,5 horas de extração já havia sido alcançado 99,2 % do rendimento total obtido ao final dos 240 min. Enquanto no experimento realizado com a torta de semente de maracujá, em 3 horas de extração tinha-se atingido 96,8 % do rendimento total obtido ao final dos 270 min. Esses tempos de extração e vazão de solvente implicam um consumo de 1,25 kg e 1,5 kg de CO_2 , para semente e torta, respectivamente.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos da extração supercrítica de semente de maracujá e de torta de semente de maracujá realizadas a 250 bar, 40 °C e 8 ± 2 g CO_2/min .

Parâmetro	Etapa da extração de semente			Etapa da extração de torta		
	CER	FER	DCP	CER	FER	DCP
t (min)	0 - 40	40 - 100	> 100	0 - 20	20 - 140	> 140
m (g)	1,6266	0,4369	0,0613	0,1757	0,1843	0,0257
X_0 (%)	16,21	4,35	0,61	1,75	1,84	0,25
M (g/min)	0,0407	0,0073	0,0004	0,0088	0,0015	0,0002
Y (g_{extrato}/g_{CO2})	$4,88.10^{-3}$	-	-	$1,05.10^{-3}$	-	-

t: duração da etapa de extração; m: massa de extrato aproximada; X_0 : rendimento da etapa; M: taxa de extração; Y: concentração de soluto na fase solvente; CER: do inglês, *Constant extraction rate*; FER: do inglês, *Falling extraction rate*; DCP: do inglês, *Diffusion-controlled period*.

5.3. Modelagem matemática das curvas de extração supercrítica

Para a modelagem das curvas de extração de semente de maracujá e torta de semente a 250 bar, 40 °C, e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min foram empregados três modelos baseados na equação de balanço de massa diferencial, o modelo de Sovová (1994), o modelo logístico apresentado por Martínez et al. (2003) e o modelo de dessorção proposto por Tan e Liou (1989); e dois modelos baseados na analogia a transferência de calor, o modelo difusivo de placa apresentado por Gaspar et al. (2003) (SSP) e o modelo de difusão, proposto por Crank e apresentado por Reverchon (1997).

A modelagem matemática exige o conhecimento de algumas variáveis de processo. Alguns modelos são de fácil aplicação por ser necessário conhecer poucas variáveis para seu emprego, ou seja:

- ✓ Crank (1975), exige a massa de soluto inicial e o raio do fragmento sólido;
- ✓ Martínez et al. (2003), demanda a massa de soluto inicial;
- ✓ Gaspar et al. (2003) (SSP), necessita a massa de soluto inicial e a espessura dos fragmentos sólidos.

Em contrapartida, outros modelos requerem um maior número de variáveis, como:

- ✓ Tan e Liou (1989), requer a vazão de solvente, a porosidade do leito, a massa de soluto inicial, a densidade do solvente, o raio do extrator, a altura do leito e a densidade do sólido (densidade real);
- ✓ Sovová (1994), demanda a vazão de solvente, a porosidade do leito, a massa de soluto inicial, a densidade do solvente, o raio do extrator, a altura do leito, a densidade do sólido (densidade real), a massa de inerte, a solubilidade do extrato, o tempo de extração, o tempo de duração da etapa CER, a taxa de extração na etapa CER (M_{CER}) e a concentração de soluto na etapa CER (Y_{CER}).

O valor da massa de soluto inicial, correspondente a massa de extrato extraível, foi considerado constante e igual ao valor máximo obtido nos experimentos, conforme Sovová, Kucera e Jez (1994). Reverchon e Marrone (2001) e Fiori (2007) consideraram esse valor como sendo a razão entre a massa inicial de soluto - considerada igual a massa de extrato obtida no final da extração - e a massa utilizada para formar o leito. De acordo com Fiori (2007) a escolha da consideração a

ser utilizada em relação a esse parâmetro, afeta fortemente a predição proporcionada pelos modelos.

As Figuras 18 e 19 apresentam os dados experimentais e modelados obtidos para a ESC de semente de maracujá e torta de semente, respectivamente, na condição 250 bar, 40 °C e vazão de CO₂ igual a 8 ± 2 g/min. As Tabelas 8 e 9 apresentam os coeficientes, parâmetros ajustáveis e os erros médios quadráticos (EMQ) obtidos através do *software* Mass Transfer para cada modelo aplicado aos dados experimentais de ESC de semente de maracujá e torta de semente, respectivamente.

Figura 18. Curvas de ESC de semente de maracujá experimental e modeladas a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO₂.

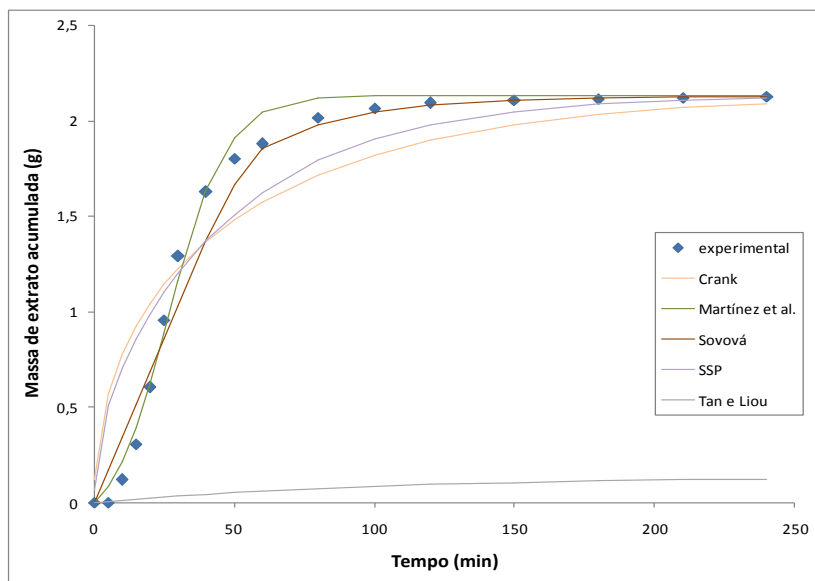


Figura 19. Curvas de ESC de torta de semente de maracujá experimental e modeladas a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO₂.

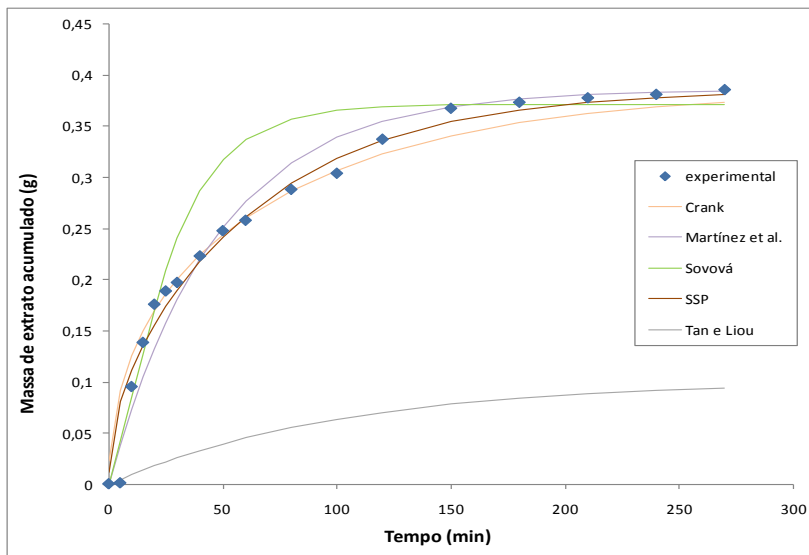


Tabela 8. Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da extração supercrítica de semente de maracujá a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO₂.

Modelo	Parâmetros		EMQ
Crank (1975)	D (m ² /min)	$8,825 \times 10^{-11}$	0,11
Martínez et al. (2003)	b (min ⁻¹)	0,097	0,006
	t_m (min)	26,72	
Sovová (1994)	X_k	- 0,0157	0,087
	k_{xa} (min ⁻¹)	0,0306	
	k_{ya} (min ⁻¹)	0,720	
Gaspar et al. (2003)	D_m (m ² /min)	$4,965 \times 10^{-10}$	0,082
Tan e Liou (1989)	k_d (min ⁻¹)	0,0100	2,36

Tabela 9. Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da extração supercrítica de torta de semente de maracujá a 250 bar, 40 °C e vazão de 8 ± 2 g/min de CO₂.

Modelo	Parâmetros		EMQ
Crank (1975)	D (m ² /min)	$1,7921 \times 10^{-11}$	0,0006
Martínez et al. (2003)	b (min ⁻¹)	0,0211	0,0005
	t_m (min)	- 2081,07	
Sovová (1994)	X_k	0,0197	0,0016
	k_{xa} (min ⁻¹)	0,0275	
	k_{ya} (min ⁻¹)	0,0955	
Gaspar et al. (2003)	D_m (m ² /min)	$9,8835 \times 10^{-11}$	0,0005
Tan e Liou (1989)	k_d (min ⁻¹)	0,0100	0,046

De acordo com a Tabela 8, o modelo de Martínez et al. (2003) apresentou o menor erro médio quadrático para a extração a partir da semente de maracujá. Nesse modelo, o parâmetro t_m corresponde ao instante em que a velocidade de extração é máxima, ou seja, próximo a 27 minutos de extração para semente de maracujá. Já no caso da torta, apesar do menor valor de EQM (Tabela 9) obtido pelo ajuste do modelo de Martínez (igual ao modelo SSP de Gaspar), devido ao afastamento entre os pontos experimentais e modelados nas etapas CER e FER (Figura 19) não é possível afirmar que esse modelo é o que melhor descreve o comportamento da curva de extração.

A principal vantagem do modelo de Sovová (1994) é a adequada descrição dos fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo de ESC (convecção e difusão), apresentando significado físico consistente para os parâmetros ajustáveis k_{xa} e k_{ya} (coeficientes de transferência de massa na fase fluida e fase sólida, respectivamente). Por outro lado, o uso desse modelo é limitado aos sistemas em que os parâmetros utilizados tenham sido corretamente determinados, assim como a solubilidade do soluto no solvente supercrítico conhecida para a condição de temperatura e pressão do processo, ou seja, densidade do CO₂ (REVERCHON; MARRONE, 2001; SOUZA et al., 2004). Assim, é provável que com um valor de solubilidade adequado para representar a complexa mistura de componentes que constituem os extratos em questão o ajuste do modelo seria melhor. O valor solubilidade usado

($9,5 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{kg}_{\text{CO}_2}$) é referente a apenas um dos componentes do extrato, o ácido linoleico, determinada por Chen, Chang e Yang (2000). Este valor foi adotado uma vez que não foram encontrados dados na literatura de solubilidade de óleo de semente de maracujá em CO_2 e pela impossibilidade operacional de realizar uma análise de determinação de solubilidade mais adequada.

O modelo de Sovová (1994) geralmente proporciona melhores ajustes às curvas experimentais de matérias-primas com alto conteúdo de óleo por possuírem uma etapa CER bem definida, ou seja, transição do período CER para o FER bem delimitada. Apesar de o EMQ para a extração de semente ter sido maior que para a extração de torta, ao observar as Figuras 18 e 19, pela proximidade entre os pontos experimentais e modelados em praticamente todas as etapas da extração, é possível considerar que esse modelo descreve melhor o comportamento da curva de extração da semente.

O parâmetro k_{ya} do modelo de Sovová (1994) é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, sendo diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido que, por sua vez, aumenta com o incremento da vazão de solvente. Já o valor de k_{xa} é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase sólida e não sofre a influência da vazão do solvente, pois é representado pela difusão do CO_2 e da mistura de CO_2 + soluto no interior dos fragmentos de matéria-prima (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; MICHIELIN et al., 2005; SOVOVÁ, 1994). Conforme os dados da Tabela 8, o valor do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{ya}) foi bastante superior ao do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{xa}), o que indica que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção na extração de semente de maracujá.

Os modelos de Crank (1975) e de Gaspar et al. (2003) (SSP) consideram que a transferência de massa na extração se dá unicamente pela difusão, desconsiderando o mecanismo de transferência de massa por convecção. Analisando as Figuras 18 e 19, percebemos que esses modelos geram curvas com comportamento semelhante entre si, com bom ajuste para o processo com a torta, mas, diferente da curva de dados experimentais para o ensaio com semente. Isso indica que a consideração de processo controlado pela difusão pode ser adequada para a torta uma vez que não há soluto (óleo) em sua superfície. Em contrapartida, esses modelos parecem ser inadequados para descrever o sistema com semente de maracujá cujo alto teor de óleo faz com que

haja, no início da extração, um maior gradiente de concentração entre a superfície dos sólidos e a fase fluida.

O modelo de Tan e Liou (1989) apresentou o maior erro médio quadrático em ambos os casos. Esta deficiência no ajuste aos dados experimentais pode estar ligada ao fato de que o modelo foi desenvolvido a partir de experimentos com uma matriz inerte e não considerando a complexidade de uma matriz vegetal. Além disso, os autores tratam a constante de dessorção (k_d) como um parâmetro dependente apenas da temperatura do processo. A constante de dessorção representa a transferência de massa interfacial na qual a velocidade de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida e das características do solvente. Uma interpretação válida para essa constante seria atribuir a ela uma relação com alguns parâmetros de processo como a solubilidade (Y^*) e as restrições à transferência de massa (k_{ya} e k_{xa}).

Todas as diferentes considerações usadas na concepção e aplicação dos modelos destacam que alguns aspectos do fenômeno de transferência de massa no interior da matriz vegetal não são completamente conhecidos. De acordo com Fiori (2007), seria particularmente oportuna uma reconsideração do papel da estrutura das células dentro de um fragmento e sua distribuição granulométrica na formação de cada leito de extração. O modelo apresentado por Del Valle et al. (2006) inclui uma relação quantitativa com a microestrutura do substrato, mas ainda há poucas informações na literatura sobre sua aplicação.

A modelagem da curva de ESC de dados experimentais é importante para a otimização de projetos e aumento de escala - como a definição do volume do extrator e do tempo total da extração para uma condição de operação específica -, e para a predição do comportamento da extração ao longo do processo e de seu rendimento, dependendo do fenômeno predominante na transferência de massa do sistema extrato/ CO_2 supercrítico (fenômenos convectivos e difusivos) (GASPAR et al., 2003; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009). Assim, diferentes modelos podem ser indicados para a predição desses dados para cada uma das matérias-primas estudadas. No caso da semente de maracujá, pode-se sugerir o uso do modelo de Sovová, enquanto para a torta de semente de maracujá, a aplicação dos modelos de Crank (1975) ou de Gaspar et al. (2003) (SSP) seriam mais indicados.

5.4. Rendimento global de extração

O rendimento global da extração (X_0) é definido como a fração de compostos presente na matriz sólida passível de ser extraída pelo solvente em condições de extração pré-estabelecidas, e indica quantitativamente a eficiência do processo (SILVA, 2004). Os rendimentos dos extratos de semente de maracujá e torta de semente de maracujá obtidos através das diferentes técnicas de extração estão apresentados na Tabela 10, assim como a densidade do CO_2 supercrítico em cada condição de temperatura e pressão aplicada e o índice de polaridade dos solventes orgânicos empregados nas extrações à baixa pressão.

Tabela 10. Valores de rendimento global (X_0) em base úmida obtidos para as extrações de semente de maracujá e torta de semente de maracujá, densidade do CO_2 supercrítico em cada condição e índices de polaridade dos solventes.

Método de Extração	Parâmetros de processo	$\rho \text{CO}_2^{(1)}$ (g/cm^3)	X_0 (%) ⁽³⁾		
			Torta	Semente	
ESC SC- CO_2	40 °C	150 bar	0,781	4,6 ± 0,1 ^{a,b}	21,4 ± 0,8 ^{b,c}
		250 bar	0,880	4,4 ± 0,4 ^b	27 ± 1 ^a
		300 bar	0,911	4,6 ± 0,2 ^{a,b}	21,8 ± 0,7 ^{a,b,c}
	50 °C	150 bar	0,701	4,2 ± 0,4 ^b	13 ± 1 ^d
		250 bar	0,835	4,7 ± 0,2 ^{a,b}	25,9 ± 0,6 ^{a,b}
		300 bar	0,871	4,5 ± 0,3 ^b	21,3 ± 0,5 ^{b,c}
ESC SC- CO_2 + 5 % EtOH	40 °C	250 bar	0,880	4,9 ± 0,3 ^{a,b}	-
		300 bar	0,911	4,93 ± 0,05 ^{a,b}	-
Baixa pressão	Solventes	IPS ⁽²⁾			
MAC	EtOH-H ₂ O	7,1	6 ± 1 ^a	9,6 ± 0,3 ^d	
	EtOH	5,2	4,8 ± 0,1 ^{a,b}	11,3 ± 0,3 ^d	
	EtOAc	4,3	4,3 ± 0,1 ^b	23,7 ± 0,3 ^{a,b,c}	
	Hx	0	4,3 ± 0,5 ^b	20,7 ± 0,3 ^c	
UE	EtOH-H ₂ O	7,1	4,8 ± 0,1 ^{a,b}	10 ± 2 ^d	
	EtOH	5,2	4,53 ± 0,01 ^b	23 ± 2 ^{a,b,c}	
	EtOAc	4,3	5,0 ± 0,4 ^{a,b}	23,1 ± 0,7 ^{a,b,c}	
	Hx	0	4,9 ± 0,2 ^{a,b}	26 ± 3 ^{a,b}	

ESC SC- CO_2 : extração com dióxido de carbono supercrítico; EtOH: etanol; UE: extração assistida por ultrassom; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v); Hx: hexano; EtOAc: acetato de etila.

- ⁽¹⁾ Densidade do SC-CO₂ (ANGUS; ARMSTRONG; DE REUCK, 1976).
- ⁽²⁾ Índice de polaridade do solvente (PHENOMENEX, 2013). IPS da solução aquosa foi calculado por $(IA/100 \times PA) + (IB/100 \times PB)$, onde IA e IB são os índices de polaridade dos solventes A e B, respectivamente, PA e PB a porcentagem dos solventes A e B, respectivamente (MARKOM et al., 2007).
- ⁽³⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de cada coluna (resultados de semente e torta analisados separadamente)

Para as sementes, os melhores rendimentos das extrações foram obtidos com SC-CO₂ a 250 bar (27 ± 1 e $25,9 \pm 0,6$ % a 40 °C e 50 °C, respectivamente) e por UE com hexano (26 ± 3 %), o que podia ser esperado devido ao alto teor de lipídios desse material e a baixa polaridade desses solventes. Porém, esses resultados diferem significativamente apenas das extrações ESC/150 bar/50 °C, MAC e UE com EtOH-H₂O e MAC com EtOH que apresentaram os menores valores de rendimento. Apesar de o teor de óleo das sementes poder variar conforme a origem da matéria-prima, considerando valor de 30 % reportado por Malacrida e Jorge (2012), pode-se considerar que os solventes de menor polaridade conseguiram extrair a maior parte do conteúdo de óleo das sementes.

Para maceração de semente, os solventes de menor polaridade tiveram melhor desempenho ($p < 0,05$) em relação aos solventes mais polares, $23,7 \pm 0,3$ e $20,7 \pm 0,3$ % para EtOAc e Hx, respectivamente, sendo estes iguais entre si estatisticamente. Oliveira, Barros e Gimenes (2013) estudaram a extração de semente de maracujá amarelo por diferentes técnicas e diferentes razões semente/solvente e concluíram que o uso de hexano com uma proporção amostra/solvente de 1/4 por 8 h sob agitação constante e rendimento de 23,6 % é a condição mais vantajosa entre as estudadas considerando todos os resultados de rendimento, custos energéticos e consumo de solvente. Usando etanol nessas mesmas condições, os referidos autores reportaram rendimento superior (18,2 %) ao obtido no presente estudo (11,3 %), indicando um processo mais eficiente e ainda menos oneroso em termos financeiros e laborais, uma vez que o procedimento aplicado aqui utilizou proporção amostra/solvente 1/5 e 7 dias de extração.

