



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Valdemir da Silva Nunes

**Recuperação de compostos bioativos e proteína de coprodutos da
pitomba (*Talisia esculenta*) usando técnicas alternativas de extração**

Florianópolis - SC

2023

Valdemir da Silva Nunes

**Recuperação de compostos bioativos e proteína de coprodutos da
pitomba (*Talisia esculenta*) usando técnicas alternativas de extração**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Orientadora: Profa. Sandra Regina Salvador, Dra.
Coorientadora: Talyta Mayara Silva Torres, Dra.

Florianópolis - SC

2023

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

Nunes, Valdemir da Silva

Recuperação de compostos bioativos e proteína de coprodutos da pitomba (*Talisia esculenta*) usando técnicas alternativas de extração / Valdemir da Silva Nunes ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira, coorientadora, Talyta Mayara Silva Torres, 2023.
139 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Pitomba. 3. Compostos bioativos. 4. Atividade antioxidante. 5. Proteína. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Torres, Talyta Mayara Silva. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Valdemir da Silva Nunes

**RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PROTEÍNA DE COPRODUTOS
DA PITOMBA (*Talisia esculenta*) USANDO TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE
EXTRAÇÃO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Salvador Ferreira - Presidente - UFSC
Dr^ª. Kátia Suzana Andrade - Membro Externo - Pesquisadora Duas Rodas Industrial.
Prof. Dr. Marcelo Lanza - Membro Interno - PPGEAL/UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak
Coordenadora do Programa

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

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho ao Criador dos vegetais (Gn 1:29), ao Multiplicador dos alimentos (Mc 6:35-44) e ao Produtor dos bons frutos (Gl 5:22-23).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Valmi e Olinda por terem me concebido a vida, cuidado e educação. Gratidão à minha esposa Suellem (fofinha) pelo amor, companhia e apoio emocional. Às minhas irmãs Lígia e Lídia por me incentivarem e acreditarem em mim. Ao meu irmão Valfrido pelo constante estímulo às atividades acadêmicas. Aos meus sobrinhos, sogros, cunhados e concunhados, pela consideração.

Grato a Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE) por me conceder liberação das atividades profissionais, até que pudesse desenvolver as atividades experimentais para além de suas fronteiras, em especial a Otoni Cantarelli e Matheus Carvalho, colegas do Departamento de Engenharia e Arquitetura (DEA) e aos membros do Conselho Universitário CONSU-UFAPE. Aos amigos Rodrigo, Leonardo e Natana, do Centro Laboratorial de Apoio a Pesquisas (CENLAG), pelas dicas sobre o uso da sala de moinhos, e, aos amigos Natana e Romualdo do Laboratório de Ensino (LABENS), pelo empréstimo da peneira para subsidiar despulpamento, e apoio e suprimento na etapa de secagem. Agradeço também a Silvana e Laís, pela autorização e agendamentos sobre o uso de despulpadora do Laboratório de Frutas e Hortaliças no Prédio de Engenharia de Alimentos (LACTAL).

Minha gratidão a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por me proporcionar a oportunidade de cursar o mestrado acadêmico. Gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - PPGEAL, pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento do trabalho, e sobretudo, pelas pessoas que o compõe.

Agradecido pelo corpo docente, em destaque aqueles professores com os quais tive o privilégio de estudar as disciplinas do programa, a saber, Marcelo Lanza (Termodinâmica), Bruno Augusto (Transferência de Calor e Massa), João Borges (Secagem de Produtos Alimentícios), Sandra Regina (Tecnologia Supercrítica, Seminário de Dissertação, e Tópicos Especiais: *Advanced Food Technology*), José Miguel (Estatística, Planejamento e Otimização de Experimentos), André Wust (Métodos Matemáticos para Engenharia de Alimentos) e Lorenzo Pastrana (Tópicos Especiais: *Advanced Food Technology*).

Grato à equipe de pesquisadores que desenvolveram trabalhos no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) nesse interstício de tempo, incluindo novos colegas que conheci, a exemplo do Adenilson, Jonas, Gabriel, Carla, Mayara, Laís, Eto, Renata, Ginna, Luana, Clóvis, Rose, Eulália dentre outros. Gratidão ao secretário do programa, Fernando Curbani, pela constante orientação desde meu ingresso no curso, inclusive pelo apoio nas etapas de trancamento e prorrogação do curso quando solicitadas devido às minhas

atividades profissionais na UFAPE. Destacadamente, sou muito agradecido a duas pessoas: à **minha orientadora profa. Sandra Regina** pela aceitação, direcionamentos, orientações, acolhimento, incentivo, sugestões, correções e redirecionamentos e, à **minha coorientadora Talyta Torres** pelo acompanhamento nas práticas laboratoriais, pelo cuidado humano, pelos planejamentos, correções, redirecionamentos e motivação.

