

Rafaela Marise Hall

**RECUPERAÇÃO DE EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS
BIOATIVOS DA SEMENTE DE MAMÃO (*Carica papaya L.*) POR
EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E POR LÍQUIDO
PRESSURIZADO**

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

Orientador: Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coorientador: Dra. Simone Mazzutti

Florianópolis
2018

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

Hall, Rafaela Marise

Recuperação de Extratos Ricos em Compostos Bioativos da Semente de Mamão (Carica papaya L.) por Extração Supercrítica e por Líquido Pressurizado / Rafaela Marise Hall ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira ; coorientadora, Simone Mazzutti, Florianópolis, 2018.

151 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Semente de mamão. 3. Extração supercrítica. 4. Extração com líquido pressurizado. 5. Processos combinados. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Mazzutti, Simone. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Rafaela Marise Hall

**RECUPERAÇÃO DE EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS
BIOATIVOS DA SEMENTE DE MAMÃO (*Carica papaya L.*) POR
EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E POR LÍQUIDO
PRESSURIZADO**

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

Florianópolis, 14 de Março de 2018.

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador do Curso

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

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Jane Mara Block
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico, a todos aqueles que hoje junto
comigo colhem esses frutos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por que em todos os momentos foi minha companhia e fortaleza.

A minha orientadora, professora Sandra Regina Salvador Ferreira, que abraçou esse trabalho junto comigo, e dedicou tempo e ensino no decorrer desses anos.

A minha coorientadora, Simone Mazzutti, que auxiliou nesse trabalho e que a todo tempo transmite energia e motivação.

A todos os amigos e colegas do LATESC, que fazem desse laboratório um ambiente de trabalho agradável e motivador. Em especial aos amigos mais chegados, que de uma forma ou outra sempre estiveram me auxiliando e dando suporte para a realização desse trabalho.

A todos os colegas e parceiros que auxiliaram na realização desse trabalho.

Aos meus amigos, de longe de perto, aos mais chegados aos irmãos, meus agradecimentos, pois se fizeram presente não só na alegria, mas também nas situações adversas. Obrigada pela amizade de vocês e por suprirem a ausência da minha família.

A minha família, que mesmo distante sempre transmitiu força e cuidado no decorrer de toda a minha vida.

Apegue-se à instrução, não a abandone; guarde-a bem, pois dela depende a sua vida.
(Provérbios 4:13)

RESUMO

O mamão é um fruto originário de regiões tropicais e subtropicais e é amplamente consumido pela sua disponibilidade e baixo custo. Além do consumo "*in natura*" o fruto é comercializado na forma de polpa, compotas e frutas cristalizadas, tendo as sementes como principal material de descarte. A semente de mamão é muito conhecida pelo emprego para fins medicinais e apresenta um amplo espectro fitoquímico, com destaque para o composto BITC (benzil-isotiocianato) que está diretamente ligado com as atividades biológicas da semente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica da semente de mamão empregando diferentes técnicas de extração para obtenção de extratos. As técnicas de extração aplicadas foram Soxhlet (SOX), líquido pressurizado (PLE), extração com fluido supercrítico (ESC) e processo combinado de ESC e PLE, extração ESC da semente de mamão e posterior extração do resíduo com PLE. Os diferentes métodos foram avaliados quanto ao rendimento de extração, conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante (DPPH e descoloração do β -caroteno) e atividade antimicrobiana pelo método de concentração mínima inibitória (CMI). Os maiores rendimentos foram observados para as extrações SOX com etanol (24,3%) e hexano (24,3%), sendo estes estatisticamente iguais aos obtidos por PLE com etanol (23,7%). Maiores teores de compostos fenólicos e de atividade antioxidante foram detectados nos extratos obtidos com água e água/etanol por PLE e pelo processo combinado de ESC e PLE. Todos os extratos da semente de mamão apresentaram atividade antimicrobiana frente as micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, com destaque para os extratos obtidos por ESC que apresentaram características de forte inibidor, especialmente para a bactéria *E. coli* ($7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ condição 20 MPa/40 °C). O processo combinado melhorou o potencial antioxidante e antimicrobiano da semente de mamão e possibilitou o máximo aproveitamento da matéria-prima. O óleo da semente de mamão mostrou-se como uma valiosa fonte de compostos naturais, especialmente BITC, apresentando concentrações de BITC de 12% para a condição de 20 MPa/80 °C. O modelo matemático que melhor se ajustou as curvas experimentais foi o modelo de Sovová, sendo o mecanismo de convecção o mais representativo no processo de extração.

Palavras-chave: Semente de mamão. Extração supercrítica. Extração com líquido pressurizado. Processos combinados.

ABSTRACT

Papaya is a fruit that originates in tropical and subtropical regions and is widely consumed for its availability and low cost. In addition to the "*in nature*" consumption, the fruit is marketed in the form of pulp, jams and crystallized fruits, with seeds being the main disposal material. The papaya seed is well known for its medicinal uses and has a broad phytochemical spectrum, especially the BITC (benzyl isothiocyanate) compound that is directly linked to the biological activities of the seed. Thus, the objective of this work was evaluate the biological activity of the papaya seed using different extraction techniques to obtain extracts. The extraction techniques were Soxhlet (SOX), pressurized liquid (PLE), supercritical fluid extraction (ESC) and combined ESC and PLE process, ESC extraction of the papaya seed and subsequent extraction of the residue with PLE. The different methods were evaluated for extraction yield, phenolic content, antioxidant activity (DPPH and β -carotene discoloration) and antimicrobial activity by the minimum inhibitory concentration (CMI) method. The highest yields were observed for SOX extractions with ethanol (24.3%) and hexane (24.3%), which were statistically the same as those obtained by PLE with ethanol (23.7%). Higher levels of phenolic compounds and antioxidant activity were detected in extracts obtained with water and water/ethanol by PLE and by the combined process of ESC and PLE. All extracts of the papaya seeds presented antimicrobial activity against the *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* microorganisms, especially the extracts obtained by ESC that presented strong inhibitory characteristics, especially for *E. coli* bacterium ($7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ condition 20 MPa/40 °C). The combined process improved the antioxidant and antimicrobial activities of the papaya seed and made possible the maximum use of the raw material. Papaya seed oil proved to be a valuable source of natural compounds, especially BITC, exhibiting BITC concentrations of 12% for the 20 MPa/80 °C condition. Sovová was the mathematical model which best-adjusted experimental data, the convection mechanism was more representative in the extraction process.

Keywords: Papaya seed. Supercritical extraction. Extraction with pressurized liquid. Combined processes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variedades de mamão comercializadas.	33
Figura 2 - Degradação do glicosinolato pela mirosinase.....	35
Figura 3 - Cinética de extração com líquido pressurizado.	39
Figura 4 - Representação da curva de extração e matriz da partícula em cada período.	44
Figura 5 - Resumo gráfico da parte experimental.	50
Figura 6 - Amostra in natura (a), desidratada (b) e triturada (c).	50
Figura 7 - Unidade de extração ESC.....	53
Figura 8 - Diagrama da unidade de extração ESC.	54
Figura 9 - Curvas de extração a 40 °C. (♦) Ensaio 1: 30 MPa e 0,7 kg.h ⁻¹ ; (*) Ensaio 2: 30 MPa e 0,35 kg.h ⁻¹ ; (▲) Ensaio 3: 30 MPa e 0,21 kg.h ⁻¹ ; (●) Ensaio 4: 20 MPa e 0,7 kg.h ⁻¹ ; (■) Ensaio 5: 15 MPa e 0,7 kg.h ⁻¹ ; (+) Ensaio 6: 15 MPa e 0,35 kg.h ⁻¹	61
Figura 10 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kg.h ⁻¹	62
Figura 11 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 15 MPa, 40 °C e vazão de 0,35 kg.h ⁻¹	63
Figura 12 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 20 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kg.h ⁻¹	63
Figura 13 - Curva experimental e modelada (Sovová) a 40 °C e 0,7 kg.h ⁻¹ nas condições de (■) Ensaio 1: 30 MPa; (●) Ensaio 4: 20 MPa; (▲) Ensaio 5: 15 MPa.	69
Figura 14 - Curva experimental e modelada (Sovová) a 40 °C e 30 MPa nas condições de (■) Ensaio 1: 0,7 kg.h ⁻¹ ; (●) Ensaio 2: 0,35 kg.h ⁻¹ ; (▲) Ensaio 3: 0,21 kg.h ⁻¹	70
Figura 15 - Curvas modeladas (Sovová) e experimentais nas condições em (■) pequena escala (30 MPa, 0,21 kg.h ⁻¹ e 40 °C) e em (●) escala ampliada (30 MPa, 1,21 kg.h ⁻¹ e 40 °C).....	71
Figura 16 – Curva cinética da ampliação de escala da semente de mamão com relação ao (●) conteúdo de compostos fenólicos e a (■) massa acumulada.	73
Figura 17 - Resumo gráfico do Capítulo 4.....	78
Figura 18 - Aparato para extração Soxhlet.....	80
Figura 19 - Unidade de extração PLE.	82
Figura 20 - Diagrama da unidade de extração PLE.....	83
Figura 21 - Cinética de extração PLE a 10 MPa, 40 °C com etanol a 3 mL.min ⁻¹	90
Figura 22 - Comparativo entre rendimento global e CFT dos extratos da semente de mamão.	96

Figura 23 - CG-EM para a condição de 30 MPa e 40 ° C: (a) CG-EM do isotiocianato de benzila (componente majoritário); (b) Zoom do maior pico de BITC- obtido a partir do extrato de sementes de mamão.	105
Figura 24 - Resumo gráfico do Capítulo 5.....	112
Figura 25 – Comparativo do rendimento e do CFT entre as extrações PLE: Resíduo (semente com o pré-tratamento ESC) e PLE (semente sem o pré-tratamento ESC).	120
Figura 26 - Comparativo da atividade antioxidante entre as extrações PLE: Resíduo (semente com o pré-tratamento ESC) e PLE (semente sem o pré-tratamento ESC).	123
Figura 27 - Curva analítica de ácido gálico utilizada no cálculo do conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT).	145
Figura 28 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,35 kgh ⁻¹	146
Figura 29 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 15 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kgh ⁻¹	146
Figura 30 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,21 kgh ⁻¹	147
Figura 31 - Curva de calibração do padrão Benzyl isothiocyanate-98% para quantificação do composto majoritário.	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros para os ensaios cinéticos de semente de mamão, a temperatura constante de 40 °C.....	56
Tabela 2 - Caracterização do leito de partículas.....	59
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos, densidade do solvente e rendimento global para as curvas de ESC da semente de mamão a 40 °C	60
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos estimados e parâmetros estatísticos calculados para os cinco modelos testados.....	64
Tabela 5 - Teste F de variância residual da ESC para um intervalo de confiança de 95%.....	68
Tabela 6 - Parâmetros ajustáveis para os ensaios em pequena e grande escala obtidos pelo modelo de Sovová.....	72
Tabela 7 - Ensaios de extração supercrítica para determinação do rendimento global (X_0).....	81
Tabela 8 - Ensaios de extração PLE para determinação do rendimento global (X_0).....	85
Tabela 9 - Rendimento global de extração para a semente de mamão.	92
Tabela 10 - Conteúdo de fenólicos totais (CFT) para os extratos da semente de mamão.	95
Tabela 11 – Atividade antioxidante dos extratos da semente de mamão pelo método DPPH, expressos em concentração efetiva a 50% (EC_{50}).98	
Tabela 12 - Atividade antioxidante dos extratos da semente de mamão através do método descoloração do sistema β -caroteno, expresso em percentual de atividade antioxidante (%AA).	100
Tabela 13 - Concentração mínima inibitória dos extratos da semente de mamão contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	103
Tabela 14 – Quantificação do composto majoritário presente no óleo extraídos da semente de mamão por diferentes métodos de extração.	107
Tabela 15 - Valores reais e codificados dos fatores estudados para o planejamento fatorial.....	114
Tabela 16 - Matriz com valores reais e codificados do planejamento fatorial $2^3 + 3$ pontos centrais para a extração PLE da semente de mamão.	115
Tabela 17 - Atividades biológicas do extrato da semente de mamão, obtido por ESC.....	118
Tabela 18 - Rendimento de extração e CFT obtido em diferentes condições experimentais por PLE para os extratos do resíduo da semente de mamão.	119

Tabela 19 - Atividade antioxidante dos extratos obtidos por processos integrados ESC e PLE da semente de mamão.	122
Tabela 20 - Concentração mínima inibitória dos extratos obtidos por processos integrados ESC e PLE da semente de mamão contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	124
Tabela 21 - Quantificação do composto majoritário presente no óleo extraídos da semente de mamão por processos integrados de extração.	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante
ANOVA – Análise de variância
AE – Ampliação de escala
BHT – Butil-hidroxi-tolueno
BITC – Isotiocianato de benzila ou benzil-isotiocianato
CER – Período de taxa constante de extração
CFT – Compostos fenólicos totais
CG-EM – Cromatografia gasosa e espectrometria de massa
CMI – Concentração mínima inibitória
CO₂ – Dióxido de carbono
DC – Período difusional (*Diffusion Controlled*)
DMSO – Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EC₅₀ – Concentração efetiva
EI – Ionização eletrônica
ESC – Extração com fluído supercrítico
FER – Período de taxa decrescente de extração
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PLE – Extração com líquido pressurizado
SOX – Extração Soxhlet
UFC – Unidades formadoras de colônias
X₀ – Rendimento global de extração

SUMÁRIO

Capítulo 1 Introdução	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 DIAGRAMA CONCEITUAL	30
Capítulo 2 Revisão Bibliográfica	31
1 MAMÃO.....	33
1.1 Semente de Mamão.....	34
2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	37
2.1 Extração Soxhlet (SOX).....	37
2.2 Extração com Líquido Pressurizado (PLE).....	38
2.3 Extração Supercrítica (ESC)	40
2.3.1 Procedimento de Extração.....	42
2.3.2 Curvas de Extração Supercrítica	43
3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	45
3.1 Atividade Antioxidante	45
3.2 Atividade Antimicrobiana.....	46
Capítulo 3 Aumento de escala e modelagem da extração supercrítica com CO₂ da semente de mamão	47
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1 Obtenção e Preparo da Amostra.....	50
2.2 Determinação do Teor de Umidade e Substâncias Voláteis..	51
2.3 Determinação do Diâmetro Médio de Partículas	51
2.4 Determinação da Massa Específica Real (ρ_r).....	52
2.5 Caracterização do Leito de Partículas	52
2.5.1 Determinação da Massa Específica Aparente (ρ_a)	52
2.5.2 Porosidade do Leito (ϵ).....	52
2.6 Extração Supercrítica (ESC)	52
2.6.1 Unidade de Extração	53
2.6.2 Procedimento Experimental de Extração	54
2.6.3 Determinação das Cinéticas de Extração	55
2.6.4 Ampliação de Escala (AE).....	56
2.6.5 Modelagem Matemática das Curvas de Extração	57
2.7 Conteúdo de Fenólicos Totais (CFT).....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 Caracterização da Matéria-Prima e do Leito de Partículas ...	59

3.2	Influência das Condições de Operação na Cinética de Extração.....	59
3.3	Modelagem das Cinéticas de Extração	62
3.4	Curvas de Extração Global	69
3.5	Ampliação de Escala.....	71
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
Capítulo 4 Efeito das técnicas de extração no rendimento global e atividades biológicas dos extratos da semente de mamão.....		75
1	INTRODUÇÃO.....	77
2	MATERIAIS E MÉTODOS	77
2.1	Obtenção e Preparo da Amostra	78
2.2	Extração em Soxhlet (SOX).....	79
2.3	Extração Supercrítica (ESC)	80
2.3.1	Determinação do Rendimento Global (X_0).....	80
2.4	Extração Líquido Pressurizado (PLE).....	82
2.4.1	Unidade de Extração.....	82
2.4.2	Procedimento Experimental de Extração.....	83
2.4.3	Determinação da Cinética de Extração	84
2.4.4	Determinação do Rendimento Global (X_0).....	84
2.5	Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	85
2.6	Determinação da Atividade Antioxidante.....	85
2.6.1	Método do Radical DPPH.....	86
2.6.2	Método de Descoloração do Sistema β -caroteno.....	86
2.7	Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	87
2.7.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)....	87
2.8	Composição Química dos Extratos	88
2.9	Análise Estatística.....	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1	Cinética ESC.....	89
3.2	Cinética PLE.....	90
3.3	Rendimento Global de Extração (X_0)	91
3.4	Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	94
3.5	Determinação da Atividade Antioxidante.....	97
3.5.1	Método DPPH.....	97
3.5.2	Método Descoloração do Sistema β -caroteno.....	99
3.6	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)..	101
3.7	Composição Química dos Extratos	105
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
Capítulo 5 Aplicação de processos integrados para valorização dos extratos da semente de mamão.....		109
1	INTRODUÇÃO.....	111

2	MATERIAIS E MÉTODOS	112
2.1	Obtenção e Preparo da Amostra.....	112
2.2	Extração Supercrítica (ESC)	113
2.2.1	Determinação do Rendimento Global (X_0)	113
2.3	Extração Líquido Pressurizado (PLE).....	113
2.3.1	Determinação do Rendimento Global (X_0)	114
2.4	Conteúdo de Compostos Fenólicos.....	116
2.5	Determinação da Atividade Antioxidante	116
2.6	Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	116
2.7	Composição Química dos Extratos	117
2.8	Análise Estatística	117
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1	Determinação da Atividade Biológica do Extrato da Semente de Mamão por ESC	117
3.2	PLE Aplicada ao Resíduo da ESC	119
3.3	Atividades Biológicas da Semente de Mamão por Processos Integrados	121
3.4	Composição Química dos Extratos	125
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
	Capítulo 6 Conclusões e perspectivas futuras.....	129
1	CONCLUSÃO GERAL.....	131
2	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	132
	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICE A – Curva analítica de ácido gálico.....	145
	APÊNDICE B – Curvas cinéticas modeladas	146
	APÊNDICE C – Curva de calibração do padrão Benzyl isothiocyanate-98%	1488
	ANEXO A – Modelos Matemáticos de Extração.....	14949

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O mamão é uma das frutíferas mais comum em regiões tropicais e subtropicais, cultivada em mais de 50 países, com produção mundial de 6,8 milhões de toneladas (SAEED et al., 2014). O Brasil é o terceiro colocado no ranking das principais nações produtoras de frutas, estando atrás da China e da Índia, respectivamente (REETZ et al., 2015).

A fruta apresenta um amplo espectro fitoquímico, incluindo polissacarídeos, vitaminas, minerais, enzimas, proteínas, glicosídeos e flavonoides, sendo esses componentes bioativos responsáveis pelas propriedades farmacológicas, medicinais e alimentícias desta planta (SUDHAKAR e THEIVANAI VIDHYA, 2014). Com isso, há um elevado consumo dessa fruta, atrelado as propriedades descritas acima e também pela alta disponibilidade do fruto em todo território nacional e durante todo o ano, resultando na geração de resíduos na forma de cascas e sementes.

As sementes são responsáveis por 14% da massa do fruto (JORGE e MALACRIDA, 2008), sendo normalmente descartadas. Estudos relatam que a semente de mamão apresenta atividades hipolipidêmicas, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antifertilidade, antiparasitária e antimicrobiana (KRISHNA; PARIDHAVI e PATEL, 2008; RASHED e FOUCHÉ, 2013; SAEED et al., 2014; YOGIRAJ et al., 2014; KHOR e WONG, 2014; HE et al., 2017). Devido ao elevado volume de resíduos gerados com o processamento do mamão, é de extrema importância a aplicação de processos de extração capazes de recuperar compostos que apresentem as atividades relatadas.

A qualidade dos extratos depende do procedimento de extração e do tipo de solvente empregado, sendo que esses fatores devem ser cuidadosamente selecionados para proporcionar um equilíbrio adequado para aumentar o rendimento e a seletividade do processo (AZMIR et al., 2013). A extração Soxhlet é uma das técnicas convencionais mais aplicadas, porém na maioria das vezes utiliza de solventes tóxicos e não amigáveis ao meio ambiente, mas é uma técnica padrão e de referência para avaliação de outras técnicas de extração (WANG e WELLER, 2006). A extração com fluido supercrítico (ESC) e extração com líquido pressurizado (PLE), são técnicas não convencionais e foram desenvolvidas para a recuperação de compostos bioativos, sendo processos que minimizam ou não utilizam solventes tóxicos (AZMIR et al., 2013).

O interesse por técnicas não convencionais de extração para obtenção de compostos bioativos é em virtude do apelo ambiental e pela seletividade dos métodos, sendo essa uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica - LATESC.

Além do apelo ambiental das técnicas de extração os conhecimentos populares e medicinais da semente de mamão indicam um grande potencial dessa planta. Com o intuito de relacionar as técnicas de extração com o potencial desse resíduo, esse estudo foi desenvolvido.

O presente documento está dividido em seis capítulos. No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a matéria-prima selecionada para o estudo, semente de mamão. Além disso, apresenta uma breve descrição dos procedimentos de extração aplicados para obtenção dos compostos bioativos da semente de mamão.

Visando incentivar a aplicação da tecnologia supercrítica em escala industrial, especialmente na América Latina, o Capítulo 3 avaliou a modelagem da cinética de extração supercrítica, com CO₂ do óleo da semente de mamão, em função das condições de operação do sistema e realizou-se um estudo de ampliação de escala.

No Capítulo 4 estão descritos os procedimentos experimentais convencionais e não convencionais utilizados para obtenção dos extratos da semente de mamão. Nesse Capítulo o objetivo foi avaliar o efeito de diferentes técnicas de extração frente ao rendimento, além disso, as atividades biológicas, antioxidante e antimicrobiana, e a caracterização química dos extratos foi realizada. Os resultados obtidos no Capítulo 4 induziram ao estudo da aplicação de técnicas combinadas de extração, utilizadas no Capítulo 5.

O Capítulo 5 teve como objetivo integrar os processos de extração ESC e PLE para obtenção de produtos com características diferentes e um esgotamento da matéria-prima. A extração com fluido supercrítico usando CO₂ como solvente extraiu os compostos apolares e o uso de solventes polares na extração com líquido pressurizado permitiu a recuperação de compostos de maior polaridade. Os extratos foram caracterizados quanto a atividade antioxidante, antimicrobiana e composição química.

Finalmente, no Capítulo 6 estão descritas as conclusões obtidas nos Capítulos 3, 4 e 5 e as perspectivas de trabalhos futuros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o aproveitamento e realizar um fracionamento do resíduo, semente de mamão da espécie *Carica papaya L.*, para obtenção de extratos ricos em compostos antioxidantes e antimicrobianos, através da avaliação das técnicas de extração supercrítica e extração com líquido pressurizado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter extratos da semente de mamão pelo emprego de extração supercrítica, extração com líquido pressurizado e extração Soxhlet, em diferentes condições de operação;
- b) Obter extratos da semente de mamão pelo emprego da extração supercrítica combinada com a extração com líquido pressurizado da semente de mamão e extração com líquido pressurizado do resíduo do processo de extração supercrítica;
- c) Comparar os rendimentos globais obtidos pelos diferentes métodos de extração;
- d) Avaliar a atividade antioxidante e compostos fenólicos dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas;
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas, frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e frente ao fungo *Candida albicans*;
- f) Caracterizar quimicamente os extratos com melhor desempenho, buscando correlacionar atividades biológicas e composição;
- g) Realizar estudo das curvas cinéticas de extração supercrítica em função das condições de operação (pressão e vazão);
- h) Aplicar modelos matemáticos com desenvolvimento de código computacional para correlacionar as curvas cinéticas com cinco modelos matemáticos;
- i) Modelagem e ampliação de escala do ensaio com melhor ajuste matemático.

3 DIAGRAMA CONCEITUAL

Recuperação de extratos ricos em compostos bioativos da semente de mamão *Carica papaya L.* por extração supercrítica e por líquido pressurizado

Por quê?

- A produção de resíduos, proveniente de descarte e industrialização de alimentos, tem aumentando e de encontro com isso a importância de destinar esses resíduos deve ser levada em consideração, assim como a possibilidade de agregar valor a esses subprodutos;
- A semente de mamão é um material de descarte, tanto do consumo “*in natura*” como do processamento, e apresenta compostos com potencial biológico;
- A busca por compostos bioativos deve estar atrelada a uma produção mais limpa e com menor geração de resíduos, e a utilização de tecnologias não convencionais de extração permite a obtenção desses compostos.

Quem já fez?

- Constam na literatura trabalhos envolvendo a extração de compostos bioativos da semente de mamão, empregando técnicas convencionais de extração e fazendo uso de solventes orgânicos;
- Apenas um trabalho foi encontrado na literatura que fez uso da tecnologia supercrítica para obtenção de compostos da semente de mamão;
- Entretanto, não há trabalhos que façam uso de tecnologias combinadas para obtenção de compostos da semente de mamão;
- E o estudo “*in vitro*” das atividades biológicas muitas vezes não é avaliado.

Hipóteses

- É possível a utilização de técnicas não convencionais de extração para obtenção de compostos da semente de mamão.
- Todo conhecimento medicinal e cultural envolvido nessa matéria-prima pode ser observado utilizando técnicas ambientalmente amigáveis.
- A utilização de processos combinados é eficiente para melhor aproveitamento da matéria-prima.
- Existe potencial biológico nesse resíduo.

Como fazer?

- Estudar os processos de extração não convencionais, a fim de selecionar as melhores condições para obter melhor seletividade dos processos;
- Avaliar a aplicação de processos combinados na obtenção de compostos bioativos;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos; Avaliar a capacidade antimicrobiana frente a diferentes micro-organismos; Estudar o perfil químico dos extratos.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 MAMÃO

O mamoeiro é uma das frutíferas mais comuns em quase todos os países da América Tropical, além de ser uma das frutíferas mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seus frutos, conhecidos como mamão ou papaia, são amplamente utilizados em dietas alimentares (SERRANO; CATTANEO, 2010).

O Brasil destaca-se no ranking das principais nações produtoras de frutas, estando atrás apenas da China e da Índia, respectivamente. Além disso, é o segundo país que mais colhe mamões, ficando atrás da Índia (REETZ et al., 2015).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a Bahia é o estado brasileiro com maior produção de mamão, com 753,417 toneladas em 2016, seguido pelo Espírito Santo com 251,365 toneladas e Ceará com 110,520 toneladas (IBGE, 2016).

A cultura do mamoeiro sustenta-se em uma estreita base genética, sendo bastante limitado o número de cultivares plantadas nas principais regiões produtoras. As cultivares mais exploradas no Brasil são classificadas em dois grupos, conforme o tipo de fruto: Solo (ex.: *Sunrise Solo* e *Improved Sunrise Solo Line*) e Formosa (ex.: *Tainung*) (TRINDADE et al., 2000).

A variedade Solo apresenta um formato de pera, com massa média de 500 g e polpa vermelha-alaranjada, enquanto que a variedade Formosa apresenta um formato mais alongado ou arredondado, com massa média entre 800 g e 1100 g e coloração da polpa laranja-avermelhada, como pode ser observado na Figura 1 (CEAGESP, 2007).

Figura 1 - Variedades de mamão comercializadas.



Fonte: (CEAGESP, 2007)

De forma geral, o mamão apresenta uma polpa delicada e saborosa, cujas características físicas, químicas e digestivas tornam esta fruta um alimento completo e saudável.

Geralmente, o mamão é consumido na forma “*in natura*”, mas sua industrialização oferece extensa gama de produtos e subprodutos para consumo direto e utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e de rações animais. Dentro dos principais métodos de industrialização do mamão destaca-se a produção de compotas, purê ou polpa, frutas cristalizadas, produtos minimamente processados e de papaína (DURIGAN; DURIGAN, 2014).