Na extração de semente de maracujá assistida por ultrassom, os resultados apresentaram certa tendência com a polaridade dos solventes empregados, porém apenas o menor valor, que foi obtido com o solvente mais polar (EtOH-H₂O), difere dos demais ($p < 0,05$). De acordo com Oliveira, Barros e Gimenes (2013), o tempo de processo e a razão

matéria-prima/solvente influenciam no rendimento da extração assistida por ultrassom, mas de forma diferente de acordo com o solvente utilizado. Mesmo no maior tempo de extração (60 min), esses autores apresentaram rendimentos ligeiramente menores (21,2 e 19,5 %, respectivamente), mas ainda semelhantes, aos obtidos no presente trabalho para a UE com hexano e etanol (26 e 23 %, respectivamente). Isso se deve, provavelmente, à menor quantidade (50 %) de solvente utilizada pelos autores proporcionalmente a massa de matéria-prima. Porém, como essa diferença entre os rendimentos obtidos é pequena, há um indício de que a razão matéria-prima/solvente ideal seria intermediária entre a empregada pelos referidos autores (1/8) e a usada no presente estudo (1/16).

A extração com ultrassom não é comumente usada na extração de óleos de sementes, porém, quando as ondas ultrassônicas são aplicadas em um sistema sólido-líquido provocam sua rápida e contínua expansão e compressão causando uma variedade de efeitos como rupturas de células e de pontes entre moléculas, o que facilita a liberação de componentes, e um efeito “esponja” que faz com que o solvente líquido passe pelo sólido através de micro canais, aumentando a transferência de massa e, conseqüentemente, o rendimento de extração (MASON; PANIWNKYK; LORIMER, 1996; MULET et al., 2003). Apesar de apresentarem resultados de rendimento semelhantes, entre as técnicas de extração à baixa pressão empregadas no presente trabalho, a UE poderia ser considerada mais vantajosa que a MAC para as matérias-primas estudadas, devido seu tempo de processo ser muito menor (45 min contra 7 dias), indicando a influência benéfica das ondas ultrassônicas na transferência de massa. Mas, para se ter uma melhor conclusão, é necessário avaliar a qualidade dos extratos.

Na extração supercrítica, como há pouca diferença significativa entre a maioria dos resultados, não foi possível detectar tendências de comportamento em função de temperatura, pressão ou densidade do CO₂. No entanto, a ligeira superioridade dos resultados obtidos a 250 bar aqui, juntamente com o fato de Zahedi e Azarpour (2011) também reportarem rendimento máximo a 250 bar (e com valor similar, 25,6 %), é possível considerar que esta seria a melhor pressão para a extração de óleo de semente de maracujá em termos quantitativos. De acordo com os referidos autores, apesar de esse melhor resultado ter sido com um tempo de extração de 3h, essa variável parece ter menos efeito nos resultados de rendimento, uma vez que bons resultados também foram obtidos com 1 h de extração. Considerando que a curva de extração dos referidos autores seja semelhante à obtida no presente trabalho, por ser a

mesma pressão de extração, a análise da cinética do processo pode explicar essa menor influência do tempo de ensaio entre as condições estudadas por eles. Isso porque, conforme apresentado no item 5.2., o tempo da etapa CER é aproximadamente 40 min; após esse tempo, a extração ocorre mais lentamente devido à redução da transferência de massa, sendo, assim, o prolongamento do tempo de extração menos influente no resultado de rendimento.

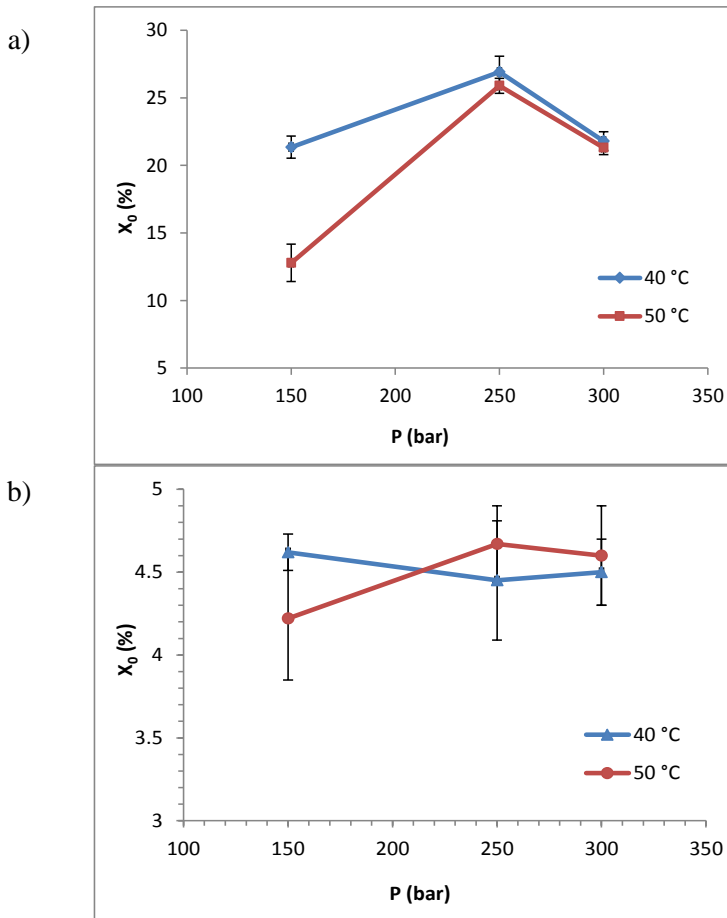
A solubilidade dos compostos no fluido supercrítico é afetada pela pressão e temperatura de operação. Em condições isotérmicas, o incremento da pressão aumenta a solubilidade do soluto (óleo) devido ao aumento da densidade do CO₂, elevando a taxa de extração. Porém, o efeito da temperatura é mais complexo, devido à influência da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente na solubilidade do soluto no fluido supercrítico. Ou seja, em condição isobárica o efeito da temperatura é devido a dois mecanismos: uma elevação na temperatura do processo aumenta a solubilidade devido ao efeito da pressão do vapor do soluto e, reduz a solubilidade devido à diminuição da densidade solvente. Esses efeitos opostos geralmente resultam na inversão das isotermas de rendimento (CASAS et al., 2007; MICHELIN et al., 2009). A Figura 20 apresenta as isotermas de rendimento para a semente de maracujá (a) e torta de semente (b), porém esse comportamento não pode ser confirmado no presente estudo devido à maior parte dos resultados serem estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$). Além disso, acima de uma pressão ótima de extração, ou máxima solubilidade, forças repulsivas entre o soluto e o solvente podem predominar sobre a influência da densidade do CO₂ no sistema (LEE; MARKIDES, 1990), o que pode explicar os menores rendimentos das extrações a 300 bar, apesar de não serem significativamente diferentes

De acordo com Liu et al. (2009), comparando as propriedades químicas dos óleos de maracujá extraídos por solventes orgânicos com os óleos extraídos por CO₂ supercrítico, estes podem ser considerados diretamente como óleo comestível, enquanto aqueles devem ser refinados para serem padrão alimentício. Assim, a semente de maracujá tem potencial para ser valorizada como uma fonte não convencional de óleo de alta qualidade tanto para uso cosmético como alimentício.

Para o resíduo industrial da produção de óleo de semente - a torta - todas as extrações realizadas proporcionaram rendimentos bastante semelhantes entre si, sem diferença significativa, com leve destaque apenas para a maceração com a mistura EtOH-H₂O, cujo resultado foi 6 ± 1 %. Não foram encontrados na literatura estudos com torta de semente de maracujá a fim de comparar resultados. A adição de etanol

como cossolvente ao CO_2 também não alterou ($p < 0,05$) o rendimento da ESC de torta. Assim, comparando-se os resultados de rendimento das sementes e da torta, pode-se dizer que o processo anterior de extração por prensagem a frio empregado na indústria extrai boa parte do óleo disponível, mas, ainda que com baixo rendimento de processo, uma segunda extração ainda pode ser uma alternativa possível para agregar valor a esse resíduo caso forneça um extrato biologicamente ativo.

Figura 20. Isotermas de rendimento da extração supercrítica de a) semente de maracujá e b) torta de semente de maracujá.



* Pontos experimentais ligados por linhas somente para melhor visualizar o comportamento das isotermas.

Ainda, após o processo de extração para a obtenção desses extratos, a matriz vegetal permanece rica em outros constituintes como fibras e proteínas que não são extraídos durante o processo, podendo ser novamente transformada em produtos de valor econômico (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). De acordo com Liu et al. (2008), o teor de proteína da semente de maracujá *in natura* é de aproximadamente 10 % (m/m), o que a torna uma boa fonte proteica para alimentação animal, ou até mesmo para um outro processo de extração de proteínas uma vez que Agizzio et al. (2006) relatou que a proteína equivalente a albumina 2S encontrada na semente de maracujá tem efeito antifúngico. Além disso, no caso da extração com CO₂ supercrítico apresenta a vantagem de o resíduo ser isento de solvente após a extração. Chau e Huang (2005) relataram que hamsters alimentados com fibras de sementes de *Passiflora edulis* tiveram significativa redução de triglicerídeos, colesterol total no sangue e no fígado e aumento de lipídeos e ácidos biliares nas fezes, indicando que as fibras do maracujá com propriedade hipocolesterolêmica podem ser utilizadas para a alimentação humana.

5.5. Atividade antioxidante pelo método de DPPH

A atividade antioxidante dos extratos de semente de maracujá e de seu resíduo após prensagem a frio para obtenção de óleo, torta, foi avaliada pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). A atividade antioxidante é apresentada em EC₅₀, quantidade de extrato necessária para inibir em 50 % a atividade dos radicais livres, e quanto menor esse valor maior a atividade antioxidante do produto. A Tabela 11 apresenta os valores de EC₅₀ dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas de extração empregadas em ambas as matérias-primas. Utilizou-se o BHT, um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante como referência para comparação dos resultados.

Como esperado, os resultados de atividade antioxidante, em geral, são função da polaridade do solvente, com valores significativamente maiores de EC₅₀ (menor atividade) para os solventes apolares (hexano e CO₂). O melhor desempenho ($p < 0,05$) foi apresentado pelos extratos, de ambas as matérias-primas, obtidos à baixa pressão pela mistura EtOH-H₂O, que é mais polar, em ambos os processos. Esse comportamento evidencia que os solventes de polaridade intermediária e alta aplicados nas extrações favoreceram a solubilização de compostos com atividade antioxidante, detectáveis pelo método DPPH. Isso porque o radical DPPH apresenta inacessibilidade estérica para moléculas grandes - como é o caso da maioria dos

compostos lipídicos - sendo, assim, menos eficiente para a determinação da atividade antioxidante desses materiais (APAK et al., 2007).

Tabela 11. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de semente de maracujá e torta de semente através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC₅₀), e comparação com o BHT.

Método de extração	Parâmetros de processo		EC ₅₀ – DPPH (µg/mL) ⁽¹⁾⁽²⁾	
			Torta	Semente
ESC SC-CO ₂	40 °C	150 bar	2934 ^h	3369 ^e
		250 bar	2751 ^g	3258 ^{d,e}
		300 bar	7019 ^j	12332 ^g
	50 °C	150 bar	3338 ⁱ	3948 ^f
		250 bar	2895 ^{g,h}	2808 ^d
		300 bar	8565 ^j	17323 ^h
ESC SC-CO ₂ + 5 % EtOH	40 °C	250 bar	3534 ^{g,h}	-
		300 bar	2713 ⁱ	-
Baixa pressão	Solventes			
MAC	EtOH-H ₂ O		242 ^b	265 ^a
	EtOH		279 ^c	323 ^b
	EtOAc		961 ^d	1967 ^c
	Hx		2780 ^h	3144 ^{e,f}
UE	EtOH-H ₂ O		59 ^a	314 ^b
	EtOH		1104 ^e	2044 ^c
	EtOAc		1502 ^f	2954 ^e
	Hx		3000 ^h	2915 ^{d,e}
BHT⁽³⁾	-		261	

ESC SC-CO₂: extração com dióxido de carbono supercrítico; EtOH: etanol; UE: extração assistida por ultrassom; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v); Hx: hexano; EtOAc: acetato de etila.

⁽¹⁾ Concentração necessária para obter 50 % de atividade antioxidante; ⁽²⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p < 0,05) entre os valores de

cada coluna (resultados de semente e torta analisados separadamente); ⁽³⁾ Benelli et al. (2010).

Com os dados obtidos para os extratos supercríticos, pode-se observar que o aumento da pressão em condição isotérmica parece influenciar positivamente a capacidade antioxidante medida pelo método DPPH, apesar de todos os valores de EC_{50} terem sido bastante elevados. Quando os valores de EC_{50} são relacionados com a temperatura, mantendo a pressão constante, não é encontrada uma tendência definida para aumento ou redução desses valores. Este comportamento pode estar relacionado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, fazendo com que, também, ocorram variações no potencial antioxidante. Estes resultados indicam que mudanças na pressão e na temperatura e, conseqüentemente, na da densidade do fluido supercrítico, alteram a concentração dos compostos extraídos e com atividade antioxidante presentes nos extratos de semente de maracujá e em seu resíduo. Como não houve tendência de diminuição da atividade antioxidante com o aumento da temperatura, pode ser um indício de que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante não sofrem degradação térmica a 50 °C (HU; HU; XU, 2005).

Para a semente, o EC_{50} do extrato de MAC/EtOH-H₂O, 265 µg/mL, foi significativamente menor que os demais extratos, com capacidade antioxidante equivalente a do BHT (261 µg/mL). Os extratos de UE/EtOH-H₂O e MAC/EtOH (314 e 323 µg/mL, respectivamente) ainda poderiam ser considerados como antioxidantes potenciais. Pereira (2011) relatou um valor de EC_{50} de 1,520 mg/mL para o óleo de semente de maracujá comercial, enquanto Ferreira et al. (2011) reportaram valores maiores para os óleos de semente de maracujá refinado, bruto (prensagem a frio) e obtido por Soxhlet com éter de petróleo - 5,74, 7,12 e 16,84 mg/mL, respectivamente. Assim, os valores de EC_{50} dos extratos mais oleosos, ou seja, obtidos por solventes de menor polaridade como CO₂ e Hx, estão de acordo com os dados apresentados por esses autores, com a mesma ordem de grandeza.

Para a torta, o desempenho significativamente melhor foi do extrato obtido por UE/EtOH-H₂O, 59 µg/mL, sendo potencialmente um antioxidante bastante superior ao BHT (261 µg/mL). Porém, os extratos resultantes da maceração com a mistura EtOH-H₂O e com EtOH puro, também apresentaram valores de EC_{50} , 242 e 279 µg/mL, respectivamente, semelhantes ao BHT. O melhor desempenho dos extratos de torta em relação aos de semente pode estar relacionado com

a possibilidade de os compostos antioxidantes estarem mais acessíveis aos solventes devido à menor quantidade de óleo na matriz vegetal; e/ou ainda pelo fato de os extratos de semente apresentarem uma maior proporção de compostos lipídicos estando os compostos com atividade antioxidante menos concentrados.

5.6. Capacidade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

No método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o β -caroteno sofre descoloração na ausência de um composto antioxidante, o que resulta na redução da leitura espectrofotométrica da absorbância da solução, num dado tempo de reação. Isso ocorre devido à formação de radicais livres a partir da oxidação do β -caroteno e do ácido linoleico. A Tabela 12 apresenta os valores obtidos para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos em percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação, para os extratos de ambas as matérias-primas e para o BHT.

Entre os extratos de semente, o de UE/EtOH-H₂O apresentou o melhor resultado de %AA ($72,3 \pm 0,9$ %), porém sem diferença significativa para os de MAC/EtOH-H₂O ($67,9 \pm 0,9$ %), MAC/EtOH ($64,9 \pm 0,7$ %), ESC/150 bar/40 °C (62 ± 4 %) e UE/EtOAc (61 ± 2 %).

A maior atividade antioxidante entre os extratos de torta foi o da extração UE/EtOAc (92 ± 8 %), porém semelhante estatisticamente aos de UE/EtOH-H₂O ($89,3 \pm 0,9$ %), MAC/EtOH-H₂O ($84,1 \pm 0,2$ %), UE/EtOH (83 ± 2 %) e ESC/300 bar/40 °C (79 ± 6 %).

Como o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico é mais indicado para avaliar a atividade antioxidante de frações lipídicas, facilmente extraídas por solventes de menor polaridade como CO₂ e hexano, esperava-se melhor desempenho de seus extratos que apresentaram valores de %AA bastante baixos, com exceção dos extratos supercríticos de semente obtido a 150 bar/40 °C e de torta da condição 300 bar/40 °C, com valores de 62 ± 4 e 79 ± 6 %, respectivamente, semelhantes estatisticamente aos extratos de melhores resultados mencionados. Isso pode indicar que, no caso das matérias-primas estudadas, a atividade antioxidante não estaria relacionada à fração lipídica. Inferência corroborada pelo estudo de Oliveira et al. (2009) com o resíduo industrial de maracujá abrangendo sementes e casca juntos, em que o extrato obtido por Soxhlet com hexano não apresentou atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH• e de sequestro do radical anion superóxido (O²⁻), enquanto o extrato metanólico do resíduo desidratado teve atividade.

De um modo geral, os extratos de torta tendem a ser mais ativos contra a oxidação do β -caroteno e do ácido linoleico que os de semente. No entanto, todos os extratos apresentaram atividade antioxidante inferiores ao BHT ($113 \pm 7 \%$).

Tabela 12. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e do BHT através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação para 1667 μg extrato/mL.

Método de extração	Parâmetros de processo		Atividade Antioxidante (% AA após 120 min) ⁽¹⁾	
			Torta	Semente
ESC SC-CO ₂	40 °C	150 bar	39 \pm 8 ^b	62 \pm 4 ^{a,b}
		250 bar	4,4 \pm 0,4 ^e	5,8 \pm 0,2 ^d
		300 bar	79 \pm 6 ^a	2,0 \pm 0,2 ^d
	50 °C	150 bar	30 \pm 6 ^{b,c}	43 \pm 13 ^c
		250 bar	5,7 \pm 0,9 ^e	4,7 \pm 0,2 ^d
		300 bar	23 \pm 8 ^{c,d}	1,1 \pm 0,2 ^d
ESC SC-CO ₂ + 5 % EtOH	40 °C	250 bar	6,55 \pm 0,01 ^e	-
		300 bar	5,1 \pm 0,7 ^e	-
Baixa pressão	Solventes			
MAC	EtOH-H ₂ O		84,1 \pm 0,2 ^a	67,9 \pm 0,9 ^{a,b}
	EtOH		43 \pm 1 ^b	64,9 \pm 0,7 ^{a,b}
	EtOAc		37,6 \pm 0,7 ^b	58 \pm 2 ^b
	Hx		7,6 \pm 0,3 ^e	2,5 \pm 0,7 ^d
UE	EtOH-H ₂ O		89,3 \pm 0,9 ^a	72,3 \pm 0,9 ^a
	EtOH		83 \pm 2 ^a	31 \pm 7 ^c
	EtOAc		92 \pm 8 ^a	61 \pm 2 ^{a,b}
	Hx		15,6 \pm 0,6 ^{d,e}	12,8 \pm 0,8 ^d
BHT⁽²⁾	-		113 \pm 7	

ESC SC-CO₂: extração com dióxido de carbono supercrítico; EtOH: etanol; UE: extração assistida por ultrassom; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v); Hx: hexano; EtOAc: acetato de etila.