Agradeço ainda aos laboratórios associados que subsidiaram a pesquisa, a exemplo do Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI), Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN), Laboratório de Sistemas Porosos (LASIPO), bem como à Central de Análises do Departamento de Química.

Finalmente, estendo minha gratidão aos professores que compõem a banca examinadora, a qual aceitou ler, assistir e avaliar o trabalho de pesquisa: Sandra Regina Salvador, Marcelo Lanza, Kátia Andrade, Luiz Gustavo e Talyta Mayara.

Qualquer que seja o ramo de investigação a que procedamos com um sincero propósito de chegar à verdade, somos postos em contato com a Inteligência invisível [...].

Encontra-se nesta conexão a mais elevada educação. (WHITE, 2008, p.14)

RESUMO

A pitomba (*Talisia esculenta*) é um fruto bastante difundido no Norte-Nordeste do Brasil, cuja polpa tem sido apreciada pelo sabor agridoce e seu potencial antioxidante. Há poucos trabalhos científicos que avaliem a capacidade antioxidante ou identifiquem o perfil químico da casca de pitomba, não sendo constatados estudos que quantifiquem os compostos antioxidantes presentes na casca. Este trabalho objetivou avaliar a capacidade antioxidante e quantificar os compostos bioativos presentes na casca de pitomba, além de recuperar e concentrar proteína em extratos da casca e da semente. Planejou-se os experimentos a partir de delineamentos composto central (DCC), fatoriais e misto, usando como variáveis de entrada a temperatura e a concentração ou o pH do solvente, bem como a metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimização. As principais técnicas empregadas nos experimentos de avaliação da capacidade antioxidante da casca foram a extração assistida por micro-ondas (MAE), a extração por líquido pressurizado (PLE) e a maceração (MAC), associadas à determinação de compostos fenólicos totais (CFT), da atividade antioxidante (pelos métodos de DPPH e FRAP), prévias à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A recuperação/concentração de proteína foi realizada por extração por água subcrítica (SWE) e maceração (MAC), prévias à determinação do potencial Zeta. As melhores amostras foram caracterizadas por turbidez, teor de sulfidril (SH) e colorimetria (CIE). Encontrou-se maior rendimento e capacidade antioxidante dos extratos da casca na MAE a 142 °C e, mistura água/etanol razão 1:1 como solvente (MAE-8). Estas condições foram replicadas na PLE e MAC. Os principais compostos quantificados por HPLC nas amostras de MAE e PLE foram ácidos fenólicos, enquanto nas amostras de MAC foram flavonoides. A MAE foi mais eficiente na recuperação dos compostos bioativos, contendo o ácido protocatequínico como principal fenólico presente em cascas de pitomba. Para a extração de proteínas, usou-se água como solvente, sendo que na casca, o maior rendimento de extração (23,00%) foi obtido com SWE a 100 °C e pH 9 (SWE-8), ao passo que o melhor teor de proteína foi alcançado na MAC a 30 °C e pH 9, seguida de precipitação a pH 2,2 (MAC-6), o qual foi de 24,64%. SWE com água a 60 °C e pH 9 (SWE-6) e MAC à temperatura ambiente e pH 11 (MAC-5) resultaram em teores de proteína de 11,82% e 13,70%, respectivamente. Nas amostras da semente o maior rendimento da MAC_s (36,55%) foi obtido a pH 11, alcançando teores de concentração e recuperação de proteínas de 15,26% e 67,10%, respectivamente. A avaliação da qualidade dos extratos da casca mostrou que SWE-6 é a amostra com menor turbidez, o ensaio MAC-6 apresentou maior teor de sulfidril, e quanto aos parâmetros de cor, SWE-6 se apresenta como a amostra mais límpida, clara e viva, tornando-se de aparência preferível.

Palavras-chave: pitomba; extrações verdes; atividade antioxidante; concentração de proteína.