Além do consumo e industrialização do mamão, as propriedades medicinais da fruta e partes da planta também são bem conhecidas no emprego para fins medicinais. O fruto verde é usado tradicionalmente para o tratamento de malária, hipertensão, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, icterícia, helmintíase intestinal, anemia falciforme (KRISHNA; PARIDHAVI; PATEL, 2008; SUDHAKAR; THEIVANAI VIDHYA, 2014).

O fruto maduro é usado como curativo de úlceras crônicas da pele, as folhas são usadas para cólica, febre, beribéri, aborto, asma, e câncer (YOGIRAJ et al., 2014). O látex é empregado como adstringente e aplicado em queimaduras e tecido necrosado (NAYAK et al., 2012).

Em um *screening* fitoquímico realizado na planta *Carica papaya* L. identificou-se a presença de enzimas (no látex), carotenoides (no fruto e sementes), alcaloides (em folhas e sementes), compostos fenólicos (frutos, sementes, folhas e brotos) e glicosinolatos (em frutos e sementes) (ASGHAR et al., 2016; EKE; AUGUSTINE; IBRAHIM, 2014; RASHED; FOUCHE, 2013).

1.1 SEMENTE DE MAMÃO

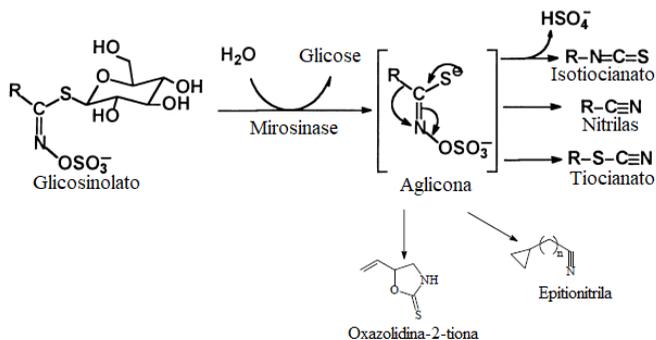
A semente de mamão é proveniente do fruto. O resíduo (semente) é proveniente tanto do consumo *in natura*, como da industrialização do fruto. Segundo Jorge e Malacrida (2008), as sementes correspondem em média a 14% da massa do fruto, que constituem geralmente de material de descarte tanto na indústria de alimentos como no consumo doméstico, entretanto, poderiam ser transformadas em produtos com valor agregado.

Como citado anteriormente o mamão contém um amplo espectro de componentes fitoquímicos, estando estes presentes nas várias partes das plantas. Especificamente nas sementes encontram-se ácidos graxos, proteína bruta, fibra bruta, o glicosídeo benzilglicosinolato, o alcalóide carpaína, a aglicona isotiocianato de benzila (BITC), o esteroide β -sitosterol, a benziltiouréia, e a enzima mirosina (KRISHNA; PARIDHAVI; PATEL, 2008).

Destes componentes destaca-se o glicosídeo benzilglicosionalto, que é um glicosídeo pertencente ao grupo dos glicosinolatos. Os glicosinolatos são ânions orgânicos contendo glicose e enxofre formando um tioglicosídeo ligado a uma cadeia lateral (Grupo R) derivada de um aminoácido. Sendo esses metabólitos classificados de acordo com o aminoácido precursor do seu grupo R e pelos tipos de modificações sofridas por esse grupo (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001).

A liberação desses compostos é catalisada pela enzima hidrolítica mirosinase, que cliva a glicose na ligação com o átomo de enxofre, resultando na aglicona, isso ocorre quando os tecidos da planta são lesionados e as células vegetais rompidas. A aglicona resultante, instável, reorganiza-se, com a perda do sulfato, dando origem a produtos voláteis pungentes, quimicamente reativos e com diversas atividades biológicas, entre os quais estão os isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos, oxazolidina-2-tionas e epitionitrilas (Figura 2). As proporções desses produtos variam dependendo do tipo de glicosinato, da espécie da planta e das condições de hidrólise como temperatura, pH, concentração de íons metálicos, presença de proteínas e cofatores (CLARKE, 2010).

Figura 2 - Degradação do glicosinolato pela mirosinase.



Fonte: Adaptado de (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001).

Estudos fitoquímicos têm demonstrando que a semente de mamão apresenta compostos biologicamente ativos. Asghar et al. (2016) determinou os polifenóis e flavonoides e a atividade antioxidante e antimicrobiana das principais partes do *Carica papaya*, utilizando técnicas convencionais de extração e obteve os melhores resultados de atividades antioxidante e antimicrobiana com o uso de etanol como solvente.

Corrêa (2011) analisou 23 extratos de resíduos agroindustriais, preparados a partir de cinco solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol:água e água), os quais foram utilizados para avaliação antimicrobiana frente ao micro-organismo *Listeria monocytogenes*. Apenas os extratos aquosos de talo de brócolis e de casca de abóbora moranga e extrato clorofórmio de semente de mamão apresentaram atividade frente ao micro-organismo *L. monocytogenes*. A composição química dos extratos de talo de brócolis e casca de abóbora moranga apresentaram alguns ácidos fenólicos e orgânicos, enquanto que no extrato de semente de mamão o único composto encontrado com potencial antimicrobiano foi o benzil-isotiocianato.

A atividade antimicrobiana da semente de mamão também foi relatada por Al-Judaibi (2015), onde extratos metanólicos e etanólicos apresentaram forte atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Shigella sonnei*. Nos extratos foram identificados os metabólicos secundários alcalóides, flavonóides, taninos, glicosídeos e terpenos.

Outros estudos também relatam atividade antimicrobiana da semente de mamão frente a diferentes micro-organismos. Tumpa; Hossain e Ishika (2015) observaram atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de semente de mamão frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*, destacando a maior eficiência para as bactérias Gram positivas. Nayak et al. (2012) observaram atividade antimicrobiana de extratos etanólicos contra *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*. He et al. (2017) analisaram a composição química e a atividade antifúngica de extratos de semente de mamão obtidos por hidrodestilação. O constituinte principal encontrado na semente de mamão foi o benzil-isotiocianato, e o extrato mostrou efeito inibitório contra as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropical*.

Barroso et al. (2016) avaliaram a composição do óleo de semente de mamão *Carica papaya L.* obtido por extração supercrítica com CO₂ nas condições de operação de 40, 60 e 80 °C e 10, 15 e 20 MPa. As melhores eficiências foram encontradas na condição de 80 °C e 20 MPa (2,56%), seguida da condição de 40 °C e 20 MPa (1,33%), sendo identificado em ambas as condições o componente benzil-isotiocianato, porém na condição de 20 MPa e 80 °C esse componente apresentou-se mais concentrado.

Avaliando os dados relatados na literatura para a semente do mamão, verifica-se que esse resíduo apresenta uma importante fonte de compostos biológicos, sendo imprescindível o estudo de novas tecnologias de extração para a recuperação dos compostos bioativos.

2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (EGGERS; JAEGER, 2003).

A técnica de extração empregada na obtenção de extratos bioativos influencia diretamente na qualidade e composição final do produto desejado. Ou seja, o método de extração bem como o solvente utilizado, está diretamente ligado ao rendimento e a composição dos extratos. Sendo assim, é importante levar em conta o solvente que será trabalhando, bem como os compostos de interesse a serem extraídos, pois cada método apresenta suas particularidades.

No caso da separação de substâncias de matrizes vegetais, as técnicas de extração podem ser classificadas como sólido-líquido e podem ser divididas em convencionais e não convencionais. Os métodos convencionais são conhecidos como técnicas clássicas baseadas na aplicação de solventes orgânicos, aplicação de calor ou agitação, como a extração assistida por ultrassom e Soxhlet. Os métodos não convencionais são as técnicas de extração que usam líquidos pressurizados, ultrassom, enzimas, pulso elétrico, micro-ondas. Em contrapartida aos convencionais, as técnicas não convencionais apresentam-se como uma alternativa mais econômica, menos agressiva ambientalmente, utilizam menor quantidade de solvente, diminuem a degradação da amostra, melhoram a eficiência de extração e a seletividade (JACQUES, 2005; VIGANÓ; MARTINEZ, 2015).

2.1 EXTRAÇÃO SOXHLET (SOX)

O extrator Soxhlet foi desenvolvido em 1879 e esta técnica vem sendo considerada como uma metodologia padrão por mais de um século. Nessa técnica, a seletividade é unicamente influenciada pela escolha do solvente. A extração com Soxhlet apresenta diversas vantagens: a amostra está sempre em contato com o solvente de extração; recirculação do

solvente, que aumenta o coeficiente de partição e a eficiência da extração; não há necessidade de filtração para separação da matéria-prima do solvente ao término da extração; a metodologia é simples; e o equipamento apresenta baixo custo (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

As maiores desvantagens da extração com Soxhlet em comparação a outras técnicas são o longo tempo de extração e a grande quantidade de solvente utilizado. Além disso, a amostra geralmente é extraída no ponto de ebulição do solvente durante longos períodos, o que pode resultar na decomposição térmica das espécies termolábeis (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

2.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

A extração com líquido pressurizado (PLE) é uma técnica que se baseia no uso de solventes líquidos a temperatura e pressão elevadas, o que melhora o desempenho da extração em comparação com as técnicas realizadas a temperatura ambiente e pressão atmosférica (CAMEL, 2001). O maior objetivo dessa técnica é promover a extração de compostos de matrizes sólidas ou semi-sólidas em um curto período de tempo e usando uma pequena quantidade de solventes (VIGANÓ; MARTINEZ, 2015).

Uma ampla gama de temperaturas de extração podem ser aplicadas no PLE, geralmente varia da temperatura ambiente a 200 °C e a faixa de pressão entre 35 a 20 MPa (OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). Devido ao sistema estar pressurizado a maior vantagem do PLE é que o solvente pressurizado permanece no estado líquido mesmo que as temperaturas sejam superiores ao seu ponto de ebulição. Essa condição melhora o poder de solvatação do líquido e a cinética de dessorção da matriz sólida (MEIRELLES et al, 2012).

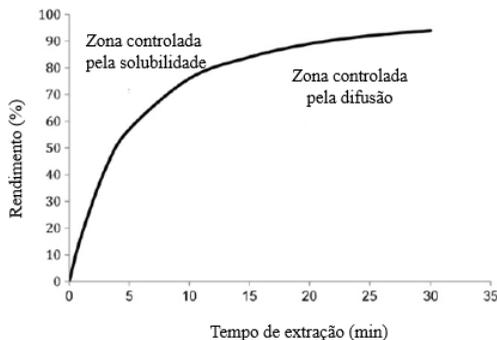
O processo de extração PLE pode ser dividido em dinâmico ou estático. Na configuração dinâmica, o solvente de extração é bombeado continuamente pelo extrator através da matriz sólida, sendo que a bomba fornece uma vazão de solvente constante e a válvula de saída da célula de extração é mantida aberta. Já na configuração estática, o processo de extração consiste em um ou vários ciclos de extração, onde o solvente preenche o extrator, enquanto que a válvula de saída da célula de extração é mantida fechada, e permanece em contato com a matriz durante um tempo determinado (SAITO et al., 2004).

A extração dinâmica é mais eficiente que a estática, por evitar a saturação do solvente, enquanto que a extração estática permite maior

penetração do solvente nos nano e micro poros da matriz devido ao maior tempo de contato entre as fases (NIETO et al., 2010).

De acordo com Viganó e Martínez (2015), o processo de PLE pode ser dividido em dois estágios (Figura 3). O primeiro estágio corresponde ao período que a extração é controlada pela solubilidade enquanto que o segundo estágio é controlado pela difusão dos solutos no solvente.

Figura 3 - Cinética de extração com líquido pressurizado.



Fonte: Adaptado de (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Em matrizes controladas pela difusão normalmente existem fortes interações entre matriz e analito, ou caminhos de difusão longos demais para que os analitos possam passar através da matriz. Nestes casos, a temperatura do solvente e o tamanho de partícula podem ser fatores importantes na melhoria da eficiência de extração. Enquanto que em matrizes controladas pela solubilidade, as interações analito-matriz são bastante fracas e a taxa de extração depende, principalmente, da compartimentação do analito entre a matriz e o fluido de extração. Neste caso, o rendimento é melhorado utilizando-se a extração em modo dinâmico (MUSTAFA; TURNER, 2011).

O desempenho das extrações PLE dependem muito do tipo de solvente, tempo de extração, pressão e temperatura. Destaca-se também a importância da natureza da matriz, as características específicas dos compostos alvo e sua localização dentro da matriz (OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

A utilização de misturas de solventes pode auxiliar no aumento da solubilidade e interação com o composto de interesse e a utilização de temperaturas elevadas proporcionam maior rendimento da extração. O uso de altas temperaturas promove a eficiência da extração assim como

ajuda no rompimento das interações analito-amostra na matriz, diminuindo a tensão superficial do solvente, soluto e matriz, diminuindo a viscosidade do solvente líquido e promove a taxa de difusão (MUSTAFA; TURNER, 2011). Além disso, a utilização de temperaturas elevadas também aumenta o coeficiente de difusão aumentando as taxas de transferência de massa, no entanto, em algumas extrações, a utilização de temperaturas moderadas é preferível tendo em vista a degradação de compostos (CAMEL, 2001).

A pressão é um parâmetro que não apresenta forte influência, tendo em vista que líquidos não são fluidos compressíveis (OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). No entanto, quando a pressão de vapor dos componentes alvo é importante para sua solubilização no solvente, a pressão pode ter um papel muito importante no processo de PLE. Por outro lado, a utilização de altas pressões facilita a extração de componentes situados no interior dos poros da matriz, devido a um aumento de pressão, forçando o solvente a penetrar em lugares onde com pressão atmosférica não seria possível (JIANG et al., 2007).

A extração com líquido pressurizado é uma alternativa aos métodos de extração convencionais, como Soxhlet, uma vez que o uso de temperatura e pressão elevadas durante a extração não só melhora o rendimento de extração, como também diminui o tempo e o consumo de solventes, além de ser uma técnica mais amigável e diminui os impactos ambientais em consideração as técnicas convencionais (SMITH, 2002).

2.3 EXTRAÇÃO SUPERCÁRITICA (ESC)

A extração supercrítica é uma operação unitária de transferência de massa baseada no uso de fluidos a temperaturas e pressões acima dos valores críticos (GÓMEZ; OSSA, 2002; FREITAS, 2007). Nessas condições de pressão e temperatura, as propriedades de um solvente são diferentes daquelas apresentadas no estado líquido ou gasoso, encontrando-se no estado de fluido supercrítico (BRUNNER, 1994).

Um fluido supercrítico é qualquer substância a uma temperatura e pressão acima de seu ponto crítico termodinâmico. Os fluidos supercríticos são os únicos solventes que podem ter seu poder de solvatação controlado por pequenas alterações na pressão e/ou temperatura. Sua massa específica é muito maior do que aquela dos gases típicos e ligeiramente menor do que aquelas dos líquidos. Por outro lado, a viscosidade do fluido supercrítico assemelha-se à dos gases, e é muito menor do que a dos líquidos. Esta característica assegura a capacidade

elevada da fase fluida para a transferência de massa, fazendo com que os fluidos supercríticos sejam escolhidos como solventes de extração (BRUNNER, 1994).

O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂) que é barato, ecológico, seguro e apresenta alta difusividade combinada com força de solvente facilmente ajustável. A temperatura e pressão crítica do CO₂ (31,1 °C e 7,38 MPa) são favoráveis no processo por permitirem a extração de compostos termicamente lábeis ou compostos facilmente oxidáveis. Além disso, na temperatura e pressão ambiente o CO₂ é gasoso, o que torna a recuperação do analito muito simples e livre de solventes (BRUNNER, 1994; HERRERO et al., 2010).

A ESC 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 (MICHELLIN, 2009). Além disso, a degradação térmica de compostos sensíveis é evitada por operar em temperaturas mais baixas enquanto a ausência de luz e oxigênio previne reações de oxidação, o que constitui uma grande vantagem para a extração de antioxidantes, garantindo a conservação de suas propriedades biológicas (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Como desvantagem da extração supercrítica pode ser citado o elevado custo de investimento, se comparada às técnicas tradicionais de extração à pressão atmosférica (REVERCHON; DE MARCO, 2006), e a dificuldade de extração de compostos muito polares quando se utiliza somente CO₂ como solvente supercrítico (MELECCHI, 2005). Porém para aumentar a extração de moléculas polares podem ser utilizados modificadores, os quais são adicionados ao solvente supercrítico para o aumento da solubilidade devido à ação conjunta dos componentes, sendo chamado de efeito cossolvente. O etanol é o cossolvente ou modificador mais utilizado nos processos de extração supercrítica devido a sua baixa toxicidade e sua miscibilidade no CO₂ (DAINTREE; KORDIKOWSKI; YORK, 2008; JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

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)

2.3.1 Procedimento de extração

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, e ao sair do extrator carrega as substâncias solubilizadas, que por meio da redução da pressão, o solvente é liberado do extrato (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Durante a extração, o solvente supercrítico escoia através de um leito fixo formado por partículas sólidas, solubilizando os componentes presentes no sólido. À medida que o solvente escoia 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 et al., 2009).

Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo inclui características específicas do material, como massa específica, diâmetro do poro, porosidade, geometria e teor de umidade. O segundo grupo inclui parâmetros do processo como pressão e temperatura de extração, vazão do solvente, tempo, temperatura e pressão de separação (MARTÍNEZ; VANCE, 2007). A seleção correta destes parâmetros é fundamental para a otimização da extração dos compostos desejados em menor tempo (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Quanto maior o poder de solvatação, maior a solubilidade de um determinado composto e maior o número de compostos solubilizados de uma mistura. Desta forma, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa. Em processos com solventes supercríticos, o grande potencial para a transferência de massa é determinado pela diferença no estado de equilíbrio (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000; AGHEL et al., 2004).

A extração com fluidos supercríticos tipicamente utiliza pressões entre 20 e 50 MPa, temperaturas de até 80 °C, razão de alimentação de solvente entre 6 e 30 kg de CO₂ por kg de amostra e adição máxima de 20% de cossolvente (KASSING et al., 2010). O tempo do processo de ESC varia de acordo com as características da matéria-prima, equipamento e condições de operação, sendo definido com base nas

informações fornecidas pelo comportamento cinético da extração (BRUNNER, 1994).

2.3.2 Curvas de extração supercrítica

O comportamento do processo de extração pode ser observado 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 ela pode fornecer como a duração da etapa de taxa constante de extração são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

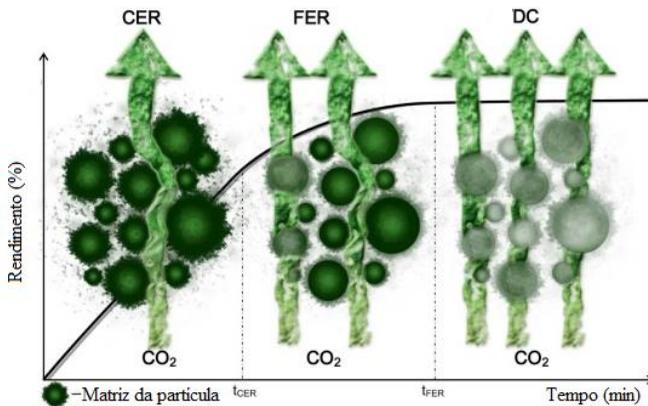
Diferentes mecanismos de transferência de massa controlam as curvas de extração, que são representadas em 3 períodos: **a)** período de taxa constante de extração (CER), **b)** período de taxa decrescente de extração (FER) e **c)** período difusional (DC) (BRUNNER, 1994; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010; SOVOVA, 1994):

a) No período CER a superfície externa da partícula está coberta com o soluto, que é chamado "soluto de fácil acesso". Neste período a convecção é o mecanismo dominante e, portanto, a resistência à transferência de massa está na fase fluida;

b) No período FER falhas na cobertura de soluto sobre a superfície externa começam a aparecer dando início à difusão do soluto presente no interior da partícula. Neste período os mecanismos de transferência de massa por difusão e convecção ocorrem simultaneamente;

c) No período DC a camada externa de soluto praticamente desaparece, e a transferência de massa se dá por difusão do interior das partículas do substrato. Neste período a resistência à transferência de massa está na fase sólida. A representação esquemática de uma curva de extração e matriz da partícula em cada período é apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Representação da curva de extração e matriz da partícula em cada período.



Fonte: Adaptado de (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

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 (SILVA, 2004; PERRUT, 2001).

A modelagem matemática de dados experimentais de ESC tem como principal objetivo a determinação de parâmetros para design de processos, tornando possível com esses parâmetros a predição de custos do processo em escala industrial (MARTÍNEZ et al., 2003).

O estudo da cinética e modelagem da ESC de ampliação de escala do óleo de semente de mamão são ferramentas importantes para projetos

de escala industrial. A modelagem das curvas de extração da semente de mamão fornece informações sobre o mecanismo de transferência de massa na extração supercrítica, auxiliando a definição de metodologias para estudos de ampliação de escala.

3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O interesse por compostos com atividade biológica aumentou no início do século 21 e permanece crescendo até hoje, devido aos benefícios vinculados ao consumo dessas substâncias para a saúde e para a indústria alimentícia e farmacêutica. Segundo Boroski et al (2015), os antioxidantes podem ser definidos como moléculas capazes de inibir ou retardar significativamente a oxidação de outras moléculas, podendo atuar em alimentos ou sistemas biológicos. 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. Os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas que podem apresentar vários graus de substituintes alquilas e são adicionados a matrizes sem a intenção de nutrir, mas de retardar o aparecimento de alterações oxidativas no alimento (ANVISA, 1997). Enquanto que os antioxidantes naturais podem ser sintetizados, mas sua obtenção deve ser de fontes naturais. Dentre os antioxidantes naturais destacam-se compostos fenólicos, quinonas, lactonas e os polifenóis (ARAÚJO, 2004).

Os efeitos dos antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais estão relacionados a dois grandes grupos: antioxidantes hidrofílicos, que compreendem ácido ascórbico e compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, como tocoferóis e carotenoides. Sendo assim, diversas metodologias são utilizadas a fim de determinar a capacidade antioxidante de diferentes compostos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Dentre as metodologias utilizadas, o método do radical DPPH é um dos mais utilizados e baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, ocorre

uma mudança na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2014).

Outro método que tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais e sucos de frutas é o método de branqueamento do β -caroteno. Esse método trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2014).

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O interesse por produtos naturais sempre existiu, porém tem aumentando nos últimos anos, tornando o uso das plantas medicinais relativamente geral por apresentarem amplo espectro de atividade sobre micro-organismos. Segundo Tippayatum e Chonhenchob (2007) antimicrobianos alimentares são compostos adicionados ou presentes em alimentos com a função de retardar ou inibir o desenvolvimento microbiano.

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis, taninos e cumarinas (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; HAIDA et al., 2007). Tais compostos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (LIMA, 2001).

As vantagens esperadas da utilização de antimicrobianos naturais incluem a redução da dependência total de antibióticos, a redução do desenvolvimento da resistência aos antibióticos por micro-organismos patogênicos, o controle de contaminações cruzadas por patógenos de origem alimentar, o melhoramento da tecnologia de preservação de alimentos e o fortalecimento do sistema imunológico em humanos (VOON; BHAT; RUSUL, 2012).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da concentração mínima inibitória (CMI), que consiste na determinação de uma pequena quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo testado (OSTROSKY et al., 2008).

Capítulo 3

AUMENTO DE ESCALA E MODELAGEM DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM CO₂ DA SEMENTE DE MAMÃO

1 INTRODUÇÃO

O fluido supercrítico mais utilizado como solvente nas extrações supercríticas (ESC) para extrair voláteis e óleos essenciais é o CO₂, devido à sua baixa polaridade, condições críticas de operação baixas (P_c=7,38 MPa e T_c=31,1 °C), é ecológico, seguro, de baixo custo e de fácil remoção do extrato não deixando resíduos de solvente (HERRERO et al., 2010; PEREIRA; MEIRELES, 2010; STARMANS; NIJHUIS, 1996). Embora a extração com fluidos supercríticos esteja bem estabelecida em algumas aplicações industriais, há uma certa relutância com as empresas para implementar ESC em escala industrial, especialmente na América Latina. A tecnologia supercrítica pode ser empregada para que a indústria brasileira de alimentos ocupe o lugar de liderança compatível com seu nível de produção agrícola, possibilitando e desenvolvendo novos produtos.

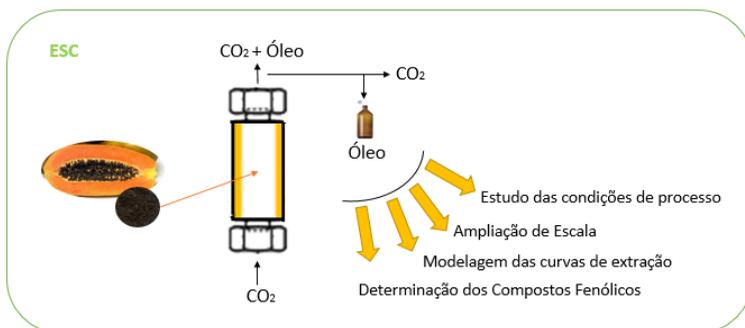
Dado os fatos acima mencionados, a avaliação das curvas de extração supercrítica é de suma importância para incentivar a aplicação da tecnologia supercrítica em escala industrial. O design e a ampliação de escala de um processo industrial para a extração supercrítica requerem o desenvolvimento de um modelo que permita descrever o comportamento do processo. Vários modelos são propostos na literatura para representar a cinética da extração empregando fluidos supercríticos a partir de matrizes sólidas, seja uma equação simples de modelos de primeira ordem ou mais complexos, incluindo transferência de massa nos poros das partículas sólidas e na fase fluida, e coeficiente de partição de fluido (SOVOVA, 1994; MARTÍNEZ et al., 2003).

Assim, o objetivo do Capítulo 3 do presente trabalho é avaliar a modelagem da cinética de extração com CO₂ supercrítico do óleo da semente de mamão, em diferentes condições de operação (vazão e pressão), além de realizar um estudo de ampliação de escala do processo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão relatados os materiais e métodos utilizados para avaliação dos efeitos das condições de processo frente as curvas cinéticas de extração, ampliação de escala, modelagem matemática e avaliação de compostos fenólicos, sendo um resumo gráfico desse Capítulo apresentado na Figura 5. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Figura 5 - Resumo gráfico da parte experimental.



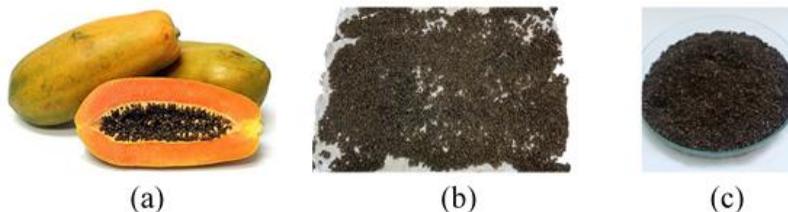
Fonte: a autora.

2.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

As sementes de mamão utilizadas nesse estudo foram provenientes do resíduo do processamento mínimo de mamão, gentilmente cedidas pela empresa Comercial Kazmierski de Jaraguá do Sul - Santa Catarina. As sementes são oriundas de mamões do cultivar Formosa, produzidos no estado da Bahia – Brasil, da safra de 2016.

As amostras recebidas no LATECSC foram higienizadas em água corrente, secas em estufa de circulação de ar (DeLeo, Porto Alegre/RS - Brasil) a temperatura de 45 °C durante 24 horas. Em seguida, as sementes foram trituradas em moinho de facas, tipo Willey (DeLeo, Porto Alegre/RS - Brasil), fracionadas em sacos de polietileno e armazenadas em congelador doméstico (Consul, Joinville/SC - Brasil) a -18 °C. Na Figura 6 é apresentada a matéria-prima in natura, desidratada e triturada.

