



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

KÁTIA SUZANA ANDRADE
Engenheira de Alimentos (UFSC 2008/2)
Mestre em Engenharia de Alimentos (UFSC/2011)

**EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS
DE INTERESSE BIOLÓGICO PROVENIENTES DE PIMENTA-
DO-REINO (*Piper nigrum* L.) E DE PIMENTA ROSA (*Schinus
terebinthifolius* R.)**

**FLORIANÓPOLIS, SC
2015**

Kátia Suzana Andrade

**EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS
DE INTERESSE BIOLÓGICO PROVENIENTES DE PIMENTA-
DO-REINO (*Piper nigrum* L.) E DE PIMENTA ROSA (*Schinus
terebinthifolius* R.)**

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

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

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

Florianópolis
2015

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

Andrade, Kátia Suzana

Extração e Microencapsulamento de Extratos de Interesse Biológico Provenientes de Pimenta-do-Reino (*Piper nigrum* L.) e de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius* R.)/ Kátia Suzana Andrade; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira –Florianópolis, SC, 2015

164 p.

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

Inclui referência

1. Engenharia de Alimentos. 2. tecnologia supercrítica. 3. antioxidantes. 4. equilíbrio de fases. 5. *Schinus terebinthifolius*. 6. *Piper nigrum*. I. Salvador Ferreira, Sandra Regina. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

Kátia Suzana Andrade

EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS DE INTERESSE BIOLÓGICO PROVENIENTES DE PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.) E DE PIMENTA ROSA (*Schinus terebinthifolius* R.)

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

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

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Camila Gambini Pereira

Prof. Dr. Eduardo Cassel

Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa

Prof. Dr. Marcelo Lanza

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis, 21 de maio de 2015.

O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.
Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e sempre guiar meus passos.

À professora Sandra Regina Salvador Ferreira pela confiança, respeito e ensinamentos. Ao meu orientador durante o estágio doutoral Denis Poncelet, pelo acolhimento e importantes contribuições.

Ao PGEAL/UFSC pela oportunidade de cursar o doutorado, e aos professores, pelos ensinamentos ao longo desses anos.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca por aceitarem avaliar este trabalho e pelas considerações realizadas.

Aos colegas do LATESC pelos momentos de descontração e amizade, e em especial às Latesquianas, pelas risadas, desabaços, ajuda e apoio.

Aos BFF pelos melhores momentos, pela companhia mesmo à distancia, pela amizade, pelas conversas sérias e pelas brincadeiras. Vocês são os melhores!

Ao meu amor Eto, não somente pela parceria na parte experimental deste trabalho, mas pela parceria na vida, por ser meu companheiro de todas as horas, e aguentar meus “dias ruins”, por não deixar que a distância nos afastasse e por fazer de cada dia o melhor pra nós.

A Marine Chalanqui, la française la plus brésilienne que j'ai déjà connu, pour tous les sourires pendant mon séjour en France. Tu me manque beaucoup !

Ao aluno de iniciação científica Guilherme Trivellin por toda sua dedicação e esforço em fazer sempre o melhor trabalho.

À minha família pelo apoio durante toda a vida, sem a qual eu não poderia estar aqui hoje.

A todos que contribuíram e torceram pelo sucesso deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O comércio de especiarias está em constante crescimento, e as pimentas figuram entre as mais apreciadas em todo mundo. A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* R.) são objetos de estudo neste trabalho, pois além de serem produzidas e comercializadas no Brasil e em diversas partes do mundo, apresentam importantes atividades biológicas, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras. Assim, o objetivo deste trabalho foi empregar diferentes técnicas para a obtenção de extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa, avaliando o potencial antioxidante de cada um, a fim de definir uma única matéria-prima de interesse para a qual ensaios de extração com propano subcrítico, estudo de equilíbrio de fases e encapsulamento em biopolímero fossem realizados. Nas extrações a baixa pressão os solventes hexano, etanol e acetato de etila foram utilizados. Na tecnologia supercrítica as condições de pressão variam de 150 a 300 bar, com temperaturas entre 35 °C e 55 °C. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada segundo os métodos DPPH e ABTS, bem como pelo teor de compostos fenólicos totais, determinado pela metodologia de Folin-Ciocalteu. Ao fim das etapas de extração e avaliação de atividade antioxidante, a pimenta rosa foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, não somente pelos satisfatórios rendimentos de extração e potencial biológico, mas principalmente pela escassez de estudos que envolvam essa matéria-prima, contribuindo para o diferencial deste trabalho. Nas extrações com propano subcrítico obtiveram-se altos rendimentos, comparados à extração com CO₂ supercrítico, porém os extratos não apresentaram forte potencial antioxidante, o que nos sugere um estudo que avalie outras atividades biológicas, ou ainda aplicações como aromatizantes, devido ao seu acentuado odor característico. O estudo do equilíbrio de fases do sistema composto por extrato de pimenta rosa + diclorometano + CO₂ apresentou transições de fases do tipo líquido-vapor, bastante semelhantes às do sistema binário diclorometano + CO₂ descrito na literatura. A síntese de partículas pela técnica de emulsificação e extração de solvente proporcionou a formação de partículas de tamanho micrométrico, com formato esférico e morfologia de microesferas. A eficiência do processo de encapsulamento de extrato de pimenta rosa em PLA variou de 34,3% a 74,1%.

Palavras-chave: tecnologia supercrítica, antioxidantes, equilíbrio de fases, *Schinus terebinthifolius*, *Piper nigrum*.

ABSTRACT

The spice commerce is constantly growing, and peppers are among the most appreciated worldwide. The black pepper (*Piper nigrum* L.) and pink pepper (*Schinus terebinthifolius* R.) are subjects of study in this work, because they are produced and marketed in Brazil and all over the world, and have important biological activities, such as antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, among others. The objective of this work was to use different techniques for obtaining black pepper and pink pepper extracts, evaluating the antioxidant potential of each one, in order to define a single raw material of interest for which the extraction with subcritical propane, phase equilibrium study and encapsulation in biopolymer were performed. At low pressure techniques of extraction, hexane, ethanol and ethyl acetate were used as solvents. In supercritical fluid extraction pressure conditions ranged from 150 to 300 bar and temperatures between 35 °C and 55 °C. The antioxidant activity of the extracts was evaluated according to the DPPH and ABTS methods and the content of phenolic compounds, verified by the Folin-Ciocalteu method. After the stages of extraction and evaluation of antioxidant activity, pink pepper was selected to continue the work, not only for satisfactory yields of extraction and biological potential, but mainly by the scarcity of studies involving this raw material, contributing to the differential of this work. In the extractions with subcritical propane were obtained high yields compared to extraction with supercritical CO₂, but the extracts did not show strong antioxidant potential, which suggests a study evaluating other biological activities, or as flavoring applications, due to its strong odor typical. The phase behavior of the system composed by pink pepper extract + dichloromethane + CO₂ presented liquid-vapor phase transitions, very similar to the binary system dichloromethane + CO₂, described in the literature. The synthesis of particles by the emulsification technique and solvent extraction led the formation of micrometer-sized particles with spherical shape and morphology of the microspheres. The encapsulation efficiency of pink pepper extract in PLA ranged from 34.3% to 74.1%.

Keywords: supercritical extraction, antioxidants, phase equilibrium, *Schinus terebinthifolius*, *Piper nigrum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pimenteira-do-reino.....	29
Figura 2 - Estrutura química da piperina.....	30
Figura 3- <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	35
Figura 4 - Representação genérica do diagrama de fases de um componente puro.....	43
Figura 5 - Diagrama esquemático do equipamento de extração supercrítica.....	46
Figura 6 - Representação da curva de extração supercrítica.....	48
Figura 7- Equilíbrio de fases de misturas complexas. Diagramas P-T com diferentes posições do ponto crítico.....	54
Figura 8 - Passos básicos para microencapsulamento por evaporação do solvente.....	57
Figura 9 - Pimenta-do-reino: (a) grãos inteiros; (b) amostra moída.....	60
Figura 10 - Pimenta rosa (a) grãos inteiros; (b) amostra seca e moída.....	61
Figura 11 - Equipamento para extração em Soxhlet.....	65
Figura 12 - (a) Equipamento de extração supercrítica e (b) diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.....	69
Figura 13 - Curvas de extração de pimenta-do-reino e de pimenta rosa.....	82
Figura 14 - Isotermas de rendimento de pimenta-do-reino.....	86
Figura 15 - Isotermas de rendimento de pimenta rosa.....	86
Figura 16 - Rendimento global X_0 para os extratos de pimenta-do-reino utilizando etanol como solvente.....	89
Figura 17 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para realizar os testes de extração.....	109
Figura 18 - Diagrama esquemático do aparato experimental para determinação de equilíbrio de fases.....	118
Figura 19 - Diagrama P-x para o sistema CO_2 + diclorometano (DCM) + extrato de pimenta rosa.....	121
Figura 20 - Diagramas P-x para os sistemas extrato de pimenta rosa + CO_2 + DCM e CO_2 + DCM: (a) 35 °C e 40 °C; (b) 45 °C e 50 °C; (c) 55 °C e 60 °C.....	122
Figura 21 - Diagrama P-T para o sistema extrato de pimenta rosa + CO_2 + DCM.....	125
Figura 22 - Micrografias obtidas por MEV das partículas obtidas pelo método de emulsificação e extração do solvente: (a) PLA puro - F1; (b) PLA e 50 mg de extrato - F1; (c) PLA e 100 mg de extrato - F1; (d) PLA puro - F2; (e) PLA e 50 mg de extrato - F2; (f) PLA e 100 mg extrato.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de pimenta-do-reino obtido por hidrodestilação (HD) e extração supercrítica (ESC) com CO ₂	31
Tabela 2 - Atividades biológicas da pimenta-preta.....	33
Tabela 3 - Composição do óleo essencial de pimenta rosa obtido por destilação a vapor.....	36
Tabela 4 - Características gerais dos métodos experimentais de determinação de equilíbrio de fases a altas pressões.....	51
Tabela 5 - Índice de polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração em Soxhlet.....	64
Tabela 6 - Plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global (X ₀).....	71
Tabela 7 - Características físicas das matérias-primas vegetais.....	77
Tabela 8 - Rendimentos das extrações a baixa pressão, utilizando diferentes solventes com polaridades variadas.....	79
Tabela 9 - Características do leito de extração supercrítica.....	81
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de extração de pimenta-do-reino a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min.....	83
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de extração de pimenta rosa a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min.....	83
Tabela 12 - Rendimento global de extração de pimenta-do-reino e de pimenta rosa (X ₀) obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão.....	84
Tabela 13 - Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), para os extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa e BHT.....	91
Tabela 14 - Potencial antioxidante dos extratos de pimenta-do-reino avaliado pelo método DPPH.....	94
Tabela 15 - Potencial antioxidante dos extratos de pimenta rosa avaliado pelo método DPPH.....	96
Tabela 16 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de pimenta-do-reino.....	98
Tabela 17 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de pimenta rosa.....	100
Tabela 18 - Planejamento experimental das extrações com propano...108	
Tabela 19 - Rendimento das extrações de pimenta rosa com propano comprimido.....	109
Tabela 20 - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante para os extratos de pimenta rosa.....	111

Tabela 21 – Rendimento global e real da síntese de partículas.....	131
Tabela 22 – Tamanho médio de partículas de PLA com extrato de pimenta rosa obtidas pelo método de emulsificação e extração do solvente.....	133
Tabela 23 – Eficiência de encapsulamento de extrato de pimenta rosa em PLA pela técnica de emulsificação e extração do solvente.....	135

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	23
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1 Pimenta-DO-REINO (<i>piper nigrum</i> L.)	29
3.1.1 Composição química dos extratos de pimenta-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.)	30
3.1.2 Atividades biológicas da pimenta-do-reino	32
3.2 PIMENTA ROSA (<i>schinus terebinthifolius</i> Raddi)	34
3.2.1 Composição química dos extratos de pimenta rosa.....	35
3.2.2 Atividades biológicas da pimenta rosa.....	37
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	39
3.4.1 Soxhlet	41
3.4.2 Extração assistida por ultrassom	42
3.4.3 Extração supercrítica	43
3.4.3.1 Princípios da extração supercrítica.....	45
3.4.3.2 Curvas de extração.....	46
3.5 EQUILÍBRIO DE FASES.....	48
3.5.1 Comportamento de fases de misturas complexas	52
3.6 MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO.....	54
3.6.1 Microencapsulamento por evaporação/extração de solvente	56
3.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	57
CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PIMENTA-DO-REINO E DE PIMENTA ROSA	59

4.1	INTRODUÇÃO	59
4.2	Materiais e métodos	59
4.2.1	Obtenção das matérias-primas vegetais	59
4.2.2	Pré-tratamento das matérias-primas vegetais	60
4.2.3	Caracterização das matérias primas vegetais	61
4.2.4	Extrações a baixa pressão	64
4.2.5	Caracterização do leito de partículas da extração supercrítica.....	66
4.2.6	Determinação da massa específica do solvente supercrítico.	67
4.2.7	Extração supercrítica (ESC).....	67
4.2.8	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	73
4.2.9	Avaliação da atividade antioxidante	74
4.2.10	Determinação do perfil químico dos extratos	76
4.3	RESULTADOS e discussão.....	77
4.3.1	Características das matérias-primas vegetais.....	77
4.3.2	Rendimento das extrações a baixa pressão	78
4.3.3	Extração supercrítica	80
4.3.4	Teor de compostos fenólicos totais (TFT)	90
4.3.5	Atividade antioxidante	93
4.3.6	Perfil químico dos extratos	100
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
CAPÍTULO 5 – OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PIMENTA ROSA UTILIZANDO PROPANO SUBCRÍTICO		105
5.1	introdução	105
5.2	materiais e métodos.....	105
5.2.1	Especificação dos materiais	105
5.2.2	Descrição do aparato experimental	106
5.2.3	Procedimento experimental.....	107

5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais	109
5.2.5 Determinação do perfil químico dos extratos.....	109
5.3 resultados e discussão.....	109
5.3.1 Rendimento global.....	109
5.3.2 Atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais e perfil químico	110
5.4 conSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
CAPÍTULO 6 – ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE FASES DO SISTEMA EXTRATO DE PIMENTA ROSA + DICLOROMETANO + CO₂	115
6.1 INTRODUÇÃO	115
6.2 materiais e métodos.....	116
6.2.1 Aparato experimental.....	116
6.2.2 Procedimento experimental	118
6.3 resultados e discussão.....	120
6.4 conSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
CAPÍTULO 7 – SÍNTESE DE PARTÍCULAS POR EMULSIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO SOLVENTE.....	127
7.1 INTRODUÇÃO	127
7.2 materiais e métodos.....	128
7.2.1 Procedimento experimental	128
7.2.2 Caracterização das partículas de PLA com extrato de pimenta rosa	129
7.3 resultados e discussão.....	131
7.3.1 Rendimento da síntese de partículas.....	131
7.3.2 Tamanho e morfologia das partículas.....	132
7.3.3 Eficiência de encapsulamento.....	135
7.4 conSIDERAÇÕES FINAIS.....	135

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÃO.....	137
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
APÊNDICE I – CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO.....	161
APÊNDICE II – CURVA ANALÍTICA DE TROLOX.....	162
APÊNDICE III – DADOS DO EQUILÍBRIO DE FASES DO SISTEMA EXTRATO DE PIMENTA ROSA + DICLOROMETANO + CO₂.....	163
APÊNDICE IV – CURVA ANALÍTICA DE extrato de pimenta rosa.....	164

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

As pimentas estão entre as especiarias mais apreciadas no mundo e movimentam um mercado em constante crescimento. No Brasil, estima-se que são cultivados anualmente 2.000 ha com pimentas em todas as regiões brasileiras, destinadas aos mais diversos fins. O mercado para as pimentas pode ser dividido de acordo com o objetivo da produção, consumo interno ou exportação, e forma de apresentação do produto, *in natura* ou processado. Praticamente toda a produção destinada à exportação é na forma processada, enquanto para o mercado interno tanto as formas processadas como *in natura* (pimentas sem processamento) são importantes (EMATER, 2013).

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é cultivada em muitas partes do mundo e o Brasil é um dos maiores produtores, oscilando entre a segunda e terceira posição no mercado mundial. A maior parte da produção, cerca de 45 mil das 50 mil toneladas produzidas, é exportada para os Estados Unidos, Holanda, Argentina, Alemanha, Espanha, México e França. Enquanto a Índia, maior produtor mundial de pimenta-do-reino consome 50% do total produzido, o Brasil consome apenas 10% na forma de grãos inteiros, grãos moídos e em misturas com outros condimentos. (FERREIRA; MEIRELES; CABRAL, 1993; CEPLAC, 2012; EMBRAPA, 2012).

O composto ativo responsável pela pungência (característica picante) nas pimentas do gênero *Piper*, a piperina, é extensivamente estudado devido às suas propriedades terapêuticas. A piperina é um alcalóide e principal componente pungente presente em plantas da família *Piperaceae*. Está presente nas pimentas na faixa de 2,8 – 9,0%. Exibe uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo antitireóide, antidepressivo, hepatoprotetor contra toxicidade induzida por CCl₄, antitumoral e anti-inflamatória (SUNILA; KUTTAN, 2004; WATTANATHORN et al. 2008; SABINA et al, 2010).

Schinus terebinthifolius Raddi (aroeira-pimenteira) é uma árvore perene nativa da costa do Brasil e que foi introduzida em outras regiões da América do Sul, América Central, Europa, Ásia e África. Está entre as espécies vegetais listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), o qual é constituído de um inventário de espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). A

finalidade da RENISUS é subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva da planta, bem como orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos), dando suporte ao desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos.

Muitas propriedades medicinais têm sido atribuídas a esta planta, como atividade antioxidante, cicatrizante, antitumoral e antimicrobiana. No Brasil ela é utilizada na medicina popular como um anti-inflamatório e cicatrizante, além de possuir qualidades adstringentes, tônicas e estimulantes. Estas propriedades têm sido associadas à presença de polifenóis como a apigenina, o ácido elágico e a naringina. Substâncias como terebinthona, ácido hidroximasticadienoico, ácido terebinthifólico e ácido ursólico, presentes no extrato de aroeira, apresentam atividade antimicrobiana. Os principais componentes terpenóides encontrados nos extratos de frutos maduros são α -pineno, β -felandreno, trans-ocimeno (AMORIM; SANTOS, 2003; BERTOLDI, 2006).

Métodos tradicionais de extração, incluindo a extração com solventes orgânicos, a destilação a vapor e a hidrodestilação, são bastante utilizados para a obtenção de extratos e óleos essenciais de diversas matrizes vegetais. Porém, estas técnicas geralmente envolvem altas temperaturas de processo, o que pode ocasionar alterações químicas e destruição de compostos termossensíveis, assim como a perda de qualidade do extrato (BE-JEN; YEN-HUI; ZER-RAN, 2004; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGUI, 2007). A tecnologia supercrítica apresenta-se então como uma técnica alternativa de extração que busca o aumento da qualidade através da exploração da seletividade do processo, uma de suas principais características (FRANÇA, 1999; BRUNNER, 1994).

O valor terapêutico de um extrato, por sua vez, deve-se à sua complexidade química, por atuarem de diversas maneiras, ao contrário dos produtos sintéticos, que atuam de um único modo, relativo ao composto químico ativo. Além disso, os compostos sintéticos perdem a sinergia específica que os compostos naturais apresentam, pois a associação molecular dos elementos presentes nos extratos naturais faz com que estes atuem de maneira específica na cura (CORAZZA, 2002).

Usualmente, nos extratos obtidos a partir de pimenta-do-reino e de pimenta rosa estão presentes alcalóides, flavonóides, taninos e terpenos, substâncias com reconhecidas atividades biológicas e que necessitam de proteção, uma vez que podem ser degradados quando expostos à luz ou oxigênio (SANTOS et al., 2007; BENDAOU et al. 2010). Sendo assim, torna-se necessária a investigação de técnicas que preservem a integridade destes compostos frente à degradação, tais como o encapsulamento em biopolímeros. O encapsulamento previne a perda de compostos voláteis, mascara sabores e odores indesejáveis 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 et al., 2011).

Ainda, o conhecimento do comportamento de fases apresenta-se como um dos fatores mais importantes nos projetos de extração, separação, precipitação e encapsulamento com fluidos supercríticos (CHEN et al., 2000). Dados de equilíbrio de fases nas condições operacionais de temperatura e pressão fornecem informações sobre a solubilidade e a seletividade dos solutos no solvente supercrítico, sendo fundamentais especialmente quando os solutos são substâncias de alto valor agregado, como os compostos bioativos.

Assim, frente ao exposto, faz-se necessária a investigação e avaliação de tecnologias que possibilitem a obtenção e o aproveitamento de extratos com qualidade biológica oriundos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa. Neste trabalho foram realizadas extração a baixas e altas pressões para a obtenção dos extratos de ambas as matérias-primas em estudo, e ainda ensaio de equilíbrio de fases e microencapsulamento dos extratos.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi aplicar a tecnologia supercrítica para a obtenção de extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa, a fim de identificar os principais compostos presentes nos extratos, avaliar o potencial antioxidante e realizar o microencapsulamento dos extratos selecionados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Comparar e avaliar, em termos de rendimento, as técnicas de extração a baixa pressão (Soxhlet e ultrassom) utilizando solventes de polaridades variadas, e a extração supercrítica (ESC) na obtenção dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa;
- b)** Avaliar o rendimento da ESC em função das condições operacionais de temperatura e pressão;
- c)** Selecionar um ou mais cossolventes para emprego na extração supercrítica, a partir do resultado das extrações a baixa pressão com solventes orgânicos de polaridades variadas;
- d)** Avaliar o efeito do(s) cossolvente(s) no rendimento da ESC para os extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa;
- e)** Avaliar a extração de pimenta rosa com propano comprimido em termos de rendimento, potencial antioxidante e composição química;
- f)** Avaliar e comparar os diferentes extratos em relação ao seu potencial antioxidante avaliado por técnicas *in vitro* (método do radical DPPH e método ABTS·) e pelo teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, e relacionar a atividade com as condições de extração aplicadas;
- g)** Selecionar um ou mais extratos a partir dos resultados obtidos para o rendimento de processo (técnica de extração) e para o potencial antioxidante, para avaliar o comportamento do equilíbrio de fases;

- h)* Estudar o equilíbrio de fases do sistema extrato-diclorometano- CO_2 visando obter informações para a potencial aplicação deste extrato em processos de precipitação/encapsulamento;
- i)* Encapsular o extrato obtido com CO_2 supercrítico em biopolímero (poli-ácido láctico) pela técnica de emulsificação e extração de solvente;
- j)* Avaliar as características das partículas formadas em termos de tamanho, morfologia e eficiência de encapsulamento.

CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)

Ervas e especiarias compõem uma parte importante da dieta humana e têm sido utilizadas há milhares de anos na medicina tradicional para realçar cor, sabor e aroma dos alimentos (ZARAI et al. 2012).

As pimentas estão entre as especiarias mais apreciadas no mundo e movimentam um mercado em constante crescimento. O Brasil figura entre os três maiores produtores mundiais, e cerca de 85% da produção é exportada (CEPLAC, 2012).

A pimenteira-do-reino (Figura 1) é uma planta trepadeira que cresce aderida a tutores de madeira ou troncos de árvores, graças às raízes adventícias que surgem na região dos nós. Alcança até 4 m de altura e diâmetro de 1,5 m. Produz frutos do tipo baga em inflorescências formadas nos ramos plagiotrópicos (secundários) ou de produção. Em condições de cultivo intensivo, a pleno sol e com adubação balanceada chega a produzir 3,0 a 4,0 t/ha de pimenta seca (EMBRAPA, 2007).

Figura 1 - Pimenteira-do-reino.



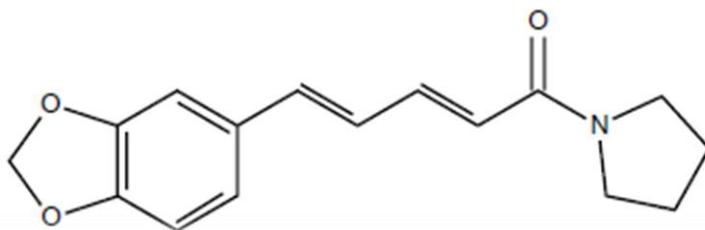
Fonte: CEPLAC (2012).

Para produzir a pimenta-do-reino, as espigas são colhidas quando as drupas (fruto seco característico da pimenteira-do-reino) estão completamente desenvolvidas, com coloração verde-claro ou amarelada, debulhadas mecanicamente em debulhadores ou manualmente. Há produtores que não costumam debulhar a pimenta. Neste caso, as espigas são colocadas para secar ao sol, e durante o processo de secagem as drupas secas vão se desprendendo do eixo da espiga. Durante o processo de revolver a pimenta para que a secagem fique uniforme, há a remoção dos eixos das espigas que estão misturados com o produto. A maioria da pimenta produzida é seca ao sol, pois poucos produtores utilizam secadores à lenha ou a diesel (EMBRAPA, 2007).

3.1.1 Composição química dos extratos de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)

A pimenta-do-reino tem no óleo volátil um componente pungente, comumente conhecido como piperina, cuja estrutura química é apresentada na Figura 2. O óleo volátil, presente em níveis de 0,6 – 2,6% tem um sabor aromático, mas não apresenta pungência. Os níveis de óleo variam em função da fonte, grau de maturação e cultivar. Entre os 100 diferentes compostos presentes no óleo, os principais são α -piperina, β -piperina, 1- α -felandreno, β -cariofileno e limoneno (PARTHASARATHY et al., 2006). Estudos identificaram a presença de 39 compostos terpênicos, que correspondem a 95% da composição total do óleo, sendo o trans-cariofileno o composto majoritário (ATTOKARAN, 2011).

Figura 2 - Estrutura química da piperina.



Fonte: Parthasarathy et al. (2006).

O β -cariofileno é um sesquiterpenóide presente em óleos essenciais de especiarias, e apresenta atividade anti-inflamatória em vários modelos com animais, além de atuar como citoprotetor gástrico. Está presente também em cosméticos e é um aditivo alimentar aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*). Este composto apresenta ainda efeitos antioxidantes, antiespasmódicos, atividade antiviral e efeito anestésico (GUELARDINI et al., 2001; HORVÁTH et al., 2012).

A Tabela 1 apresenta a composição do óleo essencial de pimenta-do-reino, obtido por hidrodestilação e extração supercrítica com CO₂, conforme resultados do trabalho de Bagheri, Manap e Solati (2014). Os extratos supercríticos foram obtidos em pressões de 150 a 300 bar, e temperaturas de 40 °C e 50 °C. Ferreira et al. (1999) também avaliaram a composição dos extratos de pimenta-do-reino obtidos por extração supercrítica em pressões de 150, 200 e 300 bar e temperaturas entre 30 °C e 50 °C.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de pimenta-do-reino obtido por hidrodestilação (HD) e extração supercrítica (ESC) com CO₂.

Composto	HD⁽¹⁾ (%)	ESC⁽¹⁾ (%)	ESC⁽²⁾
α -pineno	7,7	4,3	4,09
Sabineno	13,2	13,6	11,64
β -pineno	9,7	7,3	2,61
α -felandreno	1,6	1,8	1,85
Limoneno	14,9	15,6	19,8
3-careno	8,6	9,3	14,34
δ -elemeno	2,0	1,2	0,78
Copaeno	3,7	3,8	-
β -cariofileno	18,6	25,4	21,76

Fonte: ⁽¹⁾Bagueri; Manap; Solati (2014).

⁽²⁾Ferreira et al. (1999).

3.1.2 Atividades biológicas da pimenta-do-reino

A pimenta-do-reino é usada no tratamento de várias desordens digestivas, febre, obesidade e doenças do trato respiratório causadas por diferentes agentes patogênicos como bactérias, vírus e fungos. A família Piperaceae tem sido usada por civilizações do passado e do presente como fonte de medicamentos e temperos. Recentemente, cientistas de diferentes campos biológicos têm estudado a aplicação de metabólitos secundários de diversas plantas como agentes medicinais (AHMAD et al., 2012). Ervas e especiarias estão entre as principais fontes de antioxidantes naturais do ponto de vista de segurança, e espera-se que estes antioxidantes atuem na quimio prevenção de inflamações, no combate ao o câncer e prevenindo o envelhecimento (SINGH et al., 2004).

Dois importantes sesquiterpenos, β -cariofileno e nerolidol, foram usados primeiramente como anestésicos e somente depois como agentes flavorizantes. O nerolidol é um composto natural isolado das espécies *Piper* e apresenta também atividade pesticida contra vários tipos de ácaros (AHMAD et al., 2012).

Sabina et al. (2010) confirmaram o forte efeito hepatoprotetor da piperina contra dano hepático induzido por acetaminofeno, um popular antipirético e analgésico que leva à lesão hepática aguda. O mecanismo de ação da piperina neste caso não foi completamente elucidado, necessitando de mais estudos a fim de fundamentar esta descoberta farmacológica.