ABSTRACT

Pitomba (*Talisia esculenta*) is a widespread fruit in the North-Northeast of Brazil, whose pulp has been appreciated for its sweet and sour flavor and its antioxidant potential. There are few scientific studies evaluating the antioxidant capacity or identifying the chemical profile of pitomba peel, and there are no studies quantifying the antioxidant compounds present in the coproducts (peel and seed) of this fruit. This work aimed to evaluate the antioxidant capacity and quantify the bioactive compounds present in pitomba peel, as well as to recover and concentrate protein in extracts from the peel and seed. Experiments were planned using central composite design (CCD), factorial and mixed designs, using temperature and solvent concentration or pH as input variables, as well as response surface methodology (RSM) for optimization. The main techniques used in the experiments to assess the antioxidant capacity of the peel were microwave-assisted extraction (MAE), pressurized liquid extraction (PLE) and maceration (MAC), associated with the determination of total phenolic compounds (TPC), antioxidant activity (using the DPPH and FRAP methods), prior to high-performance liquid chromatography (HPLC). Protein recovery/concentration was carried out by subcritical water extraction (SWE) and maceration (MAC), prior to determining the zeta potential. The best samples were characterized by turbidity, sulfhydryl content (SH) and colorimetry (CIE). The highest yields and antioxidant capacity of the peel extracts were found in the MAE at 142 °C and the 1:1 ratio of water/ethanol as solvent (MAE-8). These conditions were replicated for PLE and MAC. The main compounds quantified by HPLC in the MAE and PLE samples were phenolic acids, while in the MAC samples they were flavonoids. MAE was more efficient in recovering bioactive compounds, containing protocatechuic acid as the main phenolic present in pitomba peels. For protein extraction, water was used as the solvent, and the highest extraction yield (23.00%) from the peel was with SWE at 100 °C and pH 9 (SWE-8), while the best protein content was achieved with MAC at 30 °C and pH 9, followed by precipitation at pH 2.2 (MAC-6), which was 24.64%. SWE with water at 60 °C and pH 9 (SWE-6) and MAC at room temperature and pH 11 (MAC-5) resulted in yields of 11.82% and 13.70%, respectively. In the seed samples, the highest MACS yield (36.55%) was obtained at pH 11, achieving protein concentration and recovery levels of 15.26% and 67.10%, respectively. The evaluation of the quality of the extracts showed that SWE-6 is the sample with the lowest turbidity, the MAC-6 test had the highest sulfhydryl content, and in terms of color parameters, SWE-6 is the clearest, brightest and most vivid sample, making it preferable in appearance.

Keywords: pitomba; green extractions; antioxidant activity; protein concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pitombeira em época de frutificação.....	23
Figura 2 – Distribuição geográfica da origem das principais sapindáceas.....	24
Figura 3 – Pitomba: (a) cachos; (b) feira livre; (c) fruto; (d) sementes; (e) polpa; (f) casca....	26
Figura 4 – Posicionamento do analito na matriz amostral.....	29
Figura 5 – Desenho esquemático da extração por maceração.....	31
Figura 6 – Características de uma onda eletromagnética.....	32
Figura 7 – Espectro de ondas eletromagnéticas: faixa amarelo amarelo-âmbar micro-ondas .	33
Figura 8 – <i>Design</i> do equipamento para Extração Assistida por *Micro-ondas (MAE).....	34
Figura 9 – Princípio da Extração por Líquido Pressurizado - PLE.....	35
Figura 10 – Diagrama de fases da água em função da temperatura e pressão.....	37
Figura 11 – Caminhos da biossíntese dos metabólitos secundários e exemplos tipológicos...	38
Figura 12 – Estruturas moleculares de exemplos representativos de compostos fenólicos.....	39
Figura 13 – Reação de redução ocorrida durante a quantificação de compostos fenólicos....	41
Figura 14 – Mecanismo de estabilização do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazina).....	42
Figura 15 – Conversão do complexo Fe^{3+} - TPTZ em Fe^{2+} - TPTZ.....	43
Figura 16 – Hierarquia estrutural nas proteínas – exemplo clássico da hemoglobina: (a) estrutura primária; (b) estrutura secundária; (c) estrutura terciária; (d) estrutura quaternária.....	44
Figura 17 – Sistema CIE de colorimetria: (a) diagrama Hunter $L^*a^*b^*$; (b) espaço $*C^*h^*$ Fonte: Adaptação de Martins; Manetti; Nunes [2013] e Ferreira e Sprigo [2014].....	50
Figura 18 – Planejamento de composição central com $\alpha=\sqrt{2}$: (a) 2 fatores; (b) 3 fatores Fonte: Adaptação de Clímaco [2019] e Oliveira [2017].....	51
Figura 19 – Modelagem RSM: (a) gráfico de contorno; (b) superfície de resposta.....	52
Figura 20 – Diagrama dos ensaios realizados no processamento da matéria-prima.....	53
Figura 21 – Diagrama do pré-processamento da matéria-prima.....	55
Figura 22 – Diagrama esquemático da unidade de PLE/SWE do LATESC/UFSC.....	62
Figura 23 – Diagrama experimental: $p \equiv$ pressão; $r \equiv$ razão sólido-líquido; $f \equiv$ fluxo do solvente.....	69
Figura 24 – Fluxograma do balanço de massa no pré-processamento manual dos frutos.....	79
Figura 25 – Distribuição granulométrica - partes do fruto: (a) casca; (b) polpa; (c) semente..	81
Figura 26 – Curva de cinética de extração da casca de pitomba em micro-ondas empregando a mistura etanol/água 50% v/v como solvente.....	86