Figura 6 - Amostra in natura (a), desidratada (b) e triturada (c).



Fonte: a autora.

2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

O teor de umidade e substâncias voláteis da amostra de semente de mamão, foi determinado pelo método n° 925.09 proposto pela AOAC (2005), cujo procedimento consiste na perda de umidade e substâncias voláteis em estufa a 105 °C.

Aproximadamente 5 g de amostra foram aquecidas a 105 °C por 3 h em cápsulas de alumínio, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e as massas medidas, as operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até massa constante da amostra. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem \pm desvio padrão.

2.3 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULAS

Para determinar o diâmetro médio de partículas, 100 g de amostra moída foram dispostas em agitador de peneiras (Bertel Metalurgic, Caieiras/SP - Brasil) e agitadas durante 60 minutos com peneiras da série de Tyler de 20, 35, 50, 70 e 80 mesh. Em seguida, as frações retiradas em cada peneira foram pesadas para o cálculo do diâmetro médio de partículas, conforme Equações 1 e 2 propostas por Gomide (1980).

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

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{M} \quad (2)$$

Onde: \bar{d}_s é o diâmetro médio superficial das partículas (mm), m_i é a massa de amostra retirada 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.

2.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA ESPECÍFICA REAL (ρ_r)

A massa específica real da amostra foi determinada, utilizando picnômetro em gás hélio (Micrometrics, AccuPyc II 1340, São Paulo/SP - Brasil), que segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos. Nesta técnica o gás hélio penetra nos poros da matriz sólida, determinando o volume verdadeiro de um sólido por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido. O resultado foi expresso em $\text{g cm}^{-3} \pm$ desvio padrão.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

2.5.1 Determinação da massa específica aparente (ρ_a)

A massa específica aparente das partículas de semente de mamão foi determinada pela relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume por ela ocupada no leito de extração supercrítica (ESC).

2.5.2 Porosidade do leito (ε)

A porosidade do leito foi determinada por meio da Equação 3, que relaciona a massa específica real (ρ_r) e a massa específica aparente (ρ_a).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3)$$

2.6 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

Os experimentos de ESC foram realizados em duas etapas. Na primeira, o objetivo foi estudar a influência de parâmetros (pressão e vazão de solvente) na descrição das curvas cinéticas de extração e na aplicação de modelos matemáticos, visando a criação de um programa de modelagem. Na segunda etapa, foi selecionada uma condição da primeira etapa para ampliação de escala (AE), com o objetivo de reproduzir o comportamento da curva cinética de extração da escala pequena.

O método dinâmico de extração foi utilizado para os experimentos cinéticos e para os experimentos de determinação do rendimento global.

2.6.1 Unidade de extração

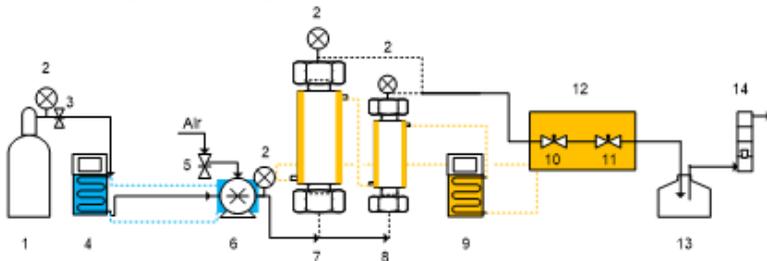
As extrações ESC foram conduzidas em uma unidade de extração *homemade*, descrita por Mazzutti et al. (2017). O fluido supercrítico utilizado como solvente foi CO₂ puro (99,9 %), entregue a uma pressão de 60 MPa em um cilindro equipado com tubo pescador (White Martins, Joinville/SC - Brasil). As Figuras 7 e 8, apresentam a unidade de extração ESC e o diagrama com os componentes detalhados.

Figura 7 - Unidade de extração ESC.



Fonte: a autora.

Figura 8 - Diagrama da unidade de extração ESC.



Fonte: Mazzutti et al. (2017).

Onde: 1: Cilindro de CO₂; 2: Manometro; 3: Regulador/reductor de pressão de CO₂; 4: Banho de resfriamento; 5: Regulador de ar comprimido; 6: Bomba de CO₂; 7: Coluna de extração 2 (EV2); 8: Coluna de extração 1 (EV1); 9: Banho de aquecimento; 10: Válvula reguladora (Regulador needle valve); 11: Válvula (Block needle valve); 12: Banho de aquecimento; 13: Frasco coletor e 14: Rotâmetro.

2.6.2 Procedimento experimental de extração

Mazzutti et al. (2017) descreveram o procedimento de extração apresentado no diagrama da Figura 8. A unidade contém uma coluna de extração de 138,2 mL (EV1, diâmetro interno de 20 mm e altura de 440 mm) e outra coluna de 622 mL (EV2, diâmetro interno de 45 mm e altura de 391,1 mm), feitas em aço inoxidável AISI 316. As colunas de extração são revestidas termicamente e controladas por banho de aquecimento (Microquímica, modelo MQBTZ 99-20, Palhoça/SC - Brasil). As pressões de extração são controladas por manômetros analógicos (Conexões Gerais, Campinas/SP - Brasil).

O CO₂ é comprimido por uma bomba de alta pressão (Maximator, modelo M111, Alemanha), juntamente com um banho termostático (Microquímica, modelo MQBMP01, Palhoça/SC - Brasil). Um banho de aquecimento de água (Fisatom, modelo 572, São Paulo/SP - Brasil) mantém a temperatura à 60 °C das válvulas reguladoras (HIP, modelo 10-11 NFA e modelo 10-11 NFA-REG, EUA) responsáveis pelo controle de vazão de CO₂. E a vazão de CO₂ é monitorada por um rotâmetro (Swagelok, modelo VAF-G4-1933-1-0, EUA).

No início do processo de extração as válvulas 10 e 11 são mantidas fechadas. O cilindro é aberto e aguarda-se a equalização dos manômetros.

A bomba é acionada e estabelece-se a pressão de trabalho desejada pela da regulagem do ar comprimido que entra na bomba. Após estabelecida a pressão desejada as válvulas 10 e 11 são abertas para depressurização do solvente e controle da vazão de solvente. Após passar pela válvula, o soluto é coletado em frascos âmbar e armazenado.

2.6.3 Determinação das cinéticas 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 o processo. Nos ensaios para a determinação da cinética de extração da semente de mamão a coluna (EV1) foi preenchida com aproximadamente 15 g de amostra e esferas de vidro para formar um leito de partículas fixo dentro da coluna, o que permitiu a formação de um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator, considerando assim, desprezada a dispersão axial.

Os frascos de coleta foram previamente pesados em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220, São Paulo/SP - Brasil) e a coleta do soluto extraído realizada em tempos pré-determinados, sendo nos primeiros 30 minutos coletadas amostras de 5 em 5 minutos, após foram realizadas coletas de 10 em 10 minutos até o intervalo de 120 minutos, e após esse tempo foram realizadas coletas de 30 em 30 minutos até o final da extração. Posterior a coleta, as massas dos frascos foram novamente medidas para determinar a massa de óleo obtida em função do tempo de experimento.

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro, e as curvas de extração foram construídas com os dados experimentais avaliando-se a influência da vazão de CO₂ e pressão de operação na cinética e modelagem. As condições de operação são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros para os ensaios cinéticos de semente de mamão, a temperatura constante de 40 °C.

Ensaio	Pressão (MPa)	Vazão (kg.h ⁻¹)
1	30	0,70
2	30	0,35
3	30	0,21
4	20	0,70
5	15	0,70
6	15	0,35

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 de velocidade constante e decrescente de extração, 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 em planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO2} .

O rendimento global (X_0) foi calculado pela razão entre a massa final de óleo extraído ($M_{extrato}$) pela massa de matéria-prima (M) utilizada para formar o leito, conforme Equação 4.

$$X_0 = \frac{M_{extrato}}{M} \times 100 \quad (4)$$

2.6.4 Ampliação de escala (AE)

A condição de operação utilizada para ampliação de escala foi selecionada a partir dos resultados obtidos nos ensaios cinéticos e considerando a geometria do equipamento. O experimento foi conduzido na mesma unidade descrita no item 2.6.1 desse capítulo, sendo utilizado no procedimento de ampliação de escala a coluna de extração EV2, com volume de 622 mL.

A proposta adotada foi selecionada de acordo com os mecanismos de transferência de massa envolvidos na extração, apresentado por

Clavier e Perrut (2004), onde para processos em que a difusão e a solubilidade são mecanismos limitantes, ambas as proporções, m_{solv}/M (massa de solvente/massa de matéria-prima) e Q_{CO_2}/M (vazão do solvente/massa de matéria-prima), devem ser mantidas constantes entre escala pequena e grande.

A razão de ampliação de escala utilizada foi de 5,4 vezes, atendendo a geometria do equipamento de extração. A fim de atender a conservação das razões indicada pela proposta, a massa de amostra utilizada no experimento foi de 85 g, temperatura de 40 °C, pressão de 30 MPa e vazão de CO₂ de 1,21 kg.h⁻¹. Os frascos de coleta foram previamente pesados e a coleta do soluto extraído realizada em tempos pré-determinados, sendo nos primeiros 30 minutos coletadas amostras de 5 em 5 minutos, após foram realizadas coletas de 10 em 10 minutos até o intervalo de 120 minutos, e após esse tempo foram realizadas coletas de 30 em 30 minutos até o final da extração. Posteriormente a coleta, as massas dos frascos foram novamente medidas para determinar a massa de óleo obtida em função do tempo de experimento.

2.6.5 Modelagem Matemática das Curvas de Extração

A modelagem das curvas de extração foi realizada com o objetivo de avaliar a influência dos parâmetros de operação (vazão de solvente e pressão de operação), avaliar a abordagem de cada modelo no melhor ajuste das curvas experimentais de ESC e validar um código computacional de modelagem.

A modelagem foi realizada utilizando os modelos de Esquivel, Bernardo-Gil e King (1999), Goto, Sato e Hirose (1993), Martínez et al. (2003), Sovova (1994) e Tan e Liou (1988). As equações que descrevem os modelos matemáticos aplicados para a representação das curvas ESC encontram-se descritas no Anexo A.

O código computacional foi desenvolvido na linguagem MATLAB R2013a para facilitar a seleção do modelo matemático mais apropriado para cada tipo de matéria-prima. Este programa foi nomeado de MSEM - MATLAB (*Simulation Extraction Models*).

O MSEM modela os dados experimentais com modelos matemáticos de Sovová, Martínez, Esquivel, Goto e Tan e Liou simultaneamente, selecionando o melhor modelo através do melhor ajuste entre os dados experimentais e numéricos e pela análise estatística dos modelos.

Os parâmetros necessários para aplicação dos modelos foram determinados experimentalmente, calculados por dados experimentais ou obtidos da literatura.

2.7 CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A determinação do conteúdo total de fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Kosar, Dorman e Hiltunen (2005). A curva padrão de ácido gálico foi preparada com uma solução estoque de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico (98% de pureza, Sigma Aldrich) em água destilada. Esta solução foi diluída em diferentes concentrações para obtenção da curva analítica ($R^2 = 0,9965$). A curva analítica de ácido gálico está apresentada no Apêndice A.

Os extratos foram diluídos em etanol P.A. (NEON) na concentração de $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, e a mistura reacional continha $10 \mu\text{L}$ de extrato ou solvente, $50 \mu\text{L}$ de reagente Folin-Ciocateau (Sigma Aldrich), $150 \mu\text{L}$ de carbonato de sódio (Lafan) a 20% e $800 \mu\text{L}$ de água destilada. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi lida em 760 nm utilizando espectrofotômetro UV-vis (Femto 800 XI, São Paulo/SP - Brasil).

Os valores de absorbância encontrados para cada extrato foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico. A absorbância foi substituída na equação do ácido gálico para calcular o valor da concentração (C), em seguida o CFT foi calculado conforme a Equação 5. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de matéria seca ($\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

$$CFT(\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}) = \frac{C \times 1000}{C_{\text{extrato}}} \quad (5)$$

Onde: CFT é o conteúdo de fenólicos totais ($\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$), C a concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) equivalente ao ácido gálico e C_{extrato} à concentração do extrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DO LEITO DE PARTÍCULAS

Inicialmente amostra passou por um processo de secagem para aumentar a vida útil, facilitar o armazenamento e além disso, altos teores de água presente na amostra podem afetar negativamente o rendimento da extração.

A semente de mamão, após a secagem, apresentou teor de umidade e substâncias voláteis de $16,95 \pm 0,10$ %. Jorge e Malacrida (2008) obtiveram um valor de 10 % de umidade e substâncias voláteis para a semente de mamão. A diferença encontrada pode estar relacionada as diferenças de cultivar e ao tempo e equipamento utilizado no processo de secagem.

A caracterização do leito de partículas é de fundamental importância para a compreensão da cinética de extração e análise dos parâmetros e curvas obtidos pela modelagem matemática. Na Tabela 2, estão apresentados os valores de diâmetro de partícula, massa específica real, massa específica aparente, porosidade do leito e solubilidade do soluto em CO₂.

Tabela 2 - Caracterização do leito de partículas.

Parâmetros	Valor
Diâmetro médio de partículas (mm)	$0,59 \pm 0,12$
Massa específica real (kg.m ⁻³)	$1156,80 \pm 0,01$
Massa específica aparente (kg.m ⁻³)	$686,15 \pm 10,62$
Porosidade do leito (kg.m ⁻³)	$0,41 \pm 0,01$
Solubilidade do soluto (g _{extrato} .g ⁻¹ CO ₂)	$0,007^{(1)}$

⁽¹⁾ (CORSO, 2008)

3.2 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Os parâmetros de extração avaliados para estudar as condições de transferência de massa da extração supercrítica da semente de mamão

foram vazão de CO₂ e pressão, totalizando 6 ensaios a temperatura constante de 40 °C.

A massa acumulada (M_0) e os parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER), M_{CER} (taxa de extração da etapa CER) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER), obtidos nas curvas de extração, são apresentados na Tabela 3. Todas as curvas de extração obtidas para os ensaios listados na Tabela 3 são apresentadas na Figura 9.

As etapas da curva de extração indicam diferentes estágios da extração e diferentes mecanismos que controlam a transferência de massa. No início da extração, a convecção é o principal mecanismo de transferência de massa, uma vez que as partículas se encontram completamente envoltas por uma camada superficial de soluto. Quando este soluto é esgotado, os compostos do interior das partículas começam a ser extraídos, de modo que a difusão se torna o mecanismo de controle (FERREIRA e MEIRELES, 2002; SOVOVÁ, 1994).

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos, densidade do solvente e rendimento global para as curvas de ESC da semente de mamão a 40 °C .

Ensaio	Pressão (MPa)	Vazão (kg.h ⁻¹)	t_{CER} (min)	M_{CER} (g.min ⁻¹)	Y_{CER} (g.g ⁻¹)	ρ CO ₂ ⁽¹⁾ (g.cm ⁻³)	M_0 (%)
1	30	0,7	34,8	0,044	$3,77 \times 10^{-3}$	0.911	21,6
2	30	0,35	61,22	0,020	$3,36 \times 10^{-3}$	0.911	16,8
3	30	0,21	84,09	0,013	$3,59 \times 10^{-3}$	0.911	15,1
4	20	0,7	92,45	0,019	$1,67 \times 10^{-3}$	0.840	18,6
5	15	0,7	287,62	0,008	$6,63 \times 10^{-4}$	0.781	17,1
6	15	0,35	270,05	0,006	$9,65 \times 10^{-4}$	0.781	13,1

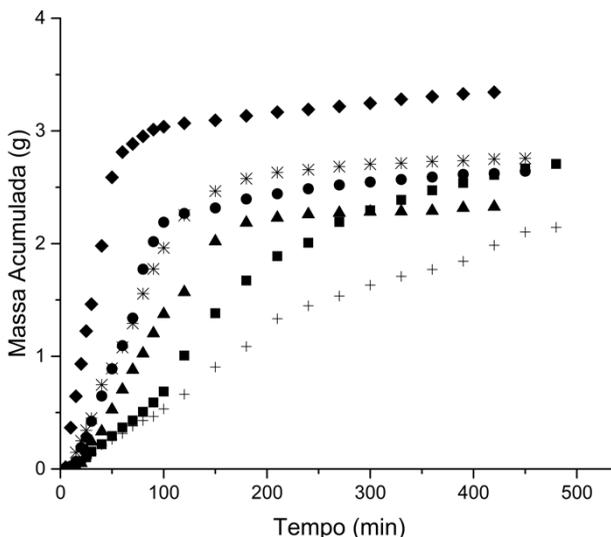
⁽¹⁾ Angus; Armstrong; De Reuck, 1976.

A concentração de soluto na fase solvente (Y_{CER}) foi determinada pela inclinação do período CER (M_{CER}/Q_{CO_2}). Os maiores valores de Y_{CER} foram obtidos nas condições de maior densidade de CO₂ (ensaios 1, 2 e 3). A solubilidade dos compostos está inteiramente relacionada à densidade do fluido supercrítico, quanto maior a densidade, maior a solubilidade do extrato no fluido e conseqüentemente maior o valor de Y_{CER} .

O efeito da vazão do solvente é observado comparando os ensaios realizados a 30 MPa (Tabela 3). Aumentando a vazão de CO₂ para a

mesma condição de pressão (ensaios 1, 2 e 3), observa-se um aumento na taxa de extração (M_{CER}) e conseqüentemente uma diminuição do tempo de duração da etapa de taxa de extração constante (t_{CER}), ou seja, o aumento da vazão acelera a remoção do soluto de fácil acesso.

Figura 9 - Curvas de extração a 40 °C. (♦) Ensaio 1: 30 MPa e 0,7 kg.h⁻¹; (*) Ensaio 2: 30 MPa e 0,35 kg.h⁻¹; (▲) Ensaio 3: 30 MPa e 0,21 kg.h⁻¹; (●) Ensaio 4: 20 MPa e 0,7 kg.h⁻¹; (■) Ensaio 5: 15 MPa e 0,7 kg.h⁻¹; (+) Ensaio 6: 15 MPa e 0,35 kg.h⁻¹.



O efeito da pressão é observado na Figura 9, comparando os ensaios 1, 4 e 5 realizados com vazão de CO₂ de 0,7 kg.h⁻¹, na qual é possível observar o aumento do rendimento (4,5%) com o aumento de pressão. Esse comportamento é explicado pelo aumento da densidade do solvente com a pressão e conseqüentemente o poder de solvatação do CO₂ (BRUNNER, 1994).

Além disso, o aumento da pressão pode causar rupturas na matriz da planta e facilitar a liberação de compostos que não estavam disponíveis a pressões mais baixas, aumentando assim o rendimento do processo (CAMPOS et al., 2005). Barroso et al. (2016) também observaram um aumento no rendimento na extração da semente de mamão com elevação da pressão 15 para 20 MPa. Nas condições de vazão de CO₂ de 16,45 mL.min⁻¹, 40 °C e tempo de extração de 180 min, o rendimento da extração de 15 e 20 MPa foi de 0,89 e 1,33%, respectivamente.

A vazão de CO₂ e a pressão de operação do sistema de extração afetam o rendimento da extração, como pode ser observado na Tabela 3. O maior rendimento, teste 1, (21,6%) foi obtido em condições de maior densidade de CO₂, pressão e vazão de CO₂.

3.3 MODELAGEM DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO

Os cinco modelos estudados, Sovová, Goto, Martínez, Esquivel, Goto e Tan e Liou (equações apresentadas no Anexo A), foram aplicados para a descrição das curvas de extração e os parâmetros cinéticos estimados são apresentados na Tabela 4, juntamente com a variância (S^2R) e o coeficiente de correlação (R^2) para cada ajuste. Pode-se observar que o modelo Sovová, Goto e Martínez obtiveram valores maiores de R^2 , superiores a 0,95. Os modelos Esquivel e Tan e Liou foram descartados por apresentarem R^2 inferior a 0,95.

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam as curvas de ESC da semente de mamão, com os dados experimentais e modelados, obtidos nas condições de 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kgh⁻¹; 15 MPa, 40 °C e vazão de 0,35 kgh⁻¹ e 20 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kgh⁻¹, respectivamente. As curvas de ESC dos outros ensaios cinéticos são apresentadas no Apêndice B.

Figura 10 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kgh⁻¹.

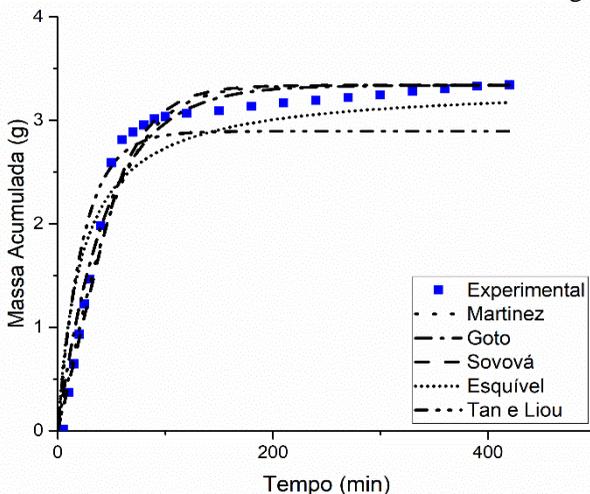


Figura 11 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 15 MPa, 40 °C e vazão de 0,35 kg^h⁻¹.

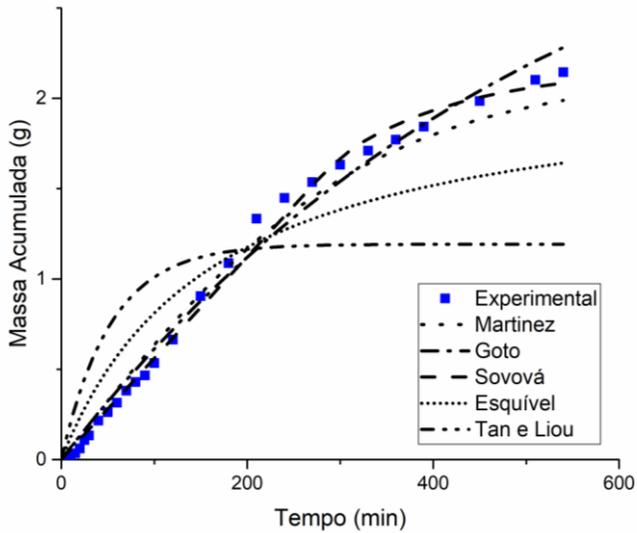


Figura 12 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 20 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kg^h⁻¹.

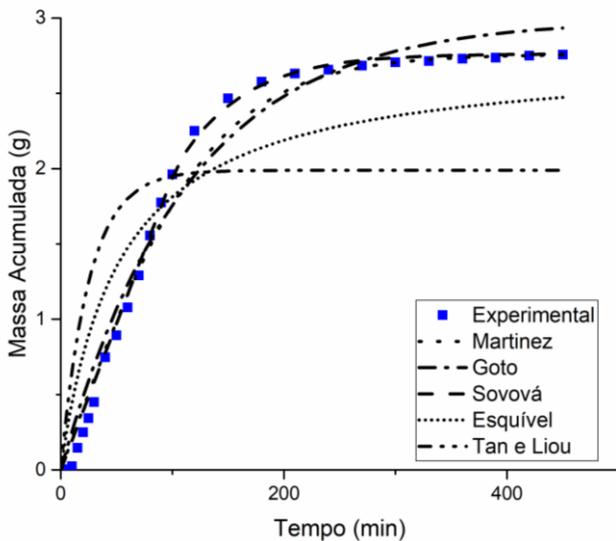


Tabela 4 - Parâmetros cinéticos estimados e parâmetros estatísticos calculados para os cinco modelos testados.

Modelos	Parâmetros	Ensaios					
		1	2	3	4	5	6
Sovová	x_k	0,091	0,081	0,065	0,060	0,036	0,037
	K_a	6,868	2,626	1,740	2,100	1,264	0,904
	k	0,592	0,545	0,562	0,589	0,514	0,599
	R^2	0,980	0,975	0,979	0,994	0,988	0,995
	S^2R	0,029	0,029	0,021	0,008	0,015	0,003
Goto	$\phi (10^{-5})$	5,30	2,43	5,00	2,02	0,61	0,86
	$K (10^{-7})$	8,49	6,89	7,33	6,99	5,94	4,19
	R^2	0,972	0,956	0,958	0,974	0,978	0,989
	S^2R	0,039	0,050	0,038	0,032	0,026	0,007
Martínez	b_i	0,030	0,016	0,013	0,015	0,007	0,006
	$t_{m,i}$	0,006	6,919	19,522	5,936	0,075	0,074
	R^2	0,977	0,969	0,975	0,987	0,979	0,988
	S^2R	0,032	0,036	0,024	0,016	0,025	0,007
Tan and Liou	k_d	0,043	0,022	0,013	0,039	0,038	0,019
	R^2	0,870	0,869	0,848	0,879	0,863	0,882
	S^2R	0,174	0,143	0,138	0,142	0,156	0,068
Esquível	b	1333	2977	4214	3137	8466	9834
	R^2	0,900	0,869	0,848	0,879	0,863	0,882
	S^2R	0,134	0,143	0,138	0,142	0,156	0,068

x_k razão mássica de soluto de difícil acesso; K_a coeficiente de transferência de massa na fase fluida; k coeficiente de transferência de massa na fase sólida; R^2 coeficiente de correlação; S^2R variância; ϕ coeficiente global de transferência de massa; K constante de dessorção do modelo Goto; b_i e $t_{(m,i)}$ parâmetros ajustáveis do modelo de Martínez; k_d constante de dessorção do modelo Tan e Liou; b parâmetro ajustável do modelo de Esquível.

Observando as Figuras 10, 11 e 12 e avaliando os valores de S^2R apresentados na Tabela 4, é possível verificar que o modelo de Sovová foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais para todos os ensaios. Este modelo apresenta bons resultados quando as curvas experimentais

têm um período de taxa constante de extração bem definido e tem como principal vantagem a descrição do fenômeno que ocorre no processo de extração supercrítica, dando um significado claro aos parâmetros ajustáveis (SOUSA et al., 2005; BENELLI, 2010).

O parâmetro K_a é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, e é diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido, que por sua vez aumenta com o aumento da vazão de solvente (MICHIELIN et al., 2009; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; AGUIAR, 2011). Já o valor de k é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase sólida e não sofre a influência da vazão do solvente, pois é representado pela difusão do CO_2 e da mistura de CO_2 +soluto no interior das partículas de matéria-prima (BENELLI, 2010).

Os valores dos coeficientes de transferência de massa na fase fluida (K_a) foram superiores aos valores obtidos para o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k), para todas as curvas avaliadas pelo modelo de Sovová (Tabela 4). Um baixo valor de k (fase sólida) indica que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção (MARTÍNEZ et al., 2003). Este fenômeno ocorre devido ao soluto exposto na superfície da matriz possuir maior facilidade de ser dissolvido, enquanto que o soluto retido no interior da matriz necessita de um tempo maior para ser solubilizado pela fase fluida. Esse comportamento pode ser observado nas Figuras 10, 11 e 12, onde grande parte da massa acumulada da cinética de extração já é removida na etapa CER, sendo nessa etapa a convecção o mecanismo dominante.

Alguns estudos também relatam esse comportamento, na extração de amêndoa de pêssego realizado por Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009), Guindani (2014) na extração do resíduo de semente de chia, Andrade (2011) na extração de casca e borra de café e Michielin (2009) na extração de erva-baleeira.