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de cada coluna (resultados de semente e torta analisados separadamente); ⁽²⁾ Benelli et al. (2010).

5.7. Capacidade antioxidante total pelo método ABTS

Esta análise teve o objetivo de verificar a capacidade dos extratos de semente e resíduo de semente de maracujá em sequestrar o radical cátion (ABTS⁺), comparado a uma curva analítica de um padrão antioxidante (Trolox). A quantidade de moléculas de radicais ABTS⁺ consumida devido à reação com compostos antioxidantes é expressa em capacidade antioxidante em Trolox equivalentes (TEAC), ou seja, quanto maior concentração TEAC, mais antioxidante é a amostra analisada (CAMPOS; LISSI, 1997; BORGES et al., 2011). Este método é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos doadores de hidrogênio e de compostos terminadores de cadeias (RE et al., 1999).

A Tabela 13 apresenta os valores de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) dos extratos de semente e torta de semente de maracujá avaliados em termos de poder de sequestro de radicais, de acordo com o método ABTS. Assim como observado nos resultados do método DPPH, as maiores capacidades antioxidantes foram detectadas nos extratos obtidos com EtOH-H₂O para ambos os processos à baixa pressão e ambas as matérias-primas, sendo significativamente superiores a dos demais extratos. Os valores de TEAC dos ensaios com essa mistura de solventes para os extratos de torta foram iguais entre si ($p < 0,05$), 1260 ± 6 e 1259 ± 4 $\mu\text{M/g}$ para MAC e UE, respectivamente. Enquanto, no caso da semente, o extrato obtido por MAC (509 ± 1 $\mu\text{M/g}$) foi significativamente melhor que o de UE (444 ± 7 $\mu\text{M/g}$).

Os resultados dos extratos obtidos com solventes de polaridade intermediária (EtOH e EtOAc) são condizentes com os reportados por Contreras-Calderón et al. (2011) cujos valores de TEAC foram de $131 \pm 0,64$ e $144 \pm 1,88$ $\mu\text{M/g}_{\text{matéria-prima fresca}}$ para extratos de semente + polpa obtidos com uma mistura de metanol e água (1:1, v/v) de *Passiflora mollissima* e *Passiflora tarminiana*, respectivamente. Porém as diferenças de espécie, partes da frutas utilizadas e de processo impossibilitam uma comparação direta.

Tabela 13. Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de semente e torta de semente de maracujá.

Método de extração	Parâmetros de processo		ABTS ($\mu\text{M TEAC/g}_{\text{extrato}}$) ⁽¹⁾⁽²⁾	
			Torta	Semente
ESC SC-CO ₂	40 °C	150 bar	47 ± 7 ^{g,h,i}	71 ± 1 ^{f,g}
		250 bar	77 ± 6 ^f	9 ± 1 ^j
		300 bar	12 ± 4 ^j	39 ± 1 ⁱ
	50 °C	150 bar	112 ± 3 ^e	83 ± 1 ^f
		250 bar	58 ± 1 ^g	54 ± 1 ^{g,h}
		300 bar	52 ± 1 ^{g,h}	50 ± 12 ^h
ESC SC-CO ₂ + 5 % EtOH	40 °C	250 bar	29 ± 3 ^{i,j}	-
		300 bar	40 ± 6 ^{h,i}	-
Baixa pressão		Solventes		
MAC	EtOH-H ₂ O		1260 ± 6 ^a	509 ± 1 ^a
	EtOH		298 ± 7 ^b	224 ± 3 ^c
	EtOAc		174 ± 1 ^c	138 ± 1 ^e
	Hx		113 ± 5 ^e	80 ± 6 ^f
UE	EtOH-H ₂ O		1259 ± 4 ^a	444 ± 7 ^b
	EtOH		185 ± 2 ^c	160 ± 1 ^d
	EtOAc		143 ± 1 ^d	130 ± 1 ^e
	Hx		91 ± 7 ^f	57 ± 1 ^{g,h}

ESC SC-CO₂: extração com dióxido de carbono supercrítico; EtOH: etanol; UE: extração assistida por ultrassom; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v); Hx: hexano; EtOAc: acetato de etila.

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de cada coluna (resultados de semente e torta analisados separadamente);

⁽²⁾ capacidade antioxidante em Trolox equivalentes.

Por ser uma metodologia recomendada para medir a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica, de acordo com Re et al. (1999), esperava-se um melhor desempenho dos extratos

obtidos por solventes de baixa polaridade (SC-CO₂ e Hx), dado que alguns dos extratos supercríticos tiveram bons resultados pelo método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico.

A comparação de resultados de atividade antioxidante, principalmente no caso da torta de semente de maracujá, é dificultada pela escassez de estudos disponíveis na literatura.

A adição de etanol como cossolvente na extração supercrítica, de maneira geral, não alterou significativamente os resultados de atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com CO₂ puro, independente da metodologia utilizada para sua avaliação. A combinação de resultados dos três métodos para avaliação da capacidade antioxidante usados neste trabalho apontam a mistura EtOH-H₂O como melhor solvente para se obter extratos antioxidantes a partir de semente e torta de semente de maracujá. Porém, bons resultados exibidos também por outras amostras podem indicar uma possível diversidade de grupos químicos extraídos pelas diferentes técnicas de extração e solventes.

O uso de extratos naturais como aditivos alimentares pode ser vantajoso, conforme sugerido por Bonilla et al. (1999). Isso porque o uso de antioxidantes sintéticos em produtos alimentícios é limitado pela legislação, de acordo com parâmetros toxicológicos, o que não se aplica a compostos de origem natural. Estudos mais recentes avaliam o efeito sinérgico entre antioxidantes sintéticos e compostos naturais com atividade antioxidante, com o intuito de adicionar estes para reduzir a quantidade daqueles para produzir uma mesma inibição da oxidação *in vitro* (ROCKENBACH et al., 2008).

Os métodos para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* representam indicadores das potenciais atividades biológicas, refletindo apenas uma biodisponibilidade teórica. Maiores avaliações são necessárias para a identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos e para verificar sua contribuição na atividade antioxidante total, assim como para testar sua atividade antioxidante em sistemas biológicos.

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

O teor de compostos fenólicos total (TFT), determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE), para cada extrato de semente e torta de semente de maracujá obtido pelos diferentes métodos de extração, bem como para o BHT, são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), para os extratos de semente e torta de semente de maracujá e o BHT.

Método de extração	Parâmetros de processo	TFT (mg GAE/ g extrato) ⁽¹⁾		
		Torta	Semente	
ESC SC-CO ₂	40 °C	150 bar	28 ± 4 ^{c,d}	33,0 ± 0,8 ^d
		250 bar	24 ± 2 ^{c,d}	30 ± 1 ^{d,e}
		300 bar	13,3 ± 0,6 ^d	18 ± 2 ⁱ
	50 °C	150 bar	31 ± 2 ^{c,d}	26,4 ± 0,8 ^{e,f}
		250 bar	21 ± 2 ^{c,d}	24,3 ± 0,4 ^{f,g}
		300 bar	14 ± 1 ^d	19,3 ± 0,8 ^{h,i}
ESC SC-CO ₂ + 5 % EtOH	40 °C	250 bar	17,9 ± 0,3 ^{c,d}	-
		300 bar	15,3 ± 0,3 ^d	-
Baixa pressão	Solventes			
MAC	EtOH-H ₂ O		284 ± 5 ^b	142,4 ± 0,4 ^a
	EtOH		27 ± 2 ^{c,d}	75 ± 2 ^b
	EtOAc		32 ± 3 ^{c,d}	24,6 ± 0,8 ^{f,g}
	Hx		31 ± 3 ^{c,d}	30 ± 1 ^{d,e}
UE	EtOH-H ₂ O		336 ± 22 ^a	61,3 ± 0,4 ^c
	EtOH		39 ± 1 ^c	21,4 ± 0,4 ^{g,h,i}
	EtOAc		28,2 ± 0,8 ^{c,d}	19 ± 1 ^{h,i}
	Hx		23,8 ± 0,4 ^{c,d}	22,3 ± 0,1 ^{g,h}
BHT⁽²⁾	-		268 ± 13	

ESC SC-CO₂: extração com dióxido de carbono supercrítico; EtOH: etanol; UE: extração assistida por ultrassom; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v); Hx: hexano; EtOAc: acetato de etila.

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p < 0,05);

⁽²⁾ Benelli et al. (2010).

Como pode ser observado na Tabela 14, aqui novamente os extratos resultantes das extrações com a mistura EtOH-H₂O apresentaram maiores teores de compostos fenólicos em ambos os processos à baixa pressão e ambas as matérias-primas. Isso porque, apesar de os compostos fenólicos apresentarem uma ampla faixa de polaridade, podendo ser solubilizados por solventes de baixa polaridade, de forma geral, esses compostos são caracterizados como polares e são solubilizados com mais facilidade por solventes mais polares como é o caso da mistura etanol-água.

Na extração supercrítica, o aumento da pressão mantendo a temperatura constante parece influenciar negativamente o teor de compostos fenólicos dos extratos, apesar de somente os resultados das extrações a 300 bar diferirem significativamente dos demais; porém, mais experimentos seriam necessários para atestar essa tendência. Comportamento oposto foi observado por Mezzomo et al. (2010) com amêndoa de pêssego. Quando se considera a variação de temperatura, em uma condição isobárica, não é possível observar nenhuma tendência. E como ocorrido nas avaliações de atividade antioxidante, a adição de etanol como cossolvente na extração supercrítica não alterou significativamente os resultados de TFT.

No caso da torta, a maioria dos extratos apresentou resultados semelhantes entre si, com destaque apenas para valores de TFT das extrações com EtOH-H₂O, sendo ainda o de UE (336 ± 22 mg GAE/g_{extrato}) significativamente superior ao de MAC (284 ± 5 mg GAE/g_{extrato}) e ambos maiores que do BHT (268 ± 13 mg GAE/g). No estudo de Oliveira et al. (2009) com o resíduo industrial de maracujá (*Passiflora alata*), que incluía sementes e casca juntos, o extrato metanólico obtido por Soxhlet desse resíduo desengordurado apresentou valor de TFT de $41,2 \pm 4,2$ mg GAE/g de extrato seco, próximo ao dado de UE de torta (também resíduo desengordurado) com etanol puro do presente trabalho (39 ± 1 mg GAE/g de extrato) cuja polaridade é próxima a do metanol.

Entre os ensaios com a semente de maracujá, o maior valor de TFT foi do extrato MAC/EtOH-H₂O, $142,4 \pm 0,4$ mg GAE/g_{extrato}, mas inferior ao BHT (268 ± 13 mg GAE/g). Saravanan e Parimelazhagan (2013) reportaram TFT de $115,7$ mg GAE/g_{extrato} para extrato de *Passiflora subpeltata* obtido por Soxhlet com metanol (polaridade próxima ao etanol). Ferreira et al. (2011) analisaram o TFT para os óleos de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) refinado, bruto (prensagem a frio) e obtido por Soxhlet com éter de petróleo, mas a forma como os dados foram reportados (350,4, 349,6 e 339,6 g/g

respectivamente) é diferente da empregada no presente trabalho o que desqualifica a comparação. Kornsteiner, Wagner e Elmadfa, (2006), em estudo com extratos oleosos de castanha-do-Brasil, amêndoa e amendoim obtidos por Soxhlet, apontam valores de TFT de 11, 23 e 42 mg GAE/g, respectivamente, semelhantes aos obtidos no presente trabalho para a maioria dos extratos.

As diferenças encontradas na literatura no teor de compostos fenólicos total para uma mesma fruta ou vegetal dependem, principalmente, das diferentes técnicas empregadas na extração e quantificação desses compostos (BRAVO, 1998; KALT et al., 2001). Com base na literatura, sabe-se que o conteúdo de compostos fenólicos determinado pelo método de Folin-Ciocalteu não é uma medida absoluta da quantidade desse tipo de substância na matéria-prima, uma vez que algumas moléculas respondem diferentemente a esse experimento e que esses componentes presentes nas frutas são encontrados nas formas livre e ligada; porém, esta última geralmente é excluída das análises, sendo o teor de compostos fenólicos total subestimado (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1999; SUN et al., 2002). Além disso, a quantidade de compostos fenólicos das plantas também depende de fatores como o gênero, espécie e cultivar da planta e de condições de cultivo, colheita e armazenamento (TOMAS-BARBERAN; ESPIN, 2001; RAPISARDA et al., 1999).

Embora a literatura reporte que o teor de compostos fenólicos tem influência na atividade antioxidante de produtos naturais, eles não caracterizam completamente essa atividade, representando apenas um indicativo dessa propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005). Não foi possível atribuir uma relação entre os resultados de TFT e atividade antioxidante obtidos pelos três métodos aplicados no presente estudo, o que sugere que há outros compostos responsáveis por essa atividade que podem estar presentes nas sementes de maracujá e no seu resíduo. De acordo com Malacrida e Jorge (2012), a atividade antioxidante de óleo de semente de maracujá pode ser influenciada também pela presença de tocoferóis, conhecidos como antioxidantes naturais, além dos compostos fenólicos. Deve-se considerar, ainda, um possível efeito sinérgico entre esses componentes na atividade antioxidante resultante (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1999).

5.9. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Com base em todos os resultados anteriores (rendimento, atividade antioxidante e TFT), os extratos de semente e de torta de semente de maracujá obtidos pelas extrações supercríticas a 40 °C (todas condições de pressão e cossolvente) e pela mistura de solventes EtOH-H₂O (1:1, v/v) por MAC e UE foram selecionados para serem submetidos a avaliação pelo método quantitativo de microdiluição em caldo de cultivo para a determinação da CMI (concentração mínima inibitória) contra as bactérias *E. coli* (Gram-negativa) e *L. innocua* (Gram-positiva). CMI se refere à menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado. Na Tabela 15 são apresentados os valores de CMI dos extratos que inibiram o crescimento de ao menos uma das bactérias testadas; os demais extratos não inibiram o crescimento. Nenhuma das concentrações testadas desses extratos apresentou atividade bactericida.

Tabela 15. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os extratos de semente e torta de semente de maracujá determinados pelo método de microdiluição para *E. coli* e *L. innocua*.

Método de extração	Condições de processo / solvente	Matéria-prima	CMI (mg/mL)	
			<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
ESC SC-CO ₂	150 bar/40 °C	torta	-	-
		semente	-	8
	300 bar/40 °C	torta	-	8
		semente	-	8
MAC	EtOH-H ₂ O	torta	4	4
		semente	8	-
UE	EtOH-H ₂ O	torta	8	4
		semente	8	-

ESC SC-CO₂: extração com dióxido de carbono supercrítico; UE: extração assistida por ultrassom; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v).

Conforme os dados da Tabela 15, os melhores resultados, ou seja, as menores concentrações inibitórias foram mais uma vez dos extratos obtidos pela mistura EtOH-H₂O, incluindo atividade contra *E. coli*, com destaque para o extrato MAC/EtOH-H₂O/torta que apresentou a menor

CMI, 4 mg/mL, contra as duas bactérias testadas. A atividade deste extrato pode ser função de seu alto teor de compostos fenólicos que, de acordo com Shoko et al. (1999), costumam estar relacionados com efeitos antimicrobianos. Saravanan e Parimelazhagan (2013) também sugeriram que compostos fenólicos seriam responsáveis pelas atividades antibacteriana e antifúngica de extratos de semente de *Passiflora subpeltata* obtidos por diferentes solventes e testados contra nove microorganismos pela técnica de difusão em meio sólido (medida do halo de inibição). O efeito inibitório dos compostos fenólicos poderia ser explicado por sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio de pontes de hidrogênio de seus grupos hidroxila que alterariam sua permeabilidade; ou ainda pela penetração dessas substâncias na célula bacteriana provocando a coagulação de seu conteúdo (SENGUL et al., 2009). Além disso, de acordo com a literatura, a atividade antimicrobiana pode estar associada às condições de cultivo das plantas visto que componentes ativos, geralmente, são sintetizados como resposta a algum tipo de estresse como ataque de microorganismos, forte radiação ultravioleta, entre outros (REVILLA; ALONSO; KOVAC, 1997).

Os resultados de CMI mostram que os extratos que apresentaram ação inibidora foram ligeiramente mais efetivos contra o crescimento da bactéria Gram-positiva (*L. innocua*) quando comparados à bactéria Gram-negativa (*E. Coli*). O mesmo comportamento também foi verificado por Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998), Boussaada et al. (2008), Michielin et al. (2009) e por Silva et al. (2014b) para outras matérias-primas e outras bactérias. A maior resistência das bactérias Gram-negativas provavelmente é devida a diferenças na parede celular dessas bactérias. A parede celular das bactérias Gram-negativas apresenta uma sofisticada barreira à permeabilidade quando comparada à parede simples das bactérias Gram-positivas, que apresenta caráter lipofílico e menor resistência à penetração de compostos (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998), o que pode também explicar o fato de os extrato supercríticos (oleosos) terem sido ativos apenas contra *L. innocua*. Na parede celular das espécies Gram-negativas há uma camada externa adicional lipopolisacarídica que restringe a penetração de grande parte das moléculas; os nutrientes, por exemplo, entram através de poros ou mecanismos de transporte especializados. Essa eficiente barreira à permeabilidade é tida como responsável pela dificuldade da indústria farmacêutica de produzir novas classes de substâncias com ampla atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LEWIS; AUSUBEL, 2006).

Ferreira et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de três tipos de óleo de semente de maracujá refinado, bruto (prensagem a frio) e obtido por Soxhlet com éter de petróleo, em soluções com concentração de 10 mg/mL, por difusão em meio sólido contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, sem que nenhum efeito inibidor do crescimento desses microrganismos tenha sido observado. Entretanto, os ácidos oleico e linoleico - maiores constituintes do óleo de semente de maracujá obtido por extração supercrítica, segundo Liu et al. (2009) - foram reportados como potenciais antimicrobianos, sendo essa atividade atribuída à longa cadeia insaturada de ambos os ácidos graxos (ZHENG et al. 2005). Esses relatos, associados aos resultados de CMI apresentados pelos extratos supercríticos obtidos a 150 e 300 bar e 40 °C no presente estudo, podem indicar uma habilidade do SC-CO₂ de extrair compostos antimicrobianos, o que possivelmente é devido à ausência de ar e luz durante o processo de extração que permite a preservação da bioatividade dos extratos (Palma et al., 1999). O bom desempenho do SC-CO₂ puro para extrair compostos antimicrobianos, em comparação com outros métodos de extração, foi também apontado por Kitzberger et al. (2007), usando cogumelo shiitake, e por Palma et al. (1999) e Oliveira et al. (2013) com semente e bagaço de uva, respectivamente.

Uma ampla faixa de valores de CMI são reportados na literatura dependendo das matérias-primas, dos procedimentos de extração ou dos microrganismos testados. Martin et al. (2012) relataram valores de CMI entre 1,56 e 12,5 mg/mL contra *Listeria monocytogenes* de extratos etanólicos de diferentes resíduos agroindustriais incluindo frutas, vegetais e oleaginosas. O único tipo de semente avaliado entre esses resíduos foi da uva Petit Verdot com CMI de 6,25 mg/mL - similar aos valores obtidos no presente estudo - e CMB de 12,5 mg/mL, enquanto nenhuma das concentrações de extratos de semente e de torta de maracujá testadas aqui foram bactericidas.

Silva et al. (2014b) avaliaram a atividade de extrato de semente de *Passiflora edulis* Sims, também obtido por maceração em mistura de etanol e água (1:1, v/v) (por 24 h e com razão semente/solvente 1:10, m:v), contra *E. coli* K12 e *L. monocytogenes*, e apresentaram valores de CMI de 2 e 0,5 mg/mL, respectivamente. Em outro estudo, Silva et al. (2014a) identificaram a cumarina como um importante composto presente nas sementes de *Passiflora edulis* Sims, que poderia estar relacionado com sua atividade antimicrobiana.