Figura 27 – Diagramas de Pareto relativos à MAE da casca de pitomba para: (a) rendimento da extração (R%); (b) conteúdo de fenólicos totais (CFT)	88
Figura 28 – Superfícies de resposta de variáveis dependentes em função da concentração de etanol e temperatura no processo MAE: (a) rendimento; (b) fenólicos totais.....	90
Figura 29 – Diagramas de Pareto relativos à MAE da casca de pitomba para determinação da atividade antioxidante pelos métodos: (a) DPPH (b) FRAP	91
Figura 30 – Superfícies de resposta de variáveis dependentes em função da concentração de etanol e temperatura no processo MAE: (c) AA – DPPH; (d) AA – FRAP.....	92
Figura 31 – Função desejabilidade e otimização da extração MAE: a) gráfico de contorno; b) superfície de resposta; c) valores preditos em função da desejabilidade.	93
Figura 32 – Curva de cinética de extração da casca em unidade SWE	99
Figura 33 – Curva de potencial Zeta em função do potencial de hidrogênio ($Z_p \times pH$) para amostras de extrato obtido em extração SWE com água sonicada sem adição de NaOH	102
Figura 34 – Curva de potencial Zeta em função do potencial de hidrogênio ($Z_p \times pH$), amostras de extrato obtido em extração convencional em temperatura ambiente, pH 9.....	102
Figura 35 – Perfil dos extratos proteicos da casca de pitomba: (a) rendimento; (b) % de proteína	104
Figura 36 – Efeito das condições de extração na turbidez dos extratos da casca de pitomba	107
Figura 37 – Efeito das condições de extração no teor de sulfidril dos extratos proteicos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>).....	108
Figura 38 – Colorimetria dos extratos proteicos da pitomba: (a) representação do 1º quadrante do espaço $L^*C^*h^o$; (b) Diferença de cor, usando o extrato MAC-5 como referência.	109
Figura 39 – Curva analítica de ácido gálico utilizada na quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>)	129
Figura 40 – Curva analítica de Trolox utilizada na mensuração da capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH dos extratos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>).....	129
Figura 41 – Curva analítica de Trolox utilizada na mensuração da capacidade antioxidante pelo método de redução do íon férrico dos extratos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>).....	130
Figura 42 – Curva analítica de β -caroteno utilizada na quantificação de carotenoides totais (TCC) dos extratos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>).....	130
Figura 43 – Curva analítica de catequina utilizada na quantificação de flavonoides totais (TFT) dos extratos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>).....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal da pitomba expressa em base seca (g/100g de amostra) .	28
Tabela 2 – Faixas de valores das variáveis utilizadas na MAE.....	63
Tabela 3 – Relação de ensaios do planejamento DCCR - MAE	64
Tabela 4 – Faixas dos fatores na extração de proteína SWE.....	65
Tabela 5 – Relação de ensaios do planejamento fatorial 4x2 – SWE	66
Tabela 6 – Condições de processo na maceração com amostras da casca de pitomba (MACc)	67
Tabela 7 – Relação de ensaios do planejamento fatorial 3 ² – MACs.....	68
Tabela 8 – Dados da literatura quanto ao percentual das partes do fruto de pitomba.....	78
Tabela 9 – Dados de teor de umidade para a casca, polpa e semente de pitomba.....	80
Tabela 10 – Diâmetro médio superficial do material	81
Tabela 11 – Massas específicas e porosidade do material.....	82
Tabela 12 – Teores de umidade de água no fruto e efetividade da secagem.....	83