O aumento da vazão de 0,21 para 0,35 e 0,7 $kg \cdot h^{-1}$ proporcionou o aumento do parâmetro K_a de 1,74 para 2,63 e 6,87 $kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$, respectivamente. Esse aumento também foi verificado por Michielin (2009), Aguiar (2011) e Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009). Esta relação entre o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (K_a) e a vazão de solvente ocorre pelo fato do coeficiente K_a ser diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido, que por sua vez aumenta com o aumento da vazão do solvente.

Já o valor do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k) manteve-se constante, uma vez que este coeficiente não sofre influência da vazão do solvente, pois é representado pela difusão do CO_2

e da mistura CO_2 +soluto no interior das partículas da matriz de extração (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

A análise do valor R^2 por si só não revela qual modelo melhor se adapta aos dados experimentais, sendo assim, uma análise mais efetiva foi realizada, o teste F. Este teste compara as melhorias significativas introduzidas por um modelo acima do outro, através do S^2R de cada modelo (MAYER et al., 2016). O S^2R para cada modelo foi calculado utilizando a Eq. (6):

$$S^2R = \sum_{m=1}^n \left(\frac{e_i^{\text{exp}} - e_i^{\text{num}}}{n - q} \right)^2 \quad (6)$$

Onde: q é o número de parâmetros ajustados; e_i^{exp} é a massa acumulada experimental no ponto i ; e_i^{num} é a massa acumulada calculada no ponto i ; n é o número total de pontos coletados.

O resultado do teste F pode ser expresso como o quociente do S^2R , comparados dois modelos, Eq. (7). O S^2R do modelo que produziu o melhor ajuste ou o mais alto nível de significância é colocado no denominador ($S^2R_{(B)}$) e assim realizada a análise.

$$F_C = \frac{S^2R_{(A)}}{S^2R_{(B)}} \quad (7)$$

Na Tabela 5, são apresentados os valores do teste F obtidos na comparação dos modelos testados (Sovová, Goto e Martínez) que apresentaram R^2 acima de 0,95. Este teste pode ser utilizado para determinar se um modelo cinético é mais preciso do que outro e se houve diferença estatisticamente significativa quanto à precisão dos modelos (MAYER et al., 2016).

O valor do teste F é obtido para um determinado nível de probabilidade e graus de liberdade do sistema, para o numerador e o denominador.

Ao analisar os valores obtidos no teste F, Tabela 5, observa-se que, para os modelos cinéticos testados (Sovová, Goto e Martínez) a um nível de probabilidade de 95%, não houve diferença significativa para os testes

1, 2, 3 e 5 ($F_T > F_C$). No entanto, no teste 6 Sovová foi melhor do que o modelo Goto ($F_T < F_C$), mas não teve diferença significativa com o modelo Martínez e no teste 4 Sovová foi melhor quando comparado aos outros modelos ($F_T < F_C$). Como o modelo de Sovová se apresentou melhor ou igual a um nível de probabilidade de 95% para todos os testes, este modelo foi escolhido como ideal para modelar a cinética ESC do óleo de semente de mamão.

Tabela 5 - Teste F de variância residual da ESC para um intervalo de confiança de 95%.

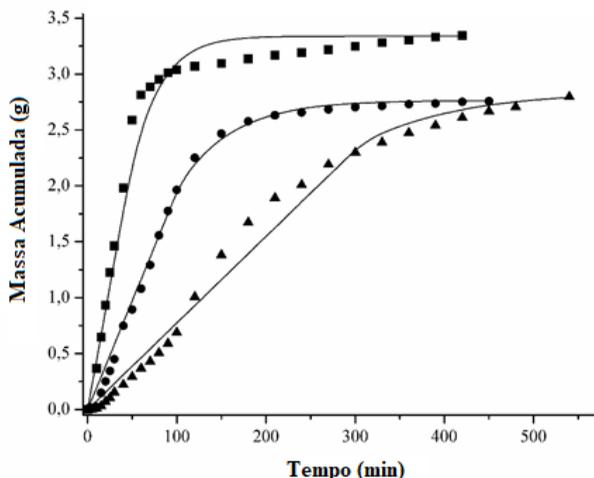
Ensaio	Modelos	S²R	F_C		Graus de Liberdade	F_T
1	Sovová (S)	0,029				
	Goto (G)	0,038	G/S 1,331		24:24:00	1,984
	Martínez (M)	0,032	M/S 1,103	G/M 1,206		
2	Sovová (S)	0,029				
	Goto (G)	0,049	G/S 1,708		25:25:00	1,955
	Martínez (M)	0,035	M/S 1,223	G/M 1,396		
3	Sovová (S)	0,015				
	Goto (G)	0,025	G/S 1,707		27:27:00	1,905
	Martínez (M)	0,024	M/S 1,660	G/M 1,028		
4	Sovová (S)	0,003				
	Goto (G)	0,006	G/S 1,971		26:26:00	1,929
	Martínez (M)	0,007	M/S 2,118	M/G 1,075		
5	Sovová (S)	0,021				
	Goto (G)	0,038	G/S 1,819		24:24:00	1,984
	Martínez (M)	0,023	M/S 1,124	G/M 1,617		
6	Sovová (S)	0,008				
	Goto (G)	0,032	G/S 3,892		25:25:00	1,955
	Martínez (M)	0,015	M/S 1,916	G/M 2,031		

S²R: variância; F_C: teste F calculado; F_T: teste F tabelado.

3.4 CURVAS DE EXTRAÇÃO GLOBAL

A Figura 13 compara as curvas experimentais e modeladas, pelo modelo de Sovová, para os ensaios 1, 4 e 5, permitindo avaliar o efeito da pressão. Observa-se que quanto maior a pressão, maior o rendimento obtido (ensaio 1). Este comportamento é justificado pelo aumento da densidade do solvente com a pressão, aumentando o poder de solvatação do CO₂ (BRUNNER, 1994). E ainda, o aumento da pressão pode gerar rupturas na matriz vegetal e facilitar a liberação de compostos, dessa forma, aumentando o rendimento do processo (CAMPOS et al., 2005).

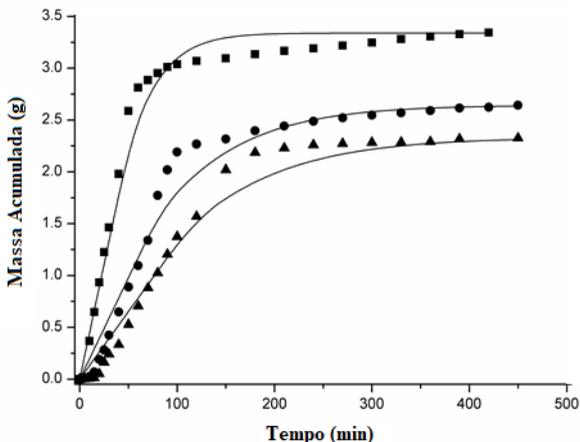
Figura 13 - Curva experimental e modelada (Sovová) 40 °C e 0,7 kg.h⁻¹ nas condições de (■) Ensaio 1: 30 MPa; (●) Ensaio 4: 20 MPa; (▲) Ensaio 5: 15 MPa.



O efeito da vazão de solvente nas curvas de extração global e o desempenho do modelo de Sovová podem ser observados na Figura 14, comparando os ensaios 1, 2 e 3. A taxa de extração aumenta com o aumento da vazão de solvente na primeira etapa de extração, devido à maior vazão de solvente presente no leito de extração. A uma vazão de solvente de 0,7 kg.h⁻¹, a massa acumulada de extrato obtida a 50 min foi de 2,59 g, enquanto que ao mesmo tempo na vazão de 0,35 kg.h⁻¹ foi de 0,89 g e para a vazão de 0,21 kg.h⁻¹ foi obtido 0,53 g. Este comportamento também foi observado na extração de cascas de café por Andrade et al.

(2012) e na extração de óleo de amêndoa de pêssego por Mezzomo et al. (2010).

Figura 14 - Curva experimental e modelada (Sovová) a 40 °C e 30 MPa nas condições de (■) Ensaio 1: 0,7 kg.h⁻¹; (●) Ensaio 2: 0,35 kg.h⁻¹; (▲) Ensaio 3: 0,21 kg.h⁻¹.



De acordo com Silva e Martínez (2014), o aumento da velocidade causa uma retração da camada limite de massa que envolve as partículas, como consequência, a resistência à transferência de massa externa é reduzida e a taxa de extração aumenta. De acordo com Kitzberger (2005), o aumento da massa acumulada com o aumento da vazão de solvente pode estar relacionado com a porosidade do sólido na matriz, fazendo com que o soluto seja extraído por difusão mais rapidamente neste passo, ou também com a maior concentração de óleo presente na superfície do sólido que é rapidamente retirada na etapa CER, aumentando desse modo a taxa de extração nesta etapa.

Outro fator a ser observado na Figura 14 é que o aumento da vazão de CO₂ causou maior inclinação no primeiro estágio de extração (CER). De acordo com Marrone et al. (1998), a maior disponibilidade de solvente no extrator por unidade de tempo proporciona um maior gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, causando uma maior taxa de transferência de massa como resultado do aumento da convecção, causada pela não saturação de CO₂ por soluto.

3.5 AMPLIAÇÃO DE ESCALA

A proposta de ampliação de escala sugerida para a extração da semente de mamão foi uma relação constante Q_{CO_2}/MA . Esta proposta baseia-se na difusão intra-partícula como um mecanismo limitante no processo ESC. O ensaio 3 (ESC 30 MPa / 40 °C / 0,21 kg.h⁻¹) foi selecionado para o estudo de aumento de escala devido a limitações da geometria do equipamento e para que a relação Q_{CO_2}/MA fosse mantida constante durante o processo. A relação Q_{CO_2}/MA foi de 0,2365g.g⁻¹min⁻¹.

O modelo de Sovová foi utilizado para descrever as curvas globais de extração obtidas por testes em escala pequena e ampliada. A comparação entre as curvas experimentais e modeladas são apresentadas na Figura 15, e pode-se observar que, para ambos os casos, o modelo de Sovová apresentam um bom ajuste. Os parâmetros ajustáveis para os ensaios em pequena e grande escala, obtidos pelo modelo Sovová, estão listados na Tabela 6.

Figura 15 - Curvas modeladas (Sovová) e experimentais nas condições em (■) pequena escala (30 MPa, 0,21 kg.h⁻¹ e 40 °C) e em (●) escala ampliada (30 MPa, 1,21 kg.h⁻¹ e 40 °C).

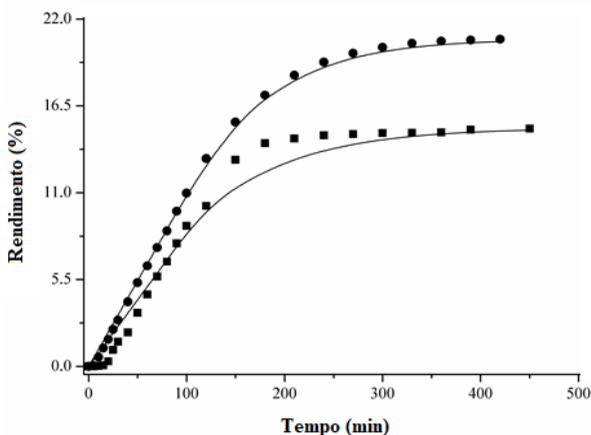


Tabela 6 - Parâmetros ajustáveis para os ensaios em pequena e grande escala obtidos pelo modelo de Sovová.

Parâmetros	Pequena escala	Ampliação de escala
<i>k</i>	0.065	0.088
<i>K_a</i>	1.740	1.481
<i>x_k</i>	0.562	0.572
<i>t_{CER}</i>	84.090	79.320
<i>t_{FER}</i>	146.180	178.190
<i>R²</i>	0.979	0.992

K_a coeficiente de transferência de massa na fase fluida; k coeficiente de transferência de massa na fase sólida; x_k razão mássica de soluto de difícil acesso; t_{CER} tempo de duração da etapa CER; t_{FER} tempo de duração da etapa FER; R^2 coeficiente de correlação.

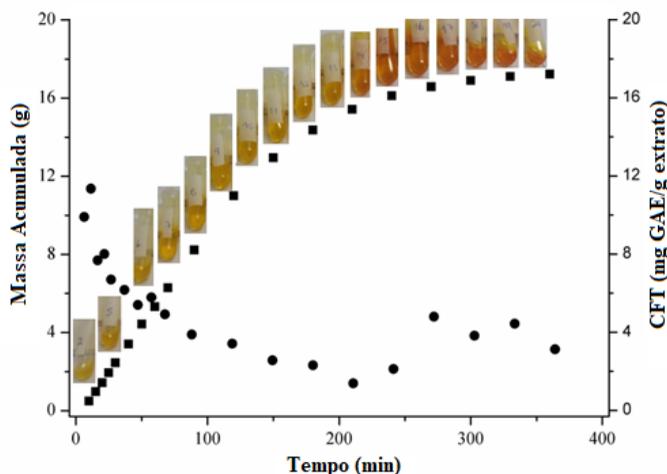
Os dados da Tabela 6 mostram valores similares de t_{CER} e t_{FER} entre a escala pequena e a ampliação, considerando uma relação Q_{CO_2}/MA constante. Esta analogia implica que a difusão intra-partícula é o mecanismo limitante na cinética ESC do óleo da semente de mamão. Outro ponto importante é que os parâmetros K_a , k e x_k possuem valores próximos entre as duas escalas, o que mostra que mantendo constante a relação Q_{CO_2}/MA é possível manter as propriedades de transporte iguais entre as escalas.

O valor obtido para o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (K_a) foi superior ao valor do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k), assim como já observado na seção 3.2. Como já explicado, isto indica que a convecção do soluto no solvente é mais representativa que a difusão na extração do óleo da semente de mamão.

Além de avaliar a influência dos parâmetros no processo de extração, o conteúdo de compostos fenólicos presentes nos extratos da semente de mamão foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu. Os compostos fenólicos são os principais antioxidantes naturais, embora não sejam a única classe de substâncias que contribuem para o desempenho antioxidante de produtos naturais (ROGINSKY; LISSI, 2005). Sendo assim, o conteúdo de compostos fenólicos (CFT) da

semente de mamão foi analisado em cada ponto da cinética de extração da ampliação de escala, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 – Curva cinética da ampliação de escala da semente de mamão com relação ao (●) conteúdo de compostos fenólicos e a (■) massa acumulada.



As maiores concentrações do conteúdo de compostos fenólicos foram obtidas durante a etapa cinética de taxa de extração constante (CER). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que no estágio CER a superfície externa da partícula é coberta com o soluto de fácil acesso, obtendo neste passo uma grande quantidade de amostra e consequentemente um conteúdo maior de CFT. Além disso, no final da extração (aproximadamente após 250 min), o conteúdo de compostos fenólicos aumenta novamente, provavelmente relacionado à difusão de compostos fenólicos presentes dentro da partícula.

Khor e Wong (2014) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos a partir de sementes de mamão extraídas com hexano e obtiveram valores CFT de $6,13 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$. Como pode ser observado na Figura 16, o conteúdo de compostos fenólicos é de $10 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ nos primeiros 10 minutos de extração, mostrando a eficiência do processo para a obtenção de compostos fenólicos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da modelagem e ampliação de escala da extração supercrítica da semente de mamão mostrou-se como uma alternativa para a valorização de subprodutos de baixo valor.

A modelagem da ESC das sementes de mamão indicou que os melhores ajustes foram alcançados pelo modelo de Sovová. A proposta de aumento de escala foi adequada para as sementes de mamão e os parâmetros cinéticos e a modelagem são indicados para a simulação das curvas de extração em escala industrial.

As maiores concentrações de conteúdo de compostos fenólicos foram obtidas durante a etapa cinética de taxa de extração constante.

Essas descobertas sugerem que o uso das sementes de mamão para obter bioextratos, pode ser direcionado para o desenvolvimento de novos produtos atraentes, com propriedades bioativas aplicando extração supercrítica.

E o código computacional desenvolvido para avaliar simultaneamente cinco modelos matemáticos se mostrou como uma ótima ferramenta para seleção do modelo com melhor ajuste.

Nos capítulos seguintes serão apresentados estudos destacando as propriedades bioativas do resíduo do mamão, a semente, e como essas propriedades são afetadas por diferentes técnicas de extração.

Capítulo 4

EFEITO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO NO RENDIMENTO GLOBAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DA SEMENTE DE MAMÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca das indústrias alimentícias e farmacêuticas por novas fontes naturais de compostos com potencial de conservação de alimentos ou emprego em medicamentos e cosméticos tem aumentado e despertado o interesse de estudos e aplicação de novas tecnologias para a extração desses compostos.

Dentre as novas tecnologias de extração, destaca-se o uso dos métodos não convencionais de extração, como extração supercrítica (ESC) e extração com líquido pressurizado (PLE). Esses métodos são atraentes para a recuperação de compostos bioativos e apresentam apelo favorável ao meio ambiente, pois utilizam etanol, água ou CO₂ como solventes, sendo assim uma boa alternativa devido a redução do consumo de energia e asseguram extratos de alta qualidade (HERRERO et al., 2013).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais utilizado na ESC para extrair voláteis e óleos essenciais devido a sua baixa polaridade, condições críticas brandas, não é inflamável, de baixo custo e facilmente removido do extrato (PEREIRA; MEIRELES, 2010). O PLE utiliza solventes líquidos a temperaturas elevadas e pressão controlada, aumentando as propriedades de solubilidade e transferência de massa. Etanol e água, têm sido amplamente utilizados para a extração de compostos fenólicos, carotenoides, entre outros compostos bioativos de plantas (HERRERO et al., 2015; PESCHEL et al., 2006).

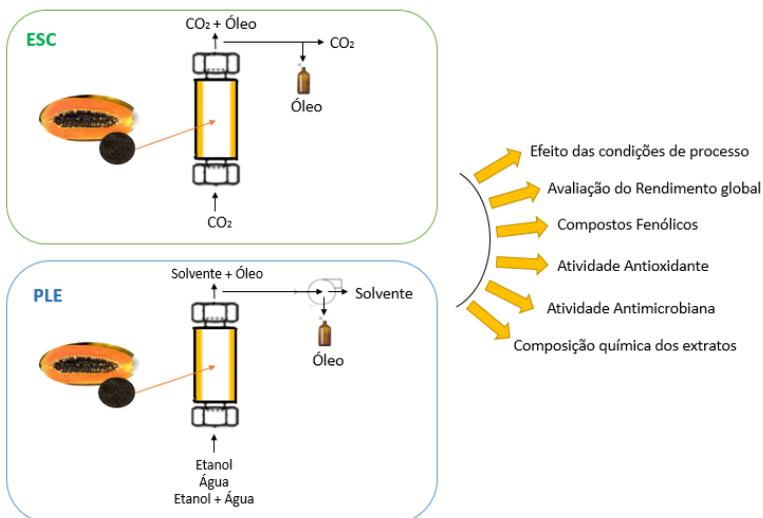
Diversos métodos podem ser utilizados para a extração de compostos bioativos. Fatores como, valor envolvido no processo de extração, uso do extrato, substância alvo, a presença de resíduo, podem ser levados em consideração para a escolha de um método específico. Portanto, o objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito de diferentes técnicas de extração frente ao rendimento e as atividades biológicas, antioxidante e antimicrobiana, do extrato da semente de mamão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão relatados os métodos utilizados para a extração do óleo da semente de mamão e as metodologias aplicadas para avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e composição química dos extratos da semente de mamão. Um resumo gráfico desse Capítulo é apresentado na Figura 17.

Os ensaios de extração e atividade antioxidante foram conduzidos no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os ensaios de atividade antimicrobiana foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, e as análises de composição química dos extratos foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Figura 17 - Resumo gráfico do Capítulo 4



Fonte: a autora.

2.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

As sementes de mamão utilizadas nesse estudo foram gentilmente cedidas pela empresa Comercial Kazmierski de Jaraguá do Sul - Santa Catarina. E são provenientes de mamões do cultivar Formosa, produzidos no estado da Bahia - Brasil.

As amostras recebidas no LATESC foram higienizadas em água corrente, secas em estufa de circulação de ar (DeLeo, Porto Alegre/RS - Brasil) a temperatura de 45 °C durante 24 horas. Em seguida, as sementes foram trituradas em moinho de facas, tipo Willey (DeLeo, Porto

Alegre/RS - Brasil), fracionadas em sacos de polietileno e armazenadas em congelador doméstico (Consul, Joinville/SC - Brasil) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 EXTRAÇÃO EM SOXHLET (SOX)

A extração Soxhlet (SOX) foi realizada de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando etanol P.A. e hexano P.A. como solventes de extração.

O aparato Soxhlet é composto de um extrator acoplado na extremidade inferior a um balão e na extremidade superior a um condensador (Figura 18). Para cada extração foram utilizadas 5 g de amostra acondicionadas em um cartucho de papel filtro e 150 mL do solvente, que foi adicionado ao balão e aquecido até a temperatura de ebulição, por meio de uma manta de aquecimento. Em todas as extrações SOX manteve-se a relação de amostra e solvente em 1:30 (m:v). O processo de extração ocorreu sob forma contínua com velocidade de gotejamento de 4 a 5 gotas de solvente por segundo, durante 6 h.

Os extratos obtidos após a extração SOX passaram por processo de eliminação do solvente, em rotaevaporador (Fitason Modelo 802, São Paulo/SP - Brasil) com arrefecimento por banho termostático na temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Microquímica, MQBTZ99-20, Palhoça/SC - Brasil), após foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (Freezer Consul, Joinville/SC - Brasil) à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. As extrações foram conduzidas em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

Figura 18 - Aparato para extração Soxhlet.



Fonte: a autora.

2.3 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

O método dinâmico de extração com CO₂ supercrítico foi empregado para os experimentos de determinação do rendimento global. A unidade de extração e o procedimento experimental estão descritos nos itens 2.6.1 e 2.6.2 do Capítulo 3, respectivamente.

2.3.1 Determinação do rendimento global (X_0)

O rendimento global de extração (X_0) é a quantidade de óleo extraível presente na matriz sólida, referente a uma dada condição de extração. Conforme abordado no item 2.6.3 do capítulo 3, na Equação 4, os rendimentos foram calculados através da razão entre a massa de extrato obtida e a massa de matéria-prima utilizada na extração.

Os ensaios de extração supercrítica foram realizados em diferentes condições de pressão e temperatura, com objetivo de avaliar a influência destas condições no rendimento global de extração. O fluido supercrítico

utilizado como solvente foi CO₂ puro, 99,9 % (White Martins, Joinville/SC - Brasil).

O efeito da pressão e temperatura no rendimento da ESC foi avaliado utilizando como condições de operação pressões de 20 e 30 MPa, temperaturas de 40, 60 e 80 °C, vazão fixa de solvente (0,7 kg.h⁻¹) e tempo de extração de 4 h, determinado pelos ensaios cinéticos apresentados no capítulo anterior. As condições de pressão selecionadas para o estudo foram determinadas de acordo com o estudo das cinéticas de extração, e as temperaturas foram selecionadas com base em Clarke (2009) que relata extrações dos compostos de glicosinolatos são realizadas a temperaturas de 65 a 100 °C, partindo do pressuposto que deve-se inativar a enzima mirosinase, que cliva a glicose resultando na aglicona.

Foram utilizados 15 g de amostra para o preenchimento do leito de extração, e o espaço restante da coluna foi preenchido com esferas de vidro. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração. A Tabela 7 apresenta os ensaios de extração supercrítica para a determinação dos resultados.

Tabela 7 - Ensaios de extração supercrítica para determinação do rendimento global (X₀).

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)
1	20	40
2	20	60
3	20	80
4	30	40
5	30	60
6	30	80

Os experimentos de rendimento global foram realizados em duplicata e os extratos obtidos nestas operações foram empregados para as análises de atividade biológica, antioxidante e antimicrobiano, bem como na análise da composição da fração volátil por cromatografia gasosa.

2.4 EXTRAÇÃO LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

Os experimentos de PLE foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, o objetivo foi realizar a cinética de extração para determinação do tempo de processo. Na segunda etapa o objetivo foi avaliar diferentes condições de operação do sistema frente ao rendimento e a seletividade dos extratos. O método dinâmico de extração foi utilizado para os experimentos.

2.4.1 Unidade de extração

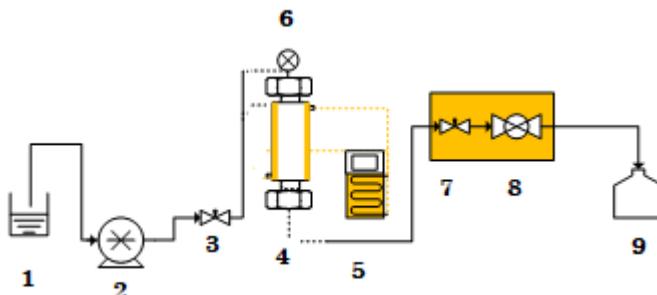
As extrações PLE foram conduzidas em uma unidade de extração descrita por Lasta (2017). Sendo utilizado como solventes de extração etanol P.A. 99,8 % (Neon, Suzano/SP - Brasil), água destilada e uma mistura água/etanol (1:1). As Figuras 19 e 20, apresentam a unidade de extração PLE e o diagrama com os componentes detalhados.

Figura 19 - Unidade de extração PLE.



Fonte: a autora.

Figura 20 - Diagrama da unidade de extração PLE.



Fonte: adaptado de Mazzutti et al., 2017

Onde: (1) Suprimento do solvente; (2) Bomba de Solvente; (3 e 7) Válvula de bloqueio; (4) Coluna de extração; (5) Banho termostático; (6) manômetro; (8) Válvula *back pressure*; (9) Recipiente de coleta do extrato.

2.4.2 Procedimento experimental de extração

Lasta (2017) descreveu o procedimento de extração apresentado no diagrama da Figura 20. A unidade contém uma coluna de extração de 30,7 mL (diâmetro interno de 12,5 mm e altura de 250 mm), feita em aço inoxidável AISI 316. A coluna de extração é revestida termicamente e controlada por banho de aquecimento (Microquímica, modelo MQBTZ 99-20, Palhoça/SC - Brasil). O solvente é bombeado através de uma bomba de alta eficiência (Waters 515 HPLC, UK) passando pela coluna de extração, sendo uma válvula de bloqueio (HIP, 10-11NFA-REG, PA - USA) e uma válvula *black pressure* (Tescom, Uk) utilizadas para controlar e manter a pressão do sistema, visualizada com um manômetro (Header, modelo H-11, São Paulo/SP - Brasil).

No início do processo de extração as válvulas são mantidas fechadas. A bomba é acionada e estabelece-se a pressão de trabalho desejada pela vazão de solvente que entra na bomba. Após estabelecida a pressão desejada as válvulas de controle de pressão são abertas regulando a pressão do sistema. O solvente entra em contato com a amostra solubilizando os compostos e os carregando através do sistema e coletados em frasco âmbar.

2.4.3 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 o processo. Nos ensaios para a determinação da cinética de extração da semente de mamão a coluna de extração foi preenchida com aproximadamente 8,5 g de amostra e esferas de vidro para formar um leito de partículas fixo dentro da coluna.

Os frascos de coleta foram previamente pesados em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220, São Paulo/SP - Brasil) e a coleta do soluto extraído realizada em tempos pré-determinados, sendo nos primeiros 12 minutos coletadas amostras de 3 em 3 minutos, e após esse tempo foram realizadas coletas de 5 em 5 minutos até o final da extração (102 min). Posterior a coleta, os extratos recolhidos foram rotaevaporados (Fitason Modelo 802, São Paulo/SP - Brasil) e as massas medidas para determinar a massa de extrato obtida em função do tempo de experimento.