Poucos resultados diretamente comparáveis são encontrados na literatura devido a diferenças na preparação dos extratos, espécie da fruta e microorganismos estudados, método aplicado e forma de expressar os resultados, entre outros. Os resultados aqui apresentados indicam um potencial de aproveitamento dos resíduos de semente de maracujá para controle de crescimento microbiano, mas cabe ressaltar que são necessários estudos adicionais que envolvam outros microorganismos e aplicações diretas em sistemas de interesse, como alimentos.

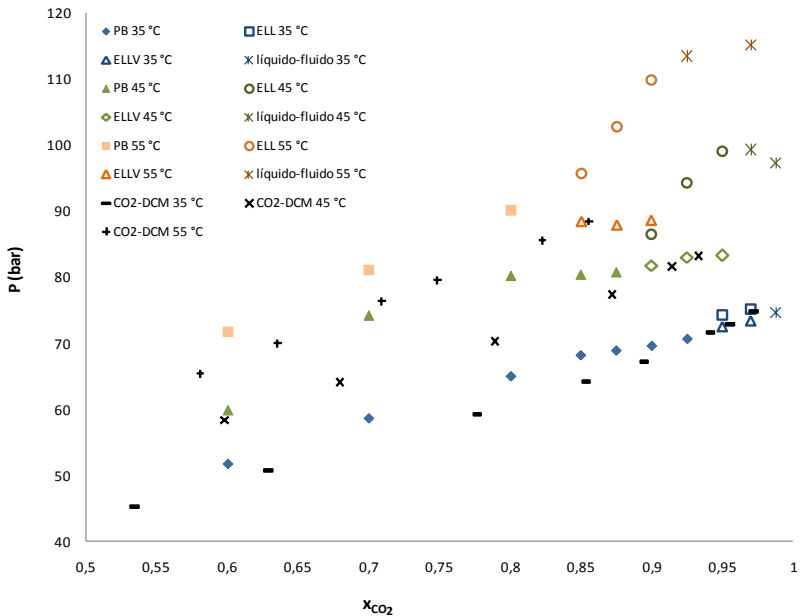
5.10. Equilíbrio de fases do extrato supercrítico de semente de maracujá

O comportamento de equilíbrio de fases do sistema pseudo ternário, CO_2 + diclorometano (DCM) + extrato supercrítico de semente de maracujá obtido a 150 bar e 40 °C (sendo esse considerado como pseudo composto puro), é apresentado num diagrama P-x (pressão *versus* fração mássica do solvente, CO_2), conforme Figura 21. A proporção extrato:DCM foi mantida em 1:125 (m/v). Os dados experimentais foram obtidos com frações mássicas de CO_2 entre 60 e 98,8 % (em relação à solução de extrato em DCM), em ensaios isotérmicos a temperaturas de 35, 45 e 55 °C e com diminuição gradativa da pressão - que variou entre 51,77 e 115,1 bar considerando todas as condições de temperatura. Foi observado visualmente durante os experimentos a ocorrência de:

- Equilíbrio líquido-vapor (ELV), descrito como sendo o surgimento de uma fase vapor no sistema (devido a redução da pressão), antes totalmente líquido, sendo caracterizado pelo aparecimento da primeira bolha no sistema, chamado ponto de bolha (PB) seguido de total separação das fases líquida e vapor;
- Equilíbrio líquido-líquido (ELL), caracterizado pelo turvamento do sistema;
- Equilíbrio líquido-líquido-vapor (ELLV), que sucede o ELL com o decréscimo na pressão do sistema, acarretando o surgimento de uma terceira fase (vapor); assim o sistema passa a ter três fases, uma fase vapor e duas fases líquidas, e sendo caracterizado por formação de bolhas com consecutiva separação das fases.

Através da Figura 21, pode ser observado que em todas as temperaturas há o aparecimento dos três tipos de equilíbrio: ELV, representado pelos marcadores cheios; ELL, representado pela linha superior de marcadores vazados que separam a região de fase única (parte superior do diagrama) da região de duas fases líquidas (entre as duas linhas de marcadores vazados); e ELLV, representado pela linha inferior de marcadores vazados na Figura 21 nos quais existe uma linha trifásica composta por duas fases líquidas e uma gasosa. Em cada isoterma a região acima da curva superior denota o sistema em uma única fase líquida; entre as duas curvas de marcadores vazados observa-se uma região de duas fases líquidas, uma rica em dióxido de carbono e uma rica em solvente orgânico; enquanto abaixo da linha inferior encontra-se uma fase líquida e outra fase vapor.

Figura 21. Diagrama P-x para o sistema CO₂ + diclorometano (DCM) + extrato de semente de maracujá (marcadores coloridos) e para o sistema CO₂ + DCM, dados de Tsvintzelis et al. (2004) (marcadores pretos).



P: Pressão (bar); PB: ponto de bolha ou equilíbrio líquido-vapor; ELL: equilíbrio líquido-líquido; ELLV: equilíbrio líquido-líquido-vapor; líquido-fluido: possivelmente equilíbrio líquido-líquido fluido supercrítico; x_{CO_2} : fração mássica de dióxido de carbono (CO₂).

O comportamento de equilíbrio de fases depende fortemente das interações energéticas, da diferença de tamanho e de polaridade entre as moléculas envolvidas no sistema (BENDER, 2008). O comportamento de fases pode se tornar mais complexo e apresentar maior desvio da idealidade conforme aumenta diferença de polaridade entre os componentes presentes no sistema estudado quando comparado a compostos puros. As curvas de transição ELV comumente são observadas em sistemas contendo CO₂ com alta assimetria molecular em relação aos outros compostos (CHAROENSEMBUT-AMON et al., 1986; VAN KONYNENBURG; SCOTT, 1980), o que parece ser o caso do sistema estudado, pois, além de multicomponente - como geralmente é o caso de extratos vegetais -, o extrato supercrítico de semente de maracujá é rico em ácidos graxos de cadeia longa (LIU et al., 2009). Portanto, a grande diferença entre a natureza química dos constituintes com relação ao CO₂, com possíveis interações complexas entre eles, pode ser a razão para o comportamento de fases ELL e ELLV (MICHIELIN, 2009).

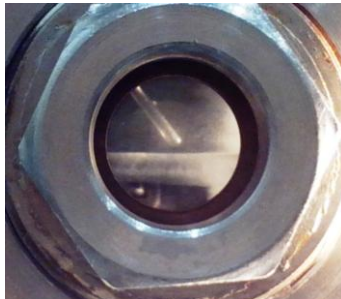
As pressões de transição para a menor isoterma (35 °C) são relativamente baixas (50 a 75 bar). Pode-se observar que as pressões de transição e a amplitude da região de equilíbrio líquido-líquido são afetadas tanto pela modificação da composição quanto pela alteração da temperatura. Um incremento da temperatura e/ou da fração mássica de CO₂ resulta em uma elevação da pressão necessária para manter o sistema em uma única fase, *i.e.*, numa mudança nas transições LV e LL para pressões mais altas, devido a um aumento na energia interna com o aumento da temperatura. Logo, significa que é necessária uma pressão maior para que o sistema se apresente totalmente miscível, principalmente quando as isotermas se aproximam do ponto crítico da mistura onde os efeitos energéticos entre os componentes são relevantes (FRANCESCHI et al., 2008a).

Comparando o comportamento de equilíbrio de fases dos sistemas CO₂ + diclorometano com (pontos coloridos referentes aos dados experimentais obtidos no presente estudo) e sem adição de extrato de semente de maracujá (pontos pretos representando os dados de Tsvintzelis et al. (2004)), observa-se que, mesmo em pequena quantidade, a presença do extrato provoca um incremento nas pressões de transição e a ocorrência de equilíbrio trifásico. De acordo com Reverchon, De Marco e Torino (2007), a presença de um soluto deve ser considerada no sistema, pois este pode modificar o equilíbrio líquido-vapor de sistemas binários solvente + CO₂. Como regra geral, o soluto (nesse caso o extrato de semente de maracujá que contém ácidos graxos

de cadeia longa) modifica o ponto crítico da mistura do sistema ternário para pressões mais elevadas e altera o diagrama de fases, quando comparado ao sistema binário correspondente, devido à maior assimetria molecular e, conseqüentemente, maiores interações energéticas entre os componentes.

Na Figura 22 observa-se que a fase gasosa está no topo da célula em equilíbrio com duas fases líquidas representando o equilíbrio líquido-líquido-vapor do sistema CO_2 + diclorometano + extrato de semente de maracujá.

Figura 22. Equilíbrio líquido-líquido-vapor do do sistema CO_2 + diclorometano + extrato supercrítico de semente de maracujá.

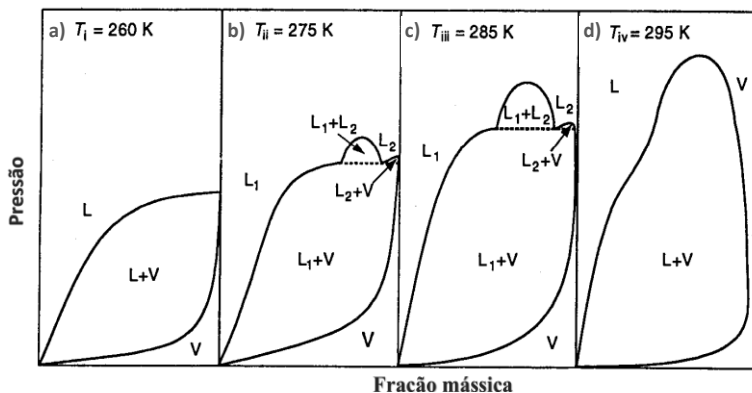


Ou ainda, esse turvamento do sistema pode estar relacionados com a existência de um equilíbrio entre uma das fases líquidas e a fase vapor, característico de um diagrama tipo V, conforme apresentado por Prausnitz, Lichtenthaler e Azevedo (1999) e ilustrado na Figura 23 em quatro diferentes temperaturas para um sistema etileno + metanol.

Na Figura 23, à temperatura T_i ocorre apenas um equilíbrio líquido vapor, que eventualmente acontece em temperatura inferior a 35 °C para o sistema (A). Quando se ultrapassa a temperatura do ponto crítico terminal inferior (LCEP, *Lower Critical End Point*), uma região de equilíbrio líquido-líquido (L_1+L_2) começa a crescer a partir da curva de equilíbrio líquido-vapor (ponto de bolha). A partir do ponto crítico de um dos componentes do sistema, aparece, então, a região de equilíbrio entre uma das fases líquidas e o vapor (L_2+V), o que origina um ponto crítico adicional (diagramas b e c da Figura 23); comportamento semelhante ao apresentado pelo sistema (A) CO_2 + DCM + extrato de semente de maracujá na Figura 21. Com o aumento ainda maior da temperatura, essa região diminui até desaparecer à temperatura

corresponde ao ponto crítico terminal superior (UCEP, *Upper Critical End Point*), passando a existir apenas equilíbrio líquido-vapor com a presença de um componente supercrítico (diagrama d) da Figura 23). Pela visualização experimental não é possível afirmar a incidência da região L_2+V para o sistema (A); no entanto, conforme Prausnitz, Lichtenthaler e Azevedo (1999), sua ocorrência em uma estreita faixa de pressão dificulta sua detecção experimental.

Figura 23. Comportamento de fases do sistema etileno + metanol, exemplo de diagrama tipo V.



Fonte: Prausnitz, Lichtenthaler e Azevedo (1999).

De acordo com a literatura, as soluções poliméricas apresentam um comportamento de fases fortemente dependente da contribuição energética e do volume livre de cada componente. Geralmente, com um incremento da temperatura, especialmente próximo do ponto crítico do solvente, as soluções poliméricas exibem imiscibilidade líquido-líquido devido às diferenças de “volume livre” entre as moléculas do polímero e do solvente. Em outras palavras, esse efeito é o resultado da maior expansividade do solvente, quando comparada àquela do polímero. Esse tipo de transição de fases é geralmente conhecido como “temperatura crítica de solução inferior” (LCST, do inglês *Lower Critical Solution Temperature*) e é caracterizado pelo aumento da pressão de transição com o aumento da temperatura; isto é $(\partial P / \partial T)_x > 0$. Essas transições podem ser atribuídas ao fato de que as diferenças entre o volume livre do polímero e do solvente são diminuídas com o aumento de pressão, fazendo com que os mesmos se tornem mais “compatíveis” (sistema homogêneo). Em sistemas LCST um incremento na fração mássica de

CO₂ tende a dissolver o solvente orgânico, reduzindo o poder de solvatação do solvente e levando a precipitação dos solutos. Como consequência, altas pressões são necessárias para manter as misturas em uma única fase (CHEN; RADOSZ, 1992; KONTOGEORGIS et al., 1995; VAN KONYNENBURG; SCOTT, 1980).

Se ao contrário, um sistema heterogêneo (duas fases) se torna homogêneo (uma fase) quando a temperatura é aumentada, ocorre uma transição do tipo “temperatura crítica de solução superior” (conhecido como UCST, do inglês *Upper Critical Solution Temperature*). Nesse caso, em temperaturas mais baixas, a região de solubilidade da solução polimérica é limitada - devido às diferenças entre as interações energética do polímero e do solvente - sendo a pressão de transição maior, isto é, $(\partial P / \partial T)_x < 0$. Para temperaturas entre UCST e LCST o sistema é miscível para todas as composições (CHEN; RADOSZ, 1992; KONTOGEORGIS et al., 1995; VAN KONYNENBURG; SCOTT, 1980).

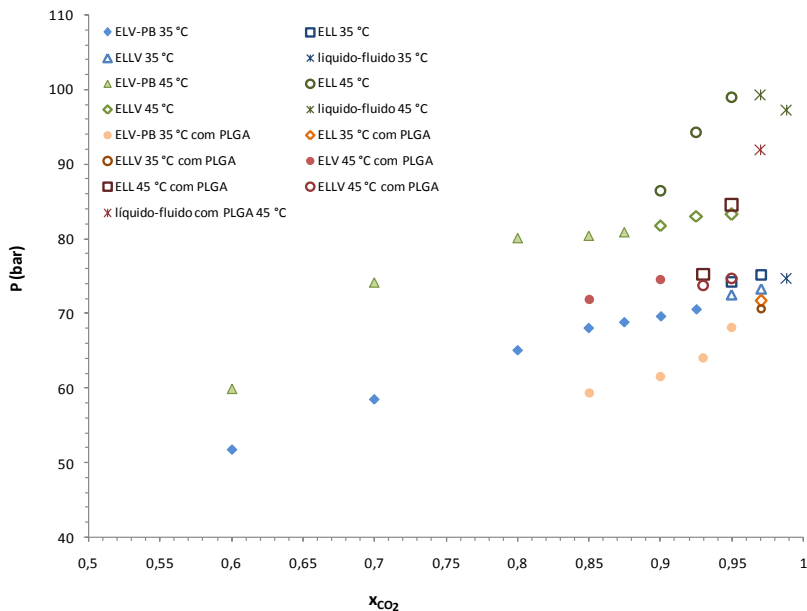
Além do sistema (A) CO₂ + DCM + extrato de semente de maracujá, também foi estudado o equilíbrio de fases do sistema (B) CO₂ + DCM + extrato de semente de maracujá + PLGA 50:50 para se determinar a influência da adição desse polímero no sistema (A) e, com isso, definir as condições a serem aplicadas no processo de formação de partículas com fluido supercrítico como antissolvente (SAS). Esses dados também são apresentados num diagrama P-x, conforme Figura 24, incluindo novamente os dados anteriores do sistema sem PLGA para efeito de comparação. São apresentados dados apenas a 35 e 45 °C, uma vez que a 55 °C ocorre a formação de um filme de polímero na parede da célula de equilíbrio durante o experimento, o que altera a composição do sistema e prejudica a obtenção de dados.

Considerando essas informações da literatura e os dados de equilíbrio apresentados na Figura 24, foram selecionadas seis condições operacionais, com diferentes combinações de temperaturas de 35 e 45 °C, pressões de 90 e 110 bar e frações mássicas de CO₂ de 92,5 e 95 %, para a realização dos ensaios de precipitação pelo método SAS, abrangendo diferentes regiões do diagrama de fases.

- ✓ Ensaio 1: 92,5% CO₂/35 °C/90 bar (uma fase, acima da linha ELV);
- ✓ Ensaio 2: 95 % CO₂/35 °C/90 bar (uma fase, acima da linha ELL);
- ✓ Ensaio 3: 95 % CO₂/35 °C/110 bar (uma fase, acima da linha ELL);
- ✓ Ensaio 4: 92,5 % CO₂/45 °C/90 bar (duas fases líquidas);

- ✓ Ensaio 5: 92,5 % CO₂/45 °C/110 bar (uma fase, acima da linha ELL);
- ✓ Ensaio 6: 95 % CO₂/45 °C/110 bar (próximo ao ponto crítico).

Figura 24. Diagrama P-x para os sistemas (A) CO₂ + diclorometano (DCM) + extrato de semente de maracujá e (B) CO₂ + DCM + extrato de semente de maracujá + PLGA 50:50.

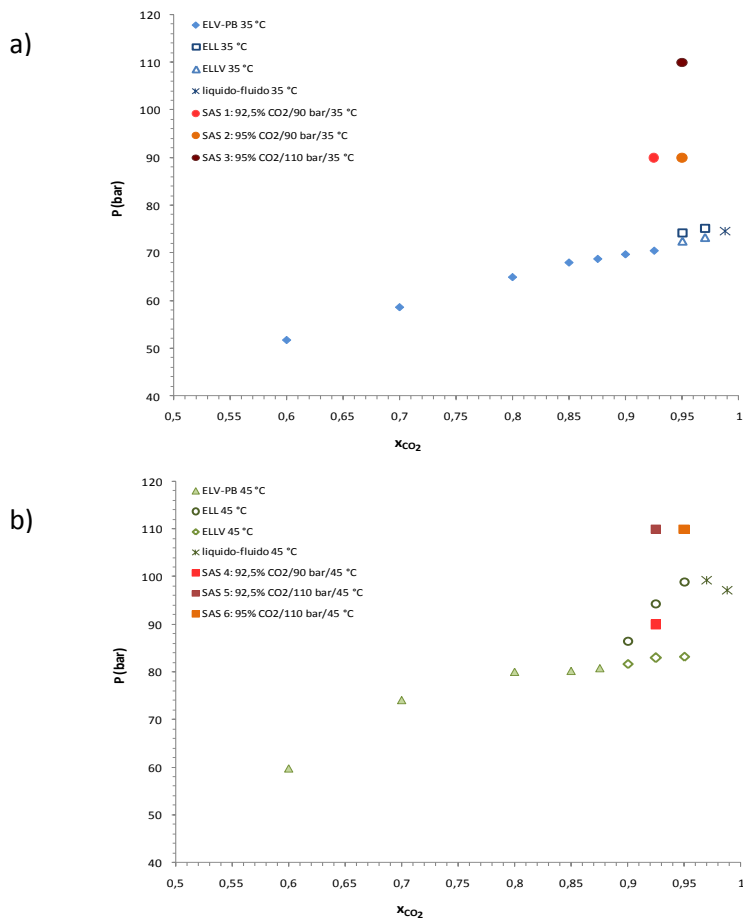


P: Pressão (bar); ELV-PB: equilíbrio líquido-vapor/ponto de bolha; ELL: equilíbrio líquido-líquido; ELLV: equilíbrio líquido-líquido-vapor; líquido-fluido: possivelmente equilíbrio líquido-fluido supercrítico; x_{CO_2} : fração mássica de dióxido de carbono (CO₂).