Tabela 13 – Composição centesimal do material em base seca (g / 100g de amostra b.s.)	84
Tabela 14 – Composição centesimal do material expressa em base seca (g / 100g de amostra): dados do autor para a pitomba em comparação com a literatura.....	85
Tabela 15 – Matriz de planejamento MAE incrementada com valores de variáveis resposta .	87
Tabela 16 – Qualidade do extrato de casca de pitomba obtido por MAE da condição otimizada (MAE-8): t = 12,5 min; r = 1:20 (g/mL); C _{EIOH} = 50 %; T = 142 °C.....	94
Tabela 17 – Perfil técnico e desempenho das extrações PLE e MAC aplicadas à casca de pitomba: (a) extração por líquido pressurizado; (b) método convencional por maceração.....	95
Tabela 18 – Perfil fenólico de extratos da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>) em ($\mu\text{g} \cdot \text{gext} -$ 1).....	97
Tabela 19 – Matriz de planejamento SWE incrementada com variáveis resposta.....	100
Tabela 20 – Desempenho da extração convencional por maceração (MAC) da casca de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>) utilizando como solvente água destilada com pH ajustado	103
Tabela 21 – Desempenho da extração convencional por maceração (MAC) da semente de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>) utilizando água destilada com pH ajustado como solvente	106
Tabela 22 – Parâmetros de cor dos extratos obtidos com pitomba: c≡casca; s≡semente.....	109
Tabela 23 – Distribuição gravimétrica - etapas de pré-processamento da matéria-prima.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
CENLAG	Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da UFAPE
CENTRAL	Central de Análises do Departamento de Química da UFSC
CER	Período de Taxa de Extração Constante (do inglês, <i>Constant Extraction Rate</i>)
CFT	Compostos fenólicos totais
CIE	Comissão Internacional de Iluminação (do francês <i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>)
CTC	Centro Tecnológico da UFSC
DC	Período Difusional (do inglês, <i>Diffusion Controlled</i>)
DCC	Delineamento Composto Central
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EQA	Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
EtOH	Etanol
FER	Período de Taxa de Extração Decrescente (do inglês, <i>Falling Extraction Rate</i>)
FRAP	Poder antioxidante redutor do íon férrico (do inglês, <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
GAE	Equivalente em ácido gálico (do inglês, <i>Galic Acid Equivalent</i>)
H ₂ O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LACTAL	Laboratório Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFAPE
LABENS	Laboratório de Ensino da UFAPE
LASIPO	Laboratório de Sistemas Porosos da UFSC
LATESC	Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica do EQA/UFSC
LINDEN	Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas
MAC	Extração convencional por maceração
MAE	Extração assistida por micro-ondas (do inglês, <i>Microwave Assisted Extraction</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PLE	Extração com líquido pressurizado (do inglês, <i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PROFI	Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos do EQA
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta (do inglês, <i>Response Surface Methodology</i>)
SOX	Extração Soxhlet
SWE	Extração com água subcrítica (do inglês, <i>Subcritical Water Extraction</i>)
TCC	Teor total de carotenoides (do inglês, <i>Total Carotenoid Content</i>)
TE	Equivalente de Trolox (do inglês, <i>Trolox Equivalent</i>)
TPTZ	2,4,6-trifidril-s-tiazina
UFAPE	Universidade Federal do Agreste de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