O experimento cinético foi conduzido a temperatura de 40 °C, pressão de 10 MPa e etanol como solvente à uma vazão de 3 mL.min⁻¹.

2.4.4 Determinação do rendimento global (X₀)

Os ensaios de extração com líquido pressurizado foram realizados em diferentes condições de temperatura e solventes, com objetivo de avaliar a influência destas condições no rendimento global de extração.

Os efeitos da temperatura e do solvente foram avaliados utilizando condições fixas de pressão, vazão e tempo, 10 MPa, 3 mL.min⁻¹ e 67 min, respectivamente. As temperaturas estudadas variaram de 40, 60 e 80 °C e os solventes utilizados foram etanol P.A., água destilada e uma mistura água e etanol na proporção 50:50 (v:v). As condições de temperatura foram selecionadas partindo do pressuposto que deve-se inativar a enzima mirosinase, que cliva a glicose resultando nos compostos de glicosinolatos (CLARKE, 2009).

Foram utilizados de 5 a 8 g de amostra, sendo o preenchimento do leito de extração realizado com esferas de vidro e amostra homogeneizadas, para evitar o empacotamento do leito. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão, para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração. A Tabela 8 apresenta os de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global.

Tabela 8 - Ensaios de extração PLE para determinação do rendimento global (X_0).

Ensaio	Temperatura (°C)	Solvente
1	40	Etanol
2	60	Etanol
3	80	Etanol
4	80	Água
5	80	Água e Etanol (1:1)

Os experimentos foram realizados em duplicata e os extratos obtidos passaram por processo de eliminação do solvente, em rotaevaporador (Fitason Modelo 802, São Paulo/SP - Brasil). Foram avaliadas a atividade biológica, antioxidante e antimicrobiano, e a fração volátil por cromatografia gasosa dos extratos obtidos.

2.5 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A determinação do conteúdo compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e encontra-se descrita no item 2.7 do capítulo 3 deste trabalho. Todos os extratos obtidos pelas extrações SOX, ESC e PLE foram avaliados.

As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de matéria seca ($\text{mgGAE.gextrato}^{-1}$).

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante “in vitro” dos extratos da semente de mamão foram avaliados por duas técnicas distintas, método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

2.6.1 Método do radical DPPH

A atividade antioxidante pelo método do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Nesse método, os extratos da semente de mamão foram diluídos em etanol P.A em concentrações de 0 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as extrações PLE e de 0 a 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as extrações ESC e SOX. Aos eppendorfs contendo as diluições dos extratos foram adicionadas alíquotas de uma solução etanólica de DPPH 0,3 mmol.L^{-1} . Os eppendorfs foram homogeneizados e incubados ao abrigo da luz e temperatura ambiente. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro em 517 nm.

A concentração efetiva para reduzir em 50 % a atividade oxidativa do radical DPPH (EC_{50}) foi calculada por regressão linear. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados encontrados para a concentração efetiva (EC_{50}) foram expressos com média \pm desvio padrão.

2.6.2 Método de descoloração do sistema β -caroteno

A atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos da semente de mamão foi realizada de acordo com o método descrito por Matthäus (2002) e Kang et al. (2006). Para o preparo da solução sistema β -caroteno/ácido linoleico, utilizaram-se 3,4 mg de β -caroteno, aos quais adicionaram-se 44 μL de ácido linoleico, 400 mg de Tween 20 e 5 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado em rotaevaporador e 100 mL de água destilada foram acrescentados.

Em eppendorfs, 1 mL da solução do sistema β -caroteno foi adicionada a 40 μL de solução de extrato etanólico (1,667 mg.mL^{-1}). E para o controle a amostra foi substituída por etanol. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 470 nm. Os eppendorfs foram colocados em banho maria, a 50 $^{\circ}\text{C}$, e as leituras realizadas antes da incubação (t:0) e após 2 h (t:120). Os resultados de atividade antioxidante (AA %) foram calculados pela Equação 8 e expressos como média \pm desvio padrão.

$$AA\% = 1 - \left\{ \left[\frac{(Abs_{t:120} - Abs_{t:0})}{(Abs_{Controle:t:120} - Abs_{Controle:t:0})} \right] \cdot 100 \right\} \quad (8)$$

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos da semente de mamão foi avaliada frente as bactérias *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e frente ao fungo *Candida albicans* MDM8. Estas espécies foram selecionadas por se tratarem de uma espécie de bactéria Gram-negativa, uma Gram-positiva e um fungo, sendo as espécies de bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos de ocorrência frequente e o fungo causador de infecções nos seres humanos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

2.7.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por Sarker; Nahar e Kumarasamy, (2007) e Ud-Daula et al., (2016) com algumas modificações.

Os extratos obtidos por extrações ESC e SOX com hexano foram dissolvidos em caldo Mueller Hinton com 1 % de Tween 80, e os extratos obtidos por extrações PLE e SOX etanol foram dissolvidos em água com 10 % de DMSO esterilizado.

Uma placa estéril de 96 poços foi identificada e um volume de 90 μL de caldo (caldo Mueller Hinton para *E. coli* e *S. aureus* e caldo Sabouraud para *C. albicans*) foi adicionado em todos os poços, após um volume de 90 μL do extrato dissolvido (concentração inicial de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi pipetado no primeiro poço, sendo em seguida realizada as diluições em série para os poços seguintes. Após, em todos os poços foram adicionados 10 μL da suspensão do micro-organismo contendo aproximadamente 10^8 UFC. mL^{-1} .

Para cada micro-organismo foram realizados um conjunto de controles, C₁: diluições seriadas de antibiótico ceftazidima (concentração inicial de 74 μL) como controle positivo; C₂: solução de água com 10% DMSO sem o extrato; C₃: solução de caldo com 1 % Tween 80 sem o extrato; C₄: controle de crescimento com caldo e suspensão do micro-organismo e C₅: controle negativo só com caldo. Os controles C₂ e C₃ foram realizados para verificar se 10 % de DMSO e 1 % de Tween 80 não apresentavam atividade inibitória frente os micro-organismos testados.

As placas foram fechadas e envoltas com filme para evitar que os micro-organismos não desidratassem e foram incubadas a 35 - 37 °C por

24 horas para as bactérias e 35 - 37 °C por 48 horas para o fungo. Após o período de incubação foi adicionado em todos os poços 10 µL da solução indicadora de resazurina (6,75 mg.mL⁻¹). A mudança de cor foi avaliada visualmente, sendo coloração azul indicativo de ausência de crescimento e coloração rosa/avermelhada indicativo de crescimento do micro-organismo. A menor concentração em que a alteração de cor ocorreu foi tomada como o valor de CMI, sendo os resultados expressos em µg.mL⁻¹. Os ensaios foram conduzidos em duplicata.

2.8 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos da semente de mamão foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A identificação e quantificação dos componentes voláteis presentes nos extratos foi realizada em cromatógrafo de gás triplo quadrupolar GC-MS-TQ8030 (Shimadzu, Japão) equipado com fonte de ionização eletrônica (EI).

As amostras do óleo da semente de mamão foram secas sob pressão reduzida para retirada da água residual, em seguida, foram dissolvidas em clorofórmio e ajustadas para uma concentração de 1 mg.mL⁻¹. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna capilar não polar RTX-5M (30 m x 0,25 mm id com 0,25 µm). Os ensaios foram realizados com injeção de 1 µL, com temperatura do injetor ajustada para 240 °C em modo dividido (20:1). A temperatura do forno foi programada inicialmente em 40 °C durante 1 min, aumentando linearmente até 290 °C a uma taxa de 10 °C.min⁻¹. O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL.min⁻¹. As condições de EM foram as seguintes: temperatura da interface da fonte de íons ajustada para 250 °C e 280 °C, respectivamente, tempo de corte de solvente 2,5 min, impacto de elétrons, varredura de modo (0,3 seg), varredura de massa de 40 - 400 m/z, energia 70 eV.

A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação dos espectros de massa armazenados na biblioteca NIST (Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology – Mass-spectral library with Windows Search Program) do sistema de dados de CG-EM.

Uma vez identificado o composto BITC como composto majoritário, optou-se por realizar a quantificação do mesmo nas diferentes amostras de óleo (obtidas por diferentes métodos de extração). O método

do CG-EM foi otimizado, utilizando-se as mesmas condições anteriores, porém com redução da faixa de temperatura (40°- 190°), e mudança no modo de aquisição de massas, de varredura passou para íon selecionado (Q3), com o intuito de aumentar a sensibilidade de quantificação. A curva de calibração foi construída (Apêndice C), utilizando-se o padrão benzil isotiocianato-98% (Sigma-Aldrich), com adição de padrão interno de Mentol (1 µg.ml⁻¹). Para a determinação de coeficiente angular e a construção da curva, utilizou-se regressão linear e os seguintes pontos de concentração: 1, 2, 5, 7, 8, 10 e 12 ppm. A amostragem quantificada foi encontrada dentro dos limites de quantificação preditos pela curva de calibração e a composição percentual de cada componente foi determinada a partir da área do componente dividida pela área total de todos os componentes isolados sob estas condições.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de rendimento de extração, conteúdo de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Sendo esses resultados avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA). Ao serem verificadas diferenças significativas ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CINÉTICA ESC

Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em características do material e em parâmetros de processo (MARTÍNEZ; VANCE, 2007). Entre os parâmetros de processo destaca-se o tempo de operação. Sendo necessária a fixação desse para determinar o rendimento global de extração (X_0), possibilitando a análise da influência das demais características do processo, como temperatura e pressão, em tempo constante de extração.

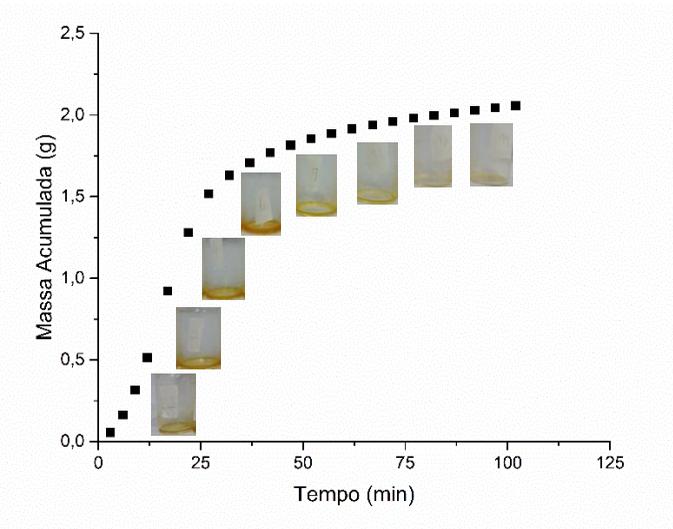
De acordo com o capítulo 3 deste trabalho, onde realizou-se o estudo das condições de processo (vazão e pressão) em relação as cinéticas de extração, o tempo necessário para que a etapa difusiva seja

alcançada é de aproximadamente 240 min (Figura 9, Capítulo 3), sendo esse tempo fixado para todos os experimentos de determinação de rendimento (X_0).

3.2 CINÉTICA PLE

Assim como para a ESC, a curva cinética de PLE também é importante na determinação do tempo de processo para a avaliação do rendimento global de extração (X_0). Na Figura 21 é apresentada a curva cinética de PLE obtida na condição de 10 MPa e 40 °C. O etanol foi o solvente empregado para a obtenção da curva cinética, na vazão de 3 mL.min⁻¹.

Figura 21- Cinética de extração PLE a 10 MPa, 40 °C com etanol a 3 mL.min⁻¹.



O tempo de extração PLE estabelecido nesse estudo foi de 67 minutos, tempo este onde a extração encontra-se na etapa difusiva. Este tempo foi fixado para todos os experimentos de determinação de rendimento (X_0).

3.3 RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0)

Os resultados médios do rendimento global de extração obtidos pelas técnicas de extração com líquido pressurizado (PLE), Soxhlet (SOX) e extração supercrítica (ESC) para a semente de mamão são apresentados na Tabela 9.

O maior rendimento foi verificado na extração SOX com hexano (24,32 %), porém esse valor não apresentou diferença estatística quando comparado com as extrações SOX etanol (24,30 %) e PLE etanol nas temperaturas de 40 °C (22,36 %), 60 °C (23,35 %) e 80 °C (23,72 %). O menor rendimento foi observado na extração ESC na condição de 20 MPa a 80 °C (6,02 %), sendo estatisticamente diferente das outras condições aplicadas.

O melhor desempenho da extração em SOX pode ser justificado pelas maiores temperaturas envolvidas no processo e pelo refluxo de solvente durante a operação. Na extração Soxhlet o solvente é utilizado na sua temperatura de ebulição, quando a tensão superficial e viscosidade do solvente são grandemente reduzidas, em comparação com temperatura mais baixa. Portanto, o solvente pode alcançar os sítios ativos dentro da matriz com maior facilidade, solubilizando os solutos (MARKOM et al., 2007). O reciclo do solvente de extração também facilita atingir o equilíbrio da transferência (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Para as extrações PLE, observa-se que não houve diferença significativa entre as diferentes temperaturas analisadas para o solvente etanol, não sendo observado incremento na resposta com a variação dessa condição de processo. Na temperatura de 80 °C as extrações com os solventes água/etanol e água foram diferentes significativamente da extração com etanol na mesma temperatura. E os solventes água/etanol e água não apresentaram diferença significativa entre si.

Os resultados das extrações com PLE mostram que os rendimentos foram afetados pelo solvente utilizado, e não pela condição de operação do processo, temperatura. Demonstrando assim, que a diferença nos rendimentos foi afetada pela polaridade do solvente. Morrison e Boyd (1981) reportam que o etanol, apesar de ser um solvente que solubiliza preferencialmente substâncias polares, pode também extrair lipídios, conferindo maior rendimento às extrações.

Asghar et al. (2016) avaliaram a extração pela técnica de maceração durante duas semanas da semente de mamão e obtiveram valores de rendimento para a extração com água de 12,84%, com etanol 12,36% e hexano 0,71%. Muhamad et al. (2017) avaliaram a extração da

semente de mamão por agitador orbital (shaker) e obtiveram valores de rendimento para o solvente hexano de 0,12%, para água de 0,04% e para etanol 0,02%. Khor e Wong (2014) encontraram valores de rendimento de 3,85% para a extração líquido-líquido com hexano. As condições avaliadas pelos autores são distintas das empregadas no estudo, mas destaca-se que em ambos os estudos os rendimentos foram afetados pela polaridade dos solventes utilizados.

Tabela 9 - Rendimento global de extração para a semente de mamão.

Método	Solvente	Índice de Polaridade ⁽¹⁾	Rendimento ⁽²⁾ (%)
Soxhlet	Etanol	5,2	24,30 ^A ± 0,94
Soxhlet	Hexano	0	24,32 ^A ± 0,67
Extração com Líquido Pressurizado (10 MPa)			
40 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	5,2	22,36 ^{Aa} ± 0,58
60 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	5,2	23,35 ^{Aa} ± 0,10
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	5,2	23,72 ^{Aa} ± 1,12
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água/Etanol	7,2	12,69 ^{Cb} ± 1,24
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água	9,0	13,94 ^{Cb} ± 0,96
Método	Solvente	ρ CO ₂ ⁽²⁾ (g.cm ⁻³)	Rendimento ⁽²⁾ (%)
Extração Supercrítica (0,7 kgCO₂.h⁻¹)			
20 MPa / 40 °C	CO ₂	0,840	17,20 ^{Ba} ± 0,40
20 MPa / 60 °C	CO ₂	0,724	15,38 ^{BCa} ± 0,32
20 MPa / 80 °C	CO ₂	0,600	6,02 ^{DB} ± 0,54
30 MPa / 40 °C	CO ₂	0,911	18,08 ^{Ba} ± 0,32
30 MPa / 60 °C	CO ₂	0,830	17,32 ^{Ba} ± 1,48
30 MPa / 80 °C	CO ₂	0,750	18,03 ^{Ba} ± 0,53

⁽¹⁾ Byers (2009); ⁽²⁾ (g.cm⁻³) ANGUS, ARMSTRONG, DE REUCK (1976); ⁽²⁾ média ± desvio padrão (n=2); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras maiúsculas indicam análise entre todos os resultados, b) letras minúsculas indicam análise entre as extrações PLE e c) símbolos gregos indicam análise entre extrações ESC.

Observa-se na Tabela 9, que o maior rendimento para as extrações ESC foi obtido na condição de 30 MPa a 40 °C (18,08%), sendo estatisticamente igual a todas as outras condições ESC estudadas, exceto a condição de 20 MPa a 80 °C que foi diferente significativamente de todas as outras condições, sendo essa a condição de menor rendimento (6,02%).

A temperatura e a pressão são fatores que afetam tanto o rendimento de extração como a classe de compostos extraídos. Na Tabela 9 é possível observar que a temperatura constante, são obtidos maiores rendimentos de extração com o aumento da pressão. Para a condição de 80 °C, o incremento da pressão de 20 MPa para 30 MPa proporciona o aumento do rendimento de $6,02 \pm 0,54\%$ para $18,03 \pm 0,53\%$. Esse mesmo comportamento foi observado por Barroso et al. (2016) para a extração de semente de mamão com fluido supercrítico.

O poder de solvatação do solvente supercrítico é afetado pela pressão e temperatura de operação devido a sua ação na densidade do solvente. A pressão constante um aumento na temperatura diminuiu a densidade do solvente e seu poder de solvatação, enquanto que a temperatura constante, um aumento na pressão aumenta a densidade do fluido supercrítico (BRUNNER, 1994).

Desta forma, o incremento da temperatura de 40 para 80 °C a pressão constante de 20 MPa, resultou na diminuição da densidade do solvente (0,840 para 0,600 g/cm³) e conseqüentemente na diminuição do rendimento. Para a condição de 20 MPa, o rendimento diminuiu de $17,20 \pm 0,40\%$, para $15,38 \pm 0,32\%$ e posteriormente para $6,02 \pm 0,54\%$, após a temperatura de operação ser elevada de 40 para 60 e posteriormente 80°C.

Barroso et al. (2016), avaliariam a extração supercrítica da semente de mamão e os maiores rendimentos obtidos foram 2,56%, para a condição de 20 MPa, 80 °C e tempo de extração de 180 min e 1,33% para a condição de 20 MPa, 40 °C e tempo de extração de 180 min. Esses valores são inferiores aos obtidos nesse estudo, para a condição de 20 MPa, 80 °C e tempo de extração de 240 min o rendimento foi de 6,02% e para a condição de 20 MPa, 40 °C e 240 min foi de 17,20%. As diferenças encontradas para os valores de rendimento se devem as condições experimentais utilizadas nos estudos, com destaque para o conteúdo de água presente na matéria-prima, pois Barroso et al. (2016) relatam que realizou um tratamento na amostra após a extração supercrítica para remover uma quantidade de água presente ao óleo extraído.

3.4 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

Os resultados referentes ao conteúdo de compostos fenólicos totais para as extrações Soxhlet, Líquido Pressurizado e Extração Supercrítica da semente de mamão são apresentados na Tabela 10. A curva analítica de ácido gálico, utilizada para o cálculo de CFT encontra-se no Apêndice A.

Os valores de CFT dos extratos da semente de mamão variaram entre $2,11 \pm 0,11$ a $38,48 \pm 2,75$ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$. O extrato que apresentou maior CFT foi obtido por PLE na condição de 10 MPa, 80 °C e água como solvente, com $38,48 \pm 2,75$ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$, valor este, estatisticamente igual ao obtido para a condição de PLE a 10 MPa, 80 °C e água/etanol como solvente, $38,33 \pm 1,78$ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas que apresentam grande diversidade de estruturas, incluindo moléculas simples como vanilina, ácido gálico e ácido cafeico, e polifenóis como estilbenos, flavonoides e polímeros derivados desses vários grupos (CHEYNIER, 2012). De modo geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares, e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade.

O emprego de solventes de maior polaridade proporcionou a extração de maiores teores de compostos fenólicos para a semente de mamão, tanto nas extrações Soxhlet com etanol como PLE com água, água/etanol e etanol, confirmando o caráter polar desses compostos. No entanto, a água e a mistura água/etanol proporcionaram uma extração de compostos fenólicos estatisticamente maior a extração com etanol puro.

Analisando o CFT dos extratos obtidos por PLE, os maiores valores foram alcançados utilizando água como solvente, seguido da mistura água/etanol, como comentando anteriormente. Além disso, observa-se que o conteúdo de compostos fenólicos na extração PLE com etanol aumentou com a variação da temperatura de 40 para 80 °C, $7,36 \pm 0,48$ para $12,48 \pm 0,77$, respectivamente, ou seja, o aumento da temperatura proporcionou uma maior extração de compostos fenólicos. Este comportamento está relacionado com a enzima mirosinase, que cliva a glicose dando origem a produtos quimicamente reativos e com atividades biológicas.

Tabela 10 - Conteúdo de fenólicos totais (CFT) para os extratos da semente de mamão.

Método	Solvente	CFT (mg _{GAE} ·g ⁻¹ _{extrato}) ⁽¹⁾
Soxhlet	Etanol	12,92 ^{B\diamond} \pm 0,91
Soxhlet	Hexano	6,74 ^{CD\square} \pm 0,32
Extração com Líquido Pressurizado		
40 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	7,36 ^{Cα} \pm 0,48
60 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	8,08 ^{Cα} \pm 0,54
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	12,48 ^{Bβ} \pm 0,77
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água/Etanol	38,33 ^{Aγ} \pm 1,78
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água	38,48 ^{Aγ} \pm 2,75
Extração Supercrítica		
20 MPa / 40 °C	CO ₂	7,07 ^{Cα} \pm 0,46
20 MPa / 60 °C	CO ₂	3,72 ^{DEβ} \pm 0,07
20 MPa / 80 °C	CO ₂	7,62 ^{Cα} \pm 0,77
30 MPa / 40 °C	CO ₂	2,11 ^{Eγ} \pm 0,11
30 MPa / 60 °C	CO ₂	3,86 ^{DEβ} \pm 0,36
30 MPa / 80 °C	CO ₂	5,62 ^{CDδ} \pm 0,08
BHT		266,4 ⁽²⁾

⁽¹⁾ média \pm desvio padrão (n=3); ⁽²⁾ Cruz (2016); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras maiúsculas indicam análise entre todos os métodos, b) letras minúsculas indicam análise entre as extrações ESC, c) símbolos gregos indicam análise entre extrações PLE e d) forma geométricas indicam análise entre extrações SOX.

Os conteúdos de compostos fenólicos reportados na literatura, por métodos convencionais de extração com o uso de hexano como solvente, variam de 6,13 \pm 0,25 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato} verificado por Khor e Wong (2014), 6,74 \pm 0,02 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato} verificado por Asghar et al. (2016) e 8,55 \pm 0,49 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato}, verificado por Muhamad et al. (2017). E com água como solvente Muhamad et al. (2017) obtiveram valores de CFT de 5,57 \pm 0,10 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato} e Asghar et al. (2016) de 27,94 \pm 0,09 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato}.

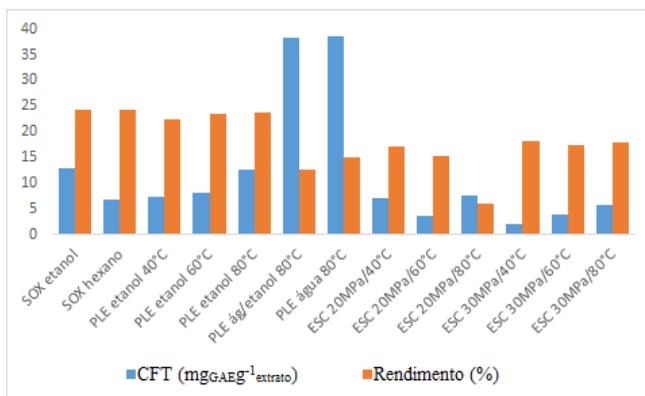
E para o solvente etanol Asghar et al. (2016) obtiveram valor de CFT de 43,42 \pm 0,06 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato}, valor este superior a todas as condições estudadas neste trabalho com o solvente etanol, e Muhamad et al. (2017) obtiveram valores de CFT para o solvente etanol de 15,45 \pm 0,11

$\text{mg}_{\text{GAEg}}^{-1}\text{extrato}$, valor próximo as condições obtidas com SOX ($12,92 \pm 0,91 \text{ mg}_{\text{GAEg}}^{-1}\text{extrato}$) e PLE 80 °C ($12,48 \pm 0,77 \text{ mg}_{\text{GAEg}}^{-1}\text{extrato}$). Com base nos dados reportados na literatura e no estudo, pode-se inferir que os solventes polares são preferíveis para a extração de compostos fenólicos, e a diferença observada entre os trabalhos reportados está relacionada as condições da matéria-prima e ao preparo das amostras

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos da semente de mamão obtidos por ESC não apresentaram tendência de variação com a mudança da pressão ou da temperatura. Os valores de CFT variaram entre $2,1 \pm 0,11$ e $7,62 \pm 0,77 \text{ mg}_{\text{GAEg}}^{-1}\text{extrato}$. Como pode ser observado na Tabela 10, os teores de compostos fenólicos totais obtidos por ESC foram inferiores aos obtidos quando utilizados solventes de maior polaridade nos métodos PLE e SOX, mostrando com isso a afinidade de composto com os solventes polares.

A Figura 22 apresenta um comparativo entre o rendimento global e o CFT de cada extração. Analisando o gráfico, percebe-se que a CFT não está diretamente ligado ao rendimento obtido durante o processo de extração, pois, o rendimento se mostrou inversamente proporcional a CFT apresentado.

Figura 22 - Comparativo entre rendimento global e CFT dos extratos da semente de mamão.



3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Método DPPH

Na tabela 11 são apresentados os resultados da atividade antioxidante dos extratos da semente de mamão obtidos pelas diferentes técnicas de extração empregadas. A atividade antioxidante pelo método DPPH foi apresentada em termos de EC_{50} (concentração efetiva) que expressa a concentração mínima necessária para inibir em 50% a atividade dos radicais livres. O composto sintético BHT foi utilizado para comparação dos resultados, sendo determinado com a mesma metodologia utilizada no presente trabalho.

Na presença de compostos antioxidantes, o radical DPPH recebe um elétron, tornando-se mais estável. Com isso, dá-se a redução da sua absorbância, e este processo pode ser avaliado visualmente, por meio da descoloração da solução contendo o DPPH e também com a utilização de espectrofotômetro. Quanto menor o valor de EC_{50} , maior a atividade antioxidante do extrato (SUCUPIRA et al., 2014). Os resultados de EC_{50} obtidos para os extratos da semente de mamão variaram entre $201,01 \pm 7,40$ a $>1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Os melhores resultados foram obtidos pela técnica de extração com PLE, com os solventes água ($768,61 \pm 10,51 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a mistura água/etanol ($201,01 \pm 7,40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Estes resultados podem ser relacionados com o teor de compostos fenólicos totais obtidos para estes mesmos extratos, que foi de $38,48 \pm 2,75 \text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$ para água e $38,33 \pm 1,78 \text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$ para água/etanol.

A mistura água/etanol proporcionou a extração de maior quantidade de compostos com atividade antioxidante comparada a utilização dos solventes água e etanol puros. O valor de EC_{50} do extrato obtido em PLE com água/etanol foi de $201 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo um valor próximo ao verificado para o antioxidante padrão BHT ($261 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), demonstrando um forte potencial antioxidante da amostra.

Tabela 11 – Atividade antioxidante dos extratos da semente de mamão pelo método DPPH, expressos em concentração efetiva a 50% (EC₅₀).