Com exceção do ensaio 4, nas demais condições operacionais o sistema se apresenta homogêneo, ou seja, com total miscibilidade entre seus componentes, o que a literatura indica como mais adequadas para a produção de micropartículas. Por outro lado, a região do diagrama em que se encontra o ensaio 4 não seria recomendada para a precipitação devido a possível formação de filmes e partículas aglomeradas, uma vez que o sistema encontra-se na região de duas fases (MIGUEL et al., 2006). Porém, como as informações da literatura acerca desse assunto variam em função do sistema estudado e não são de fato conclusivas,

foram selecionadas diferentes regiões do diagrama de fases conforme citado acima, para a realização dos ensaios de precipitação por SAS. A Figura 25 mostra a localização dessas condições operacionais no diagrama de fases do sistema A (pontos designados por SAS com numeração de 1 a 6).

Figura 25. Dados P-x de equilíbrio de fases para o sistema CO_2 + diclorometano (DCM) + extrato de semente de maracujá para temperaturas de a) 35°C e b) 45°C e pontos experimentais de precipitação por SAS a a) 35°C e b) 45°C para o sistema CO_2 + DCM + extrato de semente de maracujá + PLGA 50:50.



5.11. Caracterização das partículas obtidas

A Figura 26 mostra exemplos das partículas formadas pelos processos com antissolvente supercrítico (SAS) e emulsificação/evaporação do solvente (ESE). As partículas precipitadas por SAS são granuladas e insolúveis em solução aquosa; enquanto as amostras elaboradas por ESE têm a aparência similar a algodão doce e solúveis em água, ambos relacionados a adição do PVA durante a etapa de emulsificação. As características das partículas obtidas bem como o desempenho dos processos aplicados são discutidos na sequência.

Figura 26. Amostras de partículas formadas pelos processos: a) antissolvente supercrítico (SAS) e b) emulsificação/evaporação do solvente (ESE).



5.11.1. Tamanho e morfologia das partículas

A literatura indica que partículas de menor tamanho, uniformes e de formato esférico são melhores para que ocorra uma liberação controlada e balanceada dos compostos de interesse (ASTETE; SABLIOV, 2006; STEVANOVIĆ; USKOKOVIĆ, 2009). Os resultados de tamanho das partículas de extratos de resíduos de maracujá (semente e torta) em dois tipos de PLGA, com diferentes razões dos copolímeros de ácido lático e ácido glicólico, precipitadas pelo processos antissolvente supercrítico (SAS) e emulsificação/evaporação do solvente (ESE) estão apresentados na Tabela 16. As micrografias obtidas por MEV das partículas de PLGA 50:50 com extrato supercrítico de semente de maracujá resultantes do processo SAS em diferentes condições de pressão, temperatura e fração mássica de CO₂ estão apresentadas na Figura 27.

Tabela 16. Tamanho de partículas de PLGA com extratos de resíduos de maracujá (semente e torta) precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) e pelo método de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).

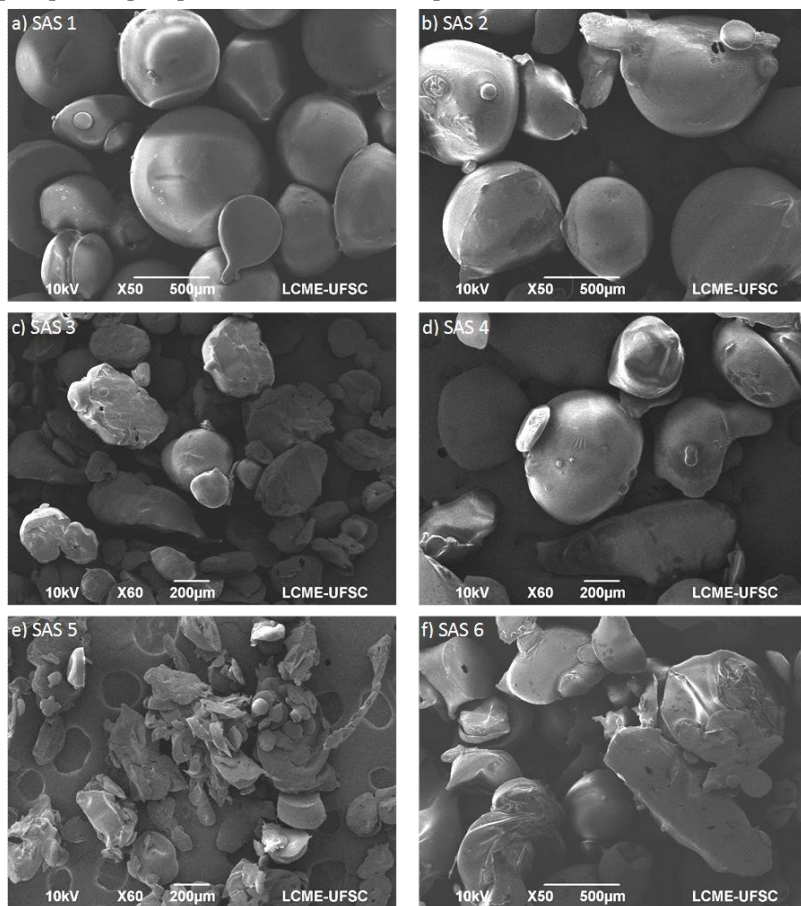
Processo	Extrato	Amostra	Tamanho de partícula (nm) ⁽¹⁾
SAS ⁽²⁾	Semente ESC 150 bar/40 °C	1: 92,5% CO ₂ , 35 °C, 90 bar	837 ± 56 ^{b,c}
		2: 95 % CO ₂ , 35 °C, 90 bar	842 ± 34 ^{b,c}
		3: 95 % CO ₂ , 35 °C, 110 bar	803 ± 125 ^{a,b,c}
		4: 92,5 % CO ₂ , 45 °C, 90 bar	721 ± 18 ^{a,b}
		5: 92,5 % CO ₂ , 45 °C, 110 bar	1498 ± 337 ^d
		6: 95 % CO ₂ , 45 °C, 110 bar	1223 ± 32 ^{c,d}
ESE	Semente ESC 150 bar/40 °C	PLGA 50:50	355 ± 10 ^a
		PLGA 65:35	417 ± 10 ^{a,b}
	MAC torta EtOH/H ₂ O	PLGA 50:50	381 ± 33 ^{a,b}
		PLGA 65:35	470 ± 15 ^{a,b}

ESC: extração com dióxido de carbono supercrítico; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v).

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$); ⁽²⁾ Todas as precipitações pelo método SAS foram realizadas com PLGA 50:50 (ácido láctico:ácido glicólico).

Entre os resultados de SAS, não foi possível evidenciar efeitos individuais ($p < 0,05$) relacionados à pressão, temperatura e quantidade de CO₂ sobre o tamanho de partícula devido à semelhança entre os valores quando se analisa a variação de apenas um desses parâmetros. Em relação à morfologia das partículas (Figura 27), todas as amostras obtidas nas diferentes condições estudadas apresentaram certa tendência à agregação e um efeito da pressão sobre a morfologia foi detectado - com formas arredondadas quando a menor pressão (90 bar) foi aplicada, e mais disformes na maior condição (110 bar). De acordo com Reverchon et al. (2010), nos processos de formação de partículas com fluidos supercríticos, os polímeros tendem a formar partículas agregadas devido à redução da temperatura de transição vítrea quando estão dissolvidos no CO₂ supercrítico.

Figura 27. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas de PLGA 50:50 com extrato supercrítico de semente de maracujá precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS).



a) SAS 1: 92,5 % CO₂, 35 °C, 90 bar; b) SAS 2: 95 % CO₂, 35 °C, 90 bar; c) SAS 3: 95 % CO₂, 35 °C, 110 bar; d) SAS 4: 92,5 % CO₂, 45 °C, 90 bar; e) SAS 5: 92,5 % CO₂, 45 °C, 110 bar; f) SAS 6: 95 % CO₂, 45 °C, 110 bar.

Grande parte dos estudos reporta que as partículas precipitadas podem exibir maiores tamanhos quando a precipitação ocorre em uma região de duas fases, em comparação às precipitações realizadas na região de uma fase (REVERCHON; CAPUTO; DE MARCO, 2003; FRANCESCHI et al., 2008b). Porém, o contrário foi observado experimentalmente por Franceschi et al. (2008a), provavelmente por, na

região de duas fases, o solvente estar menos concentrado na solução contendo o soluto (polímero + extrato), o que gera alto nível de supersaturação com partículas menores. O menor valor de tamanho das partículas obtidas pela condição SAS 4 (única na região de duas fases), apesar de não diferir significativamente dos resultados das condições a 35 °C (SAS 1, 2 e 3), sugere um comportamento semelhante ao de Franceschi et al. (2008a).

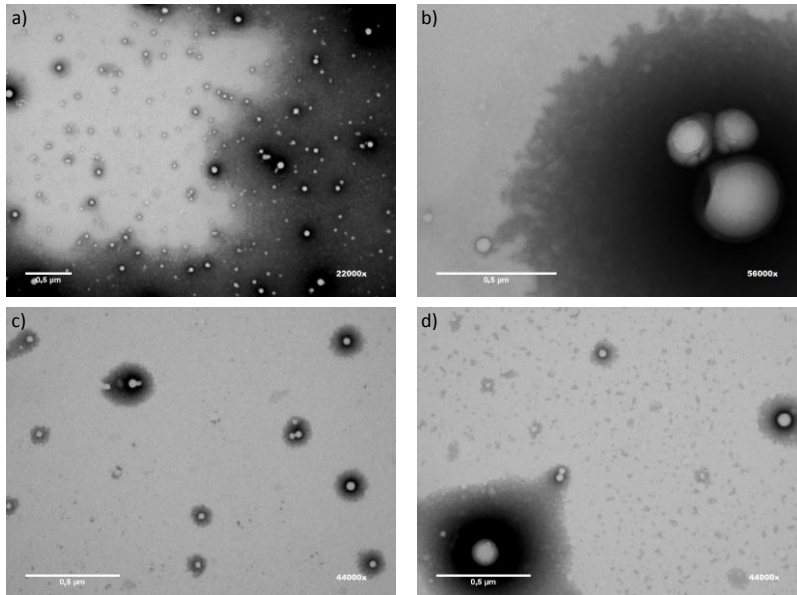
Segundo Miguel et al. (2006), quando a mistura solvente + antissolvente encontra-se em uma única fase, pressões mais altas resultam em maior solubilidade do soluto na mistura diminuindo a supersaturação. Uma vez que a supersaturação diminui, a taxa de nucleação diminui levando a um maior crescimento das partículas precipitadas (FRANCESCHI et al., 2008a), o que pode explicar o maior tamanho das partículas produzidas nas condições operacionais SAS 5 e 6. Ainda, pode-se visualizar na Figura 27, que a elevação da pressão modifica a morfologia das partículas, tornando-as mais disformes e propensas a agregação - com menor grau de deformidade na condição SAS 3 e mais evidente nas condições SAS 5 e 6 - quando comparadas às condições SAS 1, 2 e 4 que exibem formas mais arredondadas.

Em todas as condições de SAS estudadas houve alguma formação de filme no filtro localizado na saída da câmara de precipitação, sendo bastante intensa nas condições SAS 5 e 6, provavelmente relacionado à aglomeração das partículas precipitadas. Possivelmente, nas condições estudadas, o tempo de queda das gotículas formadas durante a aspersão até o fundo da câmara de precipitação não é suficiente para a completa extração do solvente orgânico do sistema pelo antissolvente. Assim, as partículas parcialmente solidificadas são depositadas no fundo da câmara e interagem entre si aglomerando-se pela ação do solvente ainda remanescente em algumas partículas. Essa formação de filme no sistema estudado talvez possa ser evitada com uma câmara de precipitação maior ou com o uso de uma aspersor de diâmetro menor (capilar), para reduzir o tamanho das gotículas e extrair mais rapidamente o solvente, devido a maior área superficial, evitando a aglomeração das partículas. Como a formação de filme foi maior nas condições SAS 5 e 6, pode-se supor que os maiores ($p < 0,05$) tamanhos das partículas produzidas nesses ensaios e sua deformidade, seja também resultante da agregação das gotículas devido a maior pressão.

A Figura 28 mostra as imagens obtidas por MET das partículas produzidas por ESE com os dois tipos de PLGA e os dois extratos de resíduos de maracujá. Como a forma das partículas é semelhante em todas as amostras, foram selecionadas diferentes ampliações das

imagens para possibilitar a visualização tanto de morfologia quanto de tendência à agregação.

Figura 28. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras precipitadas pelo processo de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).



a) extrato supercrítico de semente de maracujá e PLGA 50:50; b) extrato supercrítico de semente de maracujá com PLGA 65:35; c) extrato de maceração de torta de semente de maracujá com PLGA 50:50; d) extrato de maceração de torta de semente de maracujá com PLGA 65:35.

As partículas sintetizadas pela técnica ESE apresentaram tamanhos menores, apesar de, em geral, não diferirem significativamente dos resultados das condições 1, 2, 3 e 4 de SAS. Também não há diferença ($p < 0,05$) entre os valores das partículas formadas com diferentes extratos e polímeros (Tabela 16). A pouca influência de diferentes tipos de extrato nos tamanhos de partículas com PLGA também foi reportado por Silva et al. (2014b). Para esses autores, as partículas de PLGA 50:50 foram menores ($p < 0,05$) que as de PLGA 65:35, o que também foi observado no presente estudo, porém sem diferenças significativas. Isso pode estar relacionado com o menor peso molecular do PLGA 50:50 em relação ao PLGA 65:35, de acordo com

outros relatos encontrados na literatura de que polímeros com maior peso molecular levam a partículas maiores (ASTETE; SABLIOV, 2006; STEVANOVIĆ; USKOKOVIĆ, 2009). Os resultados de MET da Figura 28 mostram que todas as partículas precipitadas por ESE foram similares, com forma esférica, independente do polímero e do extrato utilizado. As imagens b) e d) da Figura 28 indicam que houve encapsulamento, caracterizado pelo perímetro cinza que circunda as partículas esbranquiçadas, seguido de uma sombra mais escura associada ao PVA, com sua parte hidrofílica exposta e a hidrofóbica interconectada a cadeia do PLGA, assim como reportado por Zigoneanu, Astete e Sabliov (2008).

Grande parte dos estudos envolvendo o método ESE encontrados na literatura, apresentaram partículas esféricas com tamanho entre 130 e 600 nm (ASTETE; SABLIOV, 2006). Nesse método, o tamanho das partículas obtidas varia em função de diferentes fatores como viscosidade da solução orgânica, velocidade de agitação na homogeneização e energia de ultrassonificação, tipo e concentração de estabilizantes, solventes e compostos de interesse utilizados (ASTETE; SABLIOV, 2006; MAINARDES; EVANGELISTA, 2005), portanto, dependendo da aplicação e perfil de liberação desejados, pode-se ajustar o processo para atingir o tamanho de partícula adequado.

5.11.2. Eficiência de encapsulamento

A eficiência dos processos de coprecipitação/encapsulamento por SAS e ESE dos extratos de resíduo de maracujá (semente e torta) em polímeros está apresentada na Tabela 17.

No processo SAS, a condição ótima de encapsulamento está relacionada com as propriedades termodinâmicas do material carreador (polímero) e do componente de interesse (extrato) (FRANCESCHI et al., 2008; COCERO et al., 2009). Porém no presente estudo não foi detectada nenhuma tendência dos resultados com a variação de apenas um dos parâmetros de processo (temperatura, pressão e quantidade de CO₂), mantendo-se os demais constantes, nem mesmo com a região do diagrama de fases que a precipitação ocorreu. Apesar do maior valor ($p < 0,05$) de EE apresentado pela condição 6 (91 ± 1 %) por uma combinação entre os resultados de tamanho e morfologia de partículas e eficiência de processo, a precipitação por SAS à 35 °C (condições 1, 2, e 3) parece ser mais indicada para o sistema estudado que à 45 °C.

Tabela 17. Eficiência de encapsulamento (EE) de extratos de resíduos de maracujá (semente e torta) em PLGA pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) e pelo método de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).

Processo	Extrato	Amostra	EE (%)
SAS	Semente ESC 150 bar/40 °C	1: 92,5% CO ₂ , 35 °C, 90 bar	80,3 ± 0,7 ^b
		2: 95 % CO ₂ , 35 °C, 90 bar	77 ± 1 ^{b,c}
		3: 95 % CO ₂ , 35 °C, 110 bar	78,8 ± 0,7 ^b
		4: 92,5 % CO ₂ , 45 °C, 90 bar	70 ± 2 ^{c,d}
		5: 92,5 % CO ₂ , 45 °C, 110 bar	67,8 ± 0,4 ^{d,e}
		6: 95 % CO ₂ , 45 °C, 110 bar	91 ± 1 ^a
ESE	Semente ESC 150 bar/40 °C	PLGA 50:50	61 ± 1 ^e
		PLGA 65:35	79 ± 2 ^b
	MAC torta EtOH/H ₂ O	PLGA 50:50	23,8 ± 0,7 ^f
		PLGA 65:35	27 ± 2 ^f

ESC: extração com dióxido de carbono supercrítico; MAC: maceração; EtOH-H₂O: mistura etanol e água (1:1, v/v).

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$); ⁽²⁾ Todas as precipitações pelo método SAS foram realizadas com PLGA 50:50 (razão ácido láctico:ácido glicólico).

A eficiência de encapsulamento por ESE varia em função da afinidade e a interação entre os materiais (extratos, polímeros e emulsificante) (ASTETE; SABLIOV, 2006). Isso explica o fato de a precipitação do extrato de torta de maracujá ter sido significativamente menos eficiente que do extrato de semente. Possivelmente, a característica mais hidrofílica do extrato de torta (extraído com o solvente de maior polaridade entre os utilizados), ou seja, com maior afinidade pela fase aquosa da emulsão, dificulta sua incorporação na cadeia hidrofóbica do PLGA. Silva et al. (2014b) estudaram a precipitação por ESE de extrato de semente de *Passiflora edulis* Sims obtido também por maceração em mistura de etanol e água (1:1, v/v) e avaliaram a eficiência em termos somente do composto cumarina, com

valores de $10,61 \pm 0,52$ usando PLGA 50:50 (de maior peso molecular que o aplicado no presente estudo) e $25,47 \pm 1,4$ com PLGA 65:35.

Entre os polímeros, o encapsulamento do extrato supercrítico de semente foi mais eficiente ($p < 0,05$) com PLGA 65:35, o que pode estar associado ao caráter mais hidrofóbico desse polímero devido ao maior teor do copolímero ácido láctico em sua cadeia em relação ao PLGA 50:50. Esse comportamento também foi observado por Silva et al. (2014b) entre esses tipos de PLGA. Como os resultados de tamanho e morfologia para esse dois polímeros foram similares, os dados de EE podem indicar o PLGA 65:35 como mais adequado para a formação de partículas de extrato de semente de maracujá.

O valor de eficiência apresentado pelo método ESE com PLGA 50:50 e extrato de semente de maracujá foi semelhante ($p < 0,05$) ao pior resultado da técnica SAS, o que pode indicar o processo SAS como mais efetivo para a coprecipitação desse extrato. Assim, estudos futuros aplicando SAS com PLGA 65:35 podem render eficiências de encapsulamento ainda maiores.