O efeito da piperina na função cognitiva e a sua atividade antioxidante foram estudadas por Chonpathompikunlert et al. (2010), que avaliaram também a sua ação no comprometimento da memória e na neurodegeneração na doença de Alzheimer. Investigou-se o efeito da piperina na memória espacial e na neurodegeneração em várias regiões do hipocampo em um modelo animal da doença de Alzheimer e comprovou-se o aumento da memória espacial. Para todas as dosagens utilizadas neste estudo, a redução da memória e a neurodegeneração foram significativamente atenuadas. O mecanismo de ação da piperina foi associado parcialmente com o aumento da densidade neuronal e inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo.

Os efeitos da piperina em distúrbios cognitivos e de humor foram investigados por Wattanathorn et al. (2008). Realizaram-se testes em camundongos, com administração de piperina por quatro semanas, quando então os animais foram avaliados quanto à atividade neurofarmacológica. Diazepam® e fluoxetina foram utilizados como padrão de fármacos neste estudo. A administração de piperina por via oral foi eficiente na produção de atividade antidepressiva e no aumento dos efeitos cognitivos, sendo comparável aos controles positivos dos testes realizados (fluoxetina e Diazepam®). Assim, pode ser considerada uma potencial alternativa na melhora de funções cerebrais.

A atividade antidepressiva da piperina foi demonstrada por meio de um procedimento com camundongos, submetidos a um estresse crônico leve. A administração deste composto ativo por 15 dias consecutivos reverteu o quadro de depressão e aumentou as funções cognitivas durante todo o período de tratamento (WATTANATHORN et al., 2008; LI; LIU, 2008).

A pimenta-do-reino e seus extratos têm sido reportados como inibidores da formação de tumores, em modelos experimentais. O extrato alcoólico foi efetivo nas atividades imunomodulatória e antitumoral, e contra o linfoma ascítico de Dalton. Estudos realizados em modelos com camundongos verificaram que o agente ativo piperina atuou na prevenção e inibição de metástase no pulmão, e concluiu-se que este composto reduziu drasticamente a formação de nódulos de tumor pulmonar. (SELVENDIRAN; SAKTHISEKARAN, 2004; ABO-ZEID; FARGHALY, 2009).

A Tabela 2 traz um resumo das principais atividades biológicas atribuídas à pimenta-do-reino.

Tabela 2 - Atividades biológicas da pimenta-do-reino.

Atividade	
Anti-apoptótica	Antifúngica
Antibacteriana	Analgésica
Inseticida	Antidiarreica
Antidepressiva	Anti-inflamatória
Antimutagênica	Anti- metástica
Antioxidante	Antipirética
Imunomodulatória	Antitumoral

Fonte: Ahmad et al. (2012).

3.2 PIMENTA ROSA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

Schinus terebinthifolius Raddi (pimenta rosa) é uma árvore perene nativa da costa do Brasil e que foi introduzida em outras regiões da América do Sul, América Central, Europa, Ásia e África. É conhecida por uma variedade de nomes como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta brasileira, pimenta rosa, *poivre rose*, entre outros (LACA-BUENDIA et al, 1992).

A pimenta rosa é uma árvore de 4 a 10 metros de altura, de tronco com casca espessa e copa densa (Figura 3). Suas folhas são compostas por 3 a 10 pares de folíolos, de bordas serreadas, e suas flores pequenas, de cor amarelo-clara florescem de setembro a janeiro. São aromáticas e atrativas para abelhas e outros animais (CLEMENTE, 2006).

Espécies desta família são encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, mas também possuem representantes nas floras do Mediterrâneo e na América do Norte. É largamente distribuída em todo o território brasileiro e pode ser encontrada também na Europa, onde é cultivada em zonas temperadas como espécie ornamental (BERTOLDI, 2006).

O uso dos frutos da aroeirinha (*Schinus terebinthifolius* R.) como produto condimentar é bastante difundido nacional e internacionalmente. A pimenta rosa tem sido utilizada em substituição a pimenta-do-reino e, segundo análises químicas relatadas na literatura, existe grande similaridade entre seus componentes químicos (LACA-BUENDIA et al, 1992; BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007).

No Brasil a produção é obtida, na sua maior parte, por meio de colheita dos frutos em áreas nativas. Somente no Estado do Espírito Santo existem registros de alguns plantios de aroeira, voltados para produção de pimenta rosa. No Brasil, os frutos da aroeira são utilizados apenas em sua forma desidratada e comercializados, na maioria das vezes, a granel. Geralmente, 3 kg de sementes frescas produzem 1 kg de material processado. A produção industrial de pimenta rosa no Brasil está regulamentada pela resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde foi aprovado o “Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e Molhos” (BERTOLDI, 2006; BANDES, 2008).

3.2.1 Composição química dos extratos de pimenta rosa

A partir da pimenta rosa é obtido um óleo muito utilizado na medicina popular para o tratamento de várias doenças. O conteúdo de óleo presente na matéria-prima é de aproximadamente 7% (v/m) (BERTOLDI, 2006).

A análise fitoquímica da pimenta rosa revelou a presença de taninos, alcalóides, flavonóides, saponinas esteroidais, esteróis, terpenos e uma grande quantidade de óleo essencial. Os óleos essenciais presentes nas folhas, frutos e casca são uma fonte importante de substâncias químicas. As folhas podem conter 1% de óleo essencial, enquanto que nos frutos esse valor pode chegar a 5% (CARVALHO et al., 2003).

Figura 3- *Schinus terebinthifolius* Raddi



Fonte: PLANTAS PARA O FUTURO (2011).

Os óleos essenciais são ricos em monoterpenos e sesquiterpenos, tais como 1,8-cineol, α -terpinol, borneol, que são

compostos que atuam como inibidores da germinação e crescimento radicular em plantas (VAUGH; SPENCER, 1993).

Extratos etanólicos de todas as partes da planta revelaram a presença de compostos fenólicos (SOARES et al., 1998).

Lloyd et al. (1977) investigaram a composição em terpenos dos extratos de pimenta rosa. A maior parte do material (80%) consistia de uma mistura de 9 monoterpênicos, sendo α -pineno, β -pineno, sabineno, 3-careno, α -felandreno, limoneno, β -felandreno, p-cimeno e terpinoleno. Segundo Amorim e Santos (2003) os principais componentes terpenóides encontrados nos extratos de frutos maduros são α -pineno, β -felandreno, trans-ocimeno.

Clemente (2006) identificou β -pineno, δ -cadineno, epi- α -muurolool e α -cadinol como compostos majoritários presentes no óleo essencial obtido dos frutos verdes de *Schinus terebinthifolius*.

A presença de polifenóis como a apigenina, o ácido elágico e a naringina tem sido associada às atividades antinevrálgicas, adstringentes, tônicas e estimulantes. A Tabela 3 traz a composição química do óleo essencial de pimenta rosa obtido por destilação a vapor, segundo resultados apresentados por Bendaoud et al. (2010).

Tabela 3 - Composição do óleo essencial de pimenta rosa obtido por destilação a vapor.

Composto	(%)
α -pineno	6,5
β -pineno	3,1
p-cimeno	7,3
α -felandreno	34,4
β -felandreno	10,6
α -terpinol	5,6
δ -elemeno	0,9
β -elemeno	0,3
α -chamigreno	0,6
γ -cadineno	18,1
δ -cadineno	0,7
Germacreno B	0,7

Fonte: Bendaoud et al. (2010).

3.2.2 Atividades biológicas da pimenta rosa

Muitas propriedades medicinais têm sido atribuídas à pimenta rosa, como atividade antioxidante, cicatrizante, antitumoral e antimicrobiana. No Brasil ela é utilizada na medicina popular como um anti-inflamatório e cicatrizante. Estas propriedades têm sido associadas à presença de polifenóis como a apigenina, o ácido elágico e a naringina. Substâncias como terebinthona, ácido hidroximasticadienoico, ácido terebinthifólico e ácido ursólico, presentes no extrato de aroeira, apresentam atividade antimicrobiana (BERTOLDI, 2006).

A atividade antioxidante da pimenta rosa está relacionada à presença de compostos polares, principalmente os fenólicos. Tais propriedades podem ser potencializadas através da aplicação do extrato fenólico, ou oleoresina e óleo essencial, em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos (BERTOLDI, 2006).

Os estudos desenvolvidos por Bendaoud et al. (2010) mostraram que os óleos essenciais de pimenta rosa, obtidos de diferentes partes da planta, induziram uma promissora atividade antioxidante *in vitro* e também apresentaram citotoxicidade contra câncer de mama. O óleo essencial que continha o maior teor de sesquiterpenos foi o que apresentou maior atividade biológica. Verificou-se também a ação antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar e de humanos. Este trabalho confirmou o potencial biológico dos extratos de pimenta rosa, mas sugeriu estudos mais aprofundados para que os compostos responsáveis por cada efeito sejam identificados.

Muitos mecanismos de ação têm sido descritos para *Schinus terebinthifolius*, demonstrando a atividade anti-inflamatória pela ação de dois de seus componentes: o schinol e o ácido masticadienoico. Os bioflavonóides, que são dímeros precursores dos taninos, componentes presentes nos extratos da pimenta rosa, também apresentam ação anti-inflamatória (MARTINEZ et al., 1996; AMORIM; SANTOS, 2003).

Costa et al. (2008) realizaram estudos com 10 extratos de partes diferentes de *Schinus terebinthifolius*. Os ensaios *in vivo* demonstraram que o extrato etanólico possui uma potente atividade anti-inflamatória, sendo capaz de inibir a pleurisia induzida por zimosan ou carragenina

em camundongos e ratos na mesma magnitude que o fármaco de referência, diclofenaco de sódio.

O trabalho desenvolvido por Martins et al. (2014) verificou que o óleo essencial das folhas e frutos de *Schinus molle*, com composição semelhante ao óleo de *Schinus terebinthifolius*, apresentou propriedades antioxidantes e antimicrobianas contra bactérias Gram positivas e negativas, e fungos deteriorantes de alimentos.

O melanoma maligno é um dos tipos mais agressivos de câncer e sua incidência tem aumentado gradualmente nos últimos anos, representando aproximadamente 75% das mortes por câncer de pele. Matsuo et al. (2011) investigaram o mecanismo de morte celular induzida por α -pineno e sua aplicação terapêutica. Os autores relataram que este composto, frequentemente presente nos extratos de pimenta rosa, foi muito eficaz no tratamento do melanoma metastático e na redução do número de nódulos tumorais pulmonares.

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Radical livre é uma molécula ou fragmento molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados, que tornam essa molécula extremamente reativa quimicamente. Danos profundos às células e tecidos do corpo humano podem ser desencadeados quando há a produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos, ou ainda devido a fatores ambientais adversos, na ausência de antioxidantes disponíveis *in vivo* (GALATO, 2004; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar significativamente a oxidação de substratos oxidáveis. A importância dos antioxidantes para os alimentos e sistemas biológicos é bem conhecida, uma vez que protegem os mesmos dos processos oxidativos (BISCAIA, 2007). O efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos (ARAÚJO, 2004).

Existem duas categorias básicas de antioxidantes: sintéticos e naturais. De modo geral, os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas que podem apresentar vários graus de substituintes alquilas,

enquanto que os naturais são compostos fenólicos, quinonas, lactonas e os polifenóis (ARAÚJO, 2004).

Embora os antioxidantes sintéticos sejam amplamente utilizados pela indústria alimentícia, existem alguns argumentos com relação à segurança e efeitos adversos destas substâncias quando usadas como aditivos alimentares. Já os antioxidantes naturais, como as vitaminas e os polifenóis, podem apresentar papéis importantes na prevenção de doenças associadas aos radicais livres (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003; ZHENG; WANG, 2001).

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estas propriedades são devidas principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004).

Dois grandes grupos estão relacionados aos efeitos de antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais: antioxidantes hidrofílicos, que compreendem ácido ascórbico e compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, como tocoferóis e carotenoides. Sendo assim, diversas técnicas são utilizadas a fim de determinar o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes compostos, o que permite uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de sequestro de radicais livres, tal como DPPH· (2,2-difenil-1-picrilidrazina) e ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (KAUR; KAPOOR, 2001; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A crescente demanda por antioxidantes naturais para a aplicação em alimentos tem incentivado em todo o mundo a pesquisa sobre a extração de substâncias biologicamente ativas a partir de uma variedade de matérias-primas vegetais (DÍAZ-REINOSO et al, 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 pela família de compostos a ser extraída e também pelo objetivo do processo, se é quantitativo ou qualitativo. Ou seja, o rendimento de processo e a composição dos extratos dependem tanto do solvente utilizado como do método de extração aplicado.

As diferentes técnicas de extração podem estar baseadas em mecanismos químicos diferentes, como a solubilidade de substâncias no solvente utilizado em função sua polaridade, ou seja, diferentes substâncias serão extraídas de acordo com o grau de polaridade e o solvente utilizado. A característica hidrofílica ou lipofílica do composto a ser extraído afeta sua solubilidade no solvente, e da mesma forma, a polaridade do solvente também tem impacto sobre a eficácia da extração (BISCAIA, 2007; MOURE et al, 2001; TSAO E DENG, 2004).

Técnicas convencionais de extração com uso de solventes orgânicos, como a extração assistida por ultrassom e em Soxhlet, são comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia na obtenção de variados extratos e podem utilizar uma ampla gama 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 (BISCAIA, 2007; CAMPOS, 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Recentes técnicas de extração têm sido desenvolvidas ao longo dos últimos anos, como a micro-extração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*), extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*), extração assistida por micro-ondas (MAE - *Microwave Assisted Extraction*), extração com fluido supercrítico (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*) e extração com líquidos pressurizados (PLE - *Pressure Liquid Extraction*), conhecida também como extração por fluido pressurizado (PFE - *Pressurized Fluid Extraction*) ou extração acelerada com solvente (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*). Estas técnicas são mais rápidas que as técnicas convencionais de extração, utilizam menor quantidade de solvente, diminuem a degradação da amostra, podem eliminar a etapa de limpeza da amostra, eliminam etapas de concentração antes das análises cromatográficas, melhoram a eficiência de extração e a seletividade, além de serem de fácil automação (JACQUES, 2005).

A extração com fluidos supercríticos tem se mostrado 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. Os fluidos supercríticos são utilizados em escala industrial na descafeinação do café e extração de lúpulo em substituição ao cloreto metileno, na extração e desodorização de óleos vegetais e gordura animal, e na extração e recuperação de aromas de diversas origens, entre outras aplicações. A extração supercrítica é um processo que proporciona seletividade e eficiência com menor risco de degradação térmica dos extratos e cujo solvente pode ser facilmente removido no final da extração (GÓMEZ; OSSA, 2002; PEREIRA et al., 2004; ARAÚJO, 2004).

3.4.1 Soxhlet

O extrator Soxhlet foi desenvolvido em 1879 e o método que utiliza este aparato vem sendo considerado padrão por mais de um século. A extração convencional em Soxhlet apresenta diversas vantagens: a amostra entra em contato com o solvente de extração repetidas vezes, havendo sua constante renovação, o que facilita o equilíbrio da transferência. Não há necessidade de filtração para separação da matéria-prima do solvente ao término do procedimento, e existe a possibilidade de se realizar várias extrações simultaneamente, devido ao baixo custo do equipamento (JENSEN, 2007; CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

A extração em Soxhlet é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação (processo de extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução em um líquido). Ainda que seja um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos, ele apresenta restrições ligadas ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (MIGUEL; ANDRADE, 1989). Além disso, a integridade dos compostos extraídos pode ser afetada pela decomposição térmica ou pela reação com o solvente, já que, durante a extração, o recipiente que contém o solvente e os compostos já solubilizados é mantido na temperatura de ebulição do solvente (ARAÚJO, 2004).

Uma das principais vantagens da extração em Soxhlet é a recirculação de solvente, que aumenta o coeficiente de partição e a

eficiência da extração; além de apresentar maior reprodutibilidade do que o processo por maceração (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003). No entanto, mesmo após a evaporação do solvente, o extrato pode conter resíduos do solvente utilizado na extração, que em alguns casos pode levar a restrição da sua aplicação.

3.4.2 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom é um método que utiliza a energia das ondas ultrassônicas (mecânicas) que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. 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 (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003).

As ondas ultrassônicas se propagam na matéria, em frequências de 20,0 - 100,0 kHz, criando no meio que se propagam ciclos de expansão e compressão, fazendo com que as moléculas do meio se afastem e se aproximem inúmeras vezes. Estes ciclos de expansão e compressão geram bolhas no interior do líquido empregado no processo, que não podendo mais absorver a energia gerada pelo ultrassom, implodem, criando um efeito chamado cavitação (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003). A cavitação gera mudanças físicas e químicas permanentes aos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos, e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-sólido (MELECCHI, 2005). A agitação das moléculas provoca ainda 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 (MELECCHI, 2005; MA et al., 2008).

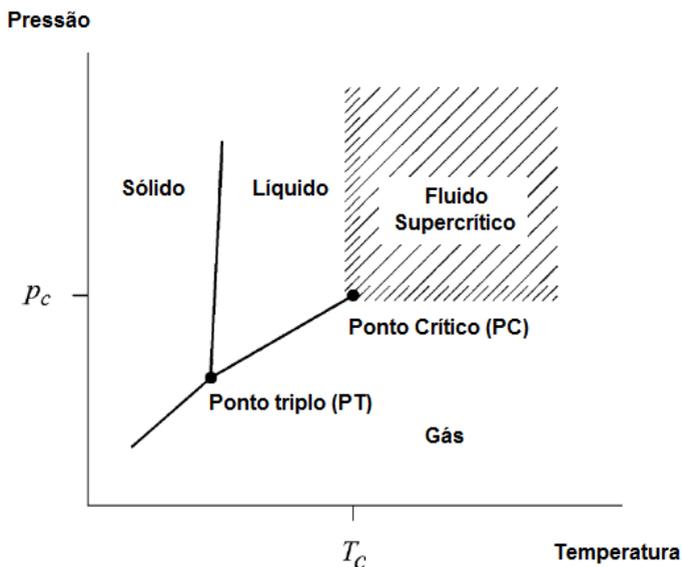
Entre as vantagens do uso do ultrassom para a obtenção de extratos naturais destacam-se: simplicidade do equipamento e baixo custo inicial; redução do tempo e da temperatura de extração e possibilidade de uso de diferentes solventes e misturas de solventes. Como desvantagens podem ser citadas sua inabilidade de renovação do solvente durante o processo, fazendo com que a capacidade de extração seja limitada pelo equilíbrio de fases, além da necessidade de filtração após a extração, que aumenta o tempo do processo e o risco de perda ou

contaminação do extrato durante a manipulação (ADAMS, 2002; MELECCHI, 2005; FREITAS, 2007).

3.4.3 Extração supercrítica

A extração supercrítica 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; OSSA, 2002; FREITAS, 2007)

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



Fonte: Adaptado de MUKHOPADHYAY (2000).

A área em torno do ponto crítico de um componente (ou de uma mistura) pode ser chamada de “região crítica”, e abrange condições sub e supercrítica. Caso uma destas 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, variando drasticamente com pequenas variações de pressão e temperatura (BRUNNER, 1994).

A extração supercrítica possui vantagens em relação às técnicas convencionais de extração porque possibilita o ajuste contínuo do poder de solvatação e, conseqüentemente da seletividade do solvente, não utiliza solventes orgânicos poluentes e, portanto, não necessita da etapa de evaporação dos extratos para a eliminação do solvente. Por conta disso, o emprego de fluidos supercríticos é considerado uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, em especial para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (REVERCHON; DE MARCO, 2006; MICHELLIN, 2009).

Dentre as vantagens da extração supercrítica, podemos citar (MAUL, 1999; MUKHOPADHYAY, 2000):

- a)* Os solventes empregados são gasosos à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, permitindo que após a extração sejam facilmente separados por completo dos extratos e recuperados;
- b)* A maioria dos gases supercríticos utilizados é fisiologicamente segura e inerte;
- c)* A extração pode ocorrer em baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando são extraídas substâncias naturais que são termicamente sensíveis;
- d)* Os extratos quase não sofrem hidrólise, oxidação, esterificação, caramelização ou alterações térmicas, representando de melhor forma o material original;
- e)* A força solvente é ajustada via compressão mecânica;
- f)* A adição de cossolventes permite a extração diferencial de solutos não polares até solutos de alta polaridade e ainda aumenta a solubilidade do material a ser extraído;
- g)* Os solventes podem ser reutilizados, reduzindo o custo operacional.

Como desvantagens da ESC podem ser citadas o elevado custo do processo, em função dos equipamentos utilizados, e a dificuldade de extração de compostos muito polares quando se utiliza CO₂ como solvente supercrítico. Este último ponto pode ser melhorado com o emprego de modificadores adequados, como solventes orgânicos de alta polaridade (MELECCHI, 2005).

Os extratos obtidos por ESC são considerados naturais e têm permissão para aplicação em alimentos, uma vez que apresentam status “GRAS” (do inglês *Generally Recognized As Safe*). Além disso, o alto gradiente de pressão entre a coluna de extração e a saída do extrator pode produzir extratos livres de micro-organismos e esporos, com maior vida útil quando comparados aos extratos obtidos por processos a baixa pressão (DÍAZ-REINOSO et al, 2006).

O CO₂ supercrítico é utilizado principalmente como solvente na extração de compostos de alto valor agregado oriundos de produtos naturais. Devido a sua característica apolar, é mais indicado para a extração de antioxidantes como carotenoides e outros relativamente lipofílicos. Compostos polares, como flavonóides e ácidos fenólicos, são menos solúveis no CO₂ supercrítico, necessitando a utilização de um cossolvente para possibilitar a extração destes compostos (TSAO; DENG, 2004; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

3.4.3.1 Princípios da extração supercrítica

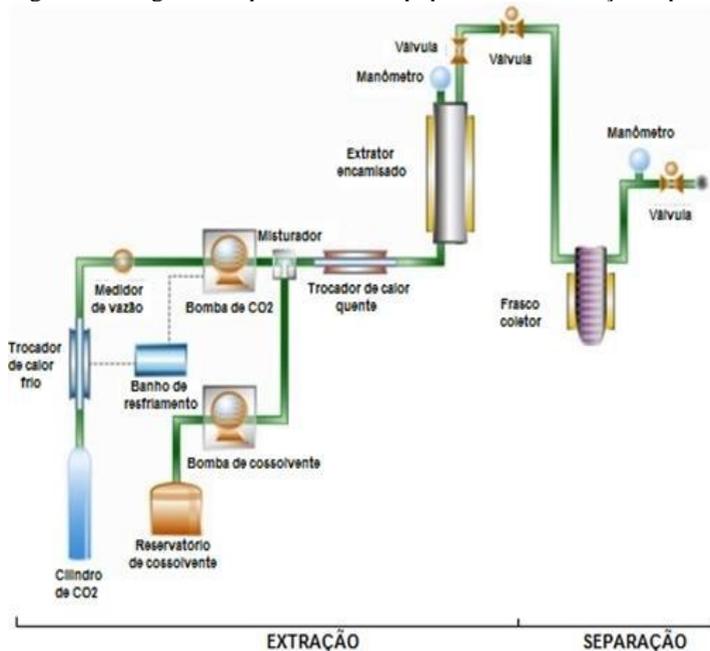
A extração supercrítica consiste basicamente de duas etapas: solubilização dos compostos presentes na matriz sólida e separação desses do solvente supercrítico. Durante a extração, o solvente flui através do leito de partículas, solubilizando os compostos presentes na matriz vegetal. O solvente sai do extrator carregando as substâncias solubilizadas, e por meio da redução da pressão, o extrato é liberado do solvente (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

A Figura 5 representa esquematicamente um equipamento de extração supercrítica de matrizes sólidas, mostrando desde a etapa de extração até a separação da mistura soluto-solvente.

A transferência de massa entre as fases depende de fatores como tipo, estrutura e grau de maturação do material vegetal, tratamento anterior a extração, etc. Além disso, o leito de partículas pode formar diferentes geometrias e tamanhos de partículas 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 destas diferentes distribuições tem alguma influência no processo de extração (BRUNNER, 1994).

Figura 5 - Diagrama esquemático do equipamento de extração supercrítica.



Fonte: Adaptado de WATERS (2013).

Durante a extração, o solvente supercrítico escoava através de um leito fixo formado por partículas sólidas, solubilizando os componentes presentes no sólido. À medida que o solvente escoava através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluida 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).

3.4.3.2 Curvas de extração

A representação da cinética da ESC é feita através da construção da curva de extração, que normalmente é apresentada como

um gráfico da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. São vários os fatores que afetam o comportamento das curvas de extração, como vazão de solvente utilizada e tamanho da partícula formadora do leito. Desta forma, é difícil fazer a comparação entre curvas obtidas a partir de matérias-primas e equipamentos diferentes, mas as informações que elas podem fornecer como a duração da taxa constante de extração são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

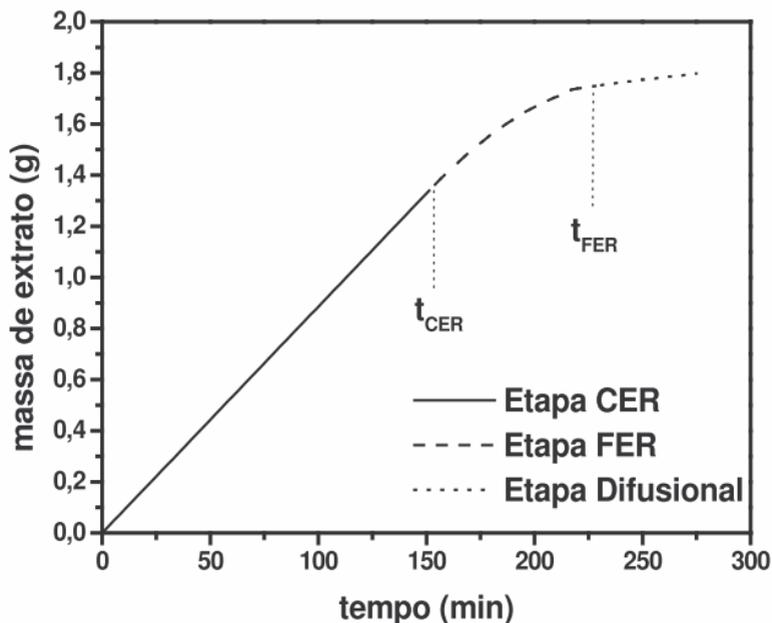
De acordo com a literatura, as curvas de extração são geralmente divididas em três etapas e são determinadas pela massa total de óleo extraído em função do tempo de extração (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA; MEIRELES, 2002):

- a)** Etapa com velocidade constante de extração (CER, do inglês *Constant Extraction Rate*): a superfície externa da partícula está coberta com o soluto, que é chamado “soluto de fácil acesso”. Neste período a convecção é o mecanismo dominante e, portanto, a resistência à transferência de massa está na fase fluida;
- b)** Etapa com velocidade decrescente de extração (FER, do inglês *Falling Extraction Rate*): falhas na cobertura de soluto sobre a superfície externa começam a aparecer dando início à difusão do soluto presente no interior da partícula. Nesta etapa os mecanismos de transferência de massa por difusão e por convecção ocorrem simultaneamente;
- c)** Etapa difusional: a camada externa de soluto praticamente desaparece. Neste período a resistência à transferência de massa está na fase sólida. A representação esquemática de uma curva de extração é apresentada na Figura 7.

A transição entre o período de velocidade constante e decrescente de extração é influenciado pelo tamanho de partícula, pelo conteúdo inicial de óleo no sólido e pela estrutura celular do material. Partículas grandes causam um aumento no período difusional e o período de taxa decrescente de extração ocorre antes do que em partículas de menor tamanho. Quando o material possui alto conteúdo de óleo, a transferência de massa ocorre predominantemente em velocidade constante, sendo a velocidade de extração controlada pela solubilidade do substrato no solvente (MUKHOPADHYAY, 2000).

A representação da curva de extração pode ser utilizada na determinação de parâmetros de processo, tais como tempo de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica e determinação da solubilidade, como também na modelagem da transferência de massa do sistema. Informações a respeito da pressão, temperatura e vazão de solvente podem ser obtidas por meio da modelagem das curvas de extração, possibilitando a ampliação de escala do processo de extração supercrítica (PERRUT, 2001; SILVA, 2004).

Figura 6 - Representação da curva de extração supercrítica.



Fonte: MARTÍNEZ (2005).

3.5 EQUILÍBRIO DE FASES

Informações experimentais sobre o equilíbrio de fases a 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, já que ao menos alguns dados experimentais são necessários para ajustar os parâmetros de interação dos modelos (DOHRN; BRUNNER, 1995).

O equilíbrio de fases termodinâmico determina os limites para a transferência de massa entre diferentes fases, as quais estão envolvidas em diversos processos químicos, incluindo aqueles com fluidos supercríticos. O equilíbrio de fases revela a composição das fases no equilíbrio, assim como 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; a variação dessas quantidades com a temperatura e pressão e a concentração dos vários componentes em equilíbrio (BRUNNER, 1994).