Método	Solvente	EC₅₀⁽¹⁾ (µg.mL⁻¹)
Soxhlet	Etanol	> 1000
Soxhlet	Hexano	> 1000
Extração com Líquido Pressurizado (PLE)		
40 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	> 1000
60 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	> 1000
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	> 1000
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água/Etanol	201,01 ^A ± 7,40
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água	768,61 ^C ± 10,51
Extração Supercrítica (ESC)		
20 MPa / 40 °C	CO ₂	> 1000
20 MPa / 60 °C	CO ₂	> 1000
20 MPa / 80 °C	CO ₂	> 1000
30 MPa / 40 °C	CO ₂	> 1000
30 MPa / 60 °C	CO ₂	> 1000
30 MPa / 80 °C	CO ₂	> 1000
BHT		261^B ± 12

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras maiúsculas indicam análise entre todos os métodos.

Os extratos obtidos por ESC, em todas as condições testadas apresentaram valores de EC₅₀ superiores a 1000 µg.mL⁻¹. Neste caso, pode-se assumir que nas condições de pressão e temperatura especificadas, os extratos não apresentaram atividade antioxidante detectável pelo método DPPH, e também, a baixa afinidade dos compostos polares antioxidantes com o CO₂ pode ter acarretado esses valores.

O mesmo comportamento foi observado para as diferentes condições de PLE com etanol, onde as variações de temperatura testadas não apresentaram atividade detectável. Além disso, para o método SOX os valores de EC₅₀ também foram superiores a 1000 µg.mL⁻¹.

Khor e Wong (2014) avaliaram a atividade antioxidante da semente de mamão dos extratos obtidos por extração líquido-líquido com os solventes hexano e acetado de etila pelo método DPPH, e observaram melhores resultados de EC_{50} para o solvente mais polar, o acetado de etila ($25,97 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$), e para o solvente hexano encontraram valores de EC_{50} de $143,11 \pm 3,22 \mu\text{g/ml}$.

3.5.2 Método descoloração do sistema β -caroteno

No método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o β -caroteno sofre descoloração na ausência de um composto antioxidante, resultando na redução da leitura espectrofotométrica da absorbância da solução, num dado tempo de reação. Isto ocorre devido à formação de radicais livres a partir da oxidação do β -caroteno e do ácido linoleico (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2014).

Na Tabela 12, são apresentados os valores da atividade antioxidante para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expresso em percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação. O composto sintético BHT foi utilizado para comparação dos resultados.

A atividade antioxidante dos extratos da semente de mamão variou de $12,50 \pm 1,22$ a $71,29 \pm 1,18$ %, sendo o maior valor obtido pelo método de extração PLE com a mistura água/etanol como solvente, sendo este valor estatisticamente igual ao obtido por PLE com água como solvente ($70,25 \pm 0,49$ %). Ao comparar os resultados obtidos com o antioxidante BHT, observa-se que as atividades antioxidantes dos extratos da semente de mamão são inferiores à do antioxidante sintético.

Analisando os extratos obtidos por PLE com etanol como solvente, observa-se que o aumento da temperatura, 40 para 80 °C, resultou no aumento da atividade antioxidante, $12,50 \pm 1,22$ para $36,44 \pm 2,54$ %, respectivamente. Resultados estes, inferiores aos obtidos pela mesma técnica com água e água/etanol como solventes.

Tabela 12 - Atividade antioxidante dos extratos da semente de mamão através do método descoloração do sistema β -caroteno, expresso em percentual de atividade antioxidante (%AA).

Método	Solvente	% AA ⁽¹⁾
Soxhlet	Etanol	25,44 ^{DEF□} ± 2,26
Soxhlet	Hexano	12,85 ^{G◇} ± 1,01
Extração com Líquido Pressurizado (PLE)		
40 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	12,50 ^{Gd} ± 1,22
60 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	24,65 ^{DEFc} ± 2,47
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	36,44 ^{Cb} ± 2,54
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água/Etanol	71,29 ^{Ba} ± 1,18
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água	70,25 ^{Ba} ± 0,49
Extração Supercrítica (ESC)		
20 MPa / 40 °C	CO ₂	29,34 ^{Dα} ± 1,34
20 MPa / 60 °C	CO ₂	21,29 ^{Fγ} ± 2,07
20 MPa / 80 °C	CO ₂	27,66 ^{Eαβ} ± 1,48
30 MPa / 40 °C	CO ₂	24,29 ^{DEFαβγ} ± 2,32
30 MPa / 60 °C	CO ₂	22,61 ^{EDβγ} ± 1,66
30 MPa / 80 °C	CO ₂	21,01 ^{Fγ} ± 2,11
BHT		97,88 ^A ± 0,7

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras maiúsculas indicam análise entre todos os métodos, b) letras minúsculas indicam análise entre as extrações PLE, c) símbolos gregos indicam análise entre extrações ESC e d) forma geométricas indicam análise entre extrações SOX.

Valores de atividade antioxidante entre 21,01±2,11 e 29,34±1,34% foram verificados para as extrações com CO₂ supercrítico (ESC). O melhor resultado encontrado para esse método foi na condição de 20 MPa e 40 °C (29,34±1,34 %), resultado esse estatisticamente igual aos obtidos pelas condições a 20 MPa a 80 °C (27,66±1,48 %) e 30 MPa a 40 °C (24,29± 2,32 %).

Observou-se que o aumento das condições de operação do sistema, pressão e temperatura, acarretaram em valores inferiores de atividade

antioxidante. Este comportamento também foi encontrado por Oliveira (2015) em extratos supercríticos de semente de maracujá que observou redução dos valores de atividade antioxidante quando há uma variação na pressão mantendo a temperatura constante e quando há um aumento na temperatura em uma condição isobárica.

Os resultados obtidos pela extração SOX apresentaram valores de atividade antioxidante inferiores aos métodos ESC e PLE, quando comparados com solvente de polaridade semelhantes. Quando comparada a atividade obtida por SOX etanol com as extrações PLE com etanol a 60 e 80 °C, observa-se que os valores obtidos por PLE foram maiores. E ao comparar os valores de SOX hexano com as extrações ESC, a atividade antioxidante foi inferior a todas as condições analisadas por ESC.

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Na Tabela 13 são apresentados os resultados da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de semente de mamão obtidos por Soxhlet, PLE e ESC frente a bactéria Gram-negativa (*E. coli*), a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e o fungo (*C. albicans*).

De acordo com Sartoratto e Machado (2004), Duarte et al. (2007) e Wang et al. (2008) é possível classificar os materiais como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de CMI apresentado pelos seus extratos. Comumente, a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e fraco inibidor para CMI acima de 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Como pode ser observado na Tabela 13, vários extratos apresentaram concentrações mínimas inibitórias inferiores a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que permite classificá-los como fortes inibidores. Destaca-se os extratos obtidos por ESC, os quais, todos os resultados se mostraram como fortes inibidores frente a todos os micro-organismos testados. Para a bactéria *E. coli* as condições de ESC a 20 MPa a temperaturas de 40 e 60 °C foram mais efetivas, para a bactéria *S. aureus* a condição mais efetiva de ESC foi a 30 MPa a 80 °C. Já para o fungo *C. albicans* a condição de ESC a 20 MPa a 80 °C foi a melhor. Esse comportamento demonstra que a extração supercrítica possibilita a obtenção de extratos com maior atividade antimicrobiana comparada a outras técnicas de extração.

Não foi possível observar uma tendência clara de CMI com a modificação das condições de operação, pressão e temperatura, para as condições ESC, mas como comentado anteriormente, todas as condições

estudas se mostraram como fortes inibidoras frente aos micro-organismos testados. Logo a extração ESC mostrou-se como uma técnica eficaz para a extração de compostos bioativos da semente de mamão.

Orhue e Momoh (2013) observaram que a atividade antimicrobiana da semente de mamão depende do solvente utilizado no processo de extração. Em solventes orgânicos como o éter de petróleo, o extrato das sementes de *C. papaya* se mostrou mais eficiente do que em solventes aquosos, como a água. Dos extratos estudados, o éter de petróleo foi o mais ativo com CMI de 2 mg.mL^{-1} , e o CMI obtido com água e com etanol apresentaram resultados de 30 mg.mL^{-1} e 28 mg.mL^{-1} , respectivamente. Ao comparar os resultados obtidos por Orhue e Momoh (2013) com o solvente apolar éter de petróleo ($2000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), observa-se que o resultado obtido pelos autores é muito superior a todas as condições ESC apresentadas nesses estudo, demonstrando com isso a seletividade da extração supercrítica frente a compostos com atividade antimicrobiana.

Analisando as condições de PLE estudadas, observa-se que todas as condições aplicadas frente a bactéria *E. coli* mostram-se como fortes inibidores, já para a bactéria *S. aureus* os resultados classificam o extrato da semente de mamão como moderado inibidor para todas as condições. Além disso, para o fungo *C. albicans* os extratos obtidos com etanol como solvente se mostraram como fortes inibidores, sendo as condições de 40 e 60 °C com melhores resultados.

Tabela 13 - Concentração mínima inibitória dos extratos da semente de mamão contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Método	Solvente	Concentração Mínima Inibitória ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ⁽¹⁾		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Soxhlet	Etanol	967,5 ^{A□}	> 967,5	> 967,5
Soxhlet	Hexano	450,0 ^{B◊}	900,0 ^B	225,0 ^C
Extração com Líquido Pressurizado				
40 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	8,1 ^{GHd}	517,5 ^{Dc}	129,4 ^{Dc}
60 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	32,3 ^{Db}	517,5 ^{Dc}	129,4 ^{Dc}
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	39,4 ^{Ca}	630,0 ^{Cb}	315,0 ^{Bb}
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água/Etanol	14,9 ^{Ec}	> 954,0	> 954,0
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água	7,3 ^{He}	936,0 ^{Aa}	936,0 ^{Aa}
Extração Supercrítica				
20 MPa / 40 °C	CO ₂	7,5 ^{He}	120,0 ^{Gγ}	60,0 ^{Fγ}
20 MPa / 60 °C	CO ₂	7,7 ^{Hδ}	123,7 ^{Gγ}	61,9 ^{Fγ}
20 MPa / 80 °C	CO ₂	8,8 ^{FGβ}	70,3 ^{Hδ}	30,9 ^{Gδ}
30 MPa / 40 °C	CO ₂	9,1 ^{Fα}	146,2 ^{Fβ}	73,1 ^{Eβ}
30 MPa / 60 °C	CO ₂	8,1 ^{GHγ}	258,7 ^{Eα}	64,7 ^{Fγ}
30 MPa / 80 °C	CO ₂	8,1 ^{GHγ}	64,7 ^{Iε}	129,4 ^{Dα}
Antibiótico		0,6 ^I	9,2 ^J	> 74,0

⁽¹⁾ média (n=2); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que: a) letras maiúsculas indicam análise entre todos os métodos, b) letras minúsculas indicam análise entre as extrações PLE, c) símbolos gregos indicam análise entre extrações ESC e d) forma geométricas indicam análise entre extrações SOX

Entre as condição PLE destaca-se a condição com água como solvente a 80 °C que apresentou CMI para *E. coli* de 7,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e as condições com etanol nas temperaturas de 40 e 60 °C, frente a *S. aureus* e *C. albicans*.

Al-Judaibi (2015) avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos da semente de mamão contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O autor verificou que os extratos obtidos por extração por agitador orbital

(shaker) com o solvente etanol foi mais efetivo para *E. coli* e *S. aureus*, em comparação com a água como solvente.

Eke; Augustine e Ibrahim (2014) também descrevem atividade antimicrobiana da semente de mamão com o uso de solvente etanol e clorofórmio contra *E. coli*, *Bacillus cerus* e *P. aeruginosa*, sendo observado melhores resultados para *E. coli* com o uso do solvente clorofórmio quando comparado com etanol.

Analisando os extratos obtidos por SOX na Tabela 13, observa-se que o método de extração SOX apresentou bons resultados, mas quando comparados com os outros métodos analisados, apresentam resultados inferiores, possivelmente devido à degradação de compostos com a exposição a altas temperaturas por longos períodos de tempo. Destaca-se para esse método o extrato obtido com o solvente não polar, hexano, que apresentou classificação de forte inibidor para *E. coli* e *C. albicans*.

Outros autores também destacam a atividade antimicrobiana da semente de mamão. Muhamad et al. (2017) encontrou valores de CMI para *E. coli* com hexano de 11,25 mg.mL⁻¹ e CMI de 11,25 mg.mL⁻¹ com etanol. He et al. (2017) observou atividade antimicrobiana frente ao fungo *C. albicans* por hidrodestilação, encontrando valores de CMI de 16 µg.mL⁻¹. Zhang e Chen (2017) relatam que a atividade de inibição do extrato da semente de mamão frente ao fungo *C. albicans*, aumenta com o aumento da concentração do extrato, observado assim, para a concentração de 18 µg.mL⁻¹ inibição de 95,08%.

Pode-se observar que os extratos da semente de mamão foram mais efetivos para a bactéria *E. coli*, seguido do fungo *C. albicans* e da bactéria *S. aureus*. Essa característica observada é muito importante, pois indica um potencial de aproveitamento dos resíduos da semente de mamão para controle de crescimento microbiano, visto que a indústria apresenta dificuldades de produzir novas classes de substâncias com atividade contra as bactérias Gram-negativas, pois estes micro-organismos são mais resistentes que os Gram-positivos (LEWIS; AUSUBEL, 2006).

A maior resistência das bactérias Gram-negativas provavelmente é devida a diferenças na parede celular dessas bactérias. A parede celular das bactérias Gram-negativas apresenta uma sofisticada barreira à permeabilidade quando comparada à parede simples das bactérias Gram-positivas, que apresenta caráter lipofílico e menor resistência à penetração de compostos (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

Com base nesses resultados, pode-se verificar que tanto os extratos obtidos com solventes polares como apolares apresentam atividade antimicrobiana. No entanto, as frações apolares parecem ser mais relevantes e apresentam maiores atividades. E os resultados indicam que

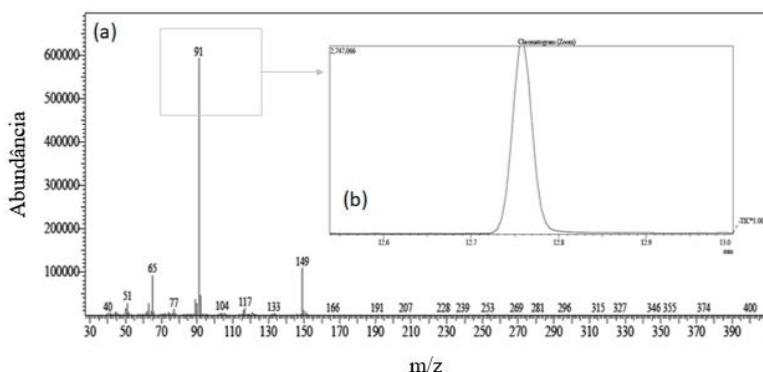
a semente de mamão é um resíduo promissor para a obtenção de compostos com forte atividade antimicrobiana.

3.7 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS

A determinação do perfil químico dos extratos da semente de mamão foi realizada apenas para alguns extratos, selecionados em função dos resultados de rendimento e atividades antioxidantes e antimicrobianas. Assim, os extratos selecionados foram: Soxhlet com etanol, Soxhlet com hexano, PLE com água a 80 °C, PLE com água/etanol a 80 °C, PLE com etanol a 80 °C, ESC a 20 MPa e 80 °C e ESC a 30 MPa a 40 °C.

A partir da análise da composição química por GC-EM para as condições citadas, observou-se que o isotiocianato de benzila (BITC) foi identificado como o principal componente do extrato de semente de mamão. A Figura 23(a) apresenta o cromatograma da condição ESC a 30 MPa e 40 °C e observa-se que isotiocianato de benzila é o composto majoritário da amostra. A Figura 23 (b) mostra o zoom do maior pico de BITC ($t_r = 12,7$ min) obtido a partir do extrato de semente de mamão. Barroso et al. (2016), Corrêa (2011) Tumpa, Hossain e Ishika (2015) também encontraram isotiocianato de benzila como o principal constituinte da semente de mamão.

Figura 23 - CG-EM para a condição de 30 MPa e 40 ° C: (a) CG-EM do isotiocianato de benzila (componente majoritário); (b) Zoom do maior pico de BITC- obtido a partir do extrato de sementes de mamão.



De acordo com Clarke (2010), o isotiocianato de benzila (BITC) é um composto bioativo catalisado pela enzima mirosinase, que cliva a glicose do glicosinolato presente nas sementes de mamão. Este composto pode ser tóxico contra fungos, bactérias e insetos, e estão relacionados principalmente à atividade antimicrobiana. As proporções destes produtos variam dependendo do tipo de glicosinolato, espécies de plantas e condições de hidrólise tais como temperatura, pH, concentração de íons metálicos, presença de proteínas e cofactores.

O BITC é uma substância bioativa presente na semente de mamão, sendo estudada entre diferentes áreas devido à sua ampla faixa de aplicação. As aplicações de BITC variaram do relaxamento vascular (WILSON et al., 2002) à inibição da proliferação do câncer (LUND et al., 2001). A atividade anti-helmíntica deste composto também é muito estudada, sendo essa atividade dependente do tratamento que a semente de mamão é submetida (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001).

Após identificação do composto BITC como majoritário, realizou-se a quantificação dos extratos selecionados da semente de mamão, obtidos pelas técnicas de extração SOX, PLE e ESC, apresentados na Tabela 14.

A presença de BITC foi detectada em todas as amostras extraídas, tendo a maior concentração a condição extraída por ESC a 20 MPa a 80°C, com 12 %, sendo esta concentração de BITC muito superior a todas as outras condições testadas e relacionada com a atividade antimicrobiana detectada pelo método de CMI. Para a condição de maior concentração de BITC (20 MPa/80 °C) o extrato apresentou características de forte inibidor frente aos três micro-organismos testados.

Tabela 14 – Quantificação do composto majoritário presente no óleo extraídos da semente de mamão por diferentes métodos de extração.

Método	Solvente	BITC (%)
Soxhlet	Etanol	4,82
Soxhlet	Hexano	4,13
Extração com Líquido Pressurizado (PLE)		
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Etanol	4,17
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água/Etanol	4,82
80 °C/3 mL.min ⁻¹	Água	1,69
Extração Supercrítica (ESC)		
20 MPa / 80 °C	CO ₂	12,36
30 MPa / 40 °C	CO ₂	1,31

As extrações SOX e PLE apresentaram valores muito próximos de BITC, sendo observando entre as extrações SOX um maior valor de BITC para o solvente etanol (4,82 %), sendo este valor igual ao obtido para a extração PLE com a mistura água/etanol como solvente (4,82 %).

Não é possível comparar as extrações ESC frente ao BITC, pois as condições de operação do sistema são diferentes, mas Barroso et al. (2016) observaram que o incremento na temperatura do processo de extração com ESC, resultou em maiores concentrações de BITC, sendo isso observado nesse estudo.

Barroso et al (2016) obteve valores de 7 % para a condição ESC à 20 MPa, 80 °C e 180 min de extração, valor este inferior ao obtido neste estudo. A diferença observada, pode estar relacionada ao tempo de extração, sendo neste estudo aplicado 240 min, e também as características da planta, como cultivo.

Todos os métodos de extração se mostram eficientes na obtenção do composto BITC, com destaque a extração ESC que apresentou a maior composição do composto majoritário. Consequentemente forte atividade antimicrobiana foi verificada para os extratos da semente de mamão, sendo está associada a presença do composto BITC.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo avaliou-se o efeito de diferentes técnicas de extração frente ao rendimento e as atividades biológicas do extrato da semente de mamão, sendo observado que o uso da semente de mamão como matéria-prima para obtenção de extratos bioativos é promissor.

Os extratos obtidos por extrações Soxhlet apresentaram rendimentos estatisticamente iguais as extrações PLE com etanol como solvente, e resultados superiores as extrações ESC e PLE com água e água/etanol. O maior rendimento de extração para a semente de mamão ($24,32 \pm 0,67\%$) foi obtido por SOX com hexano.

Embora as extrações PLE com água e água/etanol tenham apresentado baixos rendimentos, seus resultados para os ensaios de CFT e atividade antioxidante foram superiores aos outros métodos. Os solventes de maior polaridade apresentaram maiores conteúdos de composto fenólicos e atividade antioxidante. A extração supercrítica apresentou aumento da atividade antioxidante, pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, com a diminuição da pressão de operação do sistema.

Na avaliação da atividade antimicrobiana todos os extratos obtidos pelas diferentes técnicas apresentaram ótimos resultados frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, sendo a maioria dos extratos classificados como forte inibidores (CMI até $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os ensaios por ESC apresentaram melhores resultados em comparação as outras técnicas. Os extratos apresentaram forte atividade antimicrobiana, especialmente frente à bactéria *E. coli*, com valores de concentração mínima inibitória de $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o extrato de ESC na condição 20 MPa a 40°C . A atividade antimicrobiana está associada à presença do composto BITC.

O óleo da semente de mamão pode representar uma fonte valiosa de compostos naturais, especialmente o isotiocianato de benzila, não só para aplicações biomédicas ou farmacêuticas, mas também para serem utilizados como ingredientes alimentares. Necessitando para essas aplicações maiores estudos.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os extratos da semente de mamão apresentam tanto atividades antioxidantes como antimicrobiana. Além disso, verifica-se que a técnica de extração por PLE está relacionada a obtenção de compostos de maior polaridade e a técnica de extração ESC para obtenção de compostos de menor polaridade. Desta forma, a integração dos métodos de extração permite a obtenção de diversos produtos.

Capítulo 5

APLICAÇÃO DE PROCESSOS INTEGRADOS PARA VALORIZAÇÃO DE EXTRATOS DA SEMENTE DE MAMÃO

1 INTRODUÇÃO

O mamão é uma planta amplamente conhecida e presente em regiões tropicais e subtropicais. A fruta apresenta um amplo espectro fitoquímico, responsável pelas propriedades farmacológicas e nutricionais. Com isso, há um alto consumo dessa fruta, resultando na geração de resíduos na forma de casca e semente.

Sabendo do grande potencial bioativo presente na semente de mamão, percebe-se uma grande oportunidade no estudo de processos inovadores de extração, tais como a extração com fluido supercrítico (ESC) e extração com líquido pressurizado (PLE), para obtenção de extratos com alto potencial antioxidante e antimicrobiano.

Porém, a extração com fluido supercrítico usando CO₂ como solvente é uma técnica normalmente aplicada para a recuperação de compostos apolares, enquanto que a extração com líquido pressurizado é mais adequada para compostos polares (WIJNGAARD et al., 2012). Assim, é importante usar métodos para a recuperação de todos os compostos de interesse da planta, portanto a integração de processos de extração como ESC e PLE pode melhorar a eficiência de recuperação de compostos e consequente valorização da matéria-prima.

A recuperação dos compostos acima mencionados pode levar a uma obtenção de uma variedade de produtos comerciais, quer seja para insumos de processos secundários, substitutos para ingredientes, ou ainda como novos produtos. Além disso, os processos de extração integrada são inseridos no conceito de bio-refinaria, que utiliza toda a matéria-prima através de processos combinados. No entanto, existem grandes desafios técnicos e econômicos que devem ser estudados para aplicação de bio-refinarias em grande escala (TEMELLI e CIFTCI, 2015).

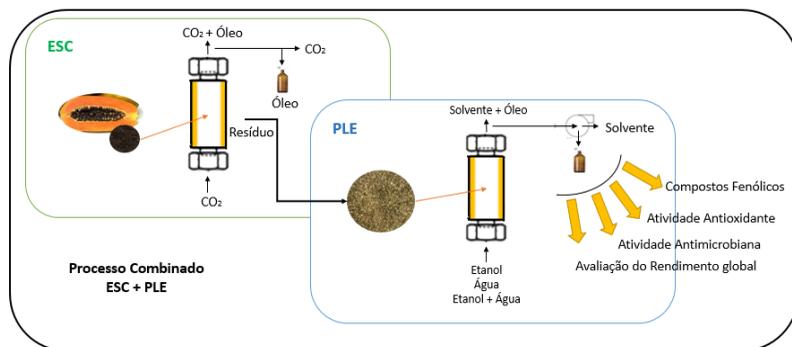
Com a finalidade de aproveitamento total da matéria-prima vegetal, este Capítulo tem como objetivo integrar dois processos de extração a alta pressão, a ESC com CO₂ supercrítico e o PLE com uso de água, etanol e água/etanol como solventes, para obtenção de extratos com alto potencial biológico. Sendo a semente de mamão utilizada na extração ESC e o resíduo desse processo utilizado como alimentação para a extração PLE, com isso obtém-se com esses processos dois produtos com características diferentes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão relatados os métodos utilizados para a extração com processos integrados para obtenção do óleo da semente de mamão e as metodologias aplicadas para avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e composição química dos extratos obtidos. Um resumo gráfico desse Capítulo é apresentado na Figura 24.

Os ensaios de extração e atividade antioxidante foram conduzidos no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os ensaios de atividade antimicrobiana foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, e as análises de composição química dos extratos foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Figura 24 - Resumo gráfico do Capítulo 5.



Fonte: a autora.

2.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

As sementes de mamão utilizadas nesse estudo foram gentilmente cedidas pela empresa Comercial Kazmierski de Jaraguá do Sul - Santa Catarina. E são provenientes de mamões do cultivar Formosa, produzidos no estado da Bahia - Brasil.

As amostras foram higienizadas em água corrente, secas em estufa de circulação de ar (DeLeo, Porto Alegre/RS - Brasil) a temperatura de 45 °C durante 24 horas. Em seguida, as sementes foram trituradas em moinho de facas, tipo Willey (DeLeo, Porto Alegre/RS - Brasil),

fracionadas em sacos de polietileno e armazenadas em congelador doméstico (Consul, Joinville/SC - Brasil) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA (ESC)

O método dinâmico de extração foi empregado para os experimentos de determinação do rendimento global. A unidade de extração e o procedimento experimental de extração estão descritos nos itens 2.6.1 e 2.6.2 do Capítulo 3 deste trabalho, respectivamente.

2.2.1 Determinação do rendimento global (X_0)

Conforme abordado no item 2.6.3 do capítulo 3, na equação 4, os rendimentos foram calculados através da razão entre a massa de extrato obtida e a massa de matéria-prima utilizada na extração.

Com o objetivo de avaliar o potencial do resíduo obtido na extração ESC, adotou-se uma condição fixa de extração supercrítica para obtenção desse resíduo para posterior análise em diferentes condições de operação de extração PLE. O ensaio ESC foi conduzido com CO_2 (White Martins, Joinville/SC - Brasil) nas condições de 30 MPa, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e vazão de $0,7\text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$, durante 4 horas de extração. Foram utilizados 15 g de amostra para o preenchimento do leito de extração, e o espaço restante da coluna foi preenchido com esferas de vidro.

A condição selecionada para esse estudo foi determinada de acordo com o estudo realizado no capítulo anterior desse trabalho, capítulo 4. Dentre as condições de operação ESC, o ensaio realizado a 30 MPa e $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou melhor rendimento em comparação as outras condições ESC já estudadas, podendo-se assim esgotar todo o extrato obtido na semente ao integrar esse resíduo a outro processo de extração.

Os ensaios de rendimento global foram realizados em duplicata, sendo o extrato obtido nesta operação empregado para as análises de atividades biológicas, e o resíduo obtido na extração ESC aplicado como matéria-prima para o processo de extração PLE.

2.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

O método dinâmico de extração foi utilizado para os experimentos. A unidade de extração e o procedimento experimental de extração com

líquido pressurizado são descritos nos itens 2.4.1 e 2.4.2 do Capítulo 4 deste trabalho, respectivamente.