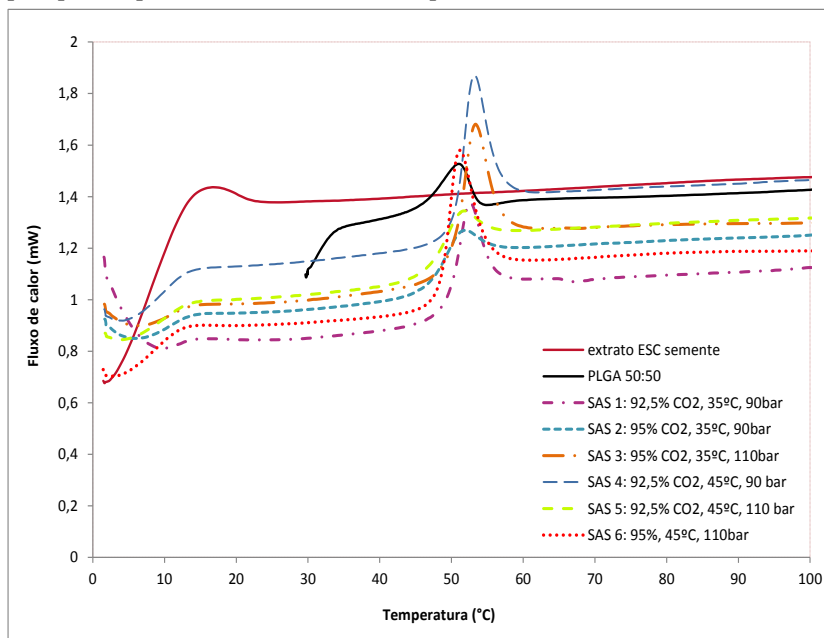
5.11.3. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada para caracterização dos extratos ESC/150 bar/40 °C de semente de maracujá e MAC/EtOH-H₂O de torta, dos dois tipos de PLGA (50:50 e 65:35) utilizados e das partículas precipitadas. Os resultados de DSC fornecem indicação sobre o desempenho da coprecipitação, isto é, indicam a eficiência de incorporação do extrato dentro da matriz polimérica; como também, sobre modificações na cristalinidade do polímero e da substância de interesse durante o processo de precipitação (KIRAN; LIU; RAMSDELL, 2008; COCERO et al., 2009).

A incorporação do extrato dentro do polímero pode ser detectada pela ausência de picos de cristalinidade e de fusão da substância ativa, o que normalmente é observado quando o componente ativo não é recoberto pelo polímero. Por outro lado, um processo de incorporação ineficiente, quando há precipitação separada de ambas as substâncias (extrato e polímero), seria caracterizado pela presença dos picos típicos desses componentes puros. Alguns extratos não possuem pico característico detectável, apresentando somente variações no fluxo de calor na análise de DSC (COCERO et al., 2009; MEZZOMO et al., 2012).

Os resultados de DSC para as amostras obtidas pelo processo SAS são apresentados na Figura 29, onde também são apresentadas as curvas de aquecimento do polímero puro não precipitado (PLGA 50:50) e do extrato supercrítico de semente de maracujá. Os resultados de DSC para as partículas formadas por ESE são mostrados na Figura 30, incluindo também as curvas de aquecimento dos polímeros (PLGA 50:50 e PLGA 65:35) e dos extratos supercrítico de semente de maracujá e de torta obtido por maceração com a mistura EtOH-H₂O puros não precipitados.

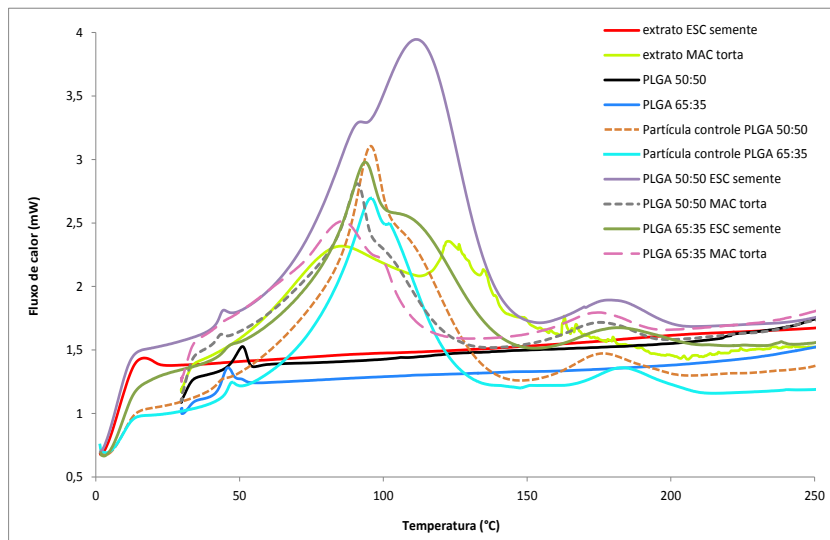
Figura 29. Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (PLGA 50:50), extrato de semente de maracujá e amostras precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS).



A curva do DSC, Figura 29, apresentou um pico próximo a 52 °C para o polímero puro, bastante semelhante ao apresentado por Joshi, Kumar e Sawant (2014), 51 °C, também para PLGA 50:50, porém sem especificar seu peso molecular e terminação. O extrato apresentou pico próximo a 17 °C, embora com uma pequena entalpia de fusão. As amostras obtidas por SAS também apresentaram picos muito próximos a 52 °C, associados ao pico de fusão do polímero, e ausência do pico

relacionados a fusão do extrato. Esse comportamento indica que houve encapsulamento, isto é, que a substância alvo (extrato) foi incorporada na matriz polimérica.

Figura 30. Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para os polímeros puros (PLGA 50:50 e PLGA 65:35), extrato supercrítico de semente de maracujá, extrato de torta de maceração com etanol e água (1:1, v/v) e amostras precipitadas pelo método emulsificação/evaporação do solvente (ESE).



A Figura 30 mostra que o PLGA 65:35 apresentou um pico de fusão próximo a 45 °C, temperatura um pouco inferior a do PLGA 50:50, 52 °C. Para as partículas controle, sintetizadas sem adição dos extratos mas com a presença dos demais materiais envolvidos no processo ESE, houve um deslocamento dos picos de fusão para perto de 97 °C, o que pode estar associado a uma alteração na estrutura molecular do polímero durante o processo de recristalização (após a evaporação do solvente orgânico), mas, principalmente, ao pico de transição da trealose (crioprotetor adicionado ao final do processo) que na literatura é reportado em 106 °C (ROE; LABUZA, 2005). Ainda, as oscilações no fluxo de calor próximas a 180 °C em todas as partículas formadas por ESE podem estar relacionadas ao PVA (surfactante usado nesse processo), uma vez que, em estudo de Patel, Bajpai e Keller (2014), esse componente apresentou pico de fusão a 185 °C. Os extratos exibem

comportamentos bastante distintos entre si, evidenciando suas diferenças de composição. Diferente do extrato supercrítico de semente de maracujá – com um único pico próximo a 17 °C e pouca variação na entalpia – o extrato de maceração de torta com EtOH-H₂O teve uma maior variação no fluxo de calor, porém em uma ampla faixa de temperatura; assim, dois picos no fluxo de calor foram considerados para comparação com os fluxos das partículas precipitadas, próximos a 85,5 °C e a 122,5 °C. No caso da amostra de partículas PLGA 65:35 MAC torta há uma proximidade com um dos picos do extrato MAC torta a 85,5 °C o que não permite afirmar que houve encapsulamento nessa amostra. Por outro lado, os perfis térmicos das demais partículas obtidas por ESE, com picos semelhantes aos das partículas controle sugerem que houve encapsulamento dos extratos pelos polímeros.

5.11.4. Estudo do perfil de liberação

Os perfis de liberação dos extratos de resíduos de maracujá a partir de partículas de PLGA foram avaliados *in vitro* em função do tempo. Os resultados ao longo de 72 h são apresentados na Figura 31 para as partículas de SAS e na Figura 32 para as amostras de ESE, com as respectivas ampliações dos perfis nos tempos iniciais para melhor visualização. A liberação de componentes das partículas é resultante de diferentes fatores como a penetração do meio de dispersão na matriz polimérica, difusão dos componentes através dessa matriz, espessura de parede da partícula, afinidade entre os compostos e o polímero, intumescimento e degradação do polímero (SANS DRAP; MOËS, 1997). Geralmente a degradação do PLGA é lenta, de forma que o desprendimento dos compostos de interesse é mais dependente da difusão, do intumescimento do polímero e da erosão superficial ou estrutural da matriz (MU; FENG, 2003).

Figura 31. a) Perfil de liberação das partículas de PLGA 50:50 com extrato supercrítico de semente de maracujá precipitadas em diferentes condições pelo processo com antissolvente supercrítica (SAS); b) Ampliação do mesmo perfil de liberação nos tempos iniciais.

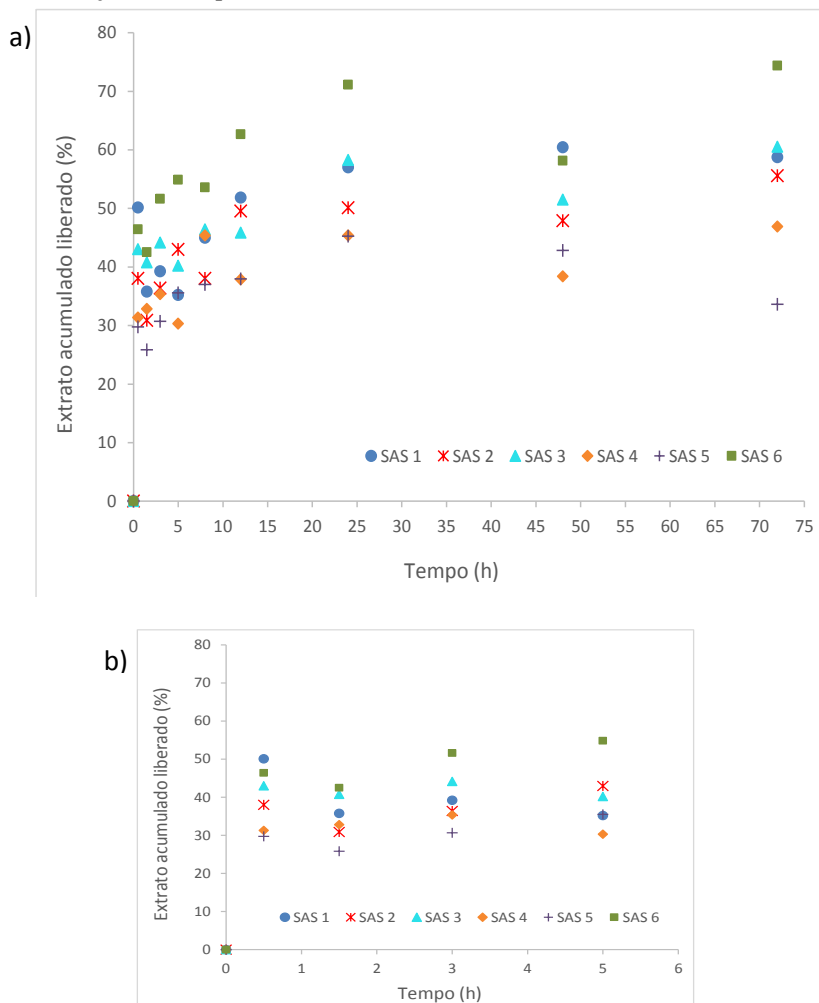
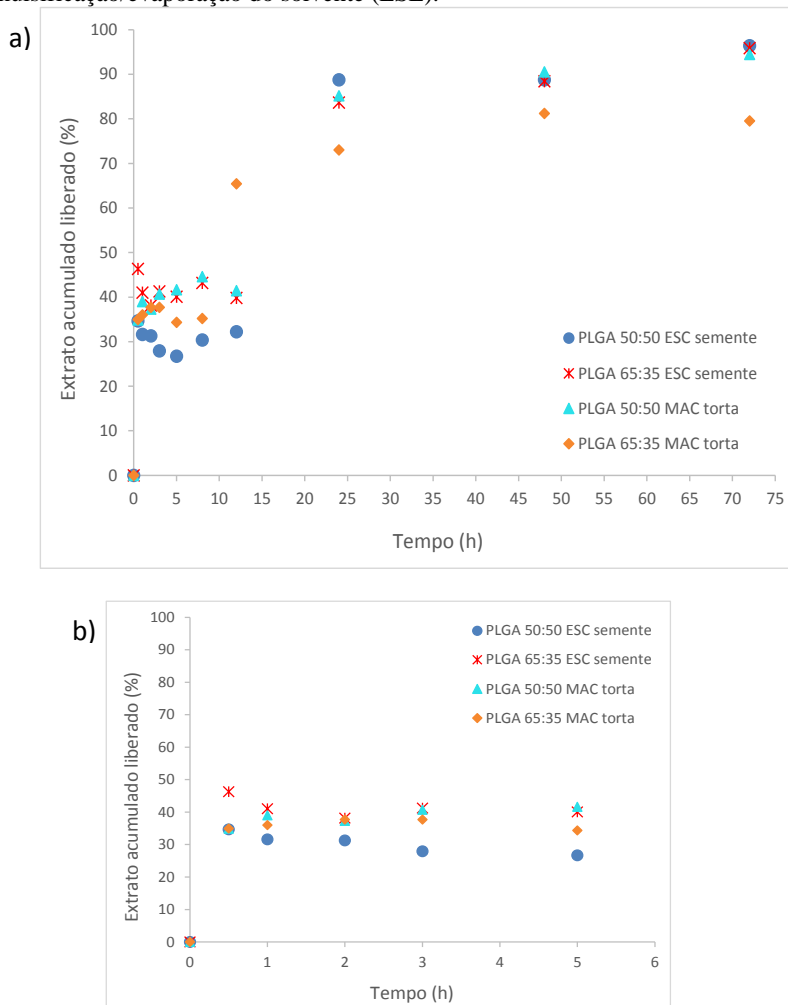


Figura 32. Perfil de liberação das partículas de PLGA 50:50 e PLGA 65:35 com extrato supercrítico de semente de maracujá e extrato de torta de semente de maceração com etanol e água (1:1, v/v) sintetizadas pelo processo de emulsificação/evaporação do solvente (ESE).



Em todos os ensaios foi observado um valor inicial de extrato liberado maior seguido de uma leve queda; assim como, a liberação de maior parte dos extratos nas primeiras 24h - entre 72 e 88 % pelas partículas ESE, e mais variado, entre 45 e 71 % para as amostras de

SAS - e após esse período, em geral, a liberação se manteve num patamar, aproximadamente.

A “explosão” (*burst*) inicial é bastante relatada na literatura e pode estar associada à presença de extrato nas proximidade da superfície das partículas ou pela existência de poros superficiais iniciais na matriz polimérica (WANG; WANG; SCHWENDEMAN, 2002; ZIGONEANU; ASTETE; SABLIOV, 2008). Após isso, no caso das partículas de SAS, há um crescimento gradual da quantidade de extrato liberado, que pode ser devido ao surgimento de poros na matriz polimérica pela penetração do meio, aliado a uma difusão progressiva desse componente no interior da partícula. Por outro lado, nessa etapa, o comportamento de liberação das partículas ESE difere das de SAS por ocorrer uma fase em que o percentual de extrato disperso no meio se mantém praticamente constante - chamada na literatura de fase “*lag*”, que estaria relacionada ao fechamento espontâneo de alguns poros iniciais e, principalmente, pela lenta difusão do extrato dentro da matriz polimérica (WANG; WANG; SCHWENDEMAN, 2002; ZIGONEANU; ASTETE; SABLIOV, 2008). A inexistência da fase *lag* no perfil das amostras de SAS pode ser efeito de uma maior porosidade em relação às partículas ESE. Depois dessa fase *lag* há uma liberação acelerada nas amostras de ESE, provavelmente causada pela erosão das partículas (MAKINO et al., 2000). Essa pode ser a razão de o percentual de extrato liberado pelas partículas sintetizadas por ESE ter sido maior que pelas precipitadas por SAS.

A literatura reporta que o tamanho das partículas afeta a liberação dos compostos de interesse (ASTETE; SABLIOV, 2006; STEVANOVIĆ; USKOKOVIĆ, 2009). Uma razão área superficial:volume mais elevada, devido a partículas menores ou mais porosas, implicaria maior penetração do meio de dispersão no interior das partículas e aceleração da difusão para a saída dos componentes de dentro dos poros (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008). Porém, não foi possível observar essa relação no presente trabalho.

O comportamento de liberação requerido (velocidade, *burst*, fase *lag*, etc.), depende do propósito das partículas. Considerando a aplicação das partículas aqui estudadas para aplicação dos extratos como antimicrobianos, o *burst* inicial dispersaria no meio uma concentração de extrato suficiente para inibir o início da fase de crescimento exponencial de microorganismos; depois disso, uma liberação gradativa em baixas concentrações manteria o efeito inibidor e evitaria seu crescimento (SILVA et al., 2014b), o que pode ser observado na

avaliação da atividade antimicrobiana apresentada a seguir no item 5.11.5.

5.11.5. Avaliação da atividade antimicrobiana das partículas

Todas as partículas obtidas pelos métodos SAS e ESE foram submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* (Gram-negativa) e *L. innocua* (Gram-positiva), conforme procedimento também aplicado aos extratos. Na Tabela 18 são apresentados os valores de CMI (concentração mínima inibitória) das amostras de partículas que inibiram o crescimento de ao menos uma das bactérias testadas em concentração equivalente de extrato. Essa concentração foi calculada para cada amostra de partículas considerando a quantidade inicial de extrato utilizado nos processos de síntese e os resultados de eficiência de encapsulamento obtidos para cada ensaio. As partículas formadas pela técnica SAS, com PLGA 50:50 e extrato supercrítico de semente de maracujá obtido a 150 bar/40 °C, foram testadas em concentração equivalente de extrato entre 4642 e 946 µg/mL, sem apresentarem inibição do crescimento das bactérias testadas. Todas as concentrações com efeito inibitório sobre as bactérias foram analisadas também para determinação da concentração mínima bactericida (CMB). Apenas as partículas geradas pelo método ESE com PLGA 65:35 e extrato supercrítico de semente de maracujá, foram bactericidas em uma concentração de 537 µg/mL.

A coprecipitação dos extratos por ESE com ambos os polímeros aumentou o efeito inibitório dos extratos contra os microorganismos testados. Puro, o extrato supercrítico de semente obtido a 150 bar/40 °C apresentou CMI de 8000 µg/mL contra *L. innocua* e não foi ativo contra *E. coli* na maior concentração utilizada nos experimentos (8000 µg/mL). As partículas desse extrato com PLGA 50:50 foram efetivas na prevenção do crescimento de ambas as bactérias, com CMI de 421 e 585 µg/mL, respectivamente; enquanto que suas partículas sintetizadas com PLGA 65:35, apesar de não evitarem o crescimento de *E. coli* nas concentrações testadas, foram ativas contra *L. innocua*, com CMI de 373 µg/mL e, ainda mais importante, CMB de 537 µg/mL. Pela comparação com o desempenho inibitório do extrato puro, a coprecipitação por ESE com PLGA 50:50 e PLGA 65:35 proporcionou uma redução de 19 e 21 vezes, respectivamente, na CMI do extrato ESC/150 bar/40 °C contra *L. innocua*.

Tabela 18. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) equivalente de extrato para as partículas de PLGA 50:50 e PLGA 65:35 obtidas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente com extratos de semente e de torta de semente de maracujá determinados pelo método de microdiluição para *Escherichia coli* e *Listeria innocua*.

Extrato coprecipitado	Polímero	CMI	
		(µg _{extrato coprecipitado} /mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
Semente ESC/150 bar/40 °C	PLGA 50:50	585	421
	PLGA 65:35	-	373
Torta/MAC/EtOH-H ₂ O	PLGA 50:50	226	226
	PLGA 65:35	261	188

Extrato coprecipitado	Polímero	CMB	
		(µg _{extrato coprecipitado} /mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
Semente ESC/150 bar/40 °C	PLGA 65:35	-	537

A concentração do extrato de torta de semente de maracujá - resultante da extração por maceração com a mistura EtOH-H₂O -, necessária para inibir o crescimento de ambas as bactérias testadas, foi reduzida 18 vezes no caso das partículas formadas com PLGA 50:50 - de 4000 µg/mL quando puro para 226 µg/mL depois de coprecipitado. Quanto a amostra elaborada com PLGA 65:35, a CMI equivalente de extrato foi 261 e 188 µg/mL contra *E. coli* e *L. innocua*, respectivamente, o que corresponde a uma redução de 15 e 21 vezes, respectivamente, em relação a CMI do extrato livre.