Uma característica comum dos processos de extração, separação e purificação de produtos naturais é a necessidade de conhecer o comportamento de fases do sistema de interesse, o que permite a definição das condições operacionais do processo. Além disso, do ponto de vista da engenharia, o conhecimento do equilíbrio de fases das misturas desempenha um papel importante na seleção das regiões operacionais adequadas e no processo de ampliação de escala (SOUZA et al., 2008).

De maneira geral, o equilíbrio de fases (ou 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. No caso de sistemas contendo fluidos supercríticos o equilíbrio pode ser afetado significativamente 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; LANZA, 2004).

O conhecimento de dados de equilíbrio de fases é uma ferramenta relevante no desenvolvimento de tecnologias como precipitação e encapsulamento de compostos bioativos empregando tecnologia supercrítica, desempenhando um importante papel na ampliação de escala destes processos. O equilíbrio de fases dos sistemas envolvidos na precipitação de compostos ativos permite identificar as regiões de uma única fase e assim estabelecer condições operacionais para a realização do processo de formação de partículas (FRANCESCHI et al., 2008; BOSCHETTO et al, 2013).

O equilíbrio de fases a altas pressões pode ser determinado por diferentes metodologias experimentais, sendo que três fatores influenciam a escolha da técnica mais adequada: custo, propriedades físico-químicas dos componentes envolvidos e condições de operação dos experimentos (LANZA, 2004). Na literatura encontram-se disponíveis diversos trabalhos que apresentam e discutem métodos experimentais para determinação do equilíbrio de fases a altas pressões, como McHugh e Krukoni (1994), Dariva (2000), Boscheto et al. (2013), Benelli et al. (2014), Rebelatto et al. (2014), entre outros.

O método de determinação do equilíbrio de fases empregado no presente trabalho é o método estático sintético, cuja principal característica está no fato da célula de equilíbrio, uma vez carregada, permanecer fechada até que o equilíbrio seja estabelecido. Neste caso, a composição das fases em equilíbrio é determinada indiretamente, sem necessidade de amostragem. 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. Assim, 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. Este método apresenta ainda outras vantagens como: 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).

A Tabela 4 apresenta as características dos principais métodos experimentais para determinação do equilíbrio de fases, como aplicações indicadas, vantagens e desvantagens do método.

Tabela 4 - Características gerais dos métodos experimentais de determinação de equilíbrio de fases a altas pressões.

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 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil aplicação a sistemas multifásicos.

		relativamente baixo. - Operação simples. - Identificação do tipo de equilíbrio e transição.	
Estático Analítico	- Qualquer sistema envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido ou sólido-fluido.	- Aplicado tanto a sistemas bifásicos quanto a sistemas multifásicos.	- 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	- Sistemas envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido.	- Redução no tempo de equilíbrio. - Amostragem mais fácil e segura, reduzindo a possibilidade de perturbação.	- Alto custo total do equipamento. - Alta complexidade de operação.

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

3.5.1 Comportamento de fases de misturas complexas

Misturas contendo muitos componentes são frequentemente encontradas em sistemas reais, tais como extratos ou óleos obtidos de

matrizes vegetais. 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 (BRUNNER, 1994).

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).

Segundo Brunner (1994), 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.

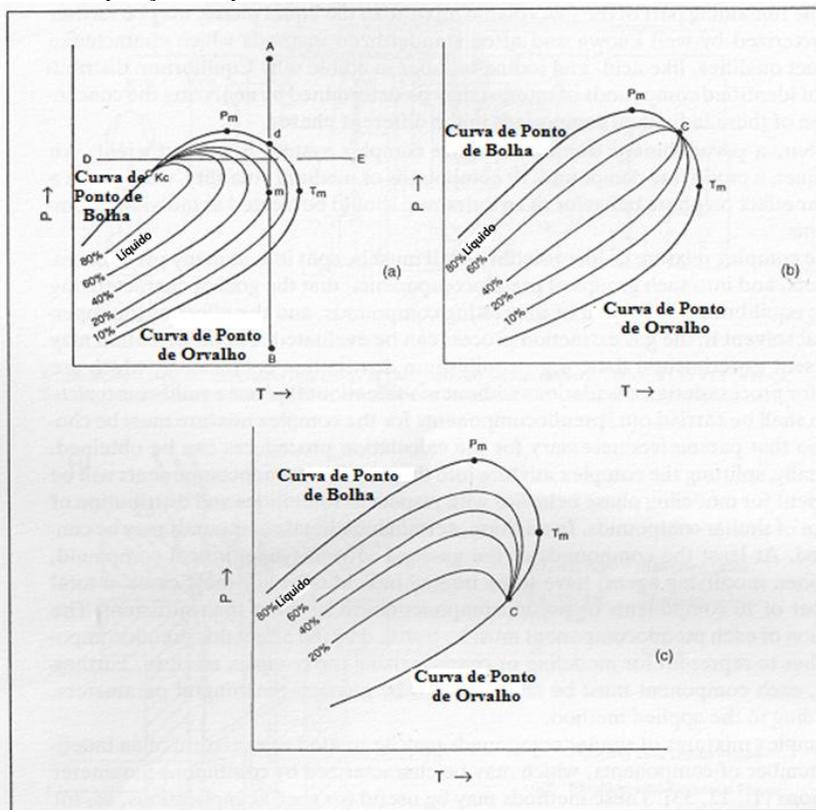
A Figura 7 é um diagrama P-T que representa o comportamento de fases de uma mistura complexa, completamente miscível na fase líquida, em relação às curvas de ponto de orvalho e de ponto bolha e a quantidade de líquido ou gás.

As curvas de ponto de orvalho e de ponto de bolha limitam a região de duas fases gás-líquido. No ponto crítico, as fases líquida e gasosa tornam-se idênticas e a pressão e a temperatura neste ponto não representam, necessariamente, condições extremas para a região de duas fases. O ponto crítico é normalmente o limite superior ou inferior da curva, sendo situado somente por coincidência em um valor extremo de pressão e temperatura (BRUNNER, 1994).

Misturas complexas apresentam comportamento de fases similar aos sistemas binários no diagrama P-T e o tamanho da área de duas fases também é determinado pelos componentes mais e menos voláteis presentes no sistema. Na extração com gases, o componente mais volátil é o solvente supercrítico e os compostos da mistura a ser separada são menos voláteis. Se uma mistura complexa de volatilidade

baixa é considerada como um pseudocomponente, um sistema pseudobinário é formado com o gás supercrítico e podem ocorrer fenômenos de equilíbrio de fases binário, como imiscibilidade líquido-líquido e curvas críticas interrompidas (BRUNNER, 1994).

Figura 7- Equilíbrio de fases de misturas complexas. Diagramas P-T com diferentes posições do ponto crítico.



Fonte: BRUNNER (1994).

3.6 MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO

A necessidade de se obter produtos de alta qualidade utilizando tecnologias de produção menos ofensivas ao ambiente constitui o principal foco de estudos em diversos ramos da pesquisa. A

nanotecnologia é um dos campos que vem recebendo pronunciada atenção no desenvolvimento de novos processos e na obtenção de materiais com propriedades e características desejáveis em diversos segmentos industriais, tais como: catalisadores, materiais cerâmicos, corantes alimentícios, biopolímeros, pigmentos, fármacos, entre outros (MARTÍN et al., 2007).

Técnicas clássicas de precipitação são geralmente empregadas na formação de partículas, como *spray drying*, liofilização e precipitação com antissolventes líquidos. As propriedades de aplicação e a funcionalidade de um material particulado são dependentes do tamanho, da distribuição de tamanho e da morfologia da partícula. No entanto, essas técnicas convencionais de produção de nano/micropartículas, além de não permitirem o controle de tamanho das partículas formadas, associam-se ao uso de solventes orgânicos que conduzem a índices residuais elevados, conferindo toxicidade ao produto final (HE et al., 2007).

A produção de partículas com tamanho e distribuição de tamanho controlados, para aplicações em diversas áreas, tem sido alvo de várias pesquisas para o desenvolvimento de nano partículas de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Tais investigações são plenamente justificáveis tendo em vista a gama de aplicações destes compostos em formulações de liberação controlada de princípios ativos com aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e de herbicidas (YEO; KIRAN, 2005).

Com relação ao encapsulamento de compostos, existem basicamente duas maneiras: o composto pode ser encapsulado, situação em que ocorre a formação de uma fina camada de polímero recobrimdo o composto, ou o composto pode ser co-precipitado, onde várias partículas do composto encontram-se dentro da partícula de polímero. O encapsulamento, também chamado de formação de micro ou nano cápsulas, ocorre quando o material a ser encapsulado é posto em suspensão em uma solução polimérica e então o polímero dissolvido é precipitado recobrimdo o material em suspensão. A co-precipitação ou formação de micro e/ou nano esferas, ou ainda impregnação, ocorre quando o composto a ser encapsulado e o polímero são dissolvidos em um único solvente ou em uma mistura destes e simultaneamente precipitados (KALOGIANNIS et al., 2006; BAHRAMI; RANJBARIAN, 2007).

3.6.1 Microencapsulamento por evaporação/extração de solvente

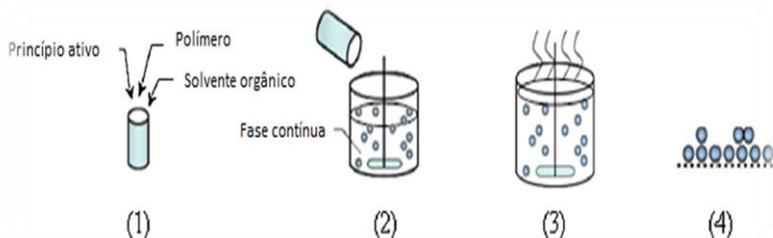
Muitos métodos têm sido usados na preparação de micropartículas de diferentes polímeros biodegradáveis, sendo eles naturais ou sintéticos. A seleção do método adequado de preparação depende das propriedades do polímero e do composto a ser encapsulado, que afetam diretamente as características das micropartículas (PAVANETTO et al., 1992).

A técnica de microencapsulamento por evaporação do solvente é amplamente aplicada em indústrias farmacêuticas para obter a liberação controlada de medicamentos. O benefício terapêutico de fármacos e compostos ativos microencapsulados trouxe a necessidade de preparar essas partículas em maior quantidade e com qualidade adequada para os ensaios clínicos e para a comercialização (BERKLAND, 2002; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005).

O processo de formação de partículas por evaporação de solvente não requer altas temperaturas nem agentes indutores de separação de fases. Os tamanhos de partícula podem ser controlados, mas um cuidado na seleção das condições operacionais e dos materiais é necessário a fim de se obter altas eficiências de encapsulamento e baixo teor de solvente residual (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005).

A preparação das micropartículas por este método consiste de quatro etapas principais: (1) dissolução ou dispersão do composto bioativo num solvente orgânico contendo o material formador de matriz (polímero); (2) emulsificação da fase orgânica, chamada fase dispersa, em um meio aquoso, chamada fase contínua; (3) extração do solvente da fase dispersa pela fase contínua, seguida pela evaporação do solvente, transformando as gotas da fase dispersa em microesferas sólidas; (4) coleta e secagem das microesferas a fim de secar o solvente residual (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). A Figura 8 apresenta os passos básicos do processo de microencapsulamento por evaporação do solvente.

Figura 8 - Passos básicos para microencapsulamento por evaporação do solvente.



Fonte: Adaptado de LI; Rouaud; Poncelet (2008).

A formação de partículas por extração do solvente é uma modificação da técnica de evaporação do solvente, descrita anteriormente. Foi reportada primeiramente por Sato et al. (1988), e na qual uma emulsão, consistindo de uma solução orgânica de polímero e composto ativo em um meio aquoso, é colocada em uma fase diluente que é miscível no solvente orgânico, mas imiscível com o polímero. Como consequência, o solvente migra das *microgotas* poliméricas para a fase diluente, produzindo microesferas sólidas (SATO et al., 1988; PAVANETTO et al., 1992).

3.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

A busca por produtos de alta qualidade e que ofereçam segurança ao consumidor impulsiona as pesquisas envolvendo compostos de fontes naturais com reconhecidas atividades biológicas.

A tecnologia supercrítica aplicada na extração e precipitação/encapsulamento tem se mostrado importante na obtenção e preservação de compostos ativos para emprego em indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos.

As matérias-primas estudadas neste trabalho, pimenta-do-reino e pimenta rosa, são utilizadas não somente no setor alimentício, mas também na medicina popular, devido às suas ações terapêuticas reconhecidas. A piperina, principal composto ativo da pimenta-do-reino, tem seu efeito benéfico à saúde humana amplamente avaliado e comprovado. O mesmo é verificado para os extratos de pimenta rosa,

cuja composição química sugere seu forte potencial como agente anti-inflamatório e antiviral. Tais relatos justificam o estudo e desenvolvimento de técnicas que preservem estes extratos e possibilitem as suas aplicações de diferentes formas.

Muitos são os estudos a respeito de métodos de extração e avaliação de atividade antioxidante *in vitro* das matérias-primas aqui relatadas. No entanto, até o momento não foram encontrados trabalhos que reportem o estudo do equilíbrio de fases ou ainda a precipitação e encapsulamento destes compostos.

CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PIMENTA-DO-REINO E DE PIMENTA ROSA

4.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta a metodologia completa e os resultados obtidos para os ensaios de extração, por diferentes técnicas, além da avaliação do potencial antioxidante dos extratos obtidos para as duas matérias-primas em estudo: pimenta-do-reino e pimenta rosa. Estes dados referem-se aos ensaios comuns às duas matérias-primas e a partir dos quais foi possível selecionar uma das amostras e definir os próximos experimentos, apresentados nos capítulos seguintes.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das matérias-primas vegetais

Os grãos de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) foram gentilmente cedidos por um produtor cuja fazenda está localizada no estado do Espírito Santo. As pimentas foram colhidas manualmente nos meses de junho e julho de 2012, e foram cedidas no último trimestre do ano. Uma coleta para material testemunho foi realizada e a amostra foi então incorporada ao acervo do Herbário Municipal de São Paulo, sob o número 15.422. Por recomendação do produtor, os grãos de pimenta já secos foram armazenados a temperatura ambiente em pequenos sacos de papel pardo, a fim de evitar a absorção de umidade e a sua degradação.

As amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* R.) foram coletadas no campus da Universidade Federal de Santa Catarina, entre os meses de abril e junho de 2012 e 2013. O material foi registrado no Herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 54.104. Após a colheita, realizou-se a limpeza dos grãos, removendo folhas, restos de galhos, poeira e demais sujidades presentes. As pimentas foram então acondicionadas em embalagens de polietileno transparente e estocadas em refrigerador a -2 °C até o momento da secagem.

4.2.2 Pré-tratamento das matérias-primas vegetais

4.2.2.1 Pimenta-do-reino

Os grãos de pimenta-do-reino foram submetidos ao processo de moagem em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil). Uma quantidade conhecida da matéria-prima triturada foi submetida à separação e classificação granulométrica em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras/SP, Brasil), com a finalidade de fracionar a matéria-prima em diferentes tamanhos, e assim determinar o diâmetro médio das partículas. Aproximadamente 100 g de amostra foram utilizados neste procedimento, utilizando-se as peneiras da série Tyler de mesh 20, 25, 32, 48, 65, 80 e fundo. Assim, o conjunto foi agitado por 20 minutos. As frações retidas em cada peneira foram pesadas para que, posteriormente, fosse realizado o cálculo do diâmetro médio de partícula, conforme descrito na seção 4.2.3.2. A amostra triturada foi acondicionada da mesma maneira que os grãos inteiros, em sacos de papel pardo, até a realização dos experimentos. Na Figura 9 têm-se uma ilustração da amostra antes e após o pré-tratamento.

Figura 9 - Pimenta-do-reino: (a) grãos inteiros; (b) amostra moída.



(a)

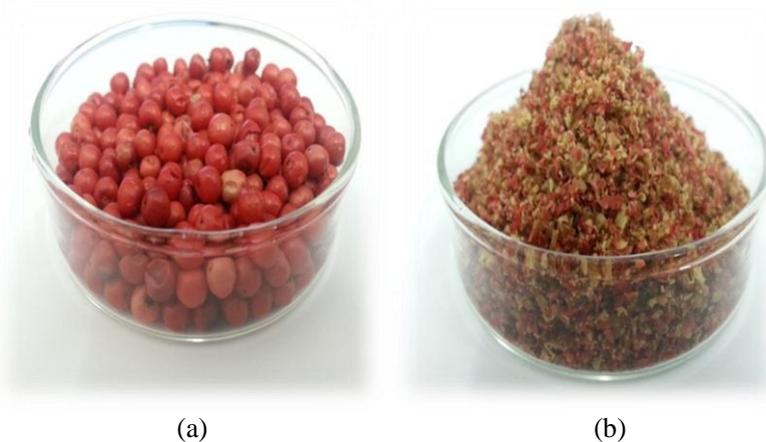
(b)

4.2.2.2 Pimenta rosa

As amostras de pimenta rosa coletadas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (De Leo, Porto Alegre/RS,

Brasil) por 6 horas a 45 °C. Após a secagem, as pimentas foram trituradas em liquidificador doméstico e, em seguida, acondicionadas em embalagens de polietileno transparente e estocadas em freezer doméstico, a -18 °C, até a realização dos experimentos. Devido à alta oleosidade dos grãos não foi possível utilizar o mesmo procedimento de moagem empregado no pré-tratamento da pimenta-do-reino, optando-se pelo uso do liquidificador. A separação granulométrica dos grãos moídos não pode ser realizada por este mesmo motivo, que fazia com que a pimenta rosa aderisse às peneiras, impossibilitando a separação. A Figura 10 apresenta uma ilustração da amostra antes e após os processos de secagem/moagem.

Figura 10 - Pimenta rosa (a) grãos inteiros; (b) amostra seca e moída.



4.2.3 Caracterização das matérias primas vegetais

4.2.3.1 Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis.

A determinação do teor de umidade e de substâncias voláteis para a pimenta-do-reino e para a pimenta rosa foi realizada conforme o método 925.09 da AOAC (2005), cujo procedimento fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis quando a amostra é submetida a 105 °C.

A massa de cada amostra foi determinada em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), sendo 5 g de cada amostra colocados em cápsulas de alumínio taradas,

previamente aquecidas em estufa (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) a 105 °C por 1 hora, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por 3 horas, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e as massas medidas novamente. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas em intervalos de meia hora, até massa constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi utilizada a Equação 1.

$$\text{Teor de umidade e voláteis (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100 \quad (1)$$

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

A determinação de umidade e substâncias voláteis de ambas as amostras foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.3.2 Determinação do diâmetro médio de partícula

A determinação do diâmetro médio de partícula da amostra de pimenta-do-reino foi efetuada através do cálculo proposto por Gomide et al. (1980). Pesaram-se 100 g de amostra moída em balança semi-analítica (BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletroeletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil), para cada batelada e, utilizando as peneiras da série *Tyler* de *mesh* -20/+48 o conjunto foi agitado por 60 minutos. Após, as massas retidas sobre cada peneira foram pesadas para o cálculo do diâmetro médio de partícula, conforme as Equações 2 e 3.

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

$$\Delta \ell_i = \frac{m_i}{M} \quad (3)$$

Onde d_s é o diâmetro médio superficial das partículas (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), M é a massa total de amostra (g), d_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número total de frações.

4.2.3.3 Determinação da massa específica real (ρ_r)

A massa específica real de ambas as amostras foi determinada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), utilizando-se a técnica de picnometria em gás hélio, que segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos, com o uso do equipamento Accu Pyc II 1340 da Micromeritics. O gás hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar as características das partículas, determinando o volume verdadeiro de um sólido, por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido. (MOURA; FIGUEIREDO, 2002).

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 o gás visando a remoção de impurezas e umidade que eventualmente possam estar presentes na amostra. Após o sistema ser 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 apresentado pelo

equipamento. O equipamento fornece os valores médios e o desvio padrão de 10 medidas realizadas durante o experimento. Assim, neste trabalho, o resultado obtido para densidade real foi expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.4 Extrações a baixa pressão

Os processos de extração a baixa pressão, que incluem o emprego de diferentes solventes orgânicos, foram realizados a fim de compará-los com o processo de extração supercrítica, em relação a rendimento de extração e atividade biológica dos extratos. O resultado destas extrações em termos de rendimento e qualidade dos extratos possibilitou a seleção do cossolvente a ser utilizado na extração supercrítica.

Os extratos obtidos após a extração em Soxhlet e com ultrassom passaram por um processo de eliminação de 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). As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes utilizados, a fim de evitar alterações do extrato devido à aplicação de calor, e o vácuo ajustado em 650 mmHg.

4.2.4.1 Extração em Soxhlet

A extração em Soxhlet foi realizada segundo o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando hexano, acetato de etila e etanol como solventes. A Tabela 5 apresenta o índice de polaridade e a constante dielétrica desses solventes.

Tabela 5 - Índice de polaridade e constante dielétrica dos solventes orgânicos utilizados na extração em Soxhlet.

Solvente	Índice de polaridade⁽¹⁾	Constante dielétrica⁽²⁾
Hexano	0	1,88
Acetato de etila	4,4	5,99
Etanol	5,2	24,85

Fonte: ⁽¹⁾Byers, 2007.

⁽²⁾Gu et al. 2004.

O sistema de extração em Soxhlet é composto de um extrator, acoplado a um balão de 250 mL e a um condensador (Figura 11). Para cada extração, 5 gramas de amostra foram acondicionados em cartucho de papel filtro, e este foi inserido no extrator. Utilizou-se 150 mL do solvente selecionado, que foi colocado no balão e aquecido até a sua respectiva temperatura de ebulição, por meio de uma manta de aquecimento. Em todas as extrações em Soxhlet manteve-se a proporção de amostra: solvente igual a 1:30 (m:v), utilizando-se novo solvente a cada procedimento. Com a evaporação o solvente entra no condensador e volta à forma líquida, entrando em contato com a amostra e ocorrendo a extração dos compostos solúveis. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido continuamente durante 6 h, sob extração contínua com velocidade de 4-5 gotas por segundo.

As extrações foram realizadas em duplicata, e os extratos, obtidos após a evaporação do solvente, foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, em *freezer* doméstico.

Figura 11 - Equipamento para extração em Soxhlet.



4.2.4.2 Extração assistida por ultrassom

O método de extração foi realizado conforme Jacques (2005) e Vinatoru (2001), no qual 7 gramas de amostra foram adicionados a 210 mL de solvente, acondicionados em balão de 250 mL. O balão foi submetido a banho indireto em ultrassom utilizando-se uma lavadora ultrassônica, por 45 minutos. Os solventes utilizados foram os mesmos empregados na extração em Soxhlet: hexano, acetato de etila e etanol.

Após o tempo de extração estabelecido, o sistema foi filtrado e realizou-se a eliminação dos solventes, conforme descrito no item 4.2.4. Em seguida, os extratos acondicionados em frascos âmbar foram armazenados em *freezer* doméstico, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. As extrações foram realizadas em duplicata e os resultados dos rendimentos expressos como média \pm desvio padrão.

4.2.5 Caracterização do leito de partículas da extração supercrítica.

4.2.5.1 Determinação da massa específica aparente (ρ_a)

A massa específica aparente das partículas de pimenta-do-reino e de pimenta rosa foi determinada por meio da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume do leito.

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

4.2.5.2 Porosidade do leito

Para a formação do leito de partículas utilizou-se aproximadamente 20 g de amostra nas extrações com pimenta-do-reino e 15 g nos ensaios com a pimenta rosa. A porosidade do leito foi determinada por meio da Equação 5, que relaciona a massa específica real (ρ_r) (item 4.2.3.3) e a massa específica aparente (ρ_a).

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

4.2.6 Determinação da massa específica do solvente supercrítico.

A massa específica do CO₂ supercrítico (ρ) nas condições de operação estudadas foi determinada através da equação de Angus, Armstrong e De Reuck (1976). Estes valores foram aplicados na avaliação da influência da temperatura e pressão na variação da massa específica do solvente e, conseqüentemente, na solubilização do soluto.

4.2.7 Extração supercrítica (ESC)

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

Os experimentos de extração supercrítica realizados visaram determinar as condições de temperatura e pressão que resultam em maiores valores de rendimento global e também produzem os melhores parâmetros de qualidade dos extratos (composição e atividade biológica). As condições operacionais utilizadas na ESC de ambas as amostras foram selecionadas de forma que abrangessem uma ampla faixa de condições de massa específica de solvente, buscando evitar a degradação de compostos termossensíveis, levando em consideração os limites de operação do equipamento utilizado.

A unidade de extração supercrítica utilizada neste trabalho foi desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha (ZETZL; LOZANO; BRUNNER, 2007). O equipamento descrito foi empregado para a determinação do rendimento global de extração, com o emprego de dióxido de carbono puro ou com cossolvente. Os ensaios foram realizados através do método dinâmico de extração que se caracteriza pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999).

A verificação da influência da pressão e da temperatura no rendimento global de extração foi realizada empregando-se pressões de 150, 200 e 300 bar, e temperaturas de 40, 50 e 60 °C. Na melhor condição de operação, levando-se em conta rendimento e atividade biológica, foi testado o uso do cossolvente, sendo esse escolhido com base nos resultados de rendimentos obtidos nas extrações convencionais.

4.2.7.1 Procedimento experimental

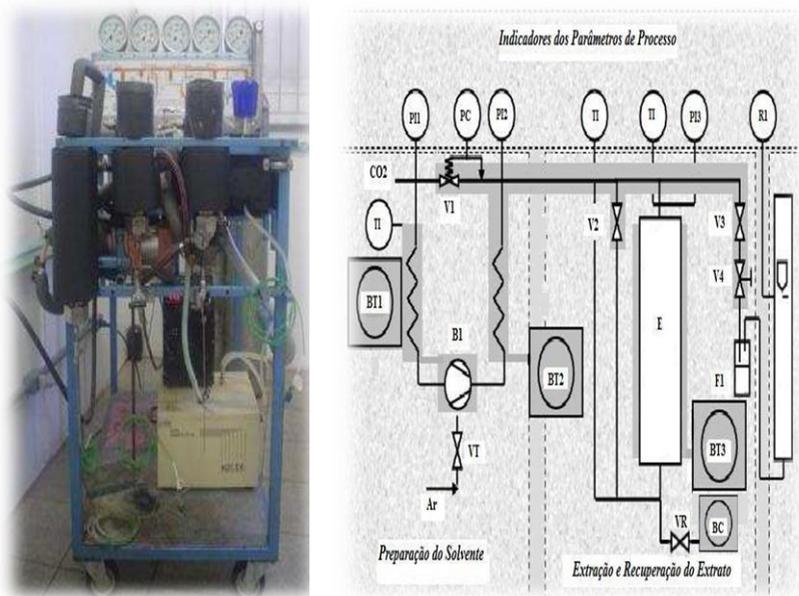
O procedimento experimental foi realizado com base em outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica – LATESC (MICHIELIN et al, 2005; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; BENELLI et al, 2010; ANDRADE et al., 2012).

O equipamento de extração supercrítica (a) utilizado no presente trabalho e o esquema de funcionamento (b) do mesmo são apresentados na Figura 12. Conforme o esquema apresentado, a unidade supercrítica consiste de um cilindro de CO₂ com tubo pescador e 99,9 % de pureza (White Martins Ltda., Joinville/SC, Brasil), que alimenta diretamente a linha de extração. A linha de solvente é imersa em um banho termostático (BT1) 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 uma linha de ar comprimido, filtrado e mantido na pressão mínima de 1 bar. A pressão de operação desejada da unidade supercrítica é controlada através da pressão do ar comprimido, uma vez que a bomba opera em uma razão 1:130.

Durante o funcionamento do equipamento a bomba encaminha o CO₂ pressurizado (a uma pressão pré-estabelecida) para a linha de extração, passando pelo extrator (E), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 32,9 cm de comprimento, 2,042 cm de diâmetro interno e volume de 107,74 mL, com extremidades rosqueadas. A linha após o extrator é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (BT2) a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e da válvula micrométrica durante a despressurização da mistura soluto/solvente (V4). A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (BT3). No início do processo de extração a

válvula (V2) é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A válvula (V3) também conectada na saída do extrator auxilia a V4 na despressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o soluto é conectado em frascos âmbar (F1) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (R1), regulado por V3 e V4.

Figura 12 - (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 (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); PI2: Manômetro de controle da bomba (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); PI3: Manômetro de controle do extrator (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); TI: Controladores de temperatura; BC: Bomba de cossolvente; VR: Válvula de retenção da bomba de cossolvente.

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

4.2.7.2 Determinação da cinética de extração

A curva global de extração fornece informações sobre o comportamento cinético da extração, possibilitando a determinação do tempo de ciclo mais viável para um processo. Os experimentos foram realizados no equipamento descrito em 4.2.7.1, utilizando para a determinação da curva de extração uma quantidade conhecida de cada amostra, para cada experimento. A massa de matéria-prima a ser utilizada em cada ensaio foi definida de forma que o leito formado apresentasse uma altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator, considerando que, com essa relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial seja desprezada. Sendo assim, foram utilizados 20 g de pimenta-do-reino e 7,5 g de pimenta rosa. As massas dos frascos de coleta foram previamente medidas em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados, sendo o extrato pesado de forma a determinar a massa de extrato obtida em função do tempo de experimento. Após a coleta, as massas dos frascos foram novamente medidas para determinar a quantidade de extrato em função do tempo de extração.