2.3.1 Determinação do rendimento global (X_0)

Os ensaios de PLE foram realizados em diferentes condições de operação (temperatura, tempo e solvente) com objetivo de avaliar a influência destas condições no rendimento global de extração com pressão fixa em 10 MPa. As faixas estudadas para as variáveis temperatura, tempo e solvente de extração, foram definidas com base nos estudos dos capítulos anteriores deste trabalho. Na Tabela 15 são expressos os valores reais e codificados das variáveis estudadas.

Tabela 15 - Valores reais e codificados dos fatores estudados para o planejamento fatorial.

Variáveis	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Temperatura	40 °C	60 °C	80 °C
Tempo	47 min	57 min	67 min
Solvente	Água	Água/Etanol	Etanol

Para avaliar a influência das variáveis independentes - temperatura, solvente e tempo de extração - sobre as variáveis dependentes rendimento e compostos fenólicos (CFT), foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios, apresentados na Tabela 16. O método de planejamento fatorial foi utilizado para identificar a significância dos parâmetros de entrada (tempo, temperatura e solvente) frente os parâmetros de resposta (rendimento e CFT). O planejamento foi realizado usando o software Statistica 7.0, versão Ultimate Academic.

Tabela 16 - Matriz com valores reais e codificados do planejamento fatorial $2^3 + 3$ pontos centrais para a extração PLE da semente de mamão.

Ensaio	Temperatura	Tempo	Solvente
1	40 (-)	47 (-)	Água (-)
2	80 (+)	47 (-)	Água (-)
3	40 (-)	67 (+)	Água (-)
4	80 (+)	67 (+)	Água (-)
5	40 (-)	47 (-)	Etanol (+)
6	80 (+)	47 (-)	Etanol (+)
7	40 (-)	67 (+)	Etanol (+)
8	80 (+)	67 (+)	Etanol (+)
9	60 (0)	57 (0)	Água/Etanol (0)
10	60 (0)	57 (0)	Água/Etanol (0)
11	60 (0)	57 (0)	Água/Etanol (0)

Optou-se pelo uso do planejamento fatorial para selecionar as melhores condições de extração PLE, com o resíduo obtido pela extração ESC, para obtenção de extratos com alto rendimento e conteúdo de compostos fenólicos, e posterior continuação do estudo frente a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos selecionados pelo planejamento.

Condições fixas de pressão, vazão e massa de amostra foram utilizadas, sendo pressão de 10 MPa, vazão de solvente de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e 4 g de amostra. O preenchimento do leito de extração foi realizado com esferas de vidro e amostra homogeneizadas, para evitar o empacotamento do leito e as extremidades da coluna foram revestidas com algodão, para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata e os extratos obtidos passaram por processo de eliminação do solvente, em rotaevaporador (Fitason Modelo 802, São Paulo/SP - Brasil). Foram avaliadas a atividade antioxidante e antimicrobiana e a fração volátil por cromatografia gasosa dos extratos selecionados pelo planejamento.

2.4 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e encontra-se descrita no item 2.7 do Capítulo 3 deste trabalho. Todos os extratos obtidos pelas extrações do planejamento fatorial de PLE foram avaliadas.

As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de matéria seca ($\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante *in vitro* dos extratos da semente de mamão foram avaliados por duas técnicas distintas, método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

O método do radical DPPH encontra-se descrito no item 2.6.1 do Capítulo 4, deste trabalho. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados encontrados para a concentração efetiva (EC_{50}) foram expressos com média \pm desvio padrão.

O método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico encontra-se descrito no item 2.6.2 do Capítulo 4, deste trabalho. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados da atividade antioxidante (AA%) foram calculados pela Equação 8, apresentada neste mesmo item, e expressos com média \pm desvio padrão.

Os extratos selecionados pelo planejamento fatorial foram avaliados frente a atividade antioxidante.

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos selecionados pelo planejamento fatorial foram avaliadas frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

Os extratos foram dissolvidos em uma solução de água 10 % de DMSO esterilizado. E a metodologia aplicada para determinação da CMI encontra-se descrita no item 2.7.1, do Capítulo 4 deste trabalho.

Os extratos selecionados pelo planejamento fatorial foram avaliados frente a atividade antimicrobiana, sendo conduzidos em duplicata e a menor concentração em que a alteração de cor ocorreu foi

tomada como o valor de CMI, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos da semente de mamão foi realizada no do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sendo a metodologia descrita no item 2.8 do capítulo 4, deste trabalho.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de conteúdo de compostos fenólicos totais e, atividade antioxidante. Sendo esses resultados avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA). Ao serem verificadas diferenças significativas ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO POR ESC

A condição ESC de 30 MPa e 40 °C, foi selecionada para o processo de extração sequencial, pois apresentou no estudo dos capítulos anteriores melhores resultados de rendimento. Na Tabela 17, são apresentados os resultados de rendimento e das atividades biológicas do extrato da semente de mamão.

O rendimento obtido para a semente de mamão na condição ESC de 30 MPa e 40 °C foi de 18,08 %, valor este considerado alto ao compararmos com outros estudos de sementes de produtos vegetais, tais quais de semente de butiá com rendimento de 12,6 % (CRUZ et al., 2017) e semente de chia com rendimento de 9,3 % (GUINDANI et al., 2016), ambos obtidos nas mesmas condições deste estudo.

Tabela 17 - Atividades biológicas do extrato da semente de mamão, obtido por ESC.

ESC 30 MPa e 40 °C	
Rendimento ⁽¹⁾ (%)	18,08 ± 0,32
CFT ⁽²⁾ (mg _{GAE} .g ⁻¹ _{extrato})	2,11 ± 0,11
EC ₅₀ ⁽²⁾ (µg.mL ⁻¹)	>1000
% AA ⁽²⁾	24,29 ± 2,32
CMI ⁽³⁾ <i>E. coli</i> (µg.mL ⁻¹)	9,1
CMI ⁽³⁾ <i>S. aureus</i> (µg.mL ⁻¹)	146,2
CMI ⁽³⁾ <i>C. albicans</i> (µg.mL ⁻¹)	73,1

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=2); ⁽²⁾ média ± desvio padrão (n=3); ⁽³⁾ média (n=2).

Ao analisar os resultados obtidos para o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, tanto pelo método do radical DPPH e pela descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico, observa-se valores com baixo CFT e baixa capacidade antioxidante. Esse comportamento é justificado pela baixa afinidade do CO₂ com os compostos polares antioxidantes.

De acordo com Sartoratto e Machado (2004), Duarte et al. (2007) e Wang et al. (2008) para CMI até 500 µg.mL⁻¹ o extrato é considerado como forte inibidor. Como pode ser observado na Tabela 17, a atividade antimicrobiana obtida para o extrato ESC na condição estudada, apresentou característica de extrato de forte inibição frente aos microorganismos testados, *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Esse comportamento demonstra que a extração supercrítica possibilita a obtenção de extratos com maior atividade antimicrobiana comparada a outras técnicas de extração.

As técnicas de extração que empregam fluidos supercríticos (ESC) ou fluidos subcríticos (PLE) apresentam algumas vantagens quando comparadas às técnicas de extração convencionais. Entre essas vantagens, a seletividade e a baixa geração de resíduos de solventes são mais atraentes. No entanto, algumas desvantagens podem ocorrer em relação à solubilidade dos compostos alvo. Para superar este problema e aumentar a eficiência de extração, alguns autores sugerem extrações sequenciais, nas quais diferentes técnicas de extração são aplicadas na mesma matéria-prima (VINGANO E MARTINEZ, 2015).

Considerando os resultados obtidos pela extração ESC, observa-se que o extrato apresentou ótimo comportamento para a atividade antimicrobiana, porém, para a atividade antioxidante os resultados demonstram baixa afinidade do solvente (CO₂) com os compostos antioxidantes. Sendo assim, o resíduo obtido no processo de extração ESC foi utilizado como matéria-prima para a extração PLE em diferentes condições de operação.

3.2 PLE APLICADA AO RESÍDUO DA ESC

Como verificado no item anterior, os extratos obtidos pela ESC apresentam características que favorecem a atividade antimicrobiana. Com o intuito de melhorar a capacidade antioxidante dos extratos e um melhor aproveitamento da matéria-prima, realizou-se um planejamento fatorial para selecionar as melhores condições de extração PLE, frente as respostas de rendimento e conteúdo de compostos fenólicos. Na Tabela 18 são apresentando os resultados obtidos.

Tabela 18 - Rendimento de extração e CFT obtido em diferentes condições experimentais por PLE para os extratos do resíduo da semente de mamão.

Ensaio	T (°C)	t (min)	Solvente	Rendimento (%)	CFT (mg _{GAE} .g ⁻¹ extrato)
1	40	47	Água	22,74	25,65 ± 1,41
2	80	47	Água	16,99	33,97 ± 1,32
3	40	67	Água	20,81	35,41 ± 3,09
4	80	67	Água	17,28	40,81 ± 1,16
5	40	47	Etanol	1,58	28,97 ± 1,33
6	80	47	Etanol	4,50	31,01 ± 0,90
7	40	67	Etanol	1,57	32,64 ± 2,38
8	80	67	Etanol	4,86	29,38 ± 0,86
9	60	57	Água/Etanol	16,42	38,82 ± 1,77
10	60	57	Água/Etanol	16,38	38,08 ± 2,00
11	60	57	Água/Etanol	17,89	38,63 ± 1,53

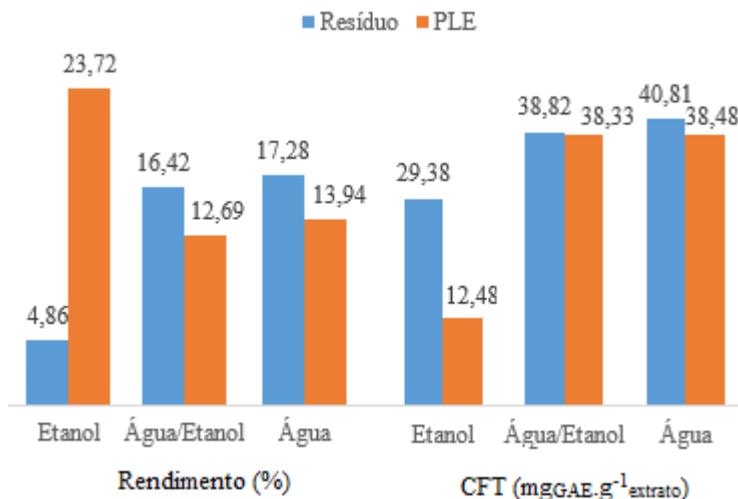
Os resultados mostram que o rendimento dos diferentes tratamentos de extração variaram de 1,57 a 22,74 %. Sendo os maiores valores observados para os tratamentos que utilizaram água como solvente de extração.

Para o solvente água, o aumento da temperatura resultou na diminuição do rendimento, porém observa-se um incremento no conteúdo de compostos fenólicos, e para o etanol na condição de 47 min, o aumento da temperatura resultou no aumento do rendimento e de CFT.

O rendimento máximo de extração da semente de mamão obtido no ensaio 1 (22,74 %) foi maior que o rendimento encontrado por Asghar et al. (2016) 12,84 % e Muhamad et al. (2017) 0,04 %, para o mesmo solvente com a matéria-prima integral. Mostrando com isso, que mesmo após a matéria-prima ter sofrido um processo de extração, o resíduo apresenta compostos a serem extraídos.

O conteúdo de compostos fenólicos variou de 25,65 a 40,81 $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$. Sendo os maiores valores observados para os tratamentos utilizando água como solvente. Um fator importante a ser observado no conteúdo de compostos fenólicos é que a realização da extração ESC na semente de mamão antes da extração PLE favoreceu o aumento do CFT. Na Figura 25 é possível observar esse comportamento.

Figura 25 – Comparativo do rendimento e do CFT entre as extrações PLE: Resíduo (semente com o pré-tratamento ESC) e PLE (semente sem o pré-tratamento ESC).



Ao analisarmos os valores obtidos para CFT do resíduo, amostra da semente de mamão que sofreu um processo de extração ESC antes da extração PLE, observa-se que para todos os solventes estudados o valor de CFT aumentou ao comparar com os valores da semente integral extraída por PLE. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato, de que, a extração ESC removeu todos os compostos apolares, possibilitando assim na extração PLE melhor interação entre o solvente e CFT. Isso demonstra que a extração com ESC além de remover o óleo presente na amostra pode ser utilizada como um pré-tratamento para o PLE.

O mesmo comportamento foi observado para a resposta rendimento, no qual o pré-tratamento da matéria-prima com ESC favoreceu a extração de maiores compostos. Observa-se que para o solvente etanol o valor obtido após o tratamento foi menor, fato este justificado por Morrison e Boyd (1981) que reportam que o etanol, apesar de ser um solvente que solubiliza preferencialmente substâncias polares, pode também extrair lipídios, conferindo maior rendimento às extrações.

De uma forma geral constata-se que a extração ESC remove todos os compostos com características apolares (óleo) e a extração PLE os compostos polares, sendo que ao realizar um tratamento nas amostras com ESC antes do processo PLE obtém-se um ganho em rendimento e CFT. Destacando com isso a importância do processo sequencial, onde uma técnica remove um composto ativo de afinidade e a outra técnica outro.

Por meio da análise pelo software Statistica 7.0, foi possível identificar que entre as variáveis independentes estudadas, o tipo de solvente foi a variável que apresentou efeito significativo (p-valor inferior 0,05) frente as respostas estudadas. Sendo assim, três ensaios foram selecionados para continuação dos estudos de atividades biológicas, levando em consideração o solvente.

Os ensaios selecionados foram 4 (80 °C, 67 min e água como solvente), 8 (80 °C, 67 min e etanol como solvente) e 9 (60 °C, 57 min e água/etanol como solvente).

3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA SEMENTE DE MAMÃO POR PROCESSOS INTEGRADOS

Na Tabela 19 são apresentando os resultados da atividade antioxidante dos extratos obtidos da semente de mamão pela extração ESC e pelos extratos obtidos do processo integrado ESC e PLE, sendo os extratos do processo integrado provenientes do resíduo da matéria-prima

utilizada no processo ESC e extraídos por PLE. A atividade antioxidante pelo método DPPH foi apresentada em termos de EC_{50} (concentração efetiva) que expressa a concentração mínima necessária para inibir em 50% a atividade dos radicais livres. E os valores da atividade antioxidante para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos em percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação. O composto sintético BHT foi utilizado para comparação dos resultados, sendo determinado com a mesma metodologia utilizada no presente trabalho.

Os resultados de EC_{50} obtidos para os extratos do resíduo da semente de mamão, variaram entre 199,7 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Observa-se que os extratos obtidos pelo processo integrado apresentaram valores de EC_{50} melhores do que o extrato bruto obtido pela extração ESC ($> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Sendo assim, a combinação dos processos favoreceu a atividade antioxidante da semente de mamão pelo método do radical DPPH.

O uso do solvente água/etanol proporcionou a extração de maior quantidade de compostos com atividade antioxidante comparada a utilização dos solventes água e etanol puros, para o método do radical DPPH. O valor de EC_{50} do extrato obtido com água/etanol foi de $199,07 \pm 3,19 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo inferior ao encontrado para o antioxidante padrão BHT ($261 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o que caracteriza com forte potencial antioxidante da amostra.

Tabela 19 - Atividade antioxidante dos extratos obtidos por processos integrados ESC e PLE da semente de mamão.

Condição	Solvente	$EC_{50}^{(1)}$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% AA ⁽¹⁾
ESC 30 MPa e 40 °C			
	CO ₂	>1000	24,29 ^D \pm 2,32
PLE Resíduo			
80 °C / 67 min	Água	1000 ^A \pm 48,10	74,22 ^B \pm 4,28
60 °C / 57 min	Água/Etanol	199,7 ^C \pm 3,19	62,51 ^C \pm 1,88
80 °C / 67 min	Etanol	529,92 ^B \pm 3,29	92,30 ^A \pm 6,67
	BHT	261 ^C	97,88 ^A

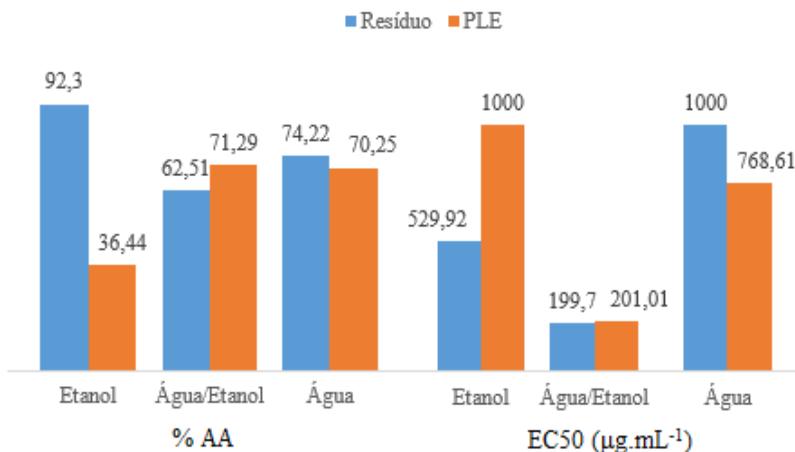
⁽¹⁾ média \pm desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) para o Teste de Tukey, sendo que letras maiúsculas indicam análise entre todos os métodos.

Como pode ser observado na Tabela 19, a atividade antioxidante, pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, dos extratos do resíduo da semente de mamão variou de $62,51 \pm 1,88$ a $92,30 \pm 6,687$ %, sendo o maior valor obtido com o uso do solvente etanol. Ao comparar os resultados obtidos com o antioxidante BHT, observa-se que a atividade antioxidante obtida no ensaio com etanol é estatisticamente igual a atividade do antioxidante sintético.

Analisando os extratos obtidos por PLE, observa-se um grande aumento da atividade antioxidante. Ao comparar o valor de %AA do resíduo obtido por etanol (92,30%) com o extrato da semente de mamão obtido por ESC (24,29%), observa-se um aumento de 3,7 vezes mais atividade. Podendo mais uma vez destacar a eficiência da combinação de processos para a maior extração de compostos com atividades biológicas.

A Figura 26 relaciona os valores obtidos para atividade antioxidante por extração PLE da semente de mamão sem tratamento, indicados na figura como PLE, e os valores obtidos para o resíduo, extrato este que passou por um pré-tratamento com extração ESC.

Figura 26 - Comparativo da atividade antioxidante entre as extrações PLE: Resíduo (semente com o pré-tratamento ESC) e PLE (semente sem o pré-tratamento ESC).



Ao analisarmos os valores obtidos para %AA, observa-se que para o solvente etanol e para a água a atividade foi maior com o pré-tratamento da semente de mamão com a ESC antes da extração PLE. O mesmo comportamento ocorreu para as extrações com etanol e água/etanol para

os valores de EC₅₀ do resíduo, onde o pré-tratamento favoreceu a atividade antioxidante.

Como já comentado para os ensaios de CFT, o pré-tratamento da amostra realizando com a extração ESC também favoreceu a obtenção de compostos com maior atividade antioxidante através da extração PLE. Comportamento este, observado ao analisar os resultados da extração com PLE sem o pré-tratamento com a extração com o pré-tratamento. Destacando a importância de mais estudos com processos sequenciais, onde uma técnica completa a outra e obtém-se compostos de grande potencial biológico.

A atividade antimicrobiana dos extratos também foi avaliada. Na Tabela 20 são apresentados os resultados da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos obtidos por processos integrados da semente de mamão frente a bactéria Gram-negativa (*E. coli*), a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e o fungo (*C. albicans*).

Tabela 20 - Concentração mínima inibitória dos extratos obtidos por processos integrados ESC e PLE da semente de mamão contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Condição	Solvente	Concentração Mínima Inibitória CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ⁽¹⁾		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
ESC 30 MPa e 40 °C				
		9,1	146,2	73,1
PLE Resíduo				
80 °C / 67 min	Água	7,73	>990	>990
60 °C / 57 min	Água/Etanol	990	>990	>990
80 °C / 67 min	Etanol	1080	>1080	>1080
	Antibiótico	0,58	9,25	>74

⁽¹⁾ média (n=2);

Ao analisarmos os valores de CMI para os extratos do resíduo obtidos por PLE, observa-se que frente aos micro-organismos *C. albicans* e *S. aureus* os extratos estudados não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações estudadas. E para o micro-organismo *E. coli* as concentrações estudadas para a extração com água/etanol e etanol apresentaram classificação de moderado inibidor e para a extração

com água a classificação foi de forte inibidor. De acordo com Sartoratto e Machado (2004), Duarte et al. (2007) e Wang et al. (2008) a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e fraco inibidor para CMI acima de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Observa-se que CMI do extrato do resíduo obtido com água (7,73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou menor concentração de extrato para inibir o micro-organismo *E. coli*, quando comparado com o extrato obtido por ESC (9,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

De forma geral o pré-tratamento da amostra favoreceu tanto a atividade antioxidante como a atividade antimicrobiana do extrato. Demonstrando que para as condições estudadas, o uso de métodos integrados pode melhorar as atividades biológicas dos extratos.

3.4 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS

A determinação do perfil químico dos extratos da semente de mamão foi realizada para todos os extratos estudados nesse Capítulo. A partir da análise da composição química por GC-EM para as condições estudadas, observou-se que o isotiocianato de benzila (BITC) foi identificado como o principal componente do extrato da semente de mamão. Barroso et al. (2016), Corrêa (2011) e Tumpa et al. (2015) também encontraram isotiocianato de benzila como o principal constituinte da semente de mamão.

De acordo com Clarke (2010), o isotiocianato de benzila (BITC) é um composto bioativo derivado da hidrólise da mirosinase, que cliva a glicose do glicosinolato presente nas sementes de mamão. O BITC é uma substância estudada entre diferentes áreas devido à sua ampla aplicação. Variando do relaxamento vascular (WILSON et al., 2002) à inibição da proliferação do câncer (LUND et al., 2001).

Após identificação do composto BITC como majoritário, realizou-se a quantificação do composto para os extratos estudados, sendo a concentração de BITC apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 - Quantificação do composto majoritário presente no óleo extraídos da semente de mamão por processos integrados de extração.

Método	Solvente	BITC (%)
ESC 30 MPa e 40 °C		
	CO ₂	1,31
PLE Resíduo		
80 °C / 67 min	Água	4,82
60 °C / 57 min	Água/Etanol	3,70
80 °C / 67 min	Etanol	1,42

Todos os métodos de extração se mostraram eficientes na obtenção do composto BITC, com destaque para a extração do resíduo com água, que apresentou a maior composição do composto majoritário. Conseqüentemente, esse ensaio obteve os melhores valores de atividade antimicrobiana, sendo este comportamento associado a presença do composto BITC.

Outro fator importante a ser observado para a quantificação do composto BITC, é que o processo integrado resultou em maiores concentrações do composto. Todos os extratos do resíduo apresentaram quantificação de BITC maior que o extrato bruto da semente de mamão obtido por ESC.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo avaliou a influência do processo integrado de ESC e PLE na obtenção de compostos bioativos da semente de mamão. Em geral, o processo combinado se mostrou como uma alternativa de melhor aproveitamento da semente de mamão e como um processo que melhora o desempenho das atividades biológicas.

O processo integrado, extração da semente de mamão por ESC e posteriormente o resíduo dessa extração aplicado como matéria-prima para a extração PLE, proporcionou a obtenção de dois produtos. Um obtido pelo processo ESC onde apresentou alta atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *E. coli* (CMI de 9,1 µg.mL⁻¹), *S. aureus* (CMI 146,2 µg.mL⁻¹) e *C. albicans* (CMI 73,1 µg.mL⁻¹) e o segundo

obtido pelo processo PLE com a utilização de diferentes solventes, água, etanol e água/etanol.

O resíduo ESC obtido por PLE com ambos os solventes se mostraram mais eficientes na obtenção de compostos fenólicos, onde o pré-tratamento com ESC favoreceu a extração de compostos fenólicos por PLE.

A atividade antioxidante dos extratos do resíduo apresentou melhores resultados comparado com a obtenção dos extratos só pela técnica de extração PLE ou até mesmo pela extração ESC. O resíduo ESC obtido por PLE com a mistura de solventes água/etanol apresentou valores de EC_{50} ($199 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) considerado como extrato de alto potencial antioxidante. E o resíduo ESC obtido por PLE com o solvente etanol apresentou valores de atividade antioxidante (92,3 %), pelo método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, estatisticamente igual ao antioxidante sintético BHT (97,88 %).

O método integrado proporcionou uma melhora na atividade antimicrobiana do extrato do resíduo obtido pela extração PLE com água como solvente. Indicando com isso, que a integração dos processos tanto pode melhorar a extração de compostos com potencial antioxidante como também de compostos antimicrobianos, sendo o determinante dessa atividade a escolha do solvente de extração no processo PLE.

O composto BITC foi identificado em todas as amostras, sendo que a quantificação do composto aumentou com o pré-tratamento da matéria-prima com ESC e posterior extração com PLE. Sendo observado maiores valores de BITC para o resíduo extraído com água (4,82 %).

A recuperação dos compostos com a utilização de processos combinados levou a uma variedade de produtos com diferentes aplicações, antimicrobiano e antioxidante, e possibilitou o máximo aproveitamento da matéria-prima, destacando o potencial da aplicação de novas estratégias de extração.

Capítulo 6

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

1 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nos Capítulos 3, 4 e 5 desse trabalho mostraram que o uso da semente de mamão para obtenção de compostos bioativos é promissor e apresentou-se como uma alternativa para a valorização desse subproduto. Os diferentes métodos aplicados para a obtenção dos extratos permitiram avaliar a influência das técnicas frente ao rendimento e as atividades biológicas.

O modelo de Sovová obteve os melhores ajustes na modelagem das curvas cinéticas da semente de mamão. E a proposta de aumento de escala, com razão m_{sol}/M e Q_{CO_2}/M mantidas constantes entre escala pequena e grande, foi adequada pois se ajustaram com os parâmetros cinéticos modelados.

Os extratos obtidos por Soxhlet apresentaram os maiores rendimentos de extração, sendo 24,30% com etanol e 24,32% com hexano, esses valores são significativamente iguais aos valores de rendimento obtidos pela extração com líquido pressurizado com etanol (23,72%). As extrações com fluido supercrítico na pressão de 30 MPa também proporcionaram altos rendimentos, por volta de 18,03%.

Na avaliação dos compostos fenólicos totais os extratos obtidos por PLE com água e a mistura água/etanol apresentaram os maiores valores. O mesmo comportamento foi observado nas análises de atividade antioxidante, onde os extratos obtidos por PLE com água e água/etanol apresentaram os melhores resultados. Pode-se observar que os solventes de maior polaridade apresentaram maiores conteúdos de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os extratos obtidos por tecnologia supercrítica apresentaram baixo potencial antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos, quando comparado com os outros métodos de extração.

A extração da semente de mamão possibilitou a obtenção de extratos com forte atividade antimicrobiana. Todos os extratos obtidos pelas diferentes técnicas apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Destaca-se os ensaios por ESC que apresentaram os melhores resultados em comparação as outras técnicas, especialmente frente a bactéria *E. coli*, com valores de CMI de $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para a condição 20 MPa a 40 °C. A análise cromatográfica por GC-EM identificou a presença do composto BITC, composto esse relacionado a forte atividade antimicrobiana dos extratos.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a semente de mamão é uma valiosa fonte de compostos bioativos. De forma geral, extratos com altos rendimentos aliados a atividade antioxidantes podem ser obtidos pelas técnicas de extração SOX e PLE a temperaturas de 80 °C. E extratos com alto rendimento e forte potencial antimicrobiano podem ser obtidos pelo emprego de extração ESC. Além disso, a utilização de processos combinados apresentou uma variedade de produtos com aplicações tanto antioxidantes e antimicrobianas, e possibilitou o máximo aproveitamento da matéria-prima.