Silva et al. (2014b) estudaram a precipitação por ESE com PLGA 50:50 (de maior peso molecular que o aplicado no presente estudo) e PLGA 65:35 de extrato de semente de *Passiflora edulis* Sims obtido também por maceração em mistura de etanol e água (1:1, v/v) (por 24 h e com razão semente/solvente 1:10, m:v) e avaliaram sua ação contra *E. coli* K12 e *L. monocytogenes*. Esses autores reportaram valores de CMI em equivalente de extrato de 500 µg/mL contra *E. coli* K12, com ambos os polímeros, e 1000 e 350 µg/mL contra *L. monocytogenes*, com partículas de PLGA 50:50 e de PLGA 65:35, respectivamente.

Ambos os extratos puros apresentam baixa solubilidade em água, uma vez que mesmo com adição de 10 % de DMSO houve dificuldade para solubilizá-los, o que dificulta a interação dos compostos ativos com os microorganismo (RAVICHANDRAN et al., 2011). Da mesma forma, as partículas obtidas por SAS são insolúveis em solução aquosa, o que provavelmente está relacionado com o fato de não terem exibido nenhum efeito inibidor contra as bactérias testadas mesmo em maior concentração equivalente de extrato que as amostras de ESE. Estas últimas, por sua vez, solubilizaram facilmente em água, o que possivelmente proporciona maior a interação dos compostos ativos com os microorganismo, resultando na ampliação da atividade antimicrobiana dos extratos após sua coprecipitação com os polímeros. A literatura relata que o processo ESE pode favorecer a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meios hidrofílicos devido a matrix formada pela interconexão entre as cadeias de PLGA e PVA, através dos segmentos hidrofóbicos deste (ZIGONEANU; ASTETE; SABLIOV, 2008). Com isso, os segmentos hidrofílicos alternados da cadeia do PVA ficam expostos, o que contribui para a solubilização das partículas em meio aquoso.

Ainda, o bom desempenho das partículas sintetizadas por ESE poderia estar relacionado a um efeito sinérgico entre os materiais utilizados nesse processo e que não fizeram parte dos ensaios com SAS (trealose e PVA), apesar de essa hipótese ser menos provável, uma vez que partículas controle - compostas por todos os materiais com exceção dos extratos - também foram testadas nas mesmas concentrações das partículas e não apresentaram atividade contra *E. coli* e *L. innocua*.

A maior atividade dessas partículas pode também estar relacionada com um efeito protetor sobre os compostos antimicrobianos, uma vez que, no caso dos extratos puros, 24 h em condições aeróbias a 35 °C pode provocar degradação de compostos ativos presentes; enquanto que, conforme apresentado no estudo de perfil de liberação, seu desprendimento gradativo das partículas garantiu a manutenção de sua atividade por um maior período prevenindo o crescimento das bactérias testadas. Esses resultados indicam que a coprecipitação com PLGA é vantajosa por reduzir a concentração dos extratos necessária para inibir o crescimento desses microorganismos.

6. CONCLUSÕES

Os ensaios com CO₂ supercrítico puro como solvente apresentaram alguns dos melhores resultados obtidos de rendimento de extração de semente de maracujá. Considerando também outros estudos encontrados na literatura que indicam que o óleo obtido por SC-CO₂ apresenta padrão alimentício, esse processo pode ser considerado como boa opção para a produção de óleo de semente de maracujá de alta qualidade e livre de resíduos de solventes tanto para uso cosmético quanto alimentício, a partir desse subproduto das indústrias de suco de maracujá. Pela combinação dos resultados de rendimento e das atividades biológicas testadas, o extrato supercrítico de semente obtido a 150 bar e 40 °C foi selecionado para a continuidade do estudo com formação de partículas.

Da mesma forma, o uso do resíduo de semente de maracujá (a torta) como matéria-prima para a obtenção de extratos bioativos é promissor, devido à presença de antioxidantes e antimicrobianos nos extratos obtidos. Os extratos obtidos com a mistura de etanol e água (1:1, v/v) como solvente apresentaram considerável teor de compostos fenólicos total, capacidade antioxidante pelos três métodos avaliados e atividade antimicrobiana, com resultados superiores aos demais extratos e até mesmo ao BHT, em alguns casos. Assim, é possível indicar a mistura de etanol e água como melhor solvente entre os testados no presente trabalho para a realização de extrações nesse resíduo da produção industrial de óleo de semente de maracujá.

O comportamento de fases dos sistemas estudados apresentaram transições de fases do tipo líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-líquido-vapor, refletindo, assim, a complexidade do sistema estudado, principalmente relacionada à composição química multicomponente do extrato. A determinação desses equilíbrios foi de fundamental importância para a determinação das condições de temperatura e pressão para a precipitação/encapsulamento pelo processo do antissolvente supercrítico (SAS).

As análises realizadas nas partículas obtidas tanto por ESE quanto por SAS indicaram a ocorrência efetiva de encapsulamento, liberação controlada e formato esférico na maior parte das amostras. Os tamanhos de partículas variaram entre 355 e 1498 nm, e a eficiência de encapsulamento entre 23,8 e 91 % para todos os ensaios. Por uma combinação entre os resultados de tamanho e morfologia de partículas e eficiência de encapsulamento, a temperatura de 35 °C parece ser mais indicada que 45 °C para a precipitação de extrato supercrítico de

semente de maracujá com PLGA 50:50 por SAS. Enquanto os resultados da técnica ESE parecem indicar o PLGA 65:35 como mais adequado para a formação de partículas de extrato de semente de maracujá. Para o extrato de torta obtido por MAC/EtOH-H₂O a eficiência de encapsulamento foi bastante inferior ao do extrato supercrítico de semente, provavelmente por ser menos hidrofóbico e interagir menos com o PLGA.

O perfil de liberação de todas as amostras foi caracterizado por uma elevada quantidade inicial de extrato sendo dispersada no meio, seguido por uma liberação controlada ao longo do tempo. Entre 48 e 96 % do extrato efetivamente co-precipitado foi liberado em 72 h, dependendo da amostra, sendo maior o percentual de extrato liberado pelas partículas sintetizadas por ESE que pelas precipitadas por SAS.

A inibição do crescimento dos microorganismos testados foi notadamente ampliada para ambos os extratos pelo encapsulamento por ESE com os dois tipos de PLGA (50:50 e 65:35), enquanto as amostras precipitadas por SAS não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, provavelmente devido à baixa solubilidade em meio aquoso.

Por uma combinação de todos os resultados, pode-se sugerir a condição a 92,5 % CO₂, 35 °C e 90 bar (SAS 1) para a precipitação de extrato de semente de maracujá pelo processo com antissolvente supercrítico. Quanto aos dois tipos de PLGA empregados, 50:50 e 65:35, este último seria mais adequado para a formação de partículas de extrato de semente de maracujá pela sua eficiência de encapsulamento, uma vez que os resultados das demais avaliações foram semelhantes para esses dois polímeros. No caso do método de emulsificação e evaporação do solvente, ainda que a eficiência de encapsulamento do extrato de maceração de torta testado tenha sido baixa, o processo mostrou-se vantajoso pelo forte efeito antimicrobiano das partículas.

Considerando o grande volume de suco de maracujá amarelo produzido no Brasil e o pequeno número de estudos envolvendo o uso de seus resíduos encontrados na literatura, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o reaproveitamento desses subprodutos apresenta potencial para a geração de outros produtos com valor agregado através da continuidade e direcionamento das pesquisas para o seu desenvolvimento e aplicação prática.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da avaliação dos resultados apresentados neste trabalho podem ser sugeridos alguns pontos para serem desenvolvidos em trabalhos futuros:

- ✓ Avaliação da atividade antioxidante do extrato de torta obtido utilizando metodologias *in vivo* e/ou aplicações em sistemas reais, como alimentos.
- ✓ Determinação do perfil químico dos extratos para isolamento das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas detectadas.
- ✓ Estudar a ampliação de escala, para prever o comportamento do processo de ESC de semente de maracujá em maior escala;
- ✓ Aplicação de SAS com PLGA 65:35;
- ✓ Aplicação de SAS de emulsão (SFEE) com a utilização de PVA ou algum outro emulsificante que possa melhorar a solubilidade das partículas em água;
- ✓ Variar as razões extrato: solvente orgânico e polímero:solvente orgânico na processo SAS e/ou SFEE e avaliar seu efeito nas características das partículas, eficiência de processo e perfil de liberação;
- ✓ Testar diferentes polímeros para melhorar a eficiência de encapsulamento do extrato de torta de semente de maracujá de maceração com etanol e água (1:1, v/v) por seu potencial biológico; Estudar a solubilidade das partículas obtidas em diferentes meios de liberação de acordo com diferentes possibilidades de aplicação.

REFERÊNCIAS

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

ADIL, I. H.; ÇETIN, H. I.; YENER, M. E.; BAYINDIRLI, A. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 55-63, 2007.

AGIZZIO, A. P.; CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F. F.; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, p. 515-522, 2006.

ANDERSON, J.; SHIVE, M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 5-24, 1997.

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

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K.; ÖZYURT, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12(7), p. 1496-1547, 2007.

ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v. 17, n. 3, p. 247-289, 2006.

AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; SIDDIQUI, W., et al. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44(7), p. 1866-1874, 2011.

AYMONIER, C.; SERANI, A.L.; REVERÓN, H.; GARRABOS, Y.; CANSELL, F. Review of supercritical fluids in inorganic materials science. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 242–251, 2006.

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, n. 1, p. 191-203, 2006.

BENDER, J. P. **Equilíbrio de Fases de Polímeros Biocompatíveis e Monômeros: Dados Experimentais e Modelagem**. Dissertação de mestrado, Departamento de Ciências Agrárias, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI- Campus de Erechim, 2008.

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 132-140, 2010.

BENELLI, P. **Obtenção de extratos bioativos de folhas de *Casearia sylvestris* e encapsulamento em biopolímero utilizando a tecnologia supercrítica**. Florianópolis: UFSC, 2014. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

BENELLI, P.; ROSSO COMIM, S. R.; OLIVEIRA, J. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Phase equilibrium data of guaçatonga (*Casearia sylvestris*) extract + ethanol + CO₂ system and encapsulation using a supercritical anti-solvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 103-111, 2014.

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

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica, *Cosmetics & Toiletries*, v. 15 (5), p. 46-49, 2003.

BLOMHOFF, R.; CARLSEN, M. H.; ANDERSEN, L. F.; JACOBS, D. R. Health benefit of nuts: Potential role of antioxidants. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, S52–S60, 2006.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v. 66, p. 209-215, 1999.

BORGES, L. L.; LUCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7(12), p. 1-20, 2011.

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

BRANDT, A. L.; CASTILLO, A.; HARRIS, K. B.; KEETON, J. T.; HARDIN, M. D.; TAYLOR, T. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **J. Food Science**, v. 75, n. 9, p. M557–63, 2010.

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

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. Darmstadt:Steinkopff, 1994.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, p. 219-224, 1997.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e**

modelagem matemática. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S.; MICHELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 163-170, 2005.

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

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; DE LA OSSA, E. M. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 43-49, 2007.

CEASA MINAS. Acessado em 07/01/2014. Disponível em: <http://www.ceasaminas.com.br/agroqualidademaracuja.asp>.

CHAROENSEMBUT-AMON, A.; MARTIN, J.; KOBAYASHI, J. R. **Fluid Phase Equil.** v.31, p.89-104, 1986.

CHAU, C. F; HUANG, Y. L. Characterization of passion fruit seed fibers - a potential fiber source. **Food Chemistry**, v. 85, p. 189-194, 2004.

CHAU, C. F; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 49, p. 786-790, 2005.

CHEN, S. J.; RADOSZ, M. Density-turned polyolefin phase equilibria. 1. Binary solutions of alternating poly(ethylene-propylene) in subcritical and supercritical propylene, 1-butene and hexane. Experimental and Flory Patterson model. **Macromolecules**, v. 25, p. 3089-3096, 1992.

CHEN, C.; CHANG, C. J.; YANG, P. Vapor-liquid equilibria of carbon dioxide with linoleic acid, α -tocoferol, and triolein at elevated pressures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 175, p. 107-115, 2000.

COCERO, M. J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 47, p. 546-555, 2009.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, p. 2047-2053, 2011.

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

CORTESI, A.; KIKIC, I.; ALESSI, P.; TURTOI, G.; GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 139-144, 1999.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. **O maracujá e suas propriedades medicinais estado de arte**. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 20, p. 475-506, 2005.

COUTO, P. G. **Óleo da Semente de Maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*, Deg): caracterização, estabilidade e análise sensorial**. 1996. 77f. Tese (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.

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

DANIELSKI, L.; ZETZL, C.; HENSE, H.; BRUNNER, G. A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 133-141, 2005.

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-CO₂ and composition profile. *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, p. 99-106, 2007.

DARIVA, C. **Equilíbrio de Fases a Altas Pressões em Sistemas com Prolipropilenos. Dados Experimentais e Modelagem SAFT.** Rio de Janeiro: COPPE/UF RJ, 2000. Tese (Doutorado), Programa de Engenharia Química - PEQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

DEL VALLE, J. M.; GERMAIN, J. C.; UQUICHE, E.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. Microstructural effects on internal mass transfer of lipids in prepressed and flaked vegetable substrates. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 178-190, 2006.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, v. 94, p. 1-23, 2004.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DOHRN, R.; BRUNNER, G. High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1988-1993). *Fluid Phase Equilibria*, v. 106 (1-2), p. 213-282, 1995.

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

EMBRAPA. Perguntas e respostas: maracujá. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-maracuja.php>. Acessado em 30 jul. 2012.

- ENGESOLUTIONS. Disponível em: <<http://www.engesolutions.com.br/artigosnews/folder%20sonochemi.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2010.
- EVANS, C. A. R.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p.152-159, 1996.
- FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J-J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219-226, 2004.
- FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: aproveitamento das sementes. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.
- FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum*L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-45, 1999.
- FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 263-9, 2002.
- FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, C. G.; FAZA, L. P.; ALMEIDA, A.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L.; GRAZUL, R. M.; LE HYARIC, M. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. **Molecules**, v. 16, p. 5875-5885, 2011.
- FERRIGNI, N. R.; MCLAUGHLIN, J. L.; POWELL, R. G.; SMITH JR., C. R. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. **J. Natural Products**, v. 47, p. 347-352, 1984.
- FILIP, V.; PLOCKOVÁ, M.; ŠMIDRKAL, J.; ŠPICKOVÁ, Z.; MELZOCH, K.; SCHMIDT, Š. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry**, v. 83, p. 585-593, 2003.

FIORI, L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 43-54, 2007.

FORNARI, R. E.; ALESSI, P.; KIKIC, I., High pressure fluid phase equilibria: Experimental methods and systems investigated. **Fluid Phase Equilibria**, v. 57, p. 1978-1987, 1990.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M. H.; TRES, M. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 8-20, 2008a.

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008b.

FRANCESCHI, E. **Precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica**. Florianópolis: UFSC, 2009. Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656-663, 2009.

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

GALATO, D. **Correlação entre os dados eletroquímicos, fotométricos e de cálculos teóricos obtidos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos**. Florianópolis, 2004. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

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

GHOSH, S. **Functional Coatings**. Weinheim: Wiley, 2006.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. **J. of Food Science**, v. 76 (2), p. N16-N24, 2011.

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

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

GOTO, M.; ROY, B. C.; KODAMA, A.; HIROSE, T. Modeling Supercritical Fluid Extraction Process Involving Solute-Solid Interaction. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 31(2), p. 171-177, 1998.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417-423, 2005.

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

HILL, L. E.; TAYLOR, M.; GOMES, C. L. Antimicrobial Efficacy of Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped Cinnamon Bark Extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Science**, v. 78 (4), p. N626-N632, 2013.

HOUCHIN, M. L.; TOPP, E. M. Physical properties of PLGA films during polymer degradation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, p. 2848–2854, 2009.

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

IBGE. Prod. agric. munic., Rio de Janeiro, v. 39, p.1-101, 2012. Disponível em: ([ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2012/pam2012.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2012/pam2012.pdf))

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

JONG, H.; BORM, J. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3(2), p.133-49, 2008.

JOSHI, G.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Enhanced bioavailability and intestinal uptake of Gemcitabine HCl loaded PLGA nanoparticles after oral delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 80-89, 2014.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p.179-219, 2001.

JUNQUEIRA-GUERTZENSTEIN, S. M. Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) amarelo na alimentação de ratos (*Rattus norvegicus*) normal e diabéticos. **Revista Cadernos do Centro Universitário São Camilo**, v. 10, p. 213-218, 2002.

KALOGIANNIS, C.G.; MICHAIOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of amoxicillin in poli (L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 8738-8743, 2006.

KALT, W.; RYAN, D. A. J.; DUY, J. C.; PRIOR, R. L.; EHLENFELDT, M. K.; VANDER KLOET, S. P. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity among genotypes of

high bush and low bush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 49, p. 4761-4767, 2001.

KATALINIC, V.; MOZINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIC, I.; ABRAMOVIC, H.; MILOS, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715-723, 2010.

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

KIM, E. J.; PARK, H.; PARK, S. Y.; JUN, J. G.; PARK, J. H. Y. The grape component piceatannol induces apoptosis in DU145 human prostate cancer cells via the activation of extrinsic and intrinsic pathways. **J. Med. Food**, v. 12, p. 943–951, 2009.

KIRAN, E.; LIU, K.; RAMSDELL, K. Morphological changes in poly([epsilon]-caprolactone) in dense carbon dioxide. **Polymer**, v. 49, p. 1853-1859, 2008.

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

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA JR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.

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

KONTOGEOGRIS, G. M.; SARAIVA, A.; FREDENSLUND, A.; TASSIOS, D. P. Prediction of liquid-liquid equilibrium for binary polymer solutions with simple activity coefficient models. **Ind. Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 1823-1834, 1995.

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

KUO, P. L.; HSU, Y. L. The grape and wine constituent piceatannol inhibits proliferation of human bladder cancer cells via blocking cell cycle progression and inducing Fas/membrane bound Fas ligand-mediated apoptotic pathway. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 52, p. 408-418, 2008.

LANZA, M. **Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão**. Erechim: URI, 2004. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ciências Agrárias, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2004.

LANZA, M. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas reacionais de etanolise e glicerólise**. Campinas: UNICAMP, 2008. Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

LEE, M. L.; MARKIDES, K. E. **Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction**. Chromatography Conferences, Provo, UT, 1990.

LEE, Y. M.; LIM, D. Y.; CHO, H. J.; SEON, M. R.; KIM, J.-K.; LEE, B.-Y.; PARK, J. H. Y. Piceatannol, a natural stilbene from grapes, induces G1 cell cycle arrest in androgen-insensitive DU145 human prostate cancer cells via the inhibition of CDK activity. **Cancer Letters**, v. 285, p. 166-173, 2009.