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro na condição de pressão de 200 bar, temperatura de 50 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min, baseado em ensaios iniciais para determinação de condições de operação e porque essa era uma pressão intermediária entre aquelas empregadas nos ensaios de rendimento global (item 4.2.7.3).

Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir das curvas de extração. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas constante (CER, do inglês *Constant Extraction Rate*) e decrescente de extração (FER, do inglês *Falling Extraction Rate*), respectivamente. A velocidade de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com auxílio de planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} (vazão de CO₂).

4.2.7.3 Determinação do rendimento global de extração (X_0)

O rendimento global de óleo (X_0) representa a massa de óleo extraível presente na matriz sólida referente a uma dada temperatura e pressão de extração. O tempo de extração foi definido através da observação da curva de extração obtida a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min (item 4.2.7.2), sendo de 4 horas para a pimenta-do-reino e de 3 horas para a pimenta rosa. Considerando estes valores de tempo total de extração, a curva de extração para cada amostra estudada se encontra na etapa de velocidade decrescente de extração (FER), onde a maior parte do soluto foi extraída da matriz vegetal.

A verificação da influência da pressão e da temperatura no rendimento global da ESC foi avaliada utilizando-se como condições de operação as pressões de 150, 200 e 300 bar, temperaturas de 40, 50 e 60 °C e vazão fixa de solvente (8 ± 2 g/min).

Cada experimento foi realizado em duplicata e organizado conforme apresentado na Tabela 6. Na formação do leito de partículas de pimenta-do-reino foram utilizados 20 g de matéria-prima, e para a pimenta rosa a quantidade foi de 15 g. A massa de ambas as amostras foram mensuradas em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, o que permitiu manter a altura do leito de sólidos constante. Nos ensaios de rendimento de ambas as amostras as extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro, garantindo total preenchimento do leito de extração com material inerte.

Tabela 6 - Plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global (X_0).

Variáveis	Níveis		
T (°C)	40	50	60
	150	150	150
P (bar)	200	200	200
	300	300	300

Os frascos contendo os extratos foram pesados em balança analítica, com precisão ao décimo de miligrama, e armazenados em freezer a -18 °C até a realização dos ensaios para avaliação da qualidade dos extratos.

O valor de X_0 foi calculado através da razão entre a massa de extrato ($M_{Extrato}$) obtida e a massa de cada matéria-prima vegetal (M) utilizada para formar o leito, conforme a Equação 6.

$$X_0 = \frac{M_{Extrato}}{M} * 100 \quad (6)$$

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

4.2.7.4 Emprego de cossolvente (CS)

Devido a pimenta-do-reino ser uma matéria-prima com reduzido teor de lipídios (em comparação à pimenta rosa) que são mais facilmente extraídos pelo CO₂, foram realizados ensaios com adição de cossolvente ao CO₂ com esse material a fim de avaliar a influência da adição de um modificador no rendimento da ESC. Assim, com base nos resultados de rendimento das extrações em Soxhlet e dados da literatura, o etanol em frações de 2,5; 5,0 e 7,5 % (m/m) foi selecionado como cossolvente para os ensaios de ESC com modificador.

As condições de operação foram selecionadas com base nos dados de rendimento das extrações supercríticas e respeitando as restrições de trabalho da bomba de cossolvente. Os ensaios foram realizados na condição de 150 bar, 50 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e tempo de 4 h de extração.

Para a adição de cossolvente junto à extração com CO₂, uma bomba de cossolvente (BC) (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) foi acoplada ao equipamento de extração supercrítica. Após a bomba de cossolvente foi acoplada uma válvula de retenção (VR) para evitar que o solvente orgânico retornasse para BC se houvesse um aumento na pressão da bomba de CO₂ durante o experimento. A bomba de cossolvente trabalha numa faixa de vazão de 0,1 a 10 mL/min.

Os extratos obtidos ao final dos ensaios ESC com cossolvente foram submetidos à etapa de eliminação do solvente orgânico empregando-se o mesmo método utilizado nas extrações à baixa pressão (conforme item 4.2.4). Os experimentos foram realizados em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.8 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presente nos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006). Este método está associado ao aparecimento da coloração azul devido à oxidação dos compostos fenólicos em meio básico (PESCHEL et al., 2006).

Inicialmente, foi necessário construir uma curva analítica de ácido gálico, a fim de representar a absorbância da amostra frente à concentração da curva analítica. Preparou-se uma solução estoque de 0,005 g/mL de ácido gálico em água destilada, e a partir desta solução estoque, foram diluídas alíquotas em balões volumétricos de 100 mL para a obtenção de soluções de concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferidos para estes 100 μ L 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 a 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 foi realizado com água destilada. A curva analítica de ácido gálico foi representada através do gráfico de absorbância *versus* concentração de ácido gálico (mg/L) e está apresentada no Apêndice I.

Os extratos avaliados foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A. na concentração final de 1667 mg/L, e seguiu-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva analítica de ácido gálico. Os valores de absorbância encontrados para cada tipo de

extrato foram correlacionados com a curva padrão, e o teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi determinado através da Equação 7. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg de EAG/g de extrato, como média \pm desvio padrão.

$$\text{TFT (mgEAG/g)} = \left(\frac{\text{EAG} * 1000}{D_{\text{extrato}}} \right) (7)$$

Sendo:

EAG: equivalente em ácido gálico, obtido através da curva analítica (mg EAG/L);

D: diluição da amostra (mg_{extrato}/L).

4.2.9 Avaliação da atividade antioxidante

O comportamento da atividade antioxidante dos extratos, determinado pelas metodologias descritas a seguir, foi utilizado para avaliar a qualidade dos extratos obtidos pelas extrações a baixa pressão e por tecnologia supercrítica usando CO₂ e CO₂ com cossolvente, bem como comparar os resultados obtidos com o butil-hidroxitolueno (BHT), um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante.

4.2.9.1 Método DPPH

A técnica de determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH constitui na reação do composto em análise em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mM e com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL) dos extratos analisados (pimenta-do-reino e pimenta rosa), por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de reação, faz-se a leitura das absorvâncias 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 sua absorvância (MENSOR et al, 2001). Assim, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical pode ser calculado convertendo-se a absorvância em percentual de atividade antioxidante (AA %), segundo a Equação 8:

$$AA(\%) = \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (8)$$

A concentração das amostras necessárias para reagir com 50% do radical livre DPPH (EC_{50} , do inglês *Equivalent Concentration*) é calculada por análise de regressão linear (MENSOR et al., 2001). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC_{50}) e atividade antioxidante (AA %) para os extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa analisados foram calculados a partir de valores médios de absorvância de cada concentração.

4.2.9.2 Método do radical ABTS

A atividade antioxidante foi avaliada segundo a metodologia descrita por Re et al. (1999). O ABTS (Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em água até a concentração de 7,0 mmol/L e submetido à reação com persulfato de potássio (2,45 mmol/L), pela mistura de quantidades equivalentes de cada solução, para a formação do radical. A mistura permaneceu ao abrigo da luz e sob refrigeração por 16 horas antes do uso. No momento da análise, a solução do radical $ABTS^+$ foi diluída em etanol até se obter absorvância de $0,70 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 754 nm. Adicionou-se, então, 980 μ L de solução de radical $ABTS^+$ e 20 μ L de solução de extrato da matéria-prima em análise (pimenta-do-reino e pimenta rosa) nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo, SP) 6 minutos após a adição da amostra na solução de $ABTS^+$. Utilizou-se o Trolox, vitamina E sintética, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich, EUA) como antioxidante de referência, sendo preparado em etanol e estocado como solução padrão. O percentual de inibição do radical foi calculado através da Equação 9.

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \left(\frac{Abs_f}{Abs_0} \right) * 100 \quad (9)$$

Onde: Abs_f é a absorvância após a adição da amostra ao radical ABTS para o tempo de 6 minutos e Abs_0 é a absorvância do radical.

Uma curva analítica foi plotada em função da porcentagem de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox ($\mu\text{molL}^{-1}/\text{mL}$). Após a obtenção do percentual de inibição do respectivo extrato, a atividade antioxidante (AA) foi calculada através da Equação 10 com base na curva analítica de Trolox, apresentada no Apêndice II. Desta forma, os resultados foram expressos em μmolL^{-1} TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) por g de extrato.

$$AA(\mu\text{molL}^{-1}\text{TEAC} / \text{g}) = \left(\frac{C_a}{C_e} \right) \quad (10)$$

Onde C_a é a concentração ($\mu\text{molL}^{-1}/\text{mL}$) referente ao percentual de inibição obtido através da leituras espectrofotométricas do extrato e C_e é a concentração do extrato utilizada na técnica.

4.2.10 Determinação do perfil químico dos extratos

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

Para a referida análise foi empregado um espectrômetro de massas triplo quadrupolar (Scion MS-TQ, Bruker Daltonics Inc.) acoplado ao cromatógrafo gasoso (456-GC, Bruker Daltonics Inc), coluna VF5-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm , Varian, Inc., CA, USA). Os ensaios foram realizados empregando-se o modo de injeção por *split* a uma taxa de 1:20. A temperatura do injetor foi de 250 °C. O gás de arraste foi o hélio usado a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantendo por 3 minutos, aquecendo a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C, mantendo por 10 minutos. Os compostos majoritários foram identificados usando uma base de dados para produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology/NIST - Mass-Spectral Library with Windows Search Program – Version 8*).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Características das matérias-primas vegetais

Os valores de umidade e substâncias voláteis determinados em triplicata para a pimenta-do-reino e para a pimenta rosa, após a secagem, estão apresentados na Tabela 7, como média \pm desvio padrão. A massa específica real de ambas as amostras e o diâmetro médio de partículas da pimenta-do-reino são apresentados na mesma tabela.

Tabela 7 - Características físicas das matérias-primas vegetais.

Matéria-prima	Teor de umidade e voláteis (g/100g)	Diâmetro médio de partícula (mm)	Massa específica real (g/cm³)
Pimenta-do-reino	15,01 \pm 0,05	0,57 \pm 0,15	1,3916 \pm 0,0002
Pimenta rosa	20,8 \pm 0,4	-	1,3234 \pm 0,0007

Segundo Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007), a quantidade de água presente na amostra (matéria-prima vegetal) pode afetar negativamente o rendimento da extração supercrítica. Assim, a fim de evitar interações indesejáveis entre a matriz vegetal e a água, essa deve ser removida ou ao menos ter seu conteúdo controlado. Apenas 0,3% da água contida nas amostras são solúveis em CO₂ supercrítico, e esta quantidade serve para solubilizar compostos relativamente polares, pouco solúveis no CO₂ puro. Assim, amostras com teor de umidade alto normalmente levam a baixos rendimentos de extração, já que a água passa a competir com o solvente supercrítico na extração de determinadas substâncias. Além disso, o processo de secagem facilita o manuseio da amostra, evitando a formação de aglomerados.

A umidade final da pimenta rosa foi alcançada após secagem em estufa com circulação de ar, conforme descrito no item 4.2.3.1. Por meio de ensaios iniciais, verificou-se que um maior tempo de secagem, ou a aplicação de temperatura mais elevada, levavam à queima da matéria-prima, fato observado pela coloração escura que os frutos adquiriam. Assim, o valor de umidade obtido para a pimenta rosa (20,8 \pm 0,4) foi adequado aos processos de extração estudados e suficiente para evitar a formação de aglomerados de amostra durante o

armazenamento. A amostra de pimenta-do-reino não foi submetida ao processo de secagem, pois já apresenta baixo teor de umidade que permite bom manuseio da matéria-prima. Para essa amostra a análise de teor de umidade e compostos voláteis foi realizada para a caracterização da matéria-prima, a fim de definir a quantidade de água contida na amostra.

Como parte dos ensaios prévios para estabelecimento das condições de processo ambas as amostras foram submetidas à extração com CO₂ supercrítico. Após a extração foi realizada uma análise visual da matriz a fim de verificar a formação de caminhos preferenciais. Com a retirada dos sólidos que formaram o leito (tanto para a pimenta rosa como para a pimenta-do-reino) observou-se uma adequada compactação do leito e coloração uniforme, indicando que não houve formação de caminhos preferenciais durante a passagem do fluido supercrítico, sugerindo que o diâmetro médio das partículas estava adequado ao processo de extração. Partículas muito grandes ou pequenas demais podem interferir na compactação do leito e comprometer o rendimento da extração (MARTÍNEZ, 2005).

4.3.2 Rendimento das extrações a baixa pressão

Os rendimentos dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa obtidos pelos processos de extração a baixa pressão, com diferentes solventes e seus respectivos índices de polaridade, estão apresentados na Tabela 8.

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicam que os melhores rendimentos foram obtidos com a extração em Soxhlet, utilizando etanol como solvente, para as duas matérias-primas avaliadas. Na extração em Soxhlet com hexano, para a pimenta rosa, o rendimento foi de $14,1 \pm 0,2\%$, e a substituição desse solvente por etanol proporcionou um rendimento correspondente a cerca de 3 vezes o valor obtido na extração com hexano. Para a pimenta-do-reino, o extrato obtido com hexano em Soxhlet apresentou um rendimento de $4,02 \pm 0,5\%$, enquanto na extração com etanol este valor alcançou $10,3 \pm 0,6\%$. É possível observar o aumento do rendimento em função do aumento da polaridade do solvente empregado, fato este mais claramente verificado nos rendimentos de pimenta rosa, sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade de intermediária a alta.

Tabela 8 - Rendimentos das extrações a baixa pressão, utilizando diferentes solventes com polaridades variadas.

Método de extração	Solvente	Polaridade (1)	X ₀ (%) ⁽²⁾	
			Pimenta-do-reino	Pimenta rosa
Soxhlet	Hex	0	4,1 ± 0,5 ^c	14,1 ± 0,2 ^c
	EtOAc	4,4	6,5 ± 0,3 ^b	15 ± 1 ^c
	EtOH	5,2	10,3 ± 0,6 ^a	44 ± 1 ^a
Ultrassom	Hex	0	3,1 ± 0,1 ^c	8,7 ± 0,4 ^d
	EtOAc	4,4	5,6 ± 0,1 ^c	13,1 ± 0,1 ^c
	EtOH	5,2	5,3 ± 0,5 ^c	21 ± 2 ^b

Hex: Hexano; EtOAc: Acetato de etila; EtOH: Etanol.

⁽¹⁾Índice de polaridade do solvente (Byers, 2007).

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

Bertoldi (2006) encontrou valores de rendimentos semelhantes aos obtidos no presente trabalho, na extração em Soxhlet de pimenta rosa, utilizando etanol ($48,6 \pm 1,9$) e hexano ($10,6 \pm 0,4$) como solventes. A diferença observada entre os resultados dos dois solventes foi justificada pela polaridade dos solventes empregados, sugerindo a predominância de compostos polares nos extratos de pimenta rosa. Ainda, a constante dielétrica pode explicar a superioridade do rendimento das extrações com etanol em relação aos demais solventes, para ambas as amostras. A constante dielétrica é a capacidade de atenuar campos elétricos e, portanto, de auxiliar na interação entre cargas. Assim, como esta propriedade é significativamente mais elevada para o etanol, as moléculas do solvente estão fortemente ligadas aos componentes polares, contribuindo para o aumento do rendimento da extração (MARKOM et al., 2007).

No presente trabalho os rendimentos da extração em Soxhlet com etanol e com hexano para a pimenta rosa foram de 44 ± 1 e de $14,1 \pm 0,2$, respectivamente, valores próximos aos da literatura e cuja diferença pode ser justificada pela diferença de local de cultivo, grau de maturação, variedade da planta, entre outros aspectos.

Na extração em Soxhlet com hexano, tanto para a pimenta-do-reino quanto para a pimenta rosa, o rendimento foi próximo ao de solvente com polaridade intermediária, como acetato de etila, sugerindo

também a presença de compostos de caráter lipofílico, mais facilmente solubilizados em solventes apolares.

Ao se comparar os resultados de rendimentos para os diferentes métodos de extração, para um mesmo solvente, observa-se que a extração em Soxhlet apresenta maiores rendimentos em relação ao processo de extração empregando ultrassom, para todos os solventes. A justificativa desse comportamento reside na maior temperatura de operação, no reciclo do solvente e nas interações entre o solvente e matriz vegetal, característicos da extração em Soxhlet, que podem contribuir para uma maior solubilização de compostos, de diferentes classes, elevando assim o rendimento da extração (MARKON et al., 2007).

De acordo com os resultados obtidos nas técnicas a baixa pressão com diferentes solventes, o etanol mostrou-se um solvente adequado para a utilização como cossolvente na ESC, por apresentar o mais alto rendimento, tanto na extração em Soxhlet quanto na extração assistida por ultrassom.

Ao se comparar os rendimentos obtidos para as duas matérias-primas, considerando o mesmo método de extração e o mesmo solvente, observa-se que a pimenta rosa apresenta os melhores rendimentos, em todas as combinações testadas. De acordo com a literatura, o conteúdo de óleo na pimenta rosa, obtido por extração com hexano, pode alcançar 32%, enquanto que o conteúdo de óleo volátil para a pimenta-do-reino é de aproximadamente 3,5% (FERREIRA, 1996; SILVA et al., 2005).

Cabe ressaltar que a comparação entre as amostras realizada neste trabalho apresenta um caráter mais expositivo do que comparativo, que tem como objetivo apresentar as características de cada extrato, já que não seria adequado buscar relações entre resultados obtidos para matérias-primas de espécies diferentes.

4.3.3 Extração supercrítica

4.3.3.1 Características do leito de extração

A Tabela 9 apresenta as características do leito de extração supercrítica, como densidade aparente e porosidade, determinadas conforme descrito no item 4.2.5. Assim como a caracterização das

partículas das matérias-primas vegetais, o conhecimento das características do leito de extração se faz importante para o entendimento dos mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de extração, quando estes são avaliados por modelos matemáticos.

Tabela 9 - Características do leito de extração supercrítica.

Matéria-prima	Massa específica aparente (g/cm³)	Porosidade do leito
Pimenta-do-reino	0,647 ± 0,002	0,535
Pimenta rosa	0,370 ± 0,011	0,720

4.3.3.2 Curvas de extração

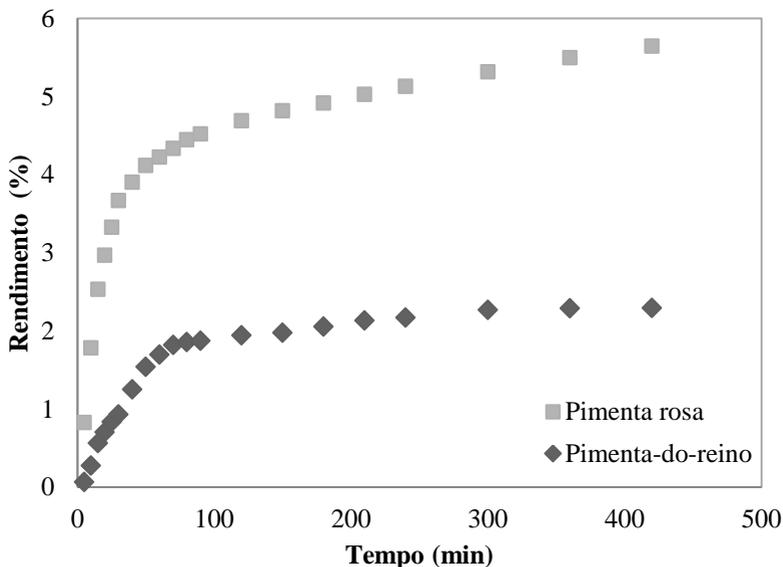
Ensaio iniciais foram realizados para permitir a definição das condições de operação adequadas para obtenção de extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa por meio de extrações com CO₂ supercrítico. Os parâmetros de processo determinados nestes ensaios foram: vazão de solvente, quantidade de amostra utilizada na formação do leito de partículas e tempo de extração. Os ensaios foram conduzidos na pressão de 200 bar e temperatura de 50 °C, condição intermediária de pressão e temperatura empregada posteriormente nos ensaios de rendimento, e vazão de 8 ± 2 g/min.

Para os ensaios de rendimento global de extração supercrítica é necessário fixar um tempo de extração, para que seja possível avaliar os efeitos da pressão e da temperatura empregados no processo de extração. O tempo é fixado com base nas etapas da curva de extração, conforme descrito no item 3.4.3.3. Na etapa de velocidade constante de extração (CER) as partículas se encontram completamente envoltas por uma camada superficial de soluto, fazendo com que o processo seja caracterizado pela transferência de massa por convecção entre a superfície do sólido e o solvente. Após a etapa CER, ocorre a etapa decrescente de extração (FER), causada pela exaustão da camada de soluto na superfície das partículas. A partir deste momento, o processo difusional começa a controlar a transferência de massa, pois o solvente encontra espaços livres para penetração na matriz sólida, solubilização do soluto e posterior difusão da mistura soluto-solvente para a superfície

da partícula. A etapa final é a de velocidade quase nula de extração ou etapa difusional, na qual a inclinação da curva diminui e a curva se aproxima do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível (X_0). Nessa etapa o mecanismo de transferência de massa que controla o processo é a difusão do soluto presente na matriz sólida para o fluido (solvente) (FERREIRA; MEIRELES, 2002).

As curvas de extração obtidas para a pimenta-do-reino e para a pimenta rosa são apresentadas na Figura 13. Padronizou-se o tempo de extração em 4 h para a pimenta-do-reino, e em 3 h para a pimenta rosa. Os tempos foram definidos de forma que a etapa difusiva fosse alcançada, garantindo assim que a maior parte de soluto tenha sido extraída. Assim, ao final das 4 h de extração, o rendimento para a pimenta-do-reino foi de 2,17% e para a pimenta rosa, após as 3h de experimento, o rendimento alcançado foi de 4,92%.

Figura 13 - Curvas de extração de pimenta-do-reino e de pimenta rosa a 200 bar, 50 °C e vazão de CO₂ de 8±2 g/min.



Fazendo a regressão linear dos dados obtidos nas curvas de extração chega-se aos parâmetros cinéticos de extração t_{CER} (tempo de duração da etapa CER) e M_{CER} (taxa de extração da etapa CER) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER), apresentados

nas Tabelas 10 e 11 para a pimenta-do-reino e para a pimenta rosa, respectivamente. Estes dados são importantes quando se deseja estudar a modelagem matemática das cinéticas de extração e para o estabelecimento do tempo das etapas da extração.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de extração de pimenta-do-reino a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min.

Parâmetro	Etapa de extração		
	CER	FER	DCP
t (min)	0 - 70	70 - 240	>240
m (g)	0,395	0,039	0,015
X₀ (%)	1,975	0,195	0,075
M (g/min)	0,005	0,0004	0,00004
Y	$6,72 \times 10^{-4}$	-	-

t: duração da etapa de extração; m: massa de extrato aproximada; X₀: rendimento da etapa; M: velocidade de extração; Y: concentração de soluto na fase solvente; CER: etapa de extração constante; FER: etapa de extração decrescente; DCP: etapa difusional.

Tabela 11-Parâmetros cinéticos de extração de pimenta rosa a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min.

Parâmetro	Etapa de extração		
	CER	FER	DCP
t (min)	0 - 40	40 - 120	>120
m (g)	0,310	0,043	0,001
X₀ (%)	4,133	0,573	0,013
M (g/min)	0,006	0,0006	0,0002
Y	$7,5 \times 10^{-4}$	-	-

t: duração da etapa de extração; m: massa de extrato aproximada; X₀: rendimento da etapa; M: velocidade de extração; Y: concentração de soluto na fase solvente; CER: etapa de extração constante; FER: etapa de extração decrescente; DCP: etapa difusional.

Para a pimenta-do-reino, após 240 min de extração, a etapa difusional já foi alcançada, e mesmo na etapa FER o rendimento já havia sido bastante reduzido. Assim, o tempo de extração total a ser utilizado nos ensaios de rendimento foi definido como 4h. No caso da pimenta rosa, o tempo até que a fase difusional fosse atingida foi bem inferior, totalizando 120 min. Por conta disso, estipulou-se 3h como o tempo a ser utilizado nos experimentos para avaliação do rendimento das extrações.

4.3.3.3 Rendimento global da ESC (X_0)

O rendimento global de extração (X_0) é definido como a quantidade total de compostos presente na matriz sólida, possível de ser extraída pelo solvente, em função das condições de extração estabelecidas (SILVA, 2004).

Na extração com CO_2 supercrítico, a avaliação do rendimento global de extração (descrito no item 4.7.3), obtido nas diferentes condições de temperatura e pressão empregadas, indica o efeito de solubilização do solvente e conseqüentemente a influência sobre a eficiência do processo de extração. A Tabela 12 apresenta os resultados médios do rendimento global de extração (X_0), realizados em duplicata, as condições de pressão e temperatura empregadas, bem como os valores de massa específica do solvente supercrítico, para os extratos de pimenta-do-reino e pimenta rosa. A extração supercrítica para ambas as amostras apresentou os melhores rendimentos nas mais altas condições de pressão e temperatura, 300 bar e 60 °C, sendo $3,2 \pm 0,3\%$ para a pimenta-do-reino e $5,9 \pm 0,3\%$ para a pimenta rosa. A condição citada (300 bar e 60 °C) representa um valor de massa específica do solvente de $0,830 \text{ g CO}_2/\text{cm}^3$.

Tabela 12 - Rendimento global de extração de pimenta-do-reino e de pimenta rosa (X_0) obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	$\rho\text{CO}_2^{(1)}$ (g/cm ³)	X_0 (%) ⁽²⁾	
			Pimenta-do-reino	Pimenta rosa
40	150	0,781	$1,5 \pm 0,4^{\text{de}}$	$3,7 \pm 0,4^{\text{d}}$
	200	0,840	$2,1 \pm 0,1^{\text{cde}}$	$4,1 \pm 0,5^{\text{cd}}$
	300	0,911	$2,4 \pm 0,4^{\text{bc}}$	$3,6 \pm 0,1^{\text{d}}$
50	150	0,701	$1,28 \pm 0,01^{\text{e}}$	$4,6 \pm 0,3^{\text{bc}}$
	200	0,785	$1,6 \pm 0,4^{\text{cde}}$	$4,2 \pm 0,4^{\text{cd}}$
	300	0,871	$2,7 \pm 0,1^{\text{ab}}$	$5,1 \pm 0,2^{\text{ab}}$
60	150	0,606	$1,4 \pm 0,3^{\text{e}}$	$2,6 \pm 0,2^{\text{e}}$
	200	0,724	$2,2 \pm 0,2^{\text{bcd}}$	$4,2 \pm 0,2^{\text{cd}}$
	300	0,830	$3,2 \pm 0,3^{\text{a}}$	$5,9 \pm 0,3^{\text{a}}$

⁽¹⁾ Angus; Armstrong; De Reuck, 1976.

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

Para a pimenta-do-reino nas três temperaturas avaliadas é possível observar o aumento do rendimento com o incremento da pressão. Este comportamento é justificado pelo aumento da densidade do solvente com a pressão, aumentando o poder de solvatação do CO₂ (BRUNNER, 1994). Ainda, o aumento da pressão pode gerar rupturas na matriz vegetal e facilitar a liberação de compostos que não estavam disponíveis em pressões mais baixas, e dessa forma, aumentar o número de compostos solubilizáveis e conseqüentemente o rendimento do processo (CAMPOS et al., 2005). O mesmo comportamento foi verificado para a pimenta rosa, na temperatura de 60 °C e mesma faixa de pressão estudada (de 150 a 300 bar).

Os rendimentos mais baixos da extração de pimenta-do-reino foram obtidos na menor pressão estudada, 150 bar, em todas as temperaturas testadas. O efeito da temperatura no rendimento de extração, a pressão constante, dá-se por dois mecanismos: o aumento na temperatura de processo aumenta a solubilidade devido ao aumento da pressão de vapor do soluto e por outro lado reduz a solubilidade devido à diminuição na densidade do solvente (BRUNNER, 1994). Esses efeitos opostos resultam na inversão das isotermas de rendimento, conforme observado nas Figuras 14 e 15. Este comportamento ocorre nas proximidades do ponto crítico, onde pequenas alterações de temperatura e/ou pressão são acompanhadas por grandes variações de densidade do solvente. Em pressões mais elevadas, o efeito dominante passa a ser a pressão de vapor do soluto (MICHIELIN et al., 2005; REVERCHON; DE MARCO, 2006; ALMEIDA et al., 2007).

Figura 14 - Isotermas de rendimento de pimenta-do-reino.