2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Testar os extratos obtidos por ESC para mais espécies de bactérias e fungos, principalmente para bactérias Gram Negativas;
- Avaliar a atividade antitumoral dos extratos obtidos por ESC e pelo processo combinado ESC e PLE;
- Avaliar outras técnicas de extração como pré-tratamento da matéria-prima;
- Análise de compostos polares por HPLC.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C.; VISENTAINER, J. V.; MARTÍNEZ, J. Extraction from striped weakfish (*Cynoscion striatus*) wastes with pressurized CO₂: Global yield, composition, kinetics and cost estimation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 1–10, 2012.
- AL-JUDAIBI, A. Comparative study of plant extracts as broad-spectrum antibacterial agents. **International Journal of Engineering And Science**, v. 5, n. 7, p. 13–17, 2015.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANDRADE, K. S. Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica* L.). (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544–552, 2012.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. DE. International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide. Oxford: Pergamon Press, 1976.
- ANVISA. **Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997** Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES>.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2004. 415p.
- ASGHAR, N.; NAQVI, S. A. R.; HUSSAIN, Z.; RASOOL, N.; KHAN, Z. A.; SHAHZAD, S. A.; SHERAZI, T. A.; JANJUA, M. R. S. A.; NAGRA, S. A.; ZIA-UL-HAQ, M.; JAAFAR, H. Z. Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all parts of the *Carica papaya* using different solvents. **Chemistry Central Journal**, p. 1–11, 2016.
- Association of Official Analytical Chemists (2005), Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BARROSO, P. T. W.; CARVALHO, P. P.; ROCHA, T. B.; PESSOA, F. L. P.; AZEVEDO, D. A.; MENDES, M. F. Evaluation of the composition of *Carica papaya* L. seed oil extracted with supercritical CO₂. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 110–116, 2016.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

BRUNNER, G. **Gas Extraction**: na introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. New York: Springer, p. 386, 1994.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. Editora Appris. Curitiba-PR. ed. 1, 2015.

BURT, S. A. Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. Ph.D. thesis, 2007.

BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex, 2009. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126, n. 7, p. 1182–1193, 2001.

CAMPOS, L.; MICHIELIN, E.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 163–170, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S., 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. 8413–8420, 2008.

CEAGESP. **Cartilha de classificação do mamão**São Paulo, 2007.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods.

Phytochemistry Reviews, v. 11, n. 2-3, p. 153–177, 2012.

CLARKE, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 310, 2010.

CLAVIER, J. Y; PERRUT, M. **Scale-Up Issues for Supercritical Fluid Processing in Compliance with GMP**. vol. 1, Champigneulle, France, 2004.

CORRÊA, C. B. Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes*. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. Piracicaba, 2011.

CORSO, M. P. Estudo da extração de óleo de semente de gergelim (*Sesamun indicum* L.) empregando os solventes dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, 2008.

CRUZ, P.N. da. Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. UFSC. Florianópolis, 2016.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

DAINTREE, L. S.; KORDIKOWSKI, A.; YORK, P. Separation processes for organic molecules using SCF Technologies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 351–372, 2008.

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.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema B-Caroteno/Ácido Linoléico E Método De Sequestro De Radicais Dpph•. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

DURIGAN, J. F.; DURIGAN, M. F. B. Processamento de mamão: Mercado nacional e Técnicas de produção. **Embrapa - Roraima**, p. 27, 2014.

EGGERS, R.; JAEGER, P. **Extraction Systems**. In: (Ed.). *Extraction*

Optimization in Food Engineering: CRC Press, 2003.

EKE, O. N.; AUGUSTINE, A. U.; IBRAHIM, H. F. Qualitative Analysis of Phytochemicals and Antibacterial Screening of Extracts of *Carica papaya* Fruits and Seeds. v. 6, n. 1, p. 48–56, 2014.

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 16, n. 1, p. 43–58, 1999.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5–51, 2001.

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.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.263-269, 2002.

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

GOMIDE, R. **Operações unitárias-1º volume: operações com sistemas sólidos granulares**. [s.l: s.n.].

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 1993.

GUINDANI, Camila. Emprego da Tecnologia Supercrítica para a Valorização do Resíduo de Semente de Chia. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Sana Catarina, Florianópolis, 2014.

HAIDA, K.S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Cienc. Saude Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HE, X.; MA, Y.; YI, G.; WU, J.; ZHOU, L.; GUO, H. Chemical composition and antifungal activity of *Carica papaya* Linn. seed essential oil against *Candida* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 350–354, 2017.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.

Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–2511, 2010.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67–83, 2013.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. D. P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2015.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal : culturas temporárias e permanentes / IBGE. v. 43, n. ISSN 0101-3963, p. 64, 2016.

JACQUES, R. A. Caracterização Química da Erva Mate (*Ilex paraguariensis*): Aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

JIANG, Y.; LI, P.; LI, S. P.; WANG, Y. T.; TU, P.F. Optimization of pressurized liquid extraction of five major flavanoids from *Lysimachia clethroides*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 341–345, 2007.

GIL-CHÁVEZ, G. J.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUIAR, G. A. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R. Extratos de sementes de mamão (*Carica Papaya L.*) como fonte de antioxidantes naturais. p. 337–340, 2008.

KABGANIAN, R.; CARRIER, D. J.; ROSE, P. A.; ABRAMS, S. R.; SOKHANSANJ, S. Localization of Alkamides, Echinacoside and Cynarin with *Echinacea angustifolia*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 10, n. 2, p. 73–81, jul. 2003.

KANG, H. J.; CHAWLA, S. P.; JO, C.; KWON, J. H.; BYUN, M. W. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 614–620, 2006.

KASSING, M.; JENELTEN, U.; SCHENK, J.; STRUBE, J. A new approach for process development of plant-based extraction processes. **Chemical**

Engineering and Technology, v. 33, n. 3, p. 377–387, 2010.

KHOR, E. S.; WONG, N. K. Potential antioxidant and cytotoxic properties of secondary metabolite extracts from *Carica Papaya* fruits and seeds. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 220–224, 2014.

KITZBERGER, C. Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a Alta Pressão. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, p. 127, Florianópolis, 2005.

KOŞAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 525–533, jul. 2005.

KRISHNA, K. L.; PARIDHAVI, M.; PATEL, J. A. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* linn.). **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 7, n. 4, p. 364–373, 2008.

KUHN, T., WANG, Y. Artemisinin – an innovative cornerstone for anti-malarial therapy. **Prog. Drug Res.** 65, 384–422, 2007.

LASTA, Heloísa F. B. Potencial antioxidante dos extratos dos resíduos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) obtidos a alta e a baixa pressão. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LEWIS, K.; AUSUBEL, F.M. Prospects for plant-derived antibacterials, **Nat. Biotechnol.** v. 24, p. 1504–1507, 2006.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos. p. 481501. 2001.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487–496, 2007.

MARRONE, C.; POLETTTO, M.; REVERCHON, E.; STASSI, A. Almond oil extraction by supercritical CO₂: experiments and modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 53, n. 21, p. 3711–3718, nov. 1998.

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

MARTÍNEZ, J. L.; VANCE, S. W. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTINEZ, J. (Ed.). **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 25–49.

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

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444–3452, 2002.

MAYER, D. A.; ULSON DE SOUZA, A. A.; FONTANA, E.; ULSON DE SOUZA, S. M. A. Kinetic study of biodegradation of BTX compounds in mono- and multicomponent systems in reactor with immobilized biomass. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 9, p. 1441–1454, 2016.

MAZZUTTI, S., RODRIGUES, L.G.G., MEZZOMO, N., VENTURI, V., FERREIRA, S.R.S. Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. **J. Supercrit. Fluids**, 135, 52–59, 2018.

MELECCHI, M. I. S. Caracterização Química de Extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração. **Tese de Doutorado**, p. 218, 2005.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C., COUBE, C. S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

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

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10–

16, 2009.

MICHELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6615–6623, 2009.

MICHELIN, 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. (Tese de Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 7ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1981.

MUHAMAD, S. A. S.; JAMILAH, B.; RUSSLY, A. R.; FARIDAH, A. The antibacterial activities and chemical composition of extracts from *Carica papaya* cv. Sekaki/Hong Kong seed. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 2, p. 810–818, 2017.

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

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.

NAYAK, B. S.; RAMDEEN, R.; ADOGWA, A.; RAMSUBHAG, A.; MARSHALL, J. R. Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds. **International Wound Journal**, v. 9, n. 6, p. 650–655, 2012.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752–764, 2010.

OLIVEIRA, D. A. de. Aplicação das tecnologias supercrítica e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2015.

ORHUE, P.O.; MOMOH, A.R.M.; Antibacterial activities of different solvent extracts of carica papaya fruit parts on some gram positive and gram negative organisms. **International journal of herbs and pharmacological research**. IJHPR, v. 2, n° 4, 2013, p. 42-47.

- OSORIO-TOBÓN, J. F.; MEIRELES, M. A. A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. **Food and Public Health**, v. 3, n. 6, p. 289–303, 2013.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.
- 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, 2000.
- 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, n. 1, p. 137–150, 2006.
- POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGUI, S. H. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Jornual Chromatogr. A**, v. 1163, p. 2-24, 2007.
- RASHED, K.; FOUCHE, G. Anticancer Activity of Carica papaya Extracts in vitro and Phytochemical Analysis. **Greener Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2013.
- REETZ, E. R.; KIST, B. B.; DOS SANTOS, C. E.; CARVALHO, C. DE; DRUM, M. Anuário Brasileiro da Fruticultura. **Editora Gazeta Santa Cruz**, 104p, 2014.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de Ficus benjamina L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235–254, 2005.
- SAEED, F.; ARSHAD, M. U.; PASHA, I.; NAZ, R.; BATOOL, R.; KHAN,

A. A.; NASIR, M. A.; SHAFIQUE, B. Nutritional and phyto-therapeutic potential of papaya (*Carica Papaya* Linn.): An overview. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 7, p. 1637–1653, 2014.

SAITO, K.; SJODIN, A.; SANDAU, C. D.; DAVIS, M. D.; NAKAZAWA, H.; MATSUKI, Y.; PATTERSON Jr, D. G. Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. **Chemosphere**, v. 57, n. 5, p. 373–381, 2004.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321–324, 2007.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O Cultivo do Mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 657–659, 2010.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal food technology**, v. 35, p. 275–280, 2004.

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

SMITH, R. M. Extractions with superheated water. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 31–46, 2002.

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

SOUSA, E.M.B.D., MARTÍNEZ, J., CHIAVONE-FILHO, O., ROSA, P.T.V., MEIRELES, M.A.A., Extraction of volatile oil from *Croton zehntneri* Pax et Hoff with pressurized CO₂: solubility, composition and kinetics. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 325- 333, 2005.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v.9, n. 3, p. 415-420, 1994.

STARMANS, D. A. J.; NIJHUIS, H. H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 191–197, 1996.

- SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B. da; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. da. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.
- SUDHAKAR, N.; THEIVANAI VIDHYA, R. M. Potential medicinal properties of carica papaya linn. - A mini review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1–4, 2014.
- TAN, C. S.; LIOU, D. C. Desorption of ethyl acetate from activated carbon by supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 27, n. 6, p. 988–991, 1988.
- TEPELLI, F.; CIFTCI, O.N. Developing an integrated supercritical fluid biorefinery for the processing of grains. **J. Supercrit. Fluids** 96 (2015) 77–85.
- TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial effect of essential oil compounds and nisin to food spoilage bacteria. **Kasetsart Journal** . v. 41, n.5, p. 319-323. 2007.
- TRINDADE, A. V. MAMÃO, Produção: Aspectos Técnicos. **Embrapa - Comunicação para Transferência de Tecnologia**, p. 77, 2000.
- TUMPA, S. I.; HOSSAIN, I.; ISHIKA, T. papaya and *Mangifera indica* against some gram positive and gram negative bacteria . v. 3, n. 6, p. 125–129, 2015.
- UD-DAULA, A. F. M. S.; DEMIRCI, F.; SALIM, K. A.; DEMIRCI, B.; LIM, L. B. L.; BASER, K. H. C.; AHMAD, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etilingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M.Sm. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 189–198, 2016.
- VIGANÓ, J.; MARTINEZ, J. Trends for the Application of Passion Fruit Industrial By-Products: A Review on the Chemical Composition and Extraction Techniques of Phytochemicals. **Food and Public Health**, v. 5, n. 5, p. 164–173, 2015.
- VOON, H. C.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34-55, 2012.
- WANG, Y. S.; HE, H. P.; YANG, J. H.; DI, Y. T.; HAO, X. J. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. **Molecules**, v. 13, p. 931–937, 2008.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals

from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

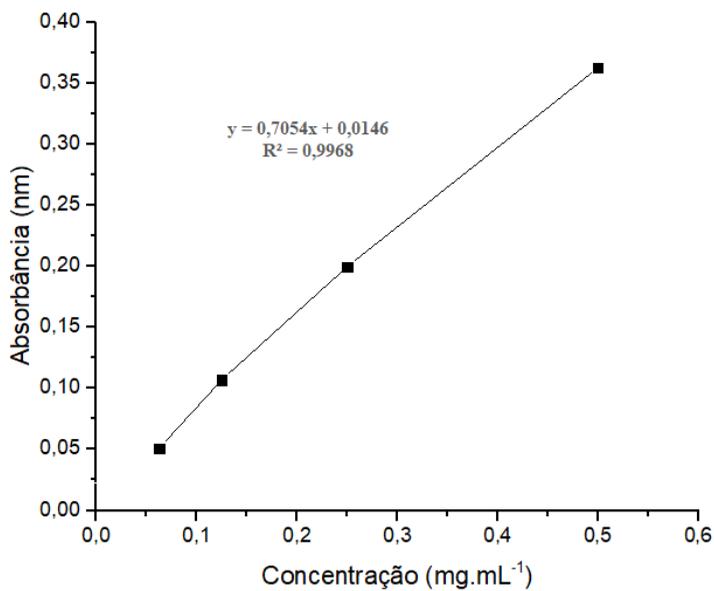
WIJNGAARD, H.; HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, 46(2), 505–5, 2012.

YOGIRAJ, V. GOYAL, P. K.; CHAUHAN, C. S.; GOYAL, A.; VYAS, B. Carica papaya Linn: an overview. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 5 Part A, p. 1–8, 2014.

ZHANG, T.; CHEN, W. The Candida albicans inhibitory activity of the extract from papaya (Carica papaya L.) seed relates to mitochondria dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

APÊNDICE A – Curva analítica de ácido gálico

Figura 27 - Curva analítica de ácido gálico utilizada no cálculo do conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT).



APÊNDICE B – Curvas cinéticas modeladas

Figura 28 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,35 kgh⁻¹.

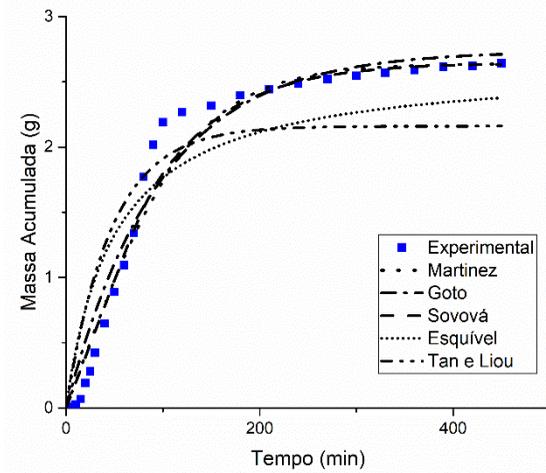


Figura 29 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 15 MPa, 40 °C e vazão de 0,7 kgh⁻¹.

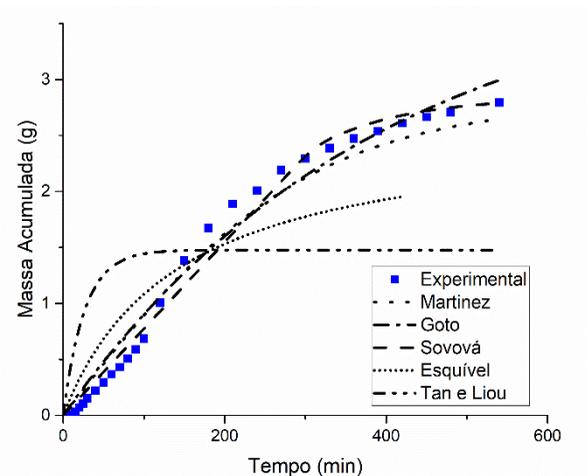
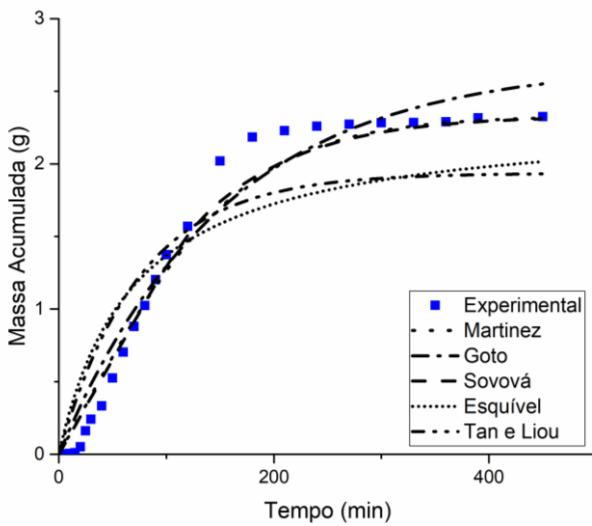
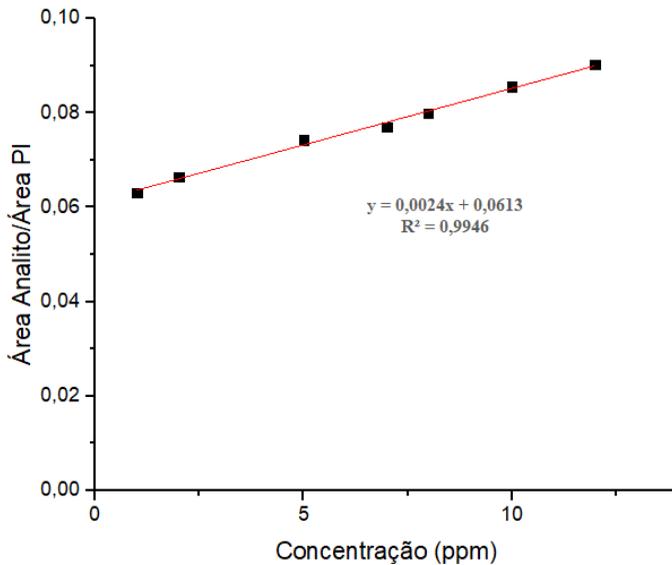


Figura 30 - Curva experimental e modelada da extração supercrítica da semente de mamão a 30 MPa, 40 °C e vazão de 0,21 kg \cdot h $^{-1}$.



APÊNDICE C – Curva de calibração do padrão Benzyl isothiocyanate-98%

Figura 31 - Curva de calibração do padrão Benzyl isothiocyanate-98% para quantificação do composto majoritário.



ANEXO A – Modelos Matemáticos de Extração

A1. Modelo de Sovová (1994)

O modelo proposto por Sovová (1994) é um dos modelos mais utilizados na simulação de curvas de extração com CO₂ supercrítico. Este modelo divide as curvas de extração em três etapas diferentes: etapa de extração de soluto de fácil acesso (soluto disponível na superfície das partículas), onde a resistência à transferência de massa está na fase solvente; a segunda etapa é a de exaustão gradual do soluto de fácil acesso e início do processo difusivo (início da extração do soluto de difícil acesso) e na terceira etapa são retirados os solutos de difícil acesso presentes no interior das partículas sólidas, onde a resistência interna é controlada pela transferência de massa. Essas três etapas de extração podem ser representadas pelas seguintes equações:

$$e = \left\{ \begin{array}{ll} (x_k \tau / Z) [1 - \exp(-Z)] & \text{for } \tau < \tau_m \\ (x_k \tau / Z) [\tau - \tau_m \exp(z_w - Z)] & \text{for } \tau_m \leq \tau < \tau_n \\ x_0 - (x_k / kZ) \ln \{1 + [\exp(r_0 kZ) - 1] \exp[k(\tau_m - \tau)] / r_0\} & \text{for } \tau \geq \tau_n \end{array} \right. \quad (9)$$

Onde, x_k e x_0 são respectivamente a massa em relação a N (massa da fase sólida livre de soluto (g)), a fração de difícil acesso do soluto e a fração do soluto inicial dentro da partícula. Os outros parâmetros (Z , r_0 , τ , τ_m , τ_n e z_w) presentes na equação (9) podem ser calculados seguindo as equações:

$$Z = \frac{K_a h}{U} \quad (10)$$

$$r_0 = \frac{x_0}{x_k} \quad (11)$$

$$\tau = \frac{K_a y^* t}{(1-e)\rho_r x_k} \quad (12)$$

$$\tau_m = r_o - 1 \quad (13)$$

$$\tau_n = \tau_m + \frac{1}{k} \ln \left[\frac{1 + \tau_m e^{(r_o k Z)}}{1 + \tau_m} \right] \quad (14)$$

$$z_w = \frac{1}{kr_o} \ln \left\{ \frac{r_o e^{[k(\tau - \tau_m)]} - 1}{r_o - 1} \right\} \quad (15)$$

Onde: K_a é o coeficiente volumétrico global de transferência de massa para a fase solvente ($\text{kgm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$); h é a coordenada axial (m); U é a velocidade superficial do solvente ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); y^* a solubilidade ($\text{g}_{\text{soluto}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{solvente}}$); t é o tempo (s); e k é o parâmetro do modelo Lack estendido (Ad). Os parâmetros k_a , k e x_k são parâmetros ajustáveis do modelo Sovová.

A2. Modelo de Martínez et al. (2003)

Martinez et al. (2003) propuseram um modelo matemático para descrever as curvas de extração com CO_2 supercrítico. Este modelo é uma proposta para sistemas multicomponentes e pode ser aplicado considerando o extrato como um pseudocomponente ou uma mistura de substâncias ou grupos de componentes com estrutura química similar. O modelo negligencia o acúmulo e a dispersão na fase fluida devido a este fenômeno não apresentar influência significativa no processo quando comparado com o efeito de convecção. O modelo Martínez é descrito por:

$$m_i(h = H, t) = \frac{m_{t,i}}{e^{(b_i t_{m,i})}} \left\{ \frac{1 + e^{(b_i t_{m,i})}}{1 + e^{[b_i(t_{m,i} - t)]}} - 1 \right\} \quad (16)$$

Onde: m_i e $m_{t,i}$ são a massa inicial total extraída (g) e a massa inicial total de um único composto (g). Os parâmetros b_i (min^{-1}) e $t_{m,i}$ (min) são parâmetros ajustáveis do modelo.

A3. Modelo de Esquivél et al. (1999)

Esquivél et al. (1999) apresentaram um modelo empírico baseado na cinética do crescimento celular proposto por Monod. Este modelo pode ser utilizado para representar o rendimento de extração em função do tempo.

$$m = X_o F_o \left(\frac{t}{b + t} \right) \quad (17)$$

Onde: m , X_o , F_o e t são respectivamente a massa extraída (g), o rendimento global (Ad), a massa inicial total da alimentação do leito (g) e o tempo de extração (min). O parâmetro b é o único parâmetro ajustável do modelo Esquivél.

A4. Modelo de Goto et al. (1993)

Goto et al. (1993) desenvolveram um modelo matemático considerando a difusão de poros para descrever as curvas de extração. Este modelo é um modelo típico e muito aplicado em sistemas de adsorção. A solução analítica para este modelo é:

$$m = \frac{A[\beta/K + (1-\beta)]X_o\rho_s Q_{CO_2}}{\rho_r} \left\{ \frac{\tau}{a_1} \left[e^{\left(\frac{a_1 t}{\tau}\right)} - 1 \right] + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - e^{\left(\frac{a_2 t}{\tau}\right)} \right] \right\} \quad (18)$$

Onde os parâmetros (a_1 , a_2 , A , b , c e ϕ) presentes na equação 18 podem ser calculados seguindo as equações:

$$a_1 = \frac{1}{2} \left[-b + \sqrt{b^2 - 4c} \right] \quad (19)$$

$$a_2 = \frac{1}{2} \left[-b - \sqrt{b^2 - 4c} \right] \quad (20)$$

$$A = \frac{(1-\varepsilon)\phi}{[\beta + (1-\beta)K]\varepsilon(a_1 - a_2)} \quad (21)$$

$$b = \frac{\phi}{[\beta + (1-\beta)K]} + \frac{1}{\varepsilon} + \frac{\phi(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (22)$$

$$c = \frac{\phi}{[\beta + (1-\beta)K]\varepsilon} \quad (23)$$

$$\phi = k_p a_p \tau \quad (24)$$

A5. Modelo de Tan e Liou (1988)

O modelo de Tan e Liou é representado pela equação:

$$m = \frac{A}{k_d} \left[1 - e^{(k_d B)} \left[e^{(-k_d t)} - 1 \right] \right] \quad (25)$$

Os parâmetros A e B da equação 25 são descritos pelas equações 26 e 27, e a constante de desorção (k_d) é o único parâmetro ajustável do modelo de Tan e Liou.

$$A = Q_{CO_2} \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} X_o \frac{\rho_r}{\rho_s} \quad (26)$$

$$B = \frac{\varepsilon H}{U} = \frac{\varepsilon H \rho_s}{Q_{CO_2}} \quad (27)$$

A6. Nomenclatura dos modelos matemáticos

a_p specific area of mass transfer (m^{-1})

b adjustable parameter of Esquível model (s)

b_i adjustable parameters of the Martínez model

e mass of extract relative to N

e_{esq} ration between the mass of solute recovery by initial mass free solute

(Ad)

e_{lim} value of e_{esq} by an infinity time of extraction (Ad)

e_i^{cal} numerical accumulated mass in the point i .

e_i^{exp} experimental accumulated mass in the point i

h axial coordinate (m)

i point of collect on a given t

k parameter of extended Lack's model (Ad)

K desorption constant of Goto model (s^{-1})

K_a global volumetric coefficient of mass transfer to the solvent phase

($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$)

k_d desorption constant of Tan and Liou model (s^{-1})

k_p mass transfer coefficient ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

m extracted mass (g)

MA raw material mass (g)

m_i total initial mass of extracted (g)

$m_{t,i}$ total initial mass of a single compound (g)

N mass of the solute-free solid phase (g)

Q_{CO_2} CO_2 flow rate ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$)

r_o solid phase concentration considering the initial solute content (Ad)

t time (s)

U superficial velocity of solvent ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

x_k fraction of solute hard access (Ad)

X_o global yield (Ad)

x_o fraction of initial solute inside of particle (Ad)

y^* solubility ($\text{g}\text{solute}\cdot\text{g}^{-1}\text{solvent}$)

Z parameter of fast extraction period

z_w dimensionless coordinate (Ad)

β particle porosity (Ad)

ε porosity of the bed (Ad)

ρ_a apparent specific mass (kg.m⁻³)

ρ_r specific mass of the seeds (k.g.m⁻³)

ρ_s specific mass of solvent (kg.m⁻³)

τ dimensionless time (Ad)

τ_R residence time of solvent of bed (s)

τ_m dimensionless time to start of the extraction from inside of particles
(Ad)

τ_n dimensionless time to end of the extraction of easily accessible solute
(Ad)

ϕ dimensionless global coefficient of mass transfer (Ad)