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

- LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, p. 731-8, 2004.
- LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 26-39, 2008.
- LIN, C.; NG, K. M.; WIBOWO, C. Production nanoparticles using precipitation with compressed antisolvent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 3580-3589, 2007.
- LIRA FILHO, J. F. **Utilização da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*, *Degener*) na produção de geléia**, 1995. 131 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1995.
- LIU, S.; YANG, F.; LI, J.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P. Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China. **Internat. J. of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 706-715, 2008.
- LIU, S.; YANG, F.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P.; DENG, C. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. **J. of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 9-14, 2009.
- LOULI, V.; RAGOISSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 201-208, 2004.
- LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.
- MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 5682-5690, 2008.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 137–144, 2005.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers (Basel)**, v. 3(3), p. 1377–1397, 2011.

MAKINO, K.; MOGI, T.; OHTAKE, N.; YOSHIDA, M.; ANDO, S.; NAKAJIMA, T.; OHSHIMA, H. Pulsatile drug release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres: how does the composition of the polymer matrices affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs? **Colloids and Surfaces. B**, v. 19, p. 173–179, 2000.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 127-134, 2012.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. Md. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-496, 2007.

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 339-350, 2008.

MARTÍN, Á.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M. J. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils, **Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 31, 2010.

MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; CORRÊA, C. B.; ALENCAR, S. M.; GLORIA, E. M.; CABRAL, I. S. R.; AQUINO, L. M. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 27-36, 2012.

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. **Ind. Eng. of Chemistry Res.**, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

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

MASON, T. J.; PANIWNKYK, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 253-260, 1996.

MATHIOWITZ, E.; KREITZ, M. R.; PEPPAS, L. B. Microencapsulation. In: MATHIOWITZ, E. (Ed.). **Encyclopedia of controlled drug delivery**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.

MATTEA, F.; MARTÍN, A.; MATÍAS-GAGO, A.; COCERO, M. J. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: β -Carotene nanoparticle formation. **J. of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 238-247, 2009.

MATSUI, Y.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 11112-11118, 2010.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal Agric. Food Chem**, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002.

McHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**. Butterworth-Heinemann, 2. ed., 1994.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Porto

Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, Volume Especial, E. 083-091, Outubro 2011.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

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

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 10-60, 2009.

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

MEZZOMO, N. **Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão.** Florianópolis: UFSC, 2012. Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MEZZOMO, N.; PAZ, E.; MARASCHIN, M.; MARTÍN, Á.; MARIA JOSÉ COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 342-349, 2012.

MEZZOMO, N.; COMIM, S. R. R.; CAMPOS, C. E. M.; FERREIRA, S. R. S. Nanosizing of sodium ibuprofen by SAS method. **Powder Technology**, v. 270, p. 378-386, 2015.

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

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

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

MIGUEL, F.; MARTÍN, Á.; GAMSE, T.; COCERO, M. J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 225-235, 2006.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; COCERO, M. J. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1594-1602, 2008.

MOHANRAJ, M. J.; CHEN, Y. Nanoparticles: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5(1), p.561-73, 2006.

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

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MU, L.; FENG, S. S. PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: Effects of the emulsifier and drug loading ratio. **Pharmaceutical Research**, v. 20(11), p. 1864-1872, 2003.

MULET, A., CÁRCEL, J. A., SANJUÁN, N., BON, J. New food drying technologies-Use of ultrasound. **Food Science and Technology International**, v. 9, p. 215-221, 2003.

NAKAJIMA, K.; TAGUCHI, H.; ENDO, T.; YOSIOKA, I. The constituents of *Scirpus fluviatilis* (Torr.) A. Gray. I. The structures of two new hydroxystilbene dimers, Scirpusin A and B. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 3050-3057, 1978.

NDIAYE, M.; KUMAR, R.; AHMAD, N. Resveratrol in cancer management. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1215, p. 144-149, 2011.

OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; PINTO, J. C. High-Pressure Phase Equilibria for Polypropylene-Hydrocarbon Systems. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 39, p. 4627-4633, 2000.

OLIVEIRA, L. M. Benefícios comprovados de óleos brasileiros. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15 (5), p. 50-55, 2003.

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

OLIVEIRA, E. M. S.; REGIS, S. A.; RESENDE, E. D. Caracterização dos resíduos da polpa do maracujá-amarelo. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 725-730, 2011.

OLIVEIRA, D. A.; SALVADOR, A. A.; SMÂNIA JR., A.; SMÂNIA, E. F. A.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace

extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, 164 (3), 2013, 423-432.

OLIVEIRA, R. C.; BARROS, S. T. D.; GIMENES, M. L. The extraction of passion fruit oil with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 458-463, 2013.

OTAGAKI, K. K.; MATSUMOTO, H. Nutritive Values and Utility of Passion Fruit By-products. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 54-57, 1958.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T.; VARELA, R. M.; CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 5044-5048, 1999.

PARK, T. G. Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight. **J Control Release**, v. 30, p. 161-173, 1994.

PATEL, A. K.; BAJPAI, R.; KELLER, J. M. On the crystallinity of PVA/palm leaf biocomposite using DSC and XRD techniques. **Microsyst Technol**, v. 20, p. 41-49, 2014.

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

PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. Ribeirão Preto: USP, 2011. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

PÉREZ DE DIEGO, Y.; WUBBOLTS, F. E.; WITKAMPA, G. J.; DE LOOSB, TH. W.; JANSSENS, P. J. Measurements of the phase behaviour of the system dextran/ DMSO/CO₂ at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 1-9, 2005.

PHENOMENEX. **HPLC Column protection guide - Version 0113**, 2013.

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

PIOTROWSKA, H.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. **Mutation Research**, v. 750, p. 60–82, 2012.

POTTER, G. A.; PATTERSON, L. H.; WANOGHO, E.; PERRY, P. J.; BUTLER, P. C.; IJAZ, T.; RUPARELIA, K. C.; LAMB, J. H.; FARMER, P. B.; STANLEY, L. A.; BURKE, M. D. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. **Br. J. Cancer**, v. 86, p. 774– 778, 2002.

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

PRAUSNITZ, J. M.; LICHTENTHALER R. N.; AZEVEDO, E. G. **Molecular thermodynamics of fluid phase equilibria**, 3 ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, N. M., 1999.

RANJIT, K.; BAQUEE, A. A. Nanoparticle: an overview of preparation, characterization and preparation. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4 (4), p. 47-57, 2013.

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

RAVICHANDRAN, M.; HETTIARACHCY, N. S.; GANESH, V.; RICKE, S. C.; SINGH, S. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken meat system. **Journal of Food Safety**, v. 31, p. 462–471, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; EVANS, C. R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26(9-10), p. 1231-1237, 1999.

REICHARDT, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. **Chem. Rev.**, v. 94, p. 2319-2358, 1994.

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.

REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G.; FALIVENE, M. G. Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, p.239-248, 2000.

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

REVERCHON, E.; CAPUTO, G.; DE MARCO, I. Role of Phase Behavior and Atomization in the Supercritical Antisolvent Precipitation. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 42, p. 6406-6414, 2003.

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

REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; TORINO, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 126-138, 2007.

REVERCHON, E.; TORINO, E.; DOWY, S.; BRAEUER, A.; LEIPERTZ, A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer during supercritical antisolvent micronization. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 446-458, 2010.

- REVILLA, E.; ALONSO, E.; KOVAC, V. The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices. **Wine**, v. 661, p. 69-80, 1997.
- ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28 (Supl.), p. 238-244, 2008.
- ROE, K. D.; LABUZA, T. P. Glass Transition and Crystallization of Amorphous Trehalose-sucrose Mixtures. **International Journal of Food Properties**, v. 8(3), p. 559-574, 2005.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American J. Enology Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- ROSSO, S. R. **Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana: Caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos**. Florianópolis: UFSC, 2009. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- ROWLINSON, J. S.; SWINTON, F. L. **Liquids and liquid mixtures**. 3 ed., Butterworth's, London, 1982.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407-412, 1999.
- SANO, S.; SUGIYAMA, K.; ITO, T.; KATANO, Y.; ISHIHATA, A. Identification of the Strong Vasorelaxing Substance Scirpusin B, a Dimer of Piceatannol, from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 6209-6213, 2011.

SANSDRAP, P.; MOES, A. J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. **J. Control. Release**, v. 43, p. 47-58, 1997.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Total phenolic content, Free radical scavenging and antimicrobial activities of *Passiflora subpeltata* seeds. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3 (04), p. 067-072, 2013.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

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

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

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-37, 2003.

SCOTT, R. L.; VAN KONYNENBURG, P. H. Static Properties of Solutions: Van der Waals and Related Models for Hydrocarbon Mixtures. **Discuss. Faraday Soc.**, v. 49, p. 87-97, 1970.

SHOKO, T.; SOICHI, T.; MEGUMI, M. M.; ERI, F.; JUN, K.; MICHIKO, W. Isolation and identification of an antibacterial compound from grape and its application to foods. **Nippon Nogekagaku Kaishi**, v. 73, p. 125-128, 1999.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Bras. de Ciências Farmacêuticas**, v. 39(1), p. 1-20, 2003.

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

SILVA, T. L.; BERNARDO, E. C.; NOBRE, B.; MENDES, R. L.; REIS, A. Extraction of Victoria and Red Globe grape seed oils using supercritical carbon dioxide with and without ethanol. **Journal of Food Lipids**, v. 15, p. 356-369, 2008.

SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014a.

SILVA, L. M.; HILL, L. E.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, C. L. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 165, p. 362-370, 2014b.

SMÂNIA JR., A., DELLE MONACHE, F., SMÂNIA, E. F. A., CUNEO, R. S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphylophoromycetidae) fruit body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 325-330, 1999.

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

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

SOUZA, A. C. G.; SANDI, D. **Industrialização**. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. Maracujá. Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, Mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001.

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

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

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

STEVANOVIĆ, M. M.; USKOKOVIĆ, D. P. Poly(lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins. **Current Nanoscience**, v. 5(1), p. 1-14, 2009.

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

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 35, n. 6, p. 1029-1031, 1989.

THIES, C. **Microencapsulation: Methods and industrial applications**. New York: Marel Dekker, 1996.

TIWARI, R.; TAKHISTOV, P. **Nanotechnology Research Methods for Food and Bioproducts**. Padua, Jon Wiley and Sons, 2012.

TOCCHINI, R. P. **III Processamento: produtos, Caracterização e Utilização. In: Maracujá: cultura, matéria-prima e aspectos econômicos**. 2. ed. Revista e ampliada. Campinas: Ital, 1994. p. 161-175.

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

TSIVINTZELIS, I.; MISSOPOLINO, D.; KALOGIANNIS, K.; PANAYIOTOU, C. Phase compositions and saturated densities for the binary systems of carbon dioxide with ethanol and dichloromethane. **Fluid Phase Equilibria**, v. 224, p. 89-96, 2004.

UNIQUE. Disponível em: <<http://www.unique.ind.br/desruptor.html>>. Acesso em: 28 set. 2010.

VACIRCA, D.; BARBATI, C.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R.; ROSANO, G.; MALORNI, W.; ORTONA, E. Anti-ATP Synthase Autoantibodies from Patients with Alzheimer's Disease Reduce Extracellular HDL Level. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 26, n. 3, p. 441-445, 2011.

VAN KONYNENBURG, P. H., SCOTT, R. L. Critical lines and phase equilibria in binary Van der Waals mixtures, **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 298, p. 495-540, 1980.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, vegetables, and grain products. **Journal Agric. Food Chem**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

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

VO, N. T. P.; MADLENER, S.; BAGO-HORVATH, Z.; HERBACEK, I.; STARK, N.; GRIDLING, M.; PROBST, P.; GIESSRIGL, B.; BAUER, S.; VONACH, C.; SAIKO, P.; GRUSCH, M.; SZEKERES, T.; FRITZER-SZEKERES, M.; JÄGER, W.; KRUPITZA, G.; SOLEIMAN, A.. Pro- and anti-carcinogenic mechanisms of piceatannol are activated dose-dependently in MCF-7 breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 12, p. 2074-2081, 2010.

WANG, J.; WANG, B. M.; SCHWENDEMAN, S. P. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. **J. Controlled Release**, v. 82, p. 289–307, 2002.

WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, p. 237-243, 2004.

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

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/ solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 298–327, 2008.

WU, X. S.; WANG, N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers, Part II: Biodegradation. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 12, p. 21-34, 2001.

WU, L.-S.; WANG, X.-J.; WANG, H.; YANG, H.-W.; JIA, A.-Q.; DING, Q. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 460-464, 2010.

XIANG, T.; UNO, T.; OGINO, F.; AI, C.; DUO, J.; SANKAWA, U. Antioxidant constituents of *Caragana tibetica*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, p. 1204-1206, 2005.

YANG, G.-X.; ZHOU, J.-T.; LI, Y.-Z.; HU, C.-Q. Anti-HIV bioactive stilbene dimmers of *Caragana rosea*. **Planta Med**, v. 71, p. 569-571, 2005.

YEO, S. D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 287-308, 2005.

YIM, N.; HA, D. T.; TRUNG, T. N.; KIM, J. P.; LEE, S.; NA, M.; JUNG, H.; KIM, H. S.; KIM, Y. H.; BAE, K. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 1165-1168, 2010.

ZAHEDI, G.; AZARPOUR, A. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil. **J. of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 40-48, 2011.

ZHENG, C. J.; YOO, J. S.; LEE, T. G.; CHO, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, W. G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 5157-5162, 2005.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20/3, p. 459-471, 2010.

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

ZHONG, M.; BUXING, HAN A. B.; YAN, H.; PENG, D. Effect of ethanol and n-octane on the solubility of stearic acid in the supercritical CO₂. **Fluid Phase Equilibria**, v. 134, p.175-183, 1997.

ZIGONEANU, I. G.; ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release. **Nanotechnology**, v. 19, p. 1-8, 2008.

ANEXO I – MODELOS MATEMÁTICOS

Modelo difusional de Crank (1975)

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

Resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula e aplicando a segunda Lei de Fick para difusão, tem-se a Equação 14 que representa a massa de soluto que se difunde através de uma partícula (MEZZOMO, 2008; MICHELIN, 2009).

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2\pi^2 Dt}{r^2}\right) \right] \quad (14)$$

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

Modelo de Dessorção de Tan e Liou (1989)

O modelo de dessorção apresentado por Tan e Liou (1989) é baseado no balanço de massa do processo considerando apenas o termo convectivo sem o termo de dispersão. Este modelo considera a transferência de massa interfacial como um modelo cinético de primeira ordem, ou seja, a taxa de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida, sendo a transferência de massa interfacial representada pela constante de dessorção (k_d). O modelo de dessorção considera a unidade de extração como um leito cilíndrico no qual o sólido, devidamente pré-tratado (seco e moído), é acomodado; e o solvente, com pressão e temperatura fixas flui axialmente através do leito, retirando do sólido os compostos de interesse. Dessa forma, na

saída do leito, tem-se o extrato, formado pelos compostos solubilizados no CO₂ supercrítico (MARTÍNEZ, 2005).

A massa de extrato na saída do extrator em função do tempo de extração é representada pela Equação 15.

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{A}{k_d} [1 - \exp(k_d B)]. [\exp(-k_d t) - 1] \quad (15)$$

Sendo:

$$A = Q_{CO_2} \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \quad (16)$$

$$B = \frac{\varepsilon H}{u} = \frac{\varepsilon H S \rho_f}{Q_{CO_2}} \quad (17)$$

onde k_d é a constante de dessorção, H é o comprimento do leito (m), S é a área da seção transversal (m²), ρ_s é a densidade do sólido (kg/m³), ρ_f é a densidade da fase fluida (kg/m³), ε é a porosidade do leito.

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

O modelo de placa, proposto por Gaspar et al. (2003) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor assim como o modelo proposto por Crank (1975) e também é um modelo difusional. A diferença entre estes dois modelos está na geometria considerada em cada modelo, ou seja, no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placas, enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas. O modelo SSP ainda assume que a concentração de soluto na fase fluida é desprezível quando comparada à concentração na fase sólida, que a resistência à transferência de massa na fase fluida é desprezada e que o balanço de massa na fase fluida é negligenciado (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008).

Ao se aplicar a segunda Lei de Fick para a difusão e resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula, a massa de extrato obtida com o tempo é representada pela Equação 18 proposta por Gaspar et al. (2003), com modificação apresentada por Campos et al. (2005).

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \sum_0^{\infty} \frac{0,8}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-D_m (2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad (18)$$

onde m_{ext} é a massa de extrato (kg); m_0 , é a massa inicial de soluto (kg); D_m , é a difusividade na matriz sólida (m^2/min); t , é o tempo (min); δ é a meia espessura das partículas (placas) (m) e n é um número inteiro (MEZZOMO, 2008).

Modelo logístico de Martínez et al. (2003)

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

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

Em princípio, o modelo logístico possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis: A_i , b_i e t_{mi} . Se a composição do óleo tiver sido determinada experimentalmente, é possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos, conforme apresentado na Equação 19. 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 20.

$$m_{ti} = \frac{\%m_t}{100} = x_{0i} m_t \quad (19)$$

$$m_i(h = H, t) = \frac{x_{0i} m_t}{\exp(b_i t_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad (20)$$

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

A Equação 21 representa a curva de extração obtida pelo modelo de Martínez et al. (2003) para um único grupo de componentes.

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{m_t}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad (21)$$

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

Modelo de Sovová (1994)

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

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

interna da partícula pode não estar acessível ao solvente (REVERCHON; MARRONE, 2001).

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

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

A curva de extração obtida pelo modelo de Sovová (1994) é representada pelas Equações 22, 23 e 24, com a massa total de extrato obtida na saída do extrator, em função do tempo.

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

$$m_{ext} = Y^*[1 - \exp(-Z)]Q_{CO_2}t \quad (22)$$

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

$$m_{ext} = Y^*[t - t_{CER} \exp(z_w - Z)]Q_{CO_2} \quad (23)$$

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

$$m_{ext} = N \left\langle x_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{W x_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\left(\frac{W Q_{CO_2}}{N} \right) (t_{CER} - t) \right] \frac{x_k}{x_0} \right\} \right\rangle \quad (24)$$

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

Nas equações do modelo de Sovová pode-se dizer que a quantidade Z , apresentada na Equação 25, é um parâmetro para o período CER porque essa quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER.

$$Z = \frac{N k_{Ya} \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (25)$$

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

Para a resolução do modelo de Sovová (1994), é necessário conhecer alguns parâmetros: M_{CER} , taxa de extração na etapa CER (kg/min); Y_{CER} , razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg_{Extrato}/kg_{CO2}); t_{CER} , duração da etapa CER (min) (CAMPOS, 2005). O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e, a partir dele, obtêm-se o valor de Y_{CER} através da Equação 26.

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad (26)$$

As demais restrições e definições são descritas pelas Equações 27 a 30:

$$t_{CER} = \frac{x_0 - x_k}{Y^* Z} \cdot \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad (27)$$

$$W = \frac{Nk_{Xa}}{Q_{CO_2}(1 - \varepsilon)} = k \frac{ZY^*}{x_k} \quad (28)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{Wx_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \cdot \exp[(WQ_{CO_2}/N)(t - t_{CER}) - x_k]}{x_0 - x_k} \right\} \quad (29)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2}} \ln \left[\frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(Wx_0/Y^*)}{x_0} \right] \quad (30)$$

Os parâmetros k_{Xa} e k_{Ya} são, respectivamente, os coeficientes de transferência de massa na fase fluida e fase sólida (min^{-1}), e são definidos pelas Equações 31 a 35:

$$k_{Ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} SH \overline{\Delta Y}} \quad (31)$$

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya} \rho_{CO_2} \overline{\Delta Y}}{\rho_s \Delta X} \quad (32)$$

$$\Delta X = \frac{(x_p + x_k)}{2} \quad (33)$$

$$x_p = x_0 + x_k \quad (34)$$

$$\overline{\Delta Y} = \frac{Y_{CER}}{\ln \left(\frac{Y^*}{Y^* - Y_{CER}} \right)} \quad (35)$$

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