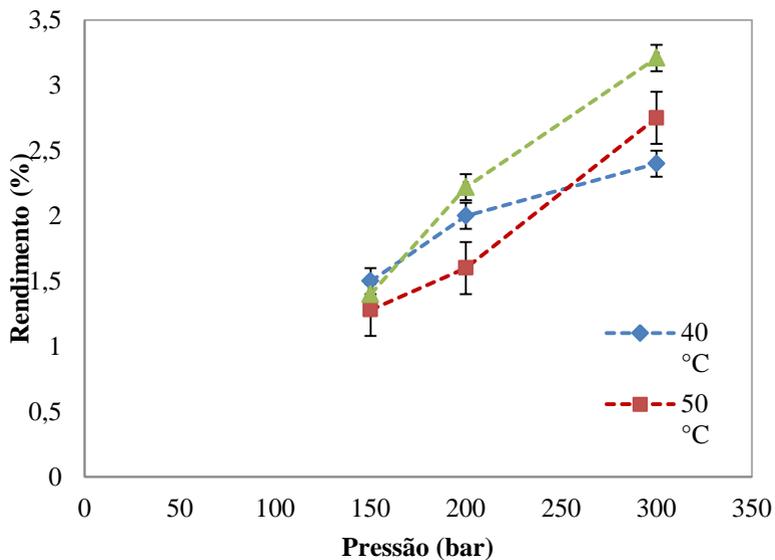
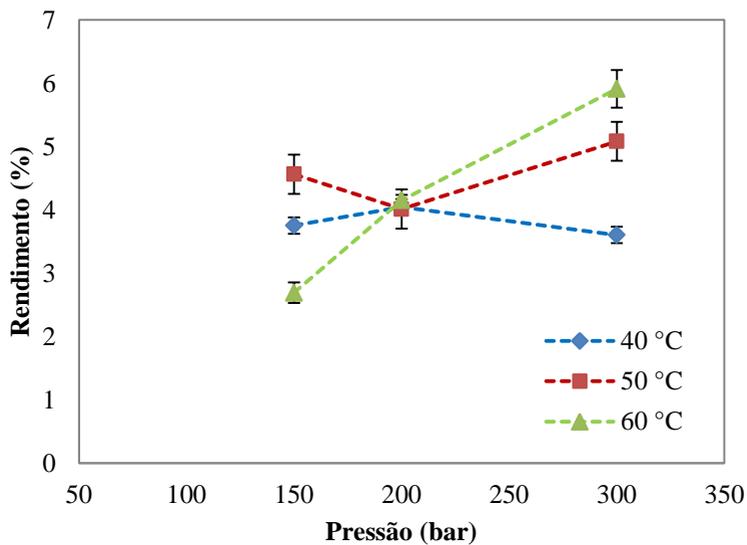


Figura 15 - Isotermas de rendimento de pimenta rosa.



Nos rendimentos da pimenta rosa, na condição isobárica de 300 bar, verificou-se o aumento do rendimento de extração em função do aumento da temperatura, sugerindo que nesta região ocorre o predomínio do efeito da pressão de vapor do soluto, que aumenta a solubilidade deste no sistema com o aumento da temperatura.

O fenômeno de inversão das isothermas, conhecido como retrogradação, pode ser observado na Figura 14. Abaixo da região próxima a 170 bar o rendimento da extração aumenta com a redução da temperatura. Neste caso, prevalece o efeito da densidade do solvente, que diminui com o aumento da temperatura provocando a redução da solubilidade dos compostos solúveis de pimenta-do-reino no CO₂ supercrítico (FERREIRA et al., 1999; MCHIELIN et al., 2005). Outra região de inversão pode ser observada próxima à região de 250 bar. Nesta região ocorre o efeito inverso ao anterior, pois o aumento da pressão de vapor do soluto com a temperatura é mais importante que a redução da densidade do solvente, fazendo com que o rendimento aumente em função do aumento da temperatura.

A inversão das isothermas também foi verificada para a pimenta rosa, na região próxima a 200 bar (Figura 15). Neste caso, até a pressão de inversão, a redução da temperatura provoca um aumento no rendimento, prevalecendo o efeito da densidade do solvente, conforme descrito para a pimenta-do-reino. Acima dessa região, a elevação da temperatura favorece o aumento do rendimento, indicando que a pressão de vapor do soluto tem mais influência na região acima de 200 bar.

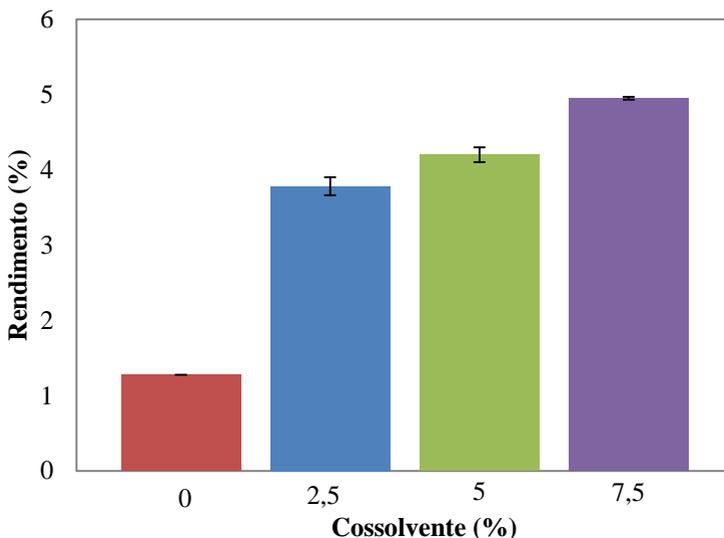
Na literatura são encontrados vários estudos que relatam esse comportamento (KITZBERGER et al., 2009; MEZZOMO et al., 2010; MICHELIN et al., 2009), porém em diferentes faixas de pressão, o que é explicado pelas diferenças nas matrizes vegetais utilizadas. A faixa de inversão é determinada pela composição dos extratos, ou seja, pela influência dos grupos funcionais e estrutura dos ácidos graxos presentes no soluto sobre a pressão de vapor dos diferentes extratos e, portanto, na solubilidade destes no solvente supercrítico (MEZZOMO et al., 2010).

Buscando melhorar o rendimento da extração e ampliar a quantidade de compostos solubilizáveis na extração supercrítica, pode-se considerar o emprego de um solvente orgânico como cossolvente na ESC. Como o CO₂ é um solvente de caráter apolar, ele extrai preferencialmente compostos apolares. Assim, a adição de um

cossolvente polar faz com que compostos polares, não solubilizados inicialmente pelo CO₂ puro, possam ser extraídos pela mistura deste com o cossolvente. Nas extrações à baixa pressão, o solvente que levou ao melhor rendimento foi o etanol, de caráter polar, sendo este então escolhido como cossolvente para a ESC. A adição de cossolvente foi realizada somente nos ensaios com a pimenta-do-reino, que apresentou rendimentos de extração inferiores aos da extração de pimenta rosa.

A definição das condições de extração supercrítica a serem empregadas utilizando cossolvente foi realizada com base no rendimento obtido utilizando CO₂ puro, e também pela atividade antioxidante apresentada pelos extratos (resultados apresentado no item 4.6.5). Sendo assim, a condição de 150 bar e 50 °C foi selecionada para os ensaios de cossolvente com a pimenta-do-reino, adicionando etanol nas frações de 2,5%, 5% e 7,5% em relação à massa de CO₂ utilizada, baseado em outros estudos já realizados com adição de modificadores à extração supercrítica (MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009). O etanol foi selecionado como cossolvente ao CO₂ na ESC devido a sua baixa toxicidade, uso comum na indústria de alimentos e farmacêutica, a facilidade de evaporação do extrato, sendo também relatada na literatura sua utilização na tecnologia supercrítica (CASAS et al., 2007; MEZZOMO et al., 2010, ANDRADE et al., 2012). Os resultados obtidos para a extração de pimenta-do-reino com adição de etanol são apresentados na Figura 16. A eliminação do solvente dos extratos foi realizada conforme procedimento descrito no item 4.2.4.

Figura 16 - Rendimento global X_0 para os extratos de pimenta-do-reino utilizando etanol como cossolvente.



Como pode ser observado na Figura 16, o aumento do rendimento da extração foi verificado para todas as razões mássicas de etanol utilizadas. Este comportamento deve-se a maior solubilização de compostos polares na mistura etanol/ CO_2 , o que não ocorre quando se utiliza o CO_2 puro, reduzindo assim a seletividade do processo, aumentando o rendimento. A adição de modificadores à extração supercrítica tem sido utilizada por diversos autores, seja buscando o aumento do rendimento da extração, a melhora no potencial antioxidante dos extratos, ou ambos os efeitos (MAZZUTTI et al, 2012; ANDRADE et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2013; BENELLI et al, 2014).

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

4.3.4 Teor de compostos fenólicos totais (TFT)

Os valores do teor de compostos fenólicos totais (TFT) determinado pelo método de Folin-Ciocalteu para cada extrato de pimenta-do-reino e de pimenta rosa, obtidos pelos diferentes métodos de extração são apresentados na Tabela 13. A curva padrão de ácido gálico, utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais consta no Apêndice I. Embora os compostos fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante de produtos naturais, a determinação destes pelo método de Folin-Ciocalteu, expressa em termos de teor de ácido gálico presente na amostra, não caracteriza completamente a atividade antioxidante, representando apenas uma boa estimativa desta propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005).

De acordo com a Tabela 13, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa obtidos por ESC não apresentou uma tendência de variação com a mudança da pressão ou da temperatura. A maioria dos extratos supercríticos apresentou resultados semelhantes entre si e bastante inferiores ao encontrado no antioxidante comercial, BHT (268 ± 13 mg EAG/ g de extrato), usado como referência.

A adição de etanol como cossolvente na ESC de pimenta-do-reino favoreceu a extração de compostos fenólicos, com exceção da concentração de 2,5% de cossolvente, quando o resultado foi inferior ao encontrado na extração com CO₂ puro. O maior valor do teor de compostos fenólicos totais entre os extratos obtidos na ESC com adição cossolvente foi de 46 ± 3 mg EAG/ g de extrato, obtido quando a concentração de 5% de etanol foi empregada. Andrade et al. (2012) também observaram a redução do teor de compostos fenólicos dos extratos de borra de café com o aumento da concentração de etanol na extração supercrítica. Segundo Campos (2005), existe uma concentração ótima de cossolvente a ser utilizada na ESC a fim de alcançar melhores rendimentos e melhor atividade antioxidante. Acima desta concentração, que no presente trabalho é de 5%, ocorreu a redução na extração de compostos fenólicos, indicativos de atividade antioxidante.

Tabela 13 - Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), para os extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa e BHT.

EXTRAÇÃO	SOLVENTE	TFT (mgEAG/g extrato) ⁽²⁾	
		Pimenta-do-reino	Pimenta rosa
UE	Hex	30,3 ± 0,3 ^c	39 ± 2 ^c
	EtOAc	42 ± 1 ^b	16 ± 2 ^d
	EtOH	27,5 ± 0,4 ^{cd}	14,2 ± 0,3 ^{de}
SOX	Hex	22 ± 2 ^{efg}	ND
	EtOAc	55 ± 6 ^a	65 ± 1 ^a
	EtOH	28 ± 1 ^{cd}	60 ± 1 ^b
ESC 150 bar/40°C	CO ₂	16 ± 2 ^h	4,1 ± 0,6 ^g
ESC 150 bar/50°C	CO ₂	19,8 ± 0,4 ^{fgh}	13 ± 1 ^e
ESC 150 bar/60°C	CO ₂	15,2 ± 0,5 ^h	2,9 ± 0,4 ^h
ESC 200 bar/40°C	CO ₂	25 ± 2 ^{def}	9 ± 1 ^f
ESC 200 bar/50°C	CO ₂	21 ± 1 ^{efgh}	13 ± 1 ^e
ESC 200 bar/60°C	CO ₂	26 ± 1 ^{cde}	14,4 ± 0,4 ^{de}
ESC 300 bar/40°C	CO ₂	20 ± 1 ^{efgh}	16 ± 1 ^d
ESC 300 bar/50°C	CO ₂	15 ± 2 ^h	15 ± 1 ^{de}
ESC 300 bar/60°C	CO ₂	21,5 ± 0,5 ^{efg}	4,1 ± 0,5 ^g
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 2,5% etanol	18 ± 2 ^{gh}	-
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 5% etanol	46 ± 3 ^b	-
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 7,5% etanol	24 ± 3 ^{def}	-
BHT ⁽¹⁾	-	268 ± 13	268 ± 13

ND: não detectada.

⁽¹⁾Benelli et al. (2010).

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

Entre as extrações à baixa pressão, a extração em Soxhlet com acetato de etila foi a que apresentou os melhores resultados de teor de compostos fenólicos totais, para ambas as amostras em estudo, sendo 55 ± 6 mg EAG/ g de extrato para a pimenta-do-reino, e 65 ± 1 mg EAG/ g de extrato para a pimenta rosa. Todos os extratos analisados apresentaram teor de compostos fenólicos inferior ao determinado para o BHT, sendo esta diferença mais evidente nos extratos de pimenta rosa,

cujo percentual de diferença mínimo verificado foi de 75%, considerando o extrato obtido com acetato de etila em Soxhlet.

Este mesmo comportamento foi verificado na extração com ultrassom para a pimenta-do-reino. Neste método de extração, o etanol foi o solvente que extraiu a menor quantidade de compostos fenólicos, contrariando o esperado, 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, sendo solubilizados com mais facilidade por solventes mais polares (ZIAKOVA; BRANDSTETEROVA, 2002).

A utilização de hexano na extração com ultrassom apresentou resultados semelhantes para as duas pimentas, sendo estes valores $30,3 \pm 0,3\%$ e $39 \pm 2\%$ respectivamente para a pimenta-do-reino e pimenta rosa, superiores aos encontrados para os mesmos solventes na extração em Soxhlet. Supõe-se que o fenômeno de cavitação gerado no processo de extração com ultrassom facilite a liberação e solubilização de compostos presentes nos poros da matriz vegetal, o que não ocorre com a extração em Soxhlet (MA et al, 2009).

Existe uma grande variação entre o conteúdo de compostos fenólicos totais presente em frutas e vegetais, que está relacionada à complexidade dos grupos constituintes e à variabilidade das matérias-primas. Além disso, diferentes técnicas empregadas na extração e quantificação dos compostos levam a resultados distintos para uma mesma matéria-prima. Ao mesmo tempo, a quantidade de compostos fenólicos das plantas também depende de fatores como o gênero, espécie e cultivar da planta e de condições de cultivo, colheita e armazenamento (TOMAS-BARBERAN; ESPIN, 2001; RAPISARDA, 1999). 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 ensaio (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1999; SUN et al., 2002).

4.3.5 Atividade antioxidante

4.3.5.1 Método DPPH

As Tabelas 14 e 15 apresentam, respectivamente, os resultados da atividade antioxidante dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa obtidos pelas diferentes técnicas de extração empregadas. A atividade antioxidante na maior concentração testada (500 mg/mL) é apresentada em percentual de atividade antioxidante (AA%) e em EC_{50} (concentração efetiva) e quanto menor esse valor maior a atividade antioxidante do produto, ou seja, menor a quantidade de extrato que é necessária para inibir em 50% a atividade dos radicais livres. Na presença de compostos antioxidantes, o radical DPPH recebe um elétron, tornando-se mais estável. Com isso, dá-se a redução da sua absorvância, e este processo pode ser avaliado visualmente, por meio da descoloração da solução contendo o DPPH e pela verificação da absorvância por meio de espectrofotômetro.

Com base nos resultados da Tabela 14 podemos verificar o incremento da atividade antioxidante com o aumento da polaridade dos solventes empregados nas extrações convencionais. Este resultado já era esperado, uma vez que normalmente os maiores percentuais de atividade antioxidante são relacionados à maior polaridade do solvente empregado na extração. O melhor desempenho foi apresentado pelo extrato obtido em Soxhlet com etanol como solvente, sendo que a atividade antioxidante determinada foi de 75%, embora ainda inferior à encontrada para o antioxidante sintético BHT, que é de 89,7%.

A adição de etanol à extração supercrítica da pimenta-do-reino aumentou o potencial antioxidante dos extratos na condição de 150 bar e 50°C, sendo que a melhor atividade antioxidante entre os extratos obtidos com adição de cossolvente foi encontrada quando utilizou-se 5% de etanol em adição ao CO_2 . Este resultado pode ser relacionado com o teor de compostos fenólicos totais obtidos para este mesmo extrato, que foi de 46 ± 3 mg EAG/ g de extrato. Acredita-se que o aumento da atividade antioxidante em relação ao extrato obtido com CO_2 puro está relacionado à maior quantidade de compostos fenólicos totais detectada no extrato pelo método Folin-Ciocalteu. Como dito no item 4.3.4, a concentração de 5% de etanol pode ser considerada uma condição ótima, acima da qual ocorre um declínio na atividade antioxidante do extrato. Em resumo, a adição de 5% de etanol favoreceu o aumento do

teor de compostos fenólicos totais e consequentemente o incremento na atividade antioxidante.

Tabela 14 - Potencial antioxidante dos extratos de pimenta-do-reino avaliado pelo método DPPH.

EXTRAÇÃO	SOLVENTE	AA% (500 $\mu\text{g/mL}$) ⁽¹⁾	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
UE	Hex	11 ^l	>1000
	EtOAc	49 ^d	499
	EtOH	48 ^e	511
SOX	Hex	13 ^k	>1000
	EtOAc	55 ^c	441
	EtOH	75 ^b	309
ESC 150 bar/40°C	CO ₂	14 ^j	>1000
ESC 150 bar/50°C	CO ₂	6 ⁿ	>1000
ESC 150 bar/60°C	CO ₂	16 ⁱ	>1000
ESC 200 bar/40°C	CO ₂	10 ^m	>1000
ESC 200 bar/50°C	CO ₂	14 ^j	>1000
ESC 200 bar/60°C	CO ₂	14 ^j	>1000
ESC 300 bar/40°C	CO ₂	26 ^g	>1000
ESC 300 bar/50°C	CO ₂	16 ⁱ	>1000
ESC 300 bar/60°C	CO ₂	26 ^g	>1000
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 2,5% etanol	13 ^k	>1000
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 5% etanol	34 ^f	713
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 7,5% etanol	25 ^h	948
BHT	-	89,7 ^a	261

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

Em relação à extração supercrítica, não foi observada uma tendência de redução ou aumento da atividade antioxidante em função da temperatura. Uma hipótese que justifique esse comportamento é a de que em função de cada condição experimental, diferentes compostos sejam extraídos, tendo como consequência a variação no potencial antioxidante do extrato. Como foi não foi observada a redução da atividade antioxidante com o aumento da temperatura acredita-se que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante não sofrem degradação térmica a 60 °C (HU; HU; XU, 2005).

No entanto, na condição isotérmica de 50 °C percebe-se o aumento do potencial antioxidante com o aumento da pressão, embora todos os valores de EC₅₀ ainda sejam elevados, indicando a necessidade de altas concentrações de extrato para reduzir em 50% a atividade do radical. A literatura indica 50 °C como uma temperatura ótima para a extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais devido a sua sensibilidade térmica, e a presença destes compostos pode estar relacionada ao potencial antioxidante dos extratos (PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006).

Bagheri, Manap e Solati (2014) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos supercríticos de pimenta-do-reino obtidos em condições de pressão e temperatura que variaram de 150 a 347 bar, e 35 a 55 °C, respectivamente. O menor valor de EC₅₀ (correspondente ao melhor potencial antioxidante), 364,72 µg/mL, foi obtido na condição de 150 bar e 50 °C, na extração com 80 min de duração. Embora a metodologia utilizada pelos autores na determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH se assemelhe à empregada no presente trabalho, os resultados obtidos sugerem um forte potencial antioxidante do extrato analisado. Tal fato pode ser justificado por diferenças na matéria-prima, tais como grau de maturação, região de cultivo, processo de secagem, entre outros.

Os resultados de atividade antioxidante pelo método DPPH para a pimenta rosa são apresentados na Tabela 15, em termos de percentual de atividade antioxidante (AA%) e EC₅₀. De acordo com os resultados obtidos nas extrações convencionais não foi possível estabelecer uma relação de aumento ou redução da atividade antioxidante em função da polaridade do solvente. Apesar disso, os melhores potenciais foram determinados na extração com etanol, em ambos os métodos utilizados, sendo de 95,5% de atividade antioxidante para o extrato obtido em Soxhlet, e 66% para aquele obtido utilizando ultrassom. Para o extrato obtido em Soxhlet com etanol, o valor de EC₅₀, de 80 µg/mL, foi inferior ao encontrado para o antioxidante padrão BHT, o que caracteriza o forte potencial antioxidante da amostra. Segundo Campos et al. (2008), valores de EC₅₀ abaixo de 250 µg/mL são considerados de alto potencial antioxidante.

Novamente não foi possível identificar uma tendência de variação nos valores de atividade antioxidante dos extratos obtidos por ESC em função da pressão ou da temperatura de extração. Assim como

para a pimenta-do-reino, este comportamento aleatório pode ser um reflexo da extração de diferentes compostos a cada condição operacional, que por sua vez influencia a variação do potencial antioxidante.

Embora o antioxidante sintético BHT apresente atividade antioxidante superior a do extrato de pimenta rosa obtido a 300 bar e 60 °C, o valor de EC₅₀ foi superior ao encontrado para o referido extrato. Acredita-se que tal comportamento tenha ocorrido devido à maior linearidade dos dados de atividade antioxidante para a pimenta rosa nas condições citadas, visto que o valor de EC₅₀ é obtido por regressão linear dos dados.

Tabela 15 - Potencial antioxidante dos extratos de pimenta rosa avaliado pelo método DPPH.

EXTRAÇÃO	SOLVENTE	AA% (500 µg/mL)⁽¹⁾	EC₅₀ (µg/mL)
UE	Hex	18 ^l	>1000
	EtOAc	7 ^h	>1000
	EtOH	66 ^d	339
SOX	Hex	6 ^l	>1000
	EtOAc	23 ^e	>1000
	EtOH	95,5 ^a	80
ESC 150 bar/40°C	CO ₂	2,5 ^l	>1000
ESC 150 bar/50°C	CO ₂	ND	>1000
ESC 150 bar/60°C	CO ₂	1,3 ^k	>1000
ESC 200 bar/40°C	CO ₂	10 ^g	>1000
ESC 200 bar/50°C	CO ₂	ND	>1000
ESC 200 bar/60°C	CO ₂	1,3 ^k	>1000
ESC 300 bar/40°C	CO ₂	1,4 ^k	>1000
ESC 300 bar/50°C	CO ₂	10 ^g	>1000
ESC 300 bar/60°C	CO ₂	72 ^c	138
BHT	-	89,7 ^b	261

ND: não detectado.

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

Os extratos obtidos por tecnologia supercrítica nas pressões de 150 e 200 bar, em todas as temperaturas testadas apresentaram valores de EC₅₀ superiores a 1000 µg/mL. Neste caso, podemos assumir que nas

condições de pressão e temperatura especificadas, os extratos não apresentaram atividade antioxidante detectável pelo método DPPH. Segundo Mishra, Ojha e Chaudhury (2012), a reversibilidade da reação de redução do radical pode levar a baixas leituras da capacidade antioxidante. Por conta disso, a capacidade antioxidante de muitos compostos pode ser erroneamente estimada.

A reversibilidade da reação do DPPH foi avaliada por Bondet, Brand-Williams e Berset (1997). Segundo os autores, o DPPH₂ é um produto da reação entre DPPH e um antioxidante. Assim, a avaliação da reversibilidade é realizada adicionando-se DPPH₂ ao final da reação. Se houver um aumento no percentual de DPPH remanescente, a reação é reversível, caso contrário, a reação é completa. O estudo verificou que a reação entre isoeugenol e DPPH dá-se de forma reversível, e neste caso a atividade antioxidante do composto é subestimada, uma vez que não reage completamente com o radical DPPH.

Na condição de 300 bar, pode-se perceber uma tendência de aumento da atividade antioxidante em função do aumento da temperatura. Nesta pressão, o potencial antioxidante determinado na temperatura de 60 °C foi muito satisfatório, alcançando 72%. A partir desses resultados podemos supor que o emprego de pressões e temperaturas mais elevadas favoreça a extração de compostos com atividade antioxidante detectáveis por este método.

4.3.5.2 Método ABTS

Esta análise teve como objetivo verificar a capacidade dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa em sequestrar o radical cátion 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), comparado a um padrão antioxidante (Trolox, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico) em uma curva analítica. Este método é uma importante ferramenta na determinação da atividade antioxidante de compostos doadores de hidrogênio e de compostos terminadores de cadeias (RE et al., 1999).

As Tabelas 16 e 17 apresentam o percentual de inibição do radical ABTS e os valores da atividade antioxidante dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa, respectivamente, avaliados em termos de poder de sequestro de radicais, de acordo com o método

ABTS, expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).

Tabela 16 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de pimenta-do-reino.

EXTRAÇÃO	SOLVENTE	% INIBIÇÃO	TEAC ⁽¹⁾
UE	Hex	13± 3 ^c	155 ± 42
	EtOAc	24± 5 ^b	306 ± 70
	EtOH	6,6± 0,3 ^{de}	69 ± 5
SOX	Hex	11± 1 ^{cd}	130 ± 20
	EtOAc	33 ± 3 ^b	430 ± 21
	EtOH	9,3± 0,6 ^{cde}	106 ± 8
ESC 150 bar/40°C	CO ₂	4,6 ± 0,3 ^{de}	41 ± 5
ESC 150 bar/50°C	CO ₂	16 ± 2 ^c	216 ± 11
ESC 150 bar/60°C	CO ₂	6 ± 1 ^{de}	52 ± 5
ESC 200 bar/40°C	CO ₂	8,6 ± 0,6 ^{cde}	95 ± 9
ESC 200 bar/50°C	CO ₂	13 ± 6 ^c	105 ± 10
ESC 200 bar/60°C	CO ₂	3,3 ± 0,5 ^e	23 ± 8
ESC 300 bar/40°C	CO ₂	13 ± 1 ^c	157 ± 20
ESC 300 bar/50°C	CO ₂	15 ± 1 ^c	186 ± 11
ESC 300 bar/60°C	CO ₂	4 ± 1 ^{de}	40 ± 8
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 2,5% etanol	6 ± 1 ^{de}	57 ± 10
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 5% etanol	9 ± 1 ^{cde}	96 ± 9
ESC 150 bar/50°C	CO ₂ + 7,5% etanol	9,8 ± 0,3 ^{de}	112 ± 4
BHT	-	93,13 ± 0,18 ^{(2)a}	

⁽¹⁾Capacidade antioxidante expressa em equivalentes de Trolox em µM/ g de extrato.

⁽²⁾Limaet al. (2013).

⁽³⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

Os extratos de pimenta-do-reino obtidos com acetato de etila para ambos os métodos de extração à baixa pressão apresentaram os melhores percentuais de inibição do radical ABTS, representando maior potencial antioxidante. Os valores encontrados na extração em Soxhlet e ultrassom foram 33 ± 3% e 24± 5%, respectivamente. Este resultado pode ser associado ao teor de compostos fenólicos totais, 55 ± 6

mgEAG/g e 42 ± 1 mgEAG/g, respectivamente, cujos melhores resultados foram obtidos nestas mesmas condições.

O menor rendimento de ESC de pimenta-do-reino foi obtido na condição de 150 bar e 50°C, sendo $1,28 \pm 0,01\%$, e cuja inibição do radical ABTS foi de $16 \pm 2\%$. Porém, a adição de etanol como cossolvente nesta condição operacional reduziu o potencial antioxidante do extrato, em todas as concentrações testadas. Esta situação sugere que a presença do etanol prejudicou a solubilização de compostos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos, detectada por este método em análise. No entanto, a confirmação desta hipótese só será possível com o conhecimento da composição química dos extratos avaliados.

Para todas as pressões testadas na ESC, na temperatura de 50 °C foram encontrados os melhores percentuais de inibição do radical ABTS, apesar de não existir uma tendência de aumento ou redução em função da variação da pressão.

A técnica do radical ABTS, é uma metodologia recomendada para avaliar a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica, de acordo com Re et al. (1999), e por isso esperava-se um melhor desempenho dos extratos obtidos por solventes de baixa polaridade, como CO₂ e hexano. No entanto, nenhum extrato apresentou capacidade antioxidante comparável ao antioxidante padrão BHT.

Os resultados de capacidade antioxidante determinados pelo método do radical ABTS dos extratos de pimenta rosa são apresentados na Tabela 17. Entre os extratos obtidos com solventes orgânicos, destaca-se a extração em Soxhlet com etanol ($31 \pm 3\%$ de inibição do radical), seguida da extração por ultrassom usando acetato de etila ($26 \pm 1\%$ de inibição do radical). Esse último resultado é comparável ao obtido na ESC, na condição de 150 bar e 60 °C.

Nesta mesma condição de pressão, 150 bar, observa-se o aumento da capacidade antioxidante em função do aumento da temperatura, sugerindo que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante detectáveis por este método não sofreram degradação térmica. No entanto, este mesmo comportamento não foi observado nas demais pressões estudadas, cujos resultados são bastante semelhantes entre si.

A comparação de resultados de atividade antioxidante, principalmente no caso da pimenta rosa, é dificultada pela escassez de estudos comparáveis disponíveis na literatura. Muitas vezes a metodologia empregada ou a forma como os resultados são apresentados desqualificam a comparação.

Tabela 17 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de pimenta rosa.

EXTRAÇÃO	SOLVENTE	% INIBIÇÃO ⁽³⁾	TEAC ⁽¹⁾
UE	Hex	7 ± 1 ^e	75 ± 10
	EtOAc	26 ± 1 ^c	341 ± 15
	EtOH	23,2 ± 0,4 ^c	297 ± 5
SOX	Hex	5,3 ± 0,5 ^e	51 ± 7
	EtOAc	14 ± 1 ^d	168 ± 18
	EtOH	31 ± 3 ^b	403 ± 41
ESC 150 bar/40°C	CO ₂	6 ± 1 ^e	60 ± 5
ESC 150 bar/50°C	CO ₂	9,3 ± 0,6 ^e	106 ± 9
ESC 150 bar/60°C	CO ₂	26 ± 3 ^c	342 ± 38
ESC 200 bar/40°C	CO ₂	7,1 ± 0,3 ^e	75 ± 4
ESC 200 bar/50°C	CO ₂	6,6 ± 0,6 ^e	70 ± 9
ESC 200 bar/60°C	CO ₂	9 ± 1 ^e	100 ± 6
ESC 300 bar/40°C	CO ₂	9 ± 3 ^e	98 ± 42
ESC 300 bar/50°C	CO ₂	7,6 ± 0,6 ^e	82 ± 8
ESC 300 bar/60°C	CO ₂	7,9 ± 0,5 ^e	87 ± 6
BHT	-	93,13 ± 0,18 ^{(2)a}	-

⁽¹⁾Capacidade antioxidante expressa em equivalentes de Trolox em µM/ g de extrato.

⁽²⁾Limaet al. (2013).

⁽³⁾Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

A avaliação de outras atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana e antitumoral, além do conhecimento dos compostos presentes nos extratos, podem indicar aplicações ainda mais favoráveis para aos extratos obtidos neste trabalho.

4.3.6 Perfil químico dos extratos

A determinação do perfil químico dos extratos de pimenta foi realizada apenas para alguns extratos, selecionados em função dos resultados de rendimento e/ou atividade antioxidante. Assim, os extratos

selecionados obtidos pelas técnicas a baixa e a alta pressão, foram: Soxhlet com etanol e com hexano, ultrassom com acetato de etila, ESC a 150 bar/50 °C, 200 bar/50 °C, 300 bar/ 60 °C para a pimenta-do-reino, e, Soxhlet com etanol e com hexano, ultrassom com acetato de etila, ESC a 150 bar/50 °C, 200 bar/60 °C, 300 bar/ 60 °C para a pimenta rosa.

O Quadro 1 apresenta a lista dos componentes identificados nos extratos selecionados de pimenta-do-reino e de pimenta rosa obtidos pelas técnicas a baixa pressão (Soxhlet e ultrassom) e com CO₂ supercrítico.

A partir dos dados do Quadro 1 é possível verificar que 20 compostos foram detectados nos diferentes extratos analisados. Os principais compostos identificados em termos de percentual de área relativa e/ou incidência nos diferentes extratos foram: piperina, fitol e gama-sitosterol (pimenta-do-reino); espatulenol, beta-amirina, lupenona e Urs-12-en-28-al (pimenta rosa). Os extratos identificados com numeração de 1 a 6 são referentes à pimenta-do-reino, e os demais se referem à pimenta rosa, numerados de 7 a 12.

Entre os extratos de pimenta-do-reino avaliados, o composto majoritário identificado foi a piperina, ponto bastante positivo, dadas as diversas atividades biológicas associadas a este composto, tais como atividade antioxidante, antitumoral, antidepressiva, entre outras. No entanto, é necessário considerar o sinergismo existente entre os componentes majoritários e minoritários presentes nos extratos para a atividade biológica.

O fitol, um diterpeno oxigenado, é um componente da clorofila das plantas e foi detectado nos extratos de pimenta-do-reino obtidos com fluido supercrítico, a exceção da condição de 300 bar e 60 °C. Por ser um composto aromático é utilizado em muitas fragrâncias e cosméticos. Além disso, estudos relatam seu potencial uso como anticonvulsivo, antimicrobiano, antitumoral e anti-inflamatório (COSTA et al. 2012; RAMAN et al. 2012).

O gama-sitosterol, um composto esteroidal, foi identificado em extratos de ambas as matérias-primas. De acordo com a literatura, este composto apresenta atividade antidiabética, anti-inflamatória e anti-hiperlipidêmica (BALAMURUGAN et al, 2011; RAMAN et al, 2012).

A lupenona é um triterpeno pentacíclico e foi identificada em 4 dos 6 extratos de pimenta rosa avaliados. Estudos relatam que este composto apresenta atividade antimicobacteriana, podendo ser utilizado no tratamento de tuberculose (NASSER et al, 2013).

Outro composto de importância detectado nos extratos de pimenta rosa foi o sesquiterpeno espatulenol. Segundo a literatura, o composto em questão apresenta atividade antibacteriana e moderada atividade citotóxica (LIMBERGER et al, 2004).

O triterpeno beta-amirina aparece como composto majoritário nos extratos de pimenta rosa avaliados. Estudos relatam diversas propriedades farmacêuticas associadas a este composto, como atividade antidiabética, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (SUNIL et al, 2014; ABDEL-RAOUF et al, 2015).

O estigmasterol é o mais comum dos fitoesteróis e apresenta estrutura semelhante ao colesterol, com algumas modificações. Estudos comprovam sua atividade anti-inflamatória e antitumoral (GABAY et al. 2010). O ácido palmítico, ácido graxo saturado, também foi identificado como constituinte dos extratos de pimenta rosa.

De maneira geral os extratos de pimenta rosa apresentaram uma maior variedade de compostos, no entanto, nenhum deles apresentou percentual de área equivalente à piperina, presente nos extratos de pimenta-do-reino.

Os compostos identificados apresentam importantes atividades biológicas, o que pode sugerir a utilização dos extratos em variadas aplicações terapêuticas, considerando, é claro, o efeito sinérgico entre os compostos.

Quadro 1 – Compostos identificados nos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa avaliados por CG-EM.

Composto	T _r (min)	% Área											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fitol	36,1	0,217	0,216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piperina	48,7	72,8	50,3	51,2	72,3	60,6	70,9	-	-	-	-	-	-
Gama-sitosterol	53,6	-	0,658	0,624	-	0,657	0,288	-	0,725	-	5,48	5,11	2,94
Estigmasterol	52,8	-	-	0,195	-	0,200	-	-	-	-	-	-	-
Cubeno	23,2	-	-	-	-	-	-	0,400	0,751	1,10	-	1,90	-
Ácido palmítico	33,3	-	-	-	-	-	-	0,878	3,14	3,50	-	1,04	-
Beta-sitosterol	53,6	-	-	-	-	-	-	1,37	-	-	-	-	-
Lupenona	53,7	-	-	-	-	-	-	3,45	3,01	-	19,6	-	5,58
Beta-amirina	54,1	-	-	-	-	-	-	4,85	3,54	-	-	-	8,39
Lanosterol	54,8	-	-	-	-	-	-	1,26	-	-	-	-	-
Beta-felandreno	8,32	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
Alfa-felandreno	6,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
Alfa-muurolol	23,7	-	-	-	-	-	-	-	2,65	-	-	-	-
Espatulenol	25,1	-	-	-	-	-	-	-	2,64	4,18	3,11	3,10	-
Olean-12-ene	54,1	-	-	-	-	-	-	-	-	4,32	-	3,54	-
Beta-cimeno	14,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,15	-	-
Beta-tujona	15,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,31	-	-
Alfa-eudesmol	26,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,59	-	-
Beta-eudesmol	26,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,21	-
Urs-12-en-28-al	57,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,4
Alfa-cubebeno	19,4	-	-	-	-	-	-	-	0,210	-	-	-	-

Onde: T_r – tempo de retenção; PP – pimenta-do-reino; PR – pimenta rosa; ND – não determinado.

1 – PP 150 bar/50 °C; 2 – PP 200 bar/50 °C; 3 – PP 300 bar/60 °C; 4 – PP Soxhlet com etanol; 5 – PP Soxhlet com hexano; 6 – PP ultrassom com acetato de etila; 7 – PR 150 bar/50 °C; 8 – PR 200 bar/60 °C; 9 – PR 300 bar/60 °C; 10 – PR Soxhlet com etanol; 11 – PR Soxhlet com hexano; 12 – PR ultrassom com acetato de etila

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que o etanol foi o solvente mais adequado para a obtenção de extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa, em relação ao rendimento do processo, seja na extração em Soxhlet ou assistida por ultrassom. Observou-se ainda uma relação crescente entre o rendimento e a polaridade do solvente orgânico empregado.

As extrações supercríticas de pimenta rosa apresentaram rendimentos superiores em relação à pimenta-do-reino, especialmente na condição de 300 bar e 60 °C. Por conta disso, optou-se por testar a adição de cossolvente somente nas extrações de pimenta-do-reino, e neste caso, para todas as concentrações de etanol adicionadas, o rendimento foi superior àquele obtido com CO₂ puro, chegando a aproximadamente 4 vezes o valor inicial por conta da adição de 7,5% de etanol, nas mesmas condições de pressão e temperatura.

De maneira geral, tanto os extratos de pimenta-do-reino como de pimenta rosa obtidos por tecnologia supercrítica apresentaram valores de atividade antioxidante inferiores ao padrão testado, o antioxidante sintético BHT, para os métodos DPPH e ABTS analisados. No entanto, tais resultados não classificam estes extratos como ruins ou inadequados para aplicação como antioxidantes, uma vez que cada metodologia tem sua particularidade e é capaz de avaliar determinadas classes de compostos. Uma alternativa é a avaliação do potencial antioxidante por outras metodologias, incluindo aquelas que avaliam o potencial *in vivo* do extrato, buscando abranger o maior número de compostos possíveis. A análise do perfil químico dos extratos avaliados permitiu a identificação de compostos como a piperina, fitol, beta-amirina e estigmasterol, que apresentam importantes atividades biológicas, descritas anteriormente.

A partir dos resultados de rendimento e potencial antioxidante apresentados neste capítulo e tendo em vista a ausência de estudos envolvendo a pimenta rosa, no que diz respeito ao estudo de equilíbrio de fases e encapsulamento de extratos, a continuidade deste trabalho se deu mediante a realização de ensaios envolvendo somente esta matéria-prima, cujas metodologias e resultados são apresentados nos capítulos seguintes.

CAPÍTULO 5 – OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PIMENTA ROSA UTILIZANDO PROPANO SUBCRÍTICO

5.1 INTRODUÇÃO

Vários compostos têm sido estudados como solventes em processos de extração supercrítica como, por exemplo, hidrocarbonetos como pentano, hexano e butano, óxido nitroso, hexafluoreto de enxofre e hidrocarbonetos fluorados (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Apesar de o CO₂ ser o solvente mais empregado nos processos que empregam a tecnologia supercrítica, estudos mostram que o propano também tem sido utilizado para extração de produtos naturais, com resultados interessantes (HEGEL et al., 2007; HAMDAN et al., 2008; FREITAS et al., 2008). Embora não apresente muitas das qualidades do dióxido de carbono, estudos têm mostrado que, em alguns casos, esse solvente é melhor para extração de óleos e produtos naturais. O propano é relativamente barato, não deixa resíduo tóxico e tem um alto poder de solvatação (SPARKS et al., 2006).

As pressões empregadas na obtenção de extratos utilizando propano são mais amenas do que aquelas usadas na extração com CO₂ supercrítico, usualmente variando de 30 a 100 bar. Além disso, a solubilidade de óleos vegetais em CO₂ supercrítico é baixa se comparada à solubilidade em propano, pois o propano líquido ou pressurizado é completamente miscível em óleo a temperatura ambiente. Economicamente, os processos com baixas pressões e temperaturas, podem reduzir custos na extração, com alto rendimento, em menor tempo, e conseqüentemente menor consumo de solvente, sendo possível, portanto, otimizar o processo (MESOMO et al., 2012).

Neste capítulo apresenta-se um estudo preliminar da extração de pimenta rosa com propano em condições subcríticas, bem como a avaliação do potencial antioxidante e o perfil químico dos extratos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Especificação dos materiais

Os ensaios de extração foram realizados no Laboratório de Processos de Separação e Mistura/Termodinâmica na URI Campus

Erechim. O solvente empregado neste trabalho como componente da extração foi o solvente propano de procedência da White Martins Gases Industriais Ltda., pureza mínima de 99,5 % na fase líquida, em botijões de 4,1 kg.

5.2.2 Descrição do aparato experimental

Os ensaios de extração da pimenta rosa foram conduzidos com base no diagrama esquemático do aparato experimental apresentado na Figura 17, o qual consiste basicamente dos seguintes itens com suas respectivas funções:

(B) Cilindro de propano (Marca White Martins Gases Industriais Ltda.). Armazena o propano empregado nos ensaios, capacidade 5 kg;

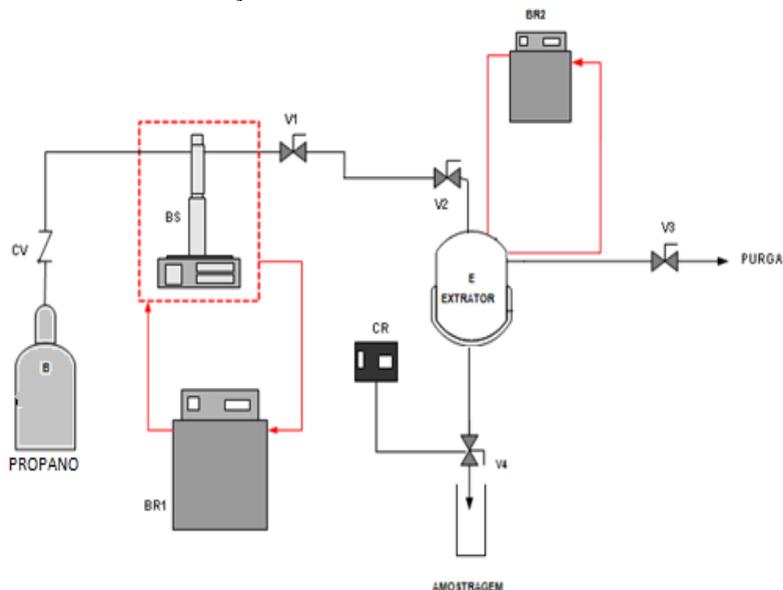
(BS) Bomba de Seringa (Marca Isco, Modelo 500D). Operada nas pressões indicadas no planejamento de experimentos, foi utilizada para suprir a vazão de propano necessária para as extrações;

(BR) Banho termostático (Marca Nova Ética, modelo 521/3D). Tem por finalidade manter a temperatura constante de 5°C na bomba de seringa, evitando mudanças de densidade do propano (B1).

(V) Válvulas de esfera (Hy-Lok, Modelo THF-2N). São responsáveis pelo fechamento da linha de solvente que vai para bomba de seringa (V1) e, na etapa de alimentação da célula, pela pressurização da parte inferior desta (V2), na purga da extratora (V3), e na amostragem (V4).

(CR) Controlador de temperatura. Manta de aquecimento com controlador de temperatura, utilizada para aquecer a válvula de amostragem (V4).

Figura 17 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para realizar os testes de extração.



5.2.3 Procedimento experimental

O procedimento de extração inicia com a estabilização da temperatura do banho termostático em 5 °C, a fim de manter constante a temperatura na bomba, seguido do carregamento do cilindro da bomba de seringa com propano proveniente do reservatório de estocagem. A temperatura de 5 °C foi definida para o propano pois nesta condição e nas pressões empregadas neste estudo (40, 50 e 60 bar) a densidade do solvente é conhecida.

A quantidade de amostra foi definida de acordo com a capacidade armazenadora do extrator, que neste trabalho foi fixada em 30 g, com base em estudos anteriormente realizados pelo grupo de pesquisa. A amostra de pimenta rosa foi colocada na unidade extratora juntamente com algodão nas duas extremidades da unidade para evitar que partículas muito finas da matéria-prima entupissem a válvula de extração.

Com a unidade extratora montada e a bomba seringa operando em vazão constante, com a pressão do ensaio ajustada de acordo com a Tabela 18, e a válvula V1 fechada, inicia-se o carregamento do extrator com propano abrindo a válvula V2 lentamente para que a vazão de solvente não ultrapassasse 3 mL/min.

Quando o fluxo de propano na bomba de seringa se aproxima de zero e o sistema encontra-se na pressão desejada para cada ensaio (igual à pressão da bomba de seringa) o extrator está completamente cheio e abre-se completamente a válvula V4 para não haver nenhuma restrição à passagem do gás. Depois de finalizado este procedimento, a unidade extratora é conectada a um erlenmeyer, no qual é acoplado internamente um tubo de ensaio onde é realizada a coleta do óleo, iniciando o processo de extração. Decorrido o tempo de extração, fecha-se a válvula V2 para que não haja mais a passagem de solvente pelo extrator, inicia-se a despressurização do sistema, retira-se o frasco contendo a amostra levando-o até uma capela para a saída completa do gás, desligando-se a bomba de seringa e os banhos termostáticos.

A fim de verificar o rendimento da extração, a massa dos tubos de ensaio foi medida antes (tubos vazios) e após os ensaios (tubos com extrato). Após a pesagem, os recipientes foram armazenados em refrigerador doméstico até o momento da realização dos ensaios de avaliação da qualidade dos extratos (8 ± 2 °C).

Os experimentos foram conduzidos em temperaturas abaixo da temperatura crítica do propano (96,8 °C) a fim de evitar a degradação térmica dos compostos de interesse, e em pressões próximas à pressão crítica (42,66 bar). Os experimentos foram realizados em triplicata no ponto central, totalizando 7 ensaios.

Tabela 18 - Planejamento experimental das extrações com propano.

Experimento	P (bar)	T (°C)	Vazão propano (mL/min)	Duração (h)
1	40	35	3	1
2	60	55	3	1
3	50	45	3	1
4	50	45	3	1
5	50	45	3	1
6	60	35	3	1
7	40	55	3	1

5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu para os extratos de pimenta rosa obtidos com propano subcrítico, bem como o potencial antioxidante analisado pelos métodos DPPH e ABTS foram avaliados conforme metodologia apresentada nos itens 4.2.8 e 4.2.9, respectivamente, pertencentes ao Capítulo 4 desta tese.

5.2.5 Determinação do perfil químico dos extratos

Os extratos de pimenta rosa obtidos a 55 °C, nas pressões de 40 e 60 bar, respectivamente, foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas a fim de determinar o perfil químico, segundo a metodologia descrita no Capítulo 4, item 4.3.6.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Rendimento global

Os rendimentos das extrações de pimenta rosa realizadas com propano subcrítico, bem como a densidade do solvente em cada condição de operação são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Rendimento (X_0) das extrações de pimenta rosa com propano subcrítico.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade propano ⁽¹⁾ (kg/m ³)	X_0 (%) ⁽²⁾
35	40	485,9	9,6 ^d
35	60	491,9	9,8 ^c
45	50	473,1	9,9 ^b
55	40	450,9	9,4 ^e
55	60	460,1	10,8 ^a

⁽¹⁾Linstrom; Mallard (2012).

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

Observando os dados da Tabela 19 pode-se perceber que a variação entre os resultados obtidos nas diferentes condições de operação é bem pequena, não sendo possível observar tendências de

aumento ou redução do rendimento em função da temperatura ou da pressão. Em todas as condições avaliadas os valores da densidade do propano foram bastante semelhantes, justificando a similaridade encontrada nos valores de X_0 , indicando que as variações desta propriedade não afetaram fortemente o rendimento final (SILVA et al, 2014; SILVA et al, 2015).

Mesomo (2013) estudando a extração de óleo de gengibre com propano pressurizado não observou o efeito da temperatura sobre o rendimento, em condições isobáricas, encontrando rendimentos similares nas temperaturas de 20 °C e 60 °C. De acordo com Corso et al. (2010) no emprego de propano como solvente em extrações de sementes de sésamo, o efeito da temperatura foi mais pronunciado que o efeito da pressão.

Segundo a literatura, o propano é um solvente mais adequado à extração de compostos lipofílicos do que o CO_2 . Neste estudo, a extração com propano proporcionou rendimentos maiores do que aqueles obtidos por extração supercrítica, utilizando CO_2 como solvente. Enquanto a extração com propano subcrítico alcançou 10,78 % de rendimento, a ESC com CO_2 foi de no máximo $5,9 \pm 0,3$ em 60 °C e 300 bar, ou seja, a extração com propano aumentou em até 83% o rendimento do processo com relação à extração com CO_2 supercrítico. Apesar do rendimento de processo ser maior com propano, é relevante salientar que é fundamental avaliar, concomitantemente com o rendimento, a qualidade do extrato obtido, determinada tanto através da composição como das atividades biológicas dos extratos. Outro fator positivo da extração com propano foi o reduzido tempo de extração (de 60 min) e as baixas pressões requeridas para a extração, quando comparadas à extração com CO_2 supercrítico, cujos resultados estão apresentados no Capítulo 4 desta tese.

5.3.2 Atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais e perfil químico

A Tabela 20 apresenta os resultados de atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e ABTS, bem como o teor de compostos fenólicos totais para os extratos de pimenta rosa obtidos pela extração com propano subcrítico.

Tabela 20 - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante para os extratos de pimenta rosa.

EXTRAÇÃO	TFT	DPPH (AA%) ⁽²⁾	ABTS	
	(mgEAG/g extrato) ⁽²⁾		% inibição ⁽²⁾	TEAC ⁽¹⁾
40 bar/35°C	3 ± 1 ^b	40,8 ^a	7,6 ± 0,3 ^b	82 ± 4
40 bar/55°C	5 ± 1 ^{ab}	3 ^c	14 ± 3 ^a	172 ± 38
50 bar/45°C	8 ± 1 ^a	3 ^c	7,6 ± 0,4 ^b	82 ± 6
60 bar/35°C	5,5 ± 0,3 ^{ab}	2,5 ^d	7,6 ± 0,4 ^b	82 ± 6
60 bar/ 55°C	8 ± 2 ^a	3,3 ^b	8 ± 1 ^b	91 ± 12

⁽¹⁾ Capacidade antioxidante expressa em equivalente de Trolox em µM/g extrato.

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

A utilização de propano subcrítico não favoreceu a extração de compostos fenólicos identificáveis pelo método de Folin-Ciocalteu, o que já era esperado, pois esse solvente tem como característica a extração de compostos altamente apolares. Apesar disso, para uma mesma pressão, é possível observar um incremento no valor do TFT em função do aumento da temperatura. Situação semelhante ocorre em condições isotérmicas, quando a pressão exerce um efeito positivo na concentração de compostos fenólicos. O mesmo comportamento foi verificado por Czaikoski et al. (2015) na extração de *E. intermedium* com propano comprimido, sendo que a maior concentração de compostos fenólicos (10,03 mg EAG/g extrato) foi encontrada para o extrato obtido na mais alta pressão em estudo, 100 bar.

Em relação à atividade antioxidante determinada pelo método DPPH, o maior percentual foi encontrado para o extrato obtido nas condições mais amenas de pressão e de temperatura, sendo de 40,8%. Nas demais condições não foram verificadas tendências de variação na atividade antioxidante em função da pressão ou da temperatura. Assim como no trabalho realizado por Czaikoski et al. (2015), a atividade antioxidante dos extratos foi baixa e este resultado provavelmente é devido à polaridade do solvente, que favorece a extração de resinas, pigmentos e outros compostos que apresentam baixo potencial antioxidante. Ainda, pode-se relacionar o reduzido potencial antioxidante determinado pelo método DPPH com os baixos teores de compostos fenólicos totais presentes nos extratos.

Segundo o método ABTS, o emprego de propano como solvente para extração de pimenta rosa produziu extratos com atividade antioxidante reduzida, entretanto o maior valor (%AA) foi encontrado para o extrato obtido na menor pressão (40 bar) e na maior temperatura (60 °C), sendo o valor de inibição igual a $14 \pm 3\%$. Mesomo et al. (2013) investigaram a atividade antioxidante dos extratos de gengibre obtidos com propano comprimido e verificaram que em altas pressões (100 bar), a atividade antioxidante aumentava com a elevação da temperatura, mas em pressões reduzidas (30 bar) o efeito da temperatura não foi significativo, comportamento contrário ao observado no presente trabalho, considerando a faixa de pressão e temperatura avaliada. Não foi possível estabelecer uma relação entre o potencial antioxidante verificado pelo método DPPH e pelo método ABTS, já que os melhores resultados de cada teste foram obtidos em diferentes condições de operação, indicando uma variação na composição de cada extrato em função da pressão e temperatura empregada, o que por sua vez afeta a atividade antioxidante.

O principal composto identificado nos dois extratos analisados (55 °C e 40 bar; 55 °C e 60 bar) foi a beta-amirina, apresentando percentuais de área total de 1,415 e 2,394, respectivamente. A beta-amirina também aparece como composto majoritário nos extratos de pimenta rosa obtidos nas extrações com CO₂ supercrítico e com solventes orgânicos. No extrato obtido a 55 °C e 60 bar foram identificados ainda copaeno (% área = 1,166), cubenol (% área= 2,232) e ácido palmítico (% área= 4,023).

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propano subcrítico pode ser considerado um solvente promissor na extração de pimenta rosa devido ao alto rendimento do processo e às baixas pressões empregadas, quando estas são comparadas aos processos com CO₂ supercrítico.

Apesar do baixo potencial antioxidante encontrado para os extratos, outras análises se tornam necessárias a fim de avaliar o real potencial biológico, por meio de diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana e antitumoral.

Cabe salientar que o trabalho aqui apresentado trata-se de um estudo preliminar, sendo necessário avaliar outras condições de extração

e análises de atividade biológica a fim de ampliar o conhecimento sobre a aplicação do propano na obtenção de extratos naturais.

CAPÍTULO 6 – ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE FASES DO SISTEMA EXTRATO DE PIMENTA ROSA + DICLOROMETANO + CO₂

6.1 INTRODUÇÃO

Nos processos de extração com solventes, a força motriz para a transferência de calor e de massa é determinada pela diferença do estado de equilíbrio. O estado de equilíbrio traz informações a respeito da quantidade de soluto que o solvente supercrítico pode dissolver no equilíbrio termodinâmico, da capacidade do solvente de dissolver seletivamente um ou mais compostos e ainda a dependência das propriedades do solvente nas condições de equilíbrio (BRUNNER, 1994).

O extrato de pimenta rosa obtido por extração com CO₂ supercrítico na condição de 300 bar e 60 °C, realizada com vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e 3 horas de extração, foi submetido a medidas experimentais de equilíbrio de fases. Este extrato foi selecionado devido a uma combinação de fatores como alto rendimento obtido na extração com CO₂ nas condições citadas e também devido ao bom comportamento do extrato em termos de atividade antioxidante. Assim, o extrato selecionado para os ensaios de avaliação do comportamento do equilíbrio de fases foi dissolvido em diclorometano P.A. na proporção de 1:100 (m/m) para formar o sistema multicomponente, ou pseudo ternário, extrato de pimenta rosa + diclorometano + CO₂.

O diclorometano foi o solvente selecionado para compor o sistema pseudo ternário em estudo com base na experiência do grupo de pesquisa do LATESC e ainda, em dados disponíveis na literatura para sistemas similares, pois apresenta poder solvente para o extrato a baixas temperaturas e alta solubilidade em CO₂ supercrítico nas condições operacionais testadas.

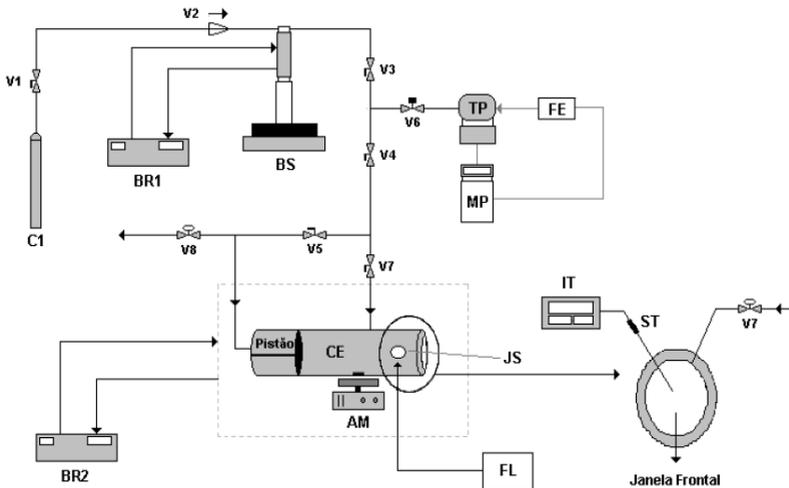
O estudo do comportamento de fases fornece informações sobre a solubilidade, precipitação e separação dos componentes envolvidos em um determinado sistema. Assim, o objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi obter e avaliar os dados de equilíbrio de fases do sistema extrato + diclorometano + CO₂ a fim de determinar condições nas quais um processo de precipitação possa ser futuramente realizado.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Aparato experimental

As medidas experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões foram conduzidas em uma célula de volume variável com visualização por meio de uma janela de safira, baseada no método estático sintético, em uma unidade similar à utilizada por Benelli et al. (2014) e Rebelatto et al. (2014). A Figura 18 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental.

Figura 18 - Diagrama esquemático do aparato experimental para determinação de equilíbrio de fases.



Fonte: Dariva, 2000 adaptado por Lanza, 2004.

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°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.

- **CE:** Célula de equilíbrio de volume variável. Consiste em um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 27 mL, possuindo um diâmetro interno de 17,2 mm e comprimento de 176 mm. 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 (ST) (J 1,5x150mm FVxFV 1000 mm ST, Salvi Casagrande, SP/Brasil) e outra com a válvula de alimentação (V7); uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral (JS) e entradas frontal (janela frontal) e traseira (fechamento e conexão com a válvula V5).
- **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, Würenlos/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.

6.2.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental para a realização de medidas de equilíbrio de fases a altas pressões utilizando o aparato experimental descrito no item 6.2.1 foi baseado na metodologia descrita por Rosso (2009) e por Michielin (2009). Brevemente, o processo 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) deve estar ajustada a 5 °C e a pressão no cilindro da bomba deve ser ajustada 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, realiza-se a montagem da célula de equilíbrio. Primeiramente, efetua-se a montagem do pistão, assegurando que o fechamento das extremidades do pistão seja realizado de forma que o mesmo 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.

No método estático sintético deve-se conhecer a composição global do sistema em estudo. Neste trabalho, o procedimento experimental foi aplicado para o sistema: extrato de pimenta rosa + diclorometano + CO₂, com razão extrato:diclorometano igual à 1:100 (m/m);

Então, para cada composição, uma quantidade de solução com extrato de pimenta rosa, dissolvido em diclorometano, referente ao sistema descrito anteriormente, é medida em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão de 0,0001 g, e, em seguida, colocada no interior da célula de equilíbrio através da conexão de alimentação, utilizando-se uma seringa com agulha. A célula de equilíbrio é então conectada à unidade experimental através das linhas que contêm as válvulas V5, V7 e o termopar, sendo mantidas fechadas.

Assim que o sistema torna-se estável (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 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 utilizadas temperaturas de 35, 45, 55 °C e frações mássicas de CO_2 de 0 a 0,98.

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 de seringa, utilizando o CO_2 como 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 através da diminuição gradativa da pressão pela bomba (3,5 bar/min), sendo mantida até a transição de fases, ou seja, o surgimento incipiente de uma segunda fase (turbamento ou formação de bolhas na solução). Neste instante, a diminuição da pressão deve ser interrompida e aguardam-se alguns instantes para a estabilização do sistema e identificação do tipo de transição e da interface entre as fases segregadas. Neste ponto, anota-se o valor da pressão e, em seguida, eleva-se novamente a pressão do sistema para repetir o procedimento. Este procedimento de aumento de pressão até a formação de uma única fase e posterior redução da pressão, para a visualização da transição de fases é realizado em duplicata para cada condição de temperatura e composição, com o objetivo de avaliar a repetibilidade da determinação experimental e obter um valor médio da pressão de transição a temperatura e composição global constantes.

Uma transição é denominada ponto de bolha (PB) quando pequenas bolhas aparecem no topo da célula. O ponto de orvalho (PO) é caracterizado quando uma fina névoa e/ou gotículas de líquido surgem dentro da célula. Para ambos os casos, a composição da fase predominante, líquida se for PB ou vapor se for PO, é considerada igual à composição global da mistura.

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 a válvula V3 por medida de segurança. Abre-se lentamente a válvula V8 para descarregar o solvente remanescente. Neste ponto, dentro da célula existirá uma fase vapor contendo praticamente solvente puro. Mantendo a válvula V8 aberta e as válvulas V3 e V4 fechadas, a válvula V7 será aberta lentamente para o descarregamento do solvente como fase vapor. Após este procedimento, segue-se com a desmontagem e limpeza da célula de equilíbrio.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

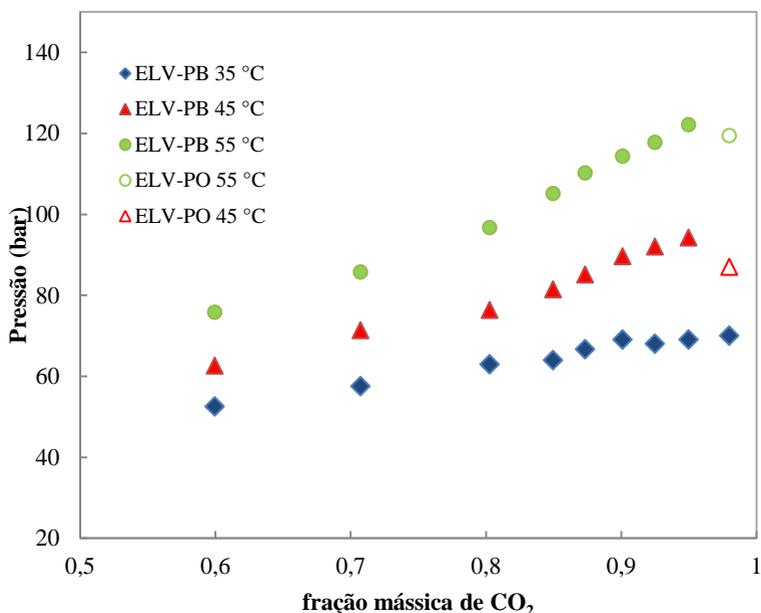
Os dados de equilíbrio de fases do sistema multicomponente extrato de pimenta rosa (obtido a 300 bar e 60 °C) + diclorometano (DCM) + CO₂ são apresentados na Figura 19, como um diagrama P-x_{CO₂} (pressão *versus* fração mássica de CO₂) e em forma de tabela, apresentada no Apêndice III. O extrato foi considerado como um composto puro, resultando assim em um sistema pseudo ternário. Os ensaios foram conduzidos na faixa de temperatura entre 35 °C e 55 °C, com frações mássicas de CO₂ que variaram de 60 a 98% (em relação à solução formada por extrato e diclorometano) e pressões de transição de fases entre 52,5 e 122,1 bar.

Durante os experimentos observou-se a ocorrência de transições de fase do tipo líquido-vapor, descritas a seguir:

- Equilíbrio líquido-vapor/ Ponto de bolha (ELV-PB): definido pelo surgimento de uma fase vapor no sistema anteriormente totalmente líquido, em função da redução da pressão, e caracterizado pela formação de uma bolha de vapor no sistema, denominado Ponto de Bolha (PB), seguida pela completa separação das fases líquida e vapor;

- Equilíbrio líquido-vapor/ Ponto de orvalho (ELV-PO): caracterizado pelo surgimento de uma fina névoa e/ou gotículas de líquido, seguido da separação das fases.

Figura 19 – Diagrama P-x para o sistema CO₂ + diclorometano (DCM) + extrato de pimenta rosa.



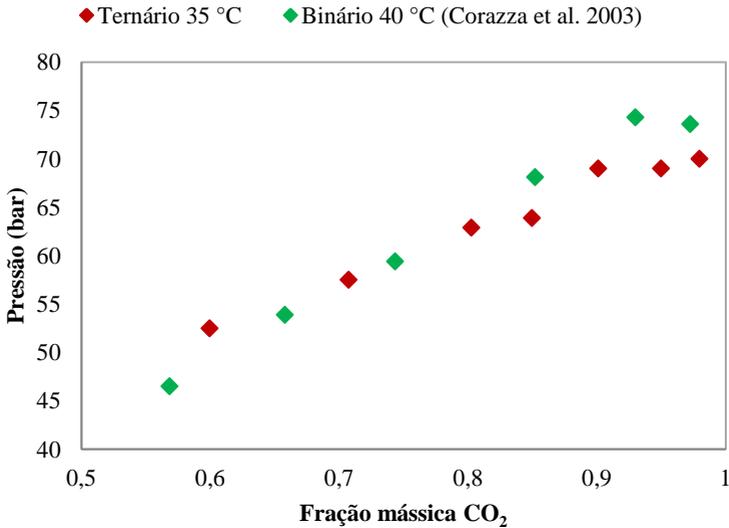
Observando a Figura 19, nas temperaturas de 45 °C e 55 °C, em altas concentrações de CO₂ verifica-se o limite entre as regiões bifásicas líquido-vapor (PB e PO), no máximo valor de pressão, que representa o ponto crítico da mistura.

O mesmo comportamento de fases aqui apresentado foi observado por Boschetto et al. (2013) no estudo do equilíbrio de fases do sistema extrato de semente de uva + diclorometano + CO₂. Ambos os trabalhos se assemelham aos dados determinados por Corazza et al. (2003) para o sistema binário CO₂ + diclorometano.

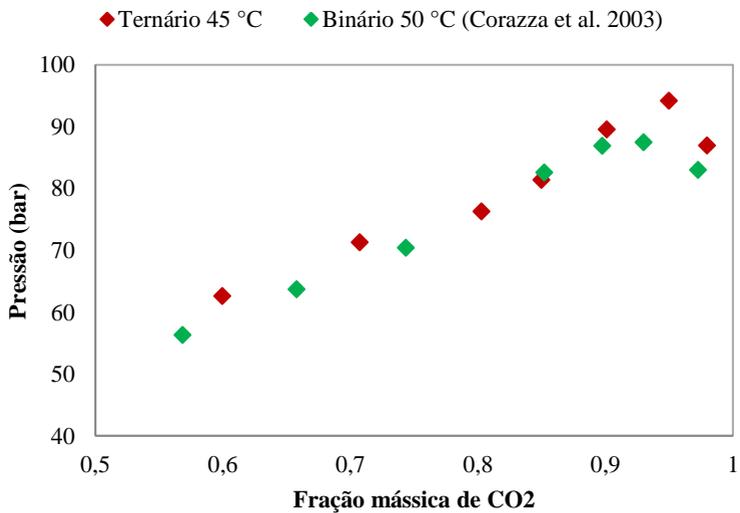
O sistema binário CO₂ + DCM descrito por Corazza et al. (2003) foi avaliado em condições isotérmicas a 40, 50, 60 e 70 °C.

Assim, com o propósito de comparar e avaliar a influência da adição do extrato de pimenta rosa ao sistema binário composto por CO_2 e diclorometano a Figura 20 é apresentada, contemplando os dados do presente trabalho (pseudo ternário) em comparação com os dados do sistema binário obtido por Corazza et al. (2003). Os diagramas P-x foram separados em três isotermas a fim de facilitar a visualização.

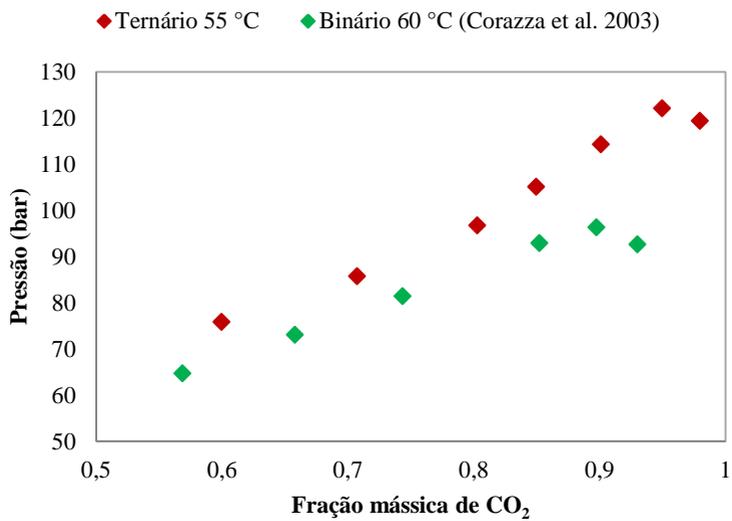
Figura 20 – Diagramas P-x para os sistemas extrato de pimenta rosa + CO_2 + DCM e CO_2 + DCM: (a) 35 °C e 40 °C; (b) 45 °C e 50 °C; (c) 55 °C e 60 °C.



(a)



(b)



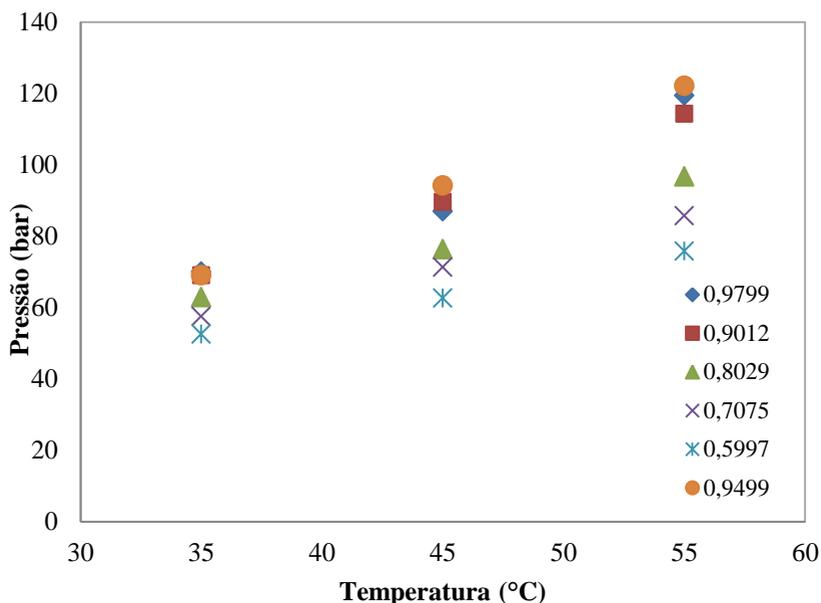
(c)

Considerando o fato de que os dados de equilíbrio de fases para os sistemas binário (Corazza et al, 2003) e pseudo ternário (presente trabalho) foram obtidos em diferentes frações mássicas de CO_2 e com estreita variação de temperatura, como mostrado na Figura 20, observa-se similaridade no comportamento das isotermas avaliadas. Ou seja, a pressão de transição aumenta com o aumento da concentração de CO_2 para uma mesma isoterma, chegando a um valor máximo, que indica o ponto crítico da mistura. A partir daí a pressão de transição reduz com a fração mássica de CO_2 , representando os dados de ponto de orvalho. Com isto podemos sugerir que o efeito da adição do extrato ao sistema binário é mais pronunciado em temperaturas mais altas (55 °C para o pseudo ternário e 60 °C para o binário) onde o deslocamento do ponto crítico da mistura para pressões superiores é mais evidente. Para o sistema binário foram observadas transições de fase do tipo ELV-PB e ELV-PO (este último na mais alta concentração de CO_2 em cada temperatura), assim como no presente trabalho.

Segundo Reverchon, De Marco e Torino (2007), a adição de um soluto ao sistema pode modificar o equilíbrio líquido-vapor do sistema binário solvente + CO_2 . De maneira geral, o soluto modifica o ponto crítico da mistura do sistema ternário para pressões mais altas, alterando o diagrama de fases quando comparado ao sistema binário correspondente, por conta da maior assimetria molecular e consequente aumento das interações energéticas entre os componentes. Esta afirmação pode ser verificada no presente trabalho, pois embora mantenha comportamento semelhante ao sistema binário dióxido de carbono + diclorometano, como demonstrado na Figura 20, o sistema pseudo ternário apresenta pressões de transição superiores. Assim, torna-se importante avaliar a adição de um extrato ao sistema composto por solvente e CO_2 quando tem-se a necessidade de determinar com maior exatidão as regiões de miscibilidade soluto/solvente, como por exemplo, nos ensaios de precipitação em meio supercrítico.

A Figura 21 apresenta um diagrama P-T para o sistema extrato de pimenta rosa + CO_2 + DCM, indicando 6 das 9 frações mássicas de CO_2 avaliadas neste trabalho, simplesmente para facilitar a visualização, sem modificar a característica do diagrama.

Figura 21– Diagrama P-T para o sistema extrato de pimenta rosa + CO₂ + DCM.



Como é demonstrado na Figura 21, o ponto crítico da mistura encontra-se próximo à fração mássica de CO₂ de 0,9499 (ELV-PB). Acima e abaixo desse valor as pressões de transição requeridas são menores, como mostrado anteriormente na Figura 19.

O conhecimento das condições de equilíbrio de sistemas multicomponentes é de extrema importância para diversos processos de separação, precipitação e/ou encapsulamento de extratos. Este trabalho em especial teve como propósito fornecer informações a respeito do sistema extrato de pimenta rosa + CO₂ + DCM para possíveis ensaios de formação de partículas em meio supercrítico.

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O equilíbrio de fases do extrato de pimenta rosa + CO₂ + DCM foi investigado na faixa de temperatura entre 35 °C e 45 °C resultando em pressões de transição de fases de até 122,1 bar.

O comportamento do sistema ternário avaliado foi semelhante ao sistema binário diclorometano e CO₂ obtido por Corazza et al. (2003), sendo encontradas transições do tipo ELV-PB e ELV-PO nos dois sistemas. Esta comparação sugere uma pequena influência do soluto (extrato de pimenta rosa) no comportamento de fases.

O estudo forneceu informações relevantes para possíveis aplicações no processo de formação de partículas em meio supercrítico usando extrato de pimenta rosa como composto de interesse.

CAPÍTULO 7 – SÍNTESE DE PARTÍCULAS POR EMULSIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO SOLVENTE

7.1 INTRODUÇÃO

Microencapsulamento é o processo pelo qual materiais sólidos e líquidos são recobertos por um filme contínuo de material polimérico. As partículas formadas neste processo apresentam tamanho entre 1 – 100 µm e são comumente empregadas na liberação controlada de fármacos e outros compostos ativos (TIWARI; VERMA, 2011).

No âmbito dos processos e produtos ambientalmente seguros, o poli (ácido lático) (PLA) representa um dos melhores substitutos aos materiais poliméricos derivados do petróleo por ser renovável, biodegradável, biocompatível e ainda apresentar boas propriedades termomecânicas. Além disso, por conta da biocompatibilidade com o corpo humano tem sido utilizado para aplicações médicas (AURAS; HARTE; SELKE, 2004; RAQUEZ et al, 2013).

O extrato de pimenta rosa obtido em condições supercríticas (300 bar e 60 °C) foi selecionado como material a ser encapsulado, devido ao seu potencial antioxidante, verificado no presente trabalho, e ainda por conta das inúmeras atividades biológicas associadas à pimenta rosa.

O método utilizado para o encapsulamento do óleo de pimenta rosa é baseado na técnica de emulsão e evaporação do solvente. No entanto, a metodologia aqui descrita apresenta modificações em relação ao procedimento original, amplamente descrito na literatura (O'DONNELL; MCGINITY, 1997; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

O diclorometano é o solvente comumente empregado nesta técnica, no entanto seu caráter tóxico é altamente limitante para a aplicação das partículas obtidas. Assim, visando minimizar o efeito tóxico do solvente, esse estudo propôs a utilização de acetato de etila como solvente na síntese de partículas por emulsão e extração do solvente. Do ponto de vista ambiental e de saúde humana o acetato de etila é visto como um solvente melhor que o diclorometano (SAH, 1997). Neste caso, a água foi utilizada como agente extrator, fazendo

uso da solubilidade do solvente orgânico na mesma, possibilitando a formação das micropartículas.

Assim, considerando o potencial biológico do extrato de pimenta rosa, e ainda a inovação no que diz respeito à utilização de um solvente orgânico menos agressivo à saúde e ao meio ambiente, o processo de síntese de partículas por emulsificação e extração do solvente foi empregado, tendo como objetivo a preservação do extrato encapsulado em biopolímero e a caracterização das partículas obtidas. Os ensaios apresentados neste capítulo foram realizados em Nantes (França), na École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation – ONIRIS, durante estágio doutoral realizado entre abril de 2014 e janeiro de 2015, sob supervisão do professor Denis Poncelet.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Procedimento experimental

A síntese de partículas de extrato de pimenta rosa em PLA foi baseada na metodologia descrita por Sah (1997) e consiste, resumidamente, de duas etapas: formação de uma emulsão primária e a extração do solvente orgânico. Na emulsão primária, a fase orgânica é constituída por polímero PLA (700 mg), acetato de etila (10 mL) e extrato supercrítico de pimenta rosa, obtido a 300 bar e 60 °C (50 mg e 100 mg, para cada formulação). Inúmeros testes foram realizados até que o procedimento para a solubilização do PLA fosse estabelecido, tornando assim a dissolução do polímero uma etapa crítica e lenta do processo, já que é necessário manter a mistura em banho-maria, a 60 °C, até a completa solubilização. A fase aquosa selecionada foi uma solução de álcool polivinílico 1%, saturada com acetato de atila, de forma a evitar uma rápida solidificação das micropartículas no momento da formação da emulsão primária. A fase orgânica é então transferida para a fase aquosa, e mantida sob agitação a 600 rpm por 2 min, para formar uma emulsão óleo em água. Em seguida, a emulsão é rapidamente transferida para um recipiente com água destilada (250 mL), mantendo-se a agitação a 150 rpm, por 45 s, caracterizando a etapa de extração do solvente. A etapa seguinte consiste na recuperação das partículas em um filtro metálico com abertura de 63 µm, seguida da lavagem abundante com água destilada, a fim de remover o solvente remanescente e evitar que as partículas fiquem aderidas à superfície do filtro. A secagem ocorre à temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C, por 24 h,

período após o qual as partículas são recuperadas e armazenadas em recipiente fechado.

Partículas controle foram preparadas da mesma forma, porém sem a adição de extrato. Neste estudo foram testadas duas formulações a fim de avaliar a influência do volume de solvente orgânico nas características das partículas: formulação 1, que utiliza uma solução polimérica de 70 mg/mL, e formulação 2, cuja concentração de polímero no solvente orgânico é de 46 mg/mL. Em cada formulação foram testadas duas concentrações de extrato de pimenta rosa (em relação ao volume inicial de acetato de etila): 5 e 10 mg/mL. Conforme a Equação 11, o rendimento da síntese de partículas foi calculado, em triplicata, pela razão entre a massa de partículas secas ao final do processo e as massas iniciais de cada componente da formulação. O resultado foi expresso como média \pm desvio padrão.

$$\text{Rendimento} = \frac{m_{particulas}}{m_{polimero} + m_{extrato}} * 100 \quad (11)$$

A fim de melhor avaliar o rendimento do processo, este foi dividido em global e real. O rendimento global considera como denominador na Equação 11 a quantidade total de polímero e de extrato usada na formulação, enquanto para o valor real a massa de PLA + extrato perdida durante o experimento é descontada do montante inicial.

7.2.2 Caracterização das partículas de PLA com extrato de pimenta rosa

7.2.2.1 Tamanho de partículas

O tamanho das partículas obtidas pelo método de emulsificação e extração do solvente foi avaliado pela técnica de difração de raio laser (Mastersizer, Malvern Instruments, Royaume-Uni), com luz monocromática vermelha, a partir de um laser de hélio-neon, sendo utilizada a via seca. Na via seca, a dispersão das partículas se dá pelo fluxo de um gás circulante, em geral ar seco. A faixa de medida do equipamento é de 0,5 - 880 μm .

Os resultados foram expressos em diâmetro médio em volume ($D_{4,3}$), uma medida comum neste tipo de análise, que corresponde ao diâmetro médio de uma esfera que apresenta o mesmo volume das partículas analisadas. Além disso, apresentou-se também o valor de Span da distribuição das partículas, cujo cálculo é apresentado na Equação 12. Segundo Mogi et al. (2000), valores de Span iguais ou menores do que uma unidade indicam uma baixa dispersão do diâmetro das micropartículas, ou seja, não existe uma grande variação no diâmetro médio do material analisado.

$$Span = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (12)$$

Onde: $D_{0,9}$: representa o diâmetro de 90% das partículas; $D_{0,1}$: diâmetro de 10% das partículas e $D_{0,5}$ representa o diâmetro de 50% das partículas analisadas.

7.2.2.2 Morfologia externa

A morfologia externa das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM-6390LV, Jeol, Japão) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras foram fixadas em um suporte metálico por meio de uma fita adesiva de carbono dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro, sob vácuo. A visualização foi realizada em aumentos de 50 a 1000 vezes, com uma tensão de 10 kV.

7.2.2.3 Eficiência de encapsulamento

A metodologia para a determinação da eficiência de encapsulamento (EE) das partículas de PLA com extrato de pimenta rosa foi baseada nos estudos de Priamo et al. (2010) e Medeiros (2013). Cerca de 100 mg de partículas foram pesadas em triplicata e dissolvidas em 10 mL de acetato de etila. A mistura foi deixada em banho-maria a 60 °C por 30 minutos ou até que as partículas estivessem completamente dissolvidas, liberando assim o extrato encapsulado. Em seguida realizou-se a medida de absorbância de cada amostra em espectrofotômetro UV a 265 nm. Acetato de etila foi utilizado como branco. O cálculo da massa de extrato encapsulada foi realizado através da correlação com a curva analítica de extrato de pimenta rosa em

acetato de etila, preparada com diferentes concentrações de extrato, apresentada no Apêndice IV. A eficiência do encapsulamento é expressa como o percentual de extrato encapsulado em relação à quantidade inicial utilizada em cada formulação.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Rendimento da síntese de partículas

Os resultados de rendimento obtidos na síntese de partículas de PLA com extrato de pimenta rosa são apresentados na Tabela 21 e ambos foram calculados pela Equação 11.

Como dito anteriormente, o rendimento da síntese de partículas foi dividido em rendimento global, determinado com base na quantidade total de polímero e de extrato utilizados no início do processo; e em rendimento real, que considera como massa inicial de componentes somente as massas de polímero e extrato realmente transferidas para o recipiente onde ocorre a solidificação das partículas, na etapa de extração do solvente. Desta forma, para o cálculo do rendimento real a quantidade de PLA + extrato perdida durante o processo de formação de partículas devido à adesão do polímero às vidrarias é desconsiderada no cálculo final.

Tabela 21 – Rendimento global e real da síntese de partículas.

Tipo de partícula	Massa (g)	Rendimento global (%)⁽¹⁾	Rendimento real (%)⁽¹⁾
PLA puro (F1)	0,52± 0,02	73,8 ± 3,3 ^a	86 ± 4 ^{ab}
50 mg extrato (F1)	0,44± 0,01	60,4 ± 2,1 ^{bc}	82,4 ± 3,5 ^{ab}
100 mg extrato (F1)	0,45± 0,05	56,3 ± 5,7 ^c	78,7 ± 5,5 ^b
PLA puro (F2)	0,48± 0,02	68,6 ± 2,5 ^{ab}	88± 3 ^{ab}
50 mg extrato (F2)	0,53± 0,03	70,2 ± 3,4 ^a	88 ± 4 ^{ab}
100 mg extrato (F2)	0,56± 0,02	70 ± 2 ^a	93± 2 ^a

F1: formulação 1 – 700 mg de PLA e 10 mL de acetato de etila;

F2: formulação 2 – 700 mg de PLA e 15 mL de acetato de etila.

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

O rendimento real é uma medida mais verdadeira, pois leva em conta o material perdido durante o processo de formação das partículas. A formulação 2 apresentou os maiores rendimentos reais, e isso se deve provavelmente à menor viscosidade da emulsão formada, reduzindo assim a massa de material perdido. A utilização de um volume maior de solvente torna a emulsão mais líquida, permitindo que ela escoe mais facilmente, diminuindo a adesão às vidrarias.

Para ambas as formulações, os valores de rendimento real foram superiores aos encontrados por Medeiros (2013) no encapsulamento de metformina em PLGA pela técnica de emulsificação e evaporação do solvente (diclorometano), que foi de 71%. No trabalho realizado por Sah (1997) o rendimento médio alcançado na formação de partículas de PLGA por emulsão e extração do solvente foi de 86,3%, valor semelhante ao encontrado no presente estudo.

Diclorometano é o solvente mais comumente utilizado na técnica de emulsão e evaporação/extração do solvente. Porém, devido à alta toxicidade associada a ele, seu uso não é aconselhável (SAH, 1997). Assim, uma das principais dificuldades encontradas neste trabalho foi estabelecer um procedimento para a solubilização do polímero PLA em acetato de etila. Muitos testes foram realizados até que a formulação final fosse alcançada, combinando fatores como rendimento do processo, facilidade de execução e reprodutibilidade.

7.3.2 Tamanho e morfologia das partículas

Segundo Astete e Sabliov (2006), para que ocorra uma liberação controlada e balanceada dos compostos encapsulados é desejável que as partículas sejam uniformes, esféricas e de menor tamanho. O valor do tamanho médio das partículas formadas de PLA com extrato supercrítico de pimenta rosa e do *Span* são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Tamanho médio de partículas de PLA com extrato de pimenta rosa obtidas pelo método de emulsificação e extração do solvente.

Tipo de partícula	D_{4,3} (µm)⁽¹⁾	Span
PLA puro (F1)	148,6 ^a	1,28
50 mg extrato (F1)	182,2 ^b	1,04
100 mg extrato (F1)	233,6 ^a	0,97
PLA puro (F2)	173,9 ^d	1,17
50 mg extrato (F2)	177,6 ^c	1,21
100 mg extrato (F2)	173,1 ^e	1,34

F1: formulação 1 – 700 mg de PLA e 10 mL de acetato de etila;

F2: formulação 2 – 700 mg de PLA e 15 mL de acetato de etila.

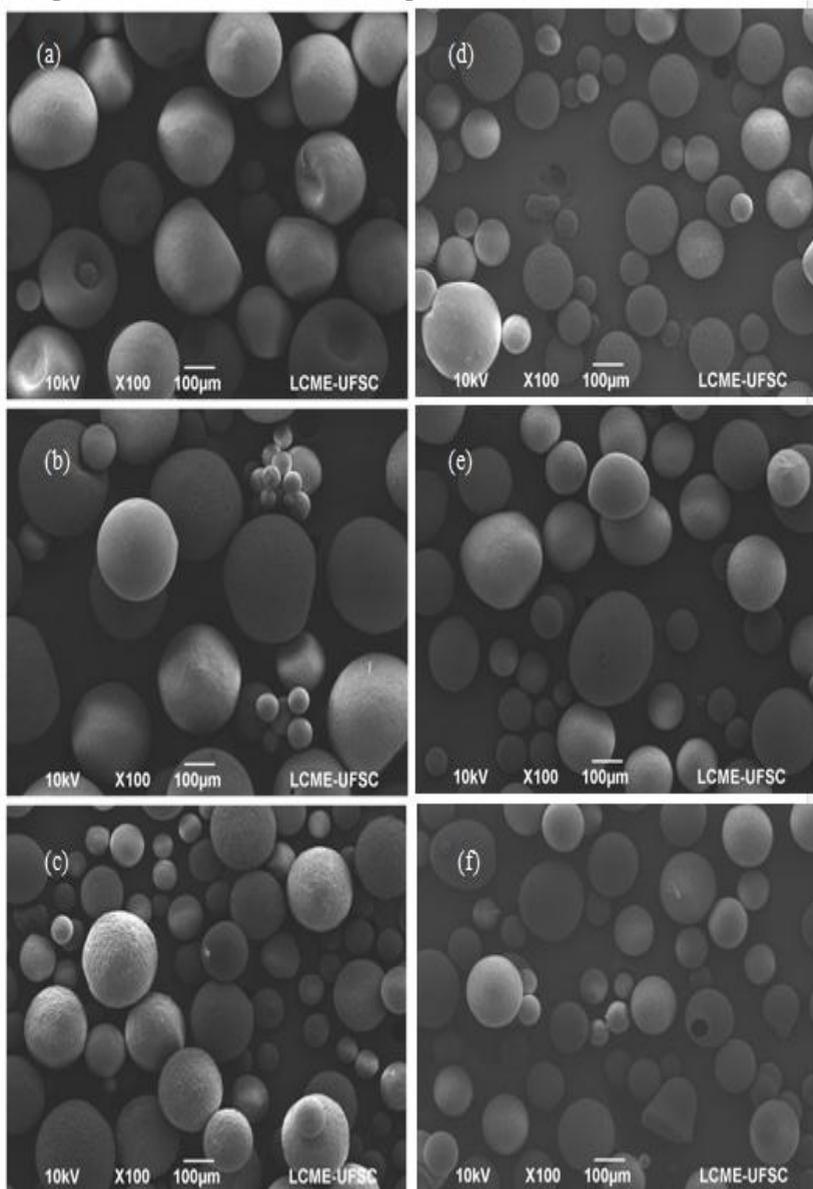
⁽¹⁾Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Por meio da Tabela 22 observa-se o aumento do diâmetro médio das partículas em função da concentração de extrato utilizada na formulação 1, porém o mesmo comportamento não é observado na formulação 2. Em todos os casos o valor de *Span* foi próximo a unidade, indicando uma baixa dispersão de tamanho de partículas. O tamanho das partículas depende de diversos fatores, como solvente e tipo de surfactante utilizado, velocidade de agitação da emulsão, viscosidade da fase orgânica, entre outros. Assim, o tamanho das partículas pode ser ajustado de forma a se adequar às necessidades da aplicação desejada.

A Figura 22 apresenta as micrografias das partículas obtidas nas duas formulações testadas.

Como pode ser observado nas micrografias, todas as partículas apresentam formato esférico, independente da formulação, e superfície levemente porosa. Segundo O'Donnell e McGinity (1997) a porosidade da partícula pode acelerar a liberação do princípio ativo além de indicar uma baixa eficiência de encapsulamento. No entanto, cada sistema tem suas particularidades, que dependem do polímero empregado e do material a ser encapsulado. Yu et al. (2014) observaram um aumento na eficiência de encapsulamento de sulfato de gentamicina em hidroxiapatita com o aumento da porosidade das partículas formadas. No presente trabalho não foi observada a presença de núcleos no interior das partículas, indicando a formação de microesferas, morfologia comumente encontrada nas partículas obtidas pela técnica de emulsificação e extração do solvente.

Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV das partículas obtidas pelo método de emulsificação e extração do solvente: (a) PLA puro – F1; (b) PLA e 50 mg de extrato – F1; (c) PLA e 100 mg de extrato – F1; (d) PLA puro – F2; (e) PLA e 50 mg de extrato – F2; (f) PLA e 100 mg extrato



7.3.3 Eficiência de encapsulamento

A eficiência do encapsulamento das partículas de extrato supercrítico de pimenta rosa em PLA é apresentada na Tabela 23.

Tabela 23 – Eficiência de encapsulamento de extrato de pimenta rosa em PLA pela técnica de emulsificação e extração do solvente.

Tipo de partícula	EE (%)⁽¹⁾
PLA + 50 mg extrato (F1)	74 ± 2 ^a
PLA + 100 mg extrato (F1)	54 ± 5 ^b
PLA + 50 mg extrato (F2)	67 ± 2 ^a
PLA + 100 mg extrato (F2)	34 ± 1 ^c

F1: formulação 1 – 700 mg de PLA e 10 mL de acetato de etila;

F2: formulação 2 – 700 mg de PLA e 15 mL de acetato de etila.

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

Os melhores resultados de eficiência de encapsulamento foram encontrados para a formulação 1, na qual um menor volume de solvente (acetato de etila) foi adicionado. Este fato pode estar associado à viscosidade da emulsão primária, que é menor na formulação 2, no entanto, mais estudos seriam necessários a fim de confirmar essa hipótese.

Em ambas as formulações testadas têm-se a redução da eficiência de encapsulamento com o aumento da massa de extrato adicionada. Segundo De Paz et al. (2012), a eficiência do processo está ligada à concentração do agente de encapsulamento, ou seja, se a razão entre a concentração de polímero e de extrato for maior, as gotículas de soluto (extrato) serão mais facilmente recobertas com polímero.

7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos pode-se dizer que a modificação proposta neste trabalho, tratando a substituição do solvente diclorometano por acetato de etila, foi adequada para o processo de formação de partículas por emulsificação e extração do solvente.

As micropartículas de extrato de pimenta rosa em PLA apresentaram formato esférico e morfologia esférica, e são levemente

porosas. A eficiência de encapsulamento foi semelhante às determinadas em outros trabalhos disponíveis na literatura para o encapsulamento de compostos hidrofóbicos.

A redução do tamanho das micropartículas pode ser estudada em trabalhos futuros, em função das variáveis do processo, a fim de aumentar a gama de aplicação do extrato encapsulado.

Avaliando os resultados obtidos neste trabalho pode-se recomendar a utilização da formulação 1, constituída de 700 mg de polímero e 10 mL de acetato de etila, com 50 mg de extrato supercrítico de pimenta rosa para a síntese de partículas pelo método de emulsificação e extração do solvente. Esta formulação apresenta valores de diâmetro de partícula e rendimento real próximos aos da formulação 2, porém a eficiência de encapsulamento é superior à obtida nos demais ensaios, além de utilizar um volume menor de solvente e, conseqüentemente, de água requerida para extraí-lo.

Considerando a aplicação das micropartículas como antioxidantes, dado o efeito apresentado pelo extrato encapsulado, deve-se considerar ainda a liberação do composto de interesse a fim de avaliar de uma forma mais completa a metodologia de formação de partículas aqui descrita.

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÃO

Entre as diferentes técnicas utilizadas na obtenção de extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa, a extração em Soxhlet usando etanol como solvente foi a que apresentou os melhores resultados de rendimento, para ambas as matérias-primas. Na extração supercrítica os ensaios realizados a 300 bar e 60 °C promoveram os maiores valores de rendimentos para a pimenta-do-reino e também para a pimenta rosa.

A adição de um cossolvente à extração supercrítica foi avaliada nos ensaios com a pimenta-do-reino, a fim de melhorar o rendimento na condição selecionada (150 bar e 50 °C) e também as características do extrato em relação ao potencial antioxidante. O solvente selecionado foi etanol e a razão mássica ótima avaliada foi de 5%, na qual foram observados: aumento do rendimento de extração, da atividade antioxidante determinada pelo método DPPH e também do teor de compostos fenólicos totais.

Na avaliação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de ambas as amostras não foi possível identificar uma tendência de variação em função da pressão ou da temperatura na extração supercrítica. De maneira geral, os extratos obtidos nas extrações a baixa pressão com solventes orgânicos apresentaram resultados mais satisfatórios em relação à ESC. O mesmo comportamento foi observado na análise da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. Em ambos os casos, para ambas as amostras, os extratos obtidos em Soxhlet e na extração assistida por ultrassom, com solventes de maior polaridade, apresentaram melhores potenciais como antioxidantes. No entanto, destaca-se o extrato de pimenta rosa obtido a 300 bar e 60 °C, que apresentou uma atividade antioxidante de 72% pelo método DPPH, valor este bastante positivo, considerando que, de maneira geral, os extratos obtidos por tecnologia supercrítica apresentam baixo potencial antioxidante.

Em vista dos resultados alcançados nesta primeira etapa, a pimenta rosa foi selecionada para os ensaios de extração com propano subcrítico, estudo do equilíbrio de fases e também para encapsulamento em biopolímero.

Embora na extração com propano subcrítico tenha-se alcançado bons rendimentos, a avaliação de atividade antioxidante não foi positiva, sugerindo a aplicação dos extratos para outros fins, já que de acordo com o perfil químico dos extratos, tem-se a presença de compostos com importantes atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antidiabética e antimicrobiana.

No estudo do equilíbrio de fases, transições do tipo líquido-vapor foram verificadas para o sistema extrato de pimenta rosa + diclorometano + dióxido de carbono. Os resultados obtidos são extremamente válidos para aplicações como formação de partículas em meio supercrítico.

As partículas de extrato de pimenta rosa em PLA sintetizadas pelo método de emulsificação e extração do solvente apresentaram bons resultados de eficiência de encapsulamento, quando comparados a sistemas semelhantes disponíveis na literatura.

Em resumo, pode-se dizer que ambas as matérias-primas estudadas ao longo desse projeto apresentam características que as tornam interessantes do ponto vista biológico e terapêutico, devido aos inúmeros benefícios à saúde associados a elas. O projeto desenvolvido contribuiu principalmente para ampliar a gama de estudos relacionados à pimenta rosa, em especial no que diz respeito ao equilíbrio de fases e também ao processo de encapsulamento de extratos e ainda incentivar outros estudos envolvendo a pimenta-do-reino, como análise do potencial dos extratos como antimicrobiano e agente antitumoral.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos durante a execução deste projeto, algumas sugestões são dadas para realização em trabalhos futuros:

- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de pimenta-do-reino e pimenta rosa por metodologias *in vivo*;
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de ambas as amostras;
- Determinação do perfil químico de todos os extratos de ambas as amostras;
- Avaliar o estudo do equilíbrio de fases do sistema extrato de pimenta rosa + DCM + CO₂ + polímero;
- Testar a formação de partículas de extrato de pimenta rosa em meio supercrítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAOUF, N; AL-ENAZI, N. M.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M.; AL-OTHMAN, M. R.; HATAMLEH, A. A. Antibacterial β -amyirin isolated from *Laurencia microcladia*. Arabian Journal of Chemistry. V. 8, p. 32–37, 2015.

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.

AHMAD, N., FAZAL, H., ABBASI, B. H., FAROOQ, S., ALI, M., KHAN, M. A. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, p. 1945-1953, 2012.

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

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. Talanta, v. 88, n. 0, p. 544-552, 2012.

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

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

ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2004. 415p.

ATTOKARAN, M. Black pepper. Natural Food Flavors and Colorants, 2011.

BAGHERI, H., MANAP, M. Y. B. A., SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. Talanta, v. 121, p. 220–228, 2014.

BAHRAMI, M.; RANJBARIAN, S., Production of micro- and nanocomposite particles by supercritical carbon dioxide. Journal of Supercritical Fluids, v. 40, p. 263 – 283, 2007.

BALAMURUGAN, R.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology, v. 667, p. 410–418, 2011.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. Química Nova, v. 30, p. 1959-1965, 2007.

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

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. Journal of Food Science, Vol. 75, No. 6, 2010.

BENELLI, P.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA, A. J.; 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, 2010.

BERKLAND, C., KING, M., COX, A., KIM, K.K., PACK, D.W. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *Journal of Controlled Release*, v. 82, 137–147, 2002.

BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 2006. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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.

BOSCHETTO et al. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. *Industrial Crops and Products*, v. 50 p. 352– 360, 2013.

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

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

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

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.

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

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Pimenta-do-reino. Disponível em www.ceplac.gov.br/radar/pimentadoreino.

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.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 798–802, 2010.

CLEMENTE, A. D. Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Viçosa, UFV. Dissertação (Mestrado em agroquímica). Pós-graduação em agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

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

CORAZZA, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. High pressure phase equilibria of the related substances in the limonene oxidation in supercritical CO₂. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 48, p. 354 – 358, 2003.

CORSO, M. P.; FAGUNDES-KLEIN, M. R.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 52, 56-61, 2010.

COSTA, T. E. M. M.; HERINGER, A. P.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. das G.; ROSAS, E. C. Estudo da ação anti-inflamatória dos extratos etanólico, frações e substâncias

obtidas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) em ensaios *in vitro* e *in vivo*. IV Bienal de Pesquisa, FIOCRUZ, 2008.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; SANTA, O. R. D.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 97, p. 145–153, 2015.

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

DIAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 7, 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 seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26(2), p. 446-52, 2006.

EMATER - Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária. Perspectivas e potencialidades do mercado para pimentas. Disponível em www.emater.go.gov.br.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção da pimenteira-do-reino. Disponível em www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br.

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, S. R. S., MEIRELES, M. A.A, CABRAL, F. A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v. 20, p. 121 – 133, 1993.

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.

FRANÇA, L.F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.A; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region, *Journal of Supercritical Fluids* v. 14, p. 247-256, 1999.

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, 2008.

FREITAS, S., MERKLE, H.P., GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, v. 102, p. 313–332, 2005.

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.

FREITAS L. S.; OLIVEIRA J. V.; DARIVA, C.; JACQUES R. A.; CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2558 - 2564, 2008.

GABAY, O.; SANCHEZ, C.; SALVAT, C. ; CHEVY, F. ; BRETON, M. ; NOURISSAT, G. ; WOLF, C. ; JACQUES, C. ; BERENBAUM, F. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.18, p. 106 - 116, 2010.

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.

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. *Journal of Food Science*, v. 76 (2), p. 16 - 24, 2011.

GOMIDE, R. Operações com sistemas sólidos granulares, in: R. Gomide (Ed.), Operações Unitárias, vol. 1, Edição do autor, São Paulo, 1980.

GHELARDINI, C., GALEOTTI, N., DI CESARE MANNELLI, L., MAZZANTI, G., BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, v. 56, p. 387–389, 2001.

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.

HAMDAN, S., DAOOD, H. G., MARKUS, M. T., ILLÉS, V. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. *J. of Supercritical Fluids*, v. 44, p. 25–30, 2008.

HEGEL, P. E.; ZABALOY, M. S.; MABE, G. D. B.; PEREDA, S.; BRIGNOLE, E. A. Phase equilibrium engineering of the extraction of oils from seeds using carbon dioxide + propane solvent mixtures. *Journal of Supercritical Fluids*, 42, 318-324, 2007.

HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GOTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. *Journal of Chromatography*, v. 776, p. 233-243, 1997.

HORVÁTH, B., MUKHOPADHYAY, P., KECHRID, M., PATEL, V., TANCHIAN, G., WINK, D., GERTSCH, J., PACHER, P. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a

cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radical Biology and Medicine*, v.52, p. 1325–1333, 2012.

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.

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

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

KASSING, M. et al. Approach for process development of plant-based extraction process. *Chemical Engineering & Technology*, v. 33, p. 377 – 387, 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.

KITZBERGER, C. S. G. Obtenção de extrato de cogumelo 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.; 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.

LACA -BUENDIA, J. P.; BRANDÃO, M.; OLIVEIRA, L. M. da S. Utilização dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) na substituição da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Daphne, Belo Horizonte*, v. 2, n. 4, p. 34-36, jul., 1992.

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.

LI, M, LIU, Z. In vitro effect of Chinese herb extracts on caries related bacteria and glucan. *J Vet Dent.*, v. 25, p. 236-239, 2008.

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.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, v. 27, p. 916-919, 2004.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W.G. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid>, 2015.

LLOYD, H. A., JAOUNI, T. M., EVANS, S. L., MORTON, J. F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 1301-1301, 1977.

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

LUTERMANN, C.; WILLEMS, E.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Effects on various binary and ternary supercritical phases on the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, v. 816, p. 201-211, 1998.

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 of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 5682-90, 2008.

MARKON, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects

of solvents and extraction methods. Separation and Purification Technology, v. 52, p. 487-496, 2007.

MARTÍN, A. et al. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with supercritical anti-solvent process. Journal of Supercritical Fluids. v. 41, p. 138-147, 2007.

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

MARTINS, M. R, ARANTES, S., CANDEIAS, F., TINOCO, M. T., CRUZ-MORAES, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. Journal of Ethnopharmacology, v.151, p. 485–492, 2014.

MATSUO et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 411, p. 449–454, 2011.

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

MAZZUTTI et al. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. Journal of Supercritical Fluids, v. 70, p. 48–56, 2012.

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

MEDEIROS, G. R. Modelagem matemática da liberação de compostos hidrofílicos incorporados por dupla emulsão em micropartículas de PLGA. Florianópolis: UFSC, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

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

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

MESOMO, M. C. Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* roscoe) usando CO₂ supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica. Curitiba, UFPR, 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)

MESOMO, M. C.; SCHEER, A. DE P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. *Journal of Supercritical Fluids*, 71, 102-109, 2012. Universidade Federal do Paraná, 2013.

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., FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of sodium ibuprofen. *In: Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA)*. Caderno de Resumos do PROSCIBA, 2013.

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.

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.; 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.

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

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

MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M.; Aplicação das técnicas de picnometria de gás e deposimetria 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.

MUKHOPADHYAY, M. *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*: CRC Press, 2000.

NASSER, A. L. M.; PAVA, F. R.; BORALLE, N.; ZOCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; MARCHI, M. R. R.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W. Esteroides e Triterpenos de espécies de *Qualea* – Bioatividade sobre

Mycobacterium tuberculosis. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v 34, p.513-517, 2013.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.28, p.25-42, 1997.

OLIVEIRA et al. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, v. 164, p. 423-432, 2013.

PARTHASARATHY, V., A., SASIKUMAR, B., NAIR, R.R., JOHNSON GEORGE, K. Black pepper: botany and horticulture. *Indian Institute of Spices Research*, v. 33, 2007.

PAVANETTO, F. CONTI, B., GENTA, I., GIUNCHEDI, P. Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 84, p. 151-159, 1992.

PEREIRA, C.; MEIRELES, M. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n. 3, p. 340-372, 2010.

PEREIRA, C. G.; MARQUES, M. O. M.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of indole 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.

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

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

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

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

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

PRIAMO, W.L.; CEZARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 103-109, 2010.

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.

RAQUEZ, J.; HABIBI, Y.; MURARIU, M.; DUBOIS, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, v. 38, p. 1504 - 1542, 2013.

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.

REBELATTO, E. A.; BENDER, J. P.; CORAZZA, M. L.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. High-pressure phase equilibrium data for the (carbon dioxide + L-lactide + ethanol) system. *J. Chem. Thermodynamics*, v. 86, p. 37-42, 2015.

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.

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

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and 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.

SABINA, E. P.; SOURIYAN, A. D. H.; JACKLINE, D.; RASOOL, M. K. Piperine, an active ingredient of black pepper attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, p. 971-976, 2010.

SAH, H. Microencapsulation techniques using ethylacetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 47, p. 233-245, 1997.

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.

SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; CELESTE MARIA PATTO DE ABREU, C. M. P. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). *Química Nova*, v. 30, p. 604-610, 2007.

SATO, T., KANKE, M., SCHROEDER, H. G., DE LUCA, P. P. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery: I. Assessment

of process conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Rex*, 5 (1988) 21-30.

SELVENDIRAN, K, SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. *Biomed Pharmacother.*, v. 58, p. 264-7, 2004.

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

SILVA, I. C. M.; SANTOS, W. L.; LEAL, I. C. R.; ZOGHBI, M. G.; FEIRHMANN, A. C.; CABRAL, V. F.; MACEDO, E. N.; CARDOZO-FILHO, L. Extraction of essential oil from *Cyperus articulatus* L. var. articulatus (priprioica) with pressurized CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 88, p. 134–141, 2014.

SILVA Z. M.; ZANQUI, A. B.; GOHARA, A. K.; SOUZA, A. H. P.; CARDOZO-FILHO, L.; VISENTAINER, J. V.; CHIAVELLI, L. U. R.; BITTENCOURT, P. R. S.; SILVA, E. A.; MATSUSHITA, M. Compressed n-propane extraction of lipids and bioactive compounds from *Perilla* (*Perilla frutescens*). *Journal of Supercritical Fluids*, v. 102, p. 1–8, 2015.

SINGH, G., MARIMUTHU, P., CATALAN, C., LAMPASONA, M. P. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 84, p. 1878 – 1884, 2004.

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.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1077-1080, 2003.

SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D.; FLEMING, T. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 885-891, 2006.

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.

SUNIL, C.; IRUDAYARAJ, S. S.; DURAI PANDIYAN, V.; AL-DHABI, N. A.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antioxidant and free radical scavenging effects of β -amyrin isolated from *S. cochinchinensis* Moore. *Leaves. Industrial Crops and Products*, v. 61, p. 510-516, 2014.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 339-346, 2004.

TIWARI, S.; VERMA, P. Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables). *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, v. 2, p. 998 - 1005, 2011.

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

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

VAUGHN, S. F., SPENCER, G. F. Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. *Weed Science*, v. 41, p. 114 - 119, 1993.

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

WATTANATHORN, J.; CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; MUCHIMAPURA, S.; PRIPREM, A.; TANKAMNERDTHAI, O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 3106–3110, 2008.

YEO, S.-D.; KIRAN, E., Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *Journal of Supercritical Fluids*, v.34, p. 287 – 308, 2005.

YU, M.; ZHOU, K.; ZHANG, F. ; ZHANG, D. Porous HA microspheres as drug delivery: Effects of porosity and pore structure on drug loading and in vitro release. *Ceramics International*, v. 40, p. 12617–12621, 2014.

ZARAI, Z., BOUJELBENE, E., BEN SALEM, N., GARGOURI, Y., SAYARI, A., Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*, *LWT Food Science and Technology*, 2012.

ZETZL, C.; LOZANO, G. A.; BRUNNER, G. Compilation of batch SFE-Models for natural products. *In: Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA)*. Foz do Iguaçu, Paraná, Caderno de Resumos do PROSCIBA, 2007.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids. Vol. 1, 2003, p. 577.

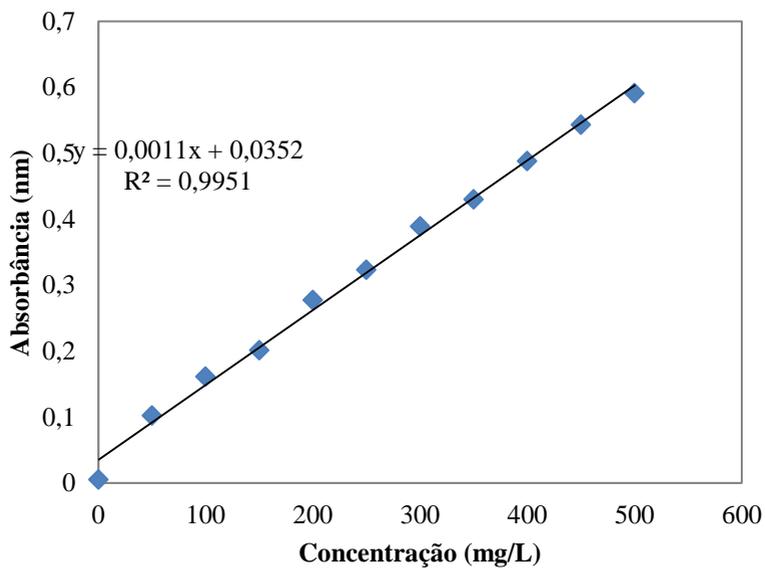
ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 5165-70, 2001.

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.

ZIAKOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 25, p. 3017-3032, 2002.

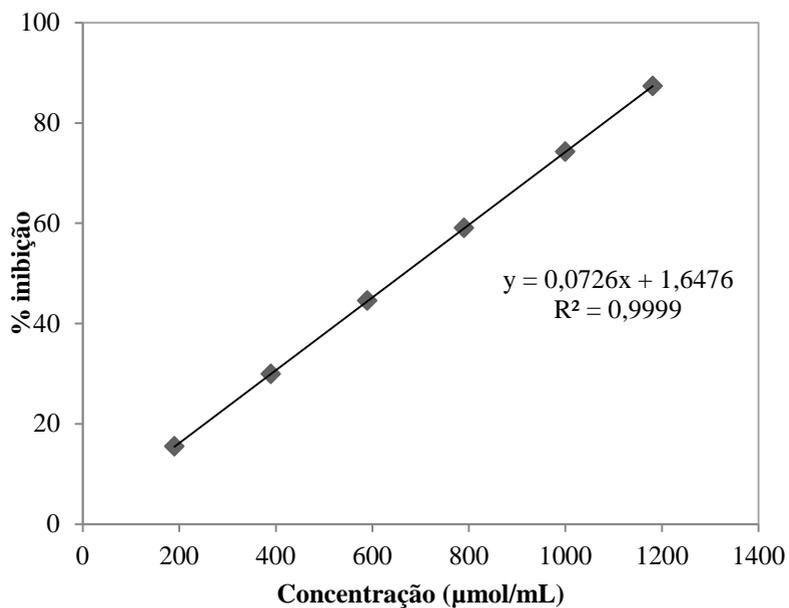
APÊNDICE I – CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO

Figura A.I – Curva analítica de ácido gálico utilizada na determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa.



APÊNDICE II – CURVA ANALÍTICA DE TROLOX

Figura A.II - Curva analítica de Trolox utilizada na determinação de capacidade antioxidante dos extratos de pimenta-do-reino e de pimenta rosa.



APÊNDICE III – DADOS DO EQUILÍBRIO DE FASES DO SISTEMA EXTRATO DE PIMENTA ROSA + DICLOROMETANO + CO₂

Tabela A.III - Dados experimentais de equilíbrio líquido-vapor para o sistema extrato de pimenta rosa + diclorometano + CO₂

T(°C)	P (bar)	σ (bar)	Tipo de		T (°C)	P (bar)	σ (bar)	Tipo de
			Transição	Transição				
$x_{CO_2}=0,5997$								
35	52,5	0,2	ELV-PB		35	69,0	0,16	ELV-PB
45	62,5	0,5	ELV-PB		45	89,6	0,53	ELV-PB
55	75,8	0,1	ELV-PB		55	114,3	0,70	ELV-PB
$x_{CO_2}=0,7075$								
35	57,5	0,4	ELV-PB		35	68,0	0,3	ELV-PB
45	71,3	0,6	ELV-PB		45	92,0	0,5	ELV-PB
55	85,7	0,4	ELV-PB		55	117,7	0,3	ELV-PB
$x_{CO_2}=0,8029$								
35	62,9	0,8	ELV-PB		35	69,0	0,4	ELV-PB
45	76,3	0,4	ELV-PB		45	94,2	0,7	ELV-PB
55	96,7	0,3	ELV-PB		55	122,1	0,5	ELV-PB
$x_{CO_2}=0,8498$								
35	63,9	0,8	ELV-PB		35	70,0	0,4	ELV-PB
45	81,4	0,8	ELV-PB		45	87,0	0,4	ELV-PO
55	105,1	0,2	ELV-PB		55	119,4	0,5	ELV-PO
$x_{CO_2}=0,8733$								
35	66,6	0,4	ELV-PB					
45	85,1	0,3	ELV-PB					
55	110,2	0,3	ELV-PB					

APÊNDICE IV – CURVA ANALÍTICA DE EXTRATO DE PIMENTA ROSA

Figura A.III – Curva analítica de extrato de pimenta rosa em acetato de etila, utilizada no cálculo de eficiência de encapsulamento das partículas de PLA.