a_0	Área superficial específica da partícula (L^2)
b.u.	Resultado da amostra expresso em base úmida
b.s.	Resultado da amostra expresso em base seca
C_{extrato}	Concentração do extrato (mg Extrato L^{-1})
$\overline{d_s}$	Diâmetro médio das partículas (mm)
m_a	Massa da amostra (g)
m_e	Massa de extrato (g)
m_{final}	Massa final da amostra (g)
m_i	Massa de amostra retida na peneira “i” (g)
m_{inicial}	Massa inicial da amostra (g)
m_t	Massa total de amostra (g)
m/V	Razão massa volume
P_c	Pressão crítica (Pa)
P_r	Pressão de equilíbrio (Pa)
V_c	Volume da amostra na análise de picnometria (m^3)
V_r	Volume da câmara de referência na análise de picnometria (m^3)
ρ_r	Massa específica real ($g\ cm^{-3}$)
ρ_a	Massa específica aparente ($g\ cm^{-3}$)
X	Concentração do extrato na matriz vegetal ($g\ m^{-3}$)
X_0	Rendimento global de extração (%)
ε	Porosidade da amostra, ou a fração de vazios

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	OBJETIVOS	20
1.1.1.	Objetivo geral	20
1.1.2.	Objetivos específicos	21
1.2.	DIAGRAMA CONCEITUAL	22
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1.	PITOMBA	23
2.1.1.	Família, taxonomia e biodiversidade	24
2.1.2.	Morfologia, cultivo e uso sociocultural	25
2.1.3.	Composição centesimal	28
2.2.	EXTRAÇÃO	29
2.2.1.	Extrações convencionais	30
2.2.1.1.	<i>Maceração – (MAC)</i>	30
2.2.2.	Extrações verdes	31
2.2.2.1.	<i>Extração assistida por micro-ondas – (MAE)</i>	32
2.2.2.2.	<i>Extração por líquido pressurizado (PLE)</i>	35
2.2.2.3.	<i>Extração por água subcrítica (SWE)</i>	36
2.3.	COMPOSTOS FENÓLICOS	38
2.3.1.	Atividade antioxidante	40
2.3.2.	Ensaio de determinação	41
2.3.2.1.	<i>Fenólicos Totais</i>	41
2.3.2.2.	<i>DPPH</i>	42
2.3.2.3.	<i>FRAP</i>	43
2.4.	PROTEÍNAS	44
2.4.1.	Estrutura e classificação	44
2.4.2.	Uso de novas fontes de proteína	45
2.4.3.	Precipitação por ponto isoelétrico	48
2.4.4.	Caracterização de extratos	49
2.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
2.5.1.	Designs experimentais	51
2.5.2.	Metodologia de superfície de resposta (RSM)	51
3.	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1.	OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	54

3.2.	PRÉ-PROCESSAMENTO	54
3.3.	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL	55
3.3.1.	Caracterização física	56
3.3.1.1.	<i>Distribuição granulométrica</i>	56
	3.3.1.1.1. Diâmetro médio das partículas.....	56
3.3.1.2.	<i>Massa específica aparente.....</i>	56
3.3.1.3.	<i>Massa específica real</i>	57
3.3.1.4.	<i>Porosidade.....</i>	57
3.3.2.	Composição centesimal	57
3.3.2.1.	<i>Umidade.....</i>	58
3.3.2.2.	<i>Lipídios.....</i>	58
3.3.2.3.	<i>Cinzas</i>	59
3.3.2.4.	<i>Proteína</i>	59
3.3.2.5.	<i>Fibras.....</i>	60
3.3.2.6.	<i>Carboidratos não fibrosos.....</i>	61
3.4.	PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	61
3.4.1.	Cinética da extração MAE.....	61
3.4.2.	Cinética da extração SWE	61
3.4.3.	Extração Assistida por Micro-ondas (MAE).....	63
3.4.3.1.	<i>Otimização - RSM.....</i>	64
3.4.4.	Extração por Líquido Pressurizado (PLE)	65
3.4.5.	Extração por Água Subcrítica (SWE)	65
3.4.6.	Maceração (MAC)	66
3.4.6.1.	<i>Maceração com amostras da casca (MACc).....</i>	67
3.4.6.2.	<i>Maceração com amostras da semente (MACs)</i>	68
3.5.	RENDIMENTO GLOBAL.....	68
3.6.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	69
3.6.1.	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)	70
3.6.2.	Determinação de AA pelo método de captura do radical DPPH	71
3.6.3.	Determinação de AA pelo método de redução do íon férrico (FRAP)	71
3.6.4.	Teor de Carotenoides Totais (TCC).....	72
3.6.5.	Teor de Flavonoides Totais (TFT)	73
3.7.	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE ..	73
3.7.1.	Compostos fenólicos	73

3.7.1.1.	<i>Preparação das amostras</i>	74
3.7.1.2.	<i>Análise HPLC–ESI-MS/M</i>	74
3.7.2.	Proteína	75
3.7.2.1.	<i>Potencial Zeta</i>	75
3.7.2.2.	<i>Kjeldahl</i>	75
3.7.2.1.	<i>Recuperação de proteína</i>	76
3.8.	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS	76
3.8.1.	Turbidez	76
3.8.2.	Teor de Sulfidrina	76
3.8.3.	Parâmetros de Cor	77
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DA PITOMBA EM SUAS DIFERENTES PARTES	78
4.1.1.	Pré-processamento	78
4.1.2.	Caracterização física	80
4.1.2.1.	<i>Distribuição granulométrica e diâmetro médio</i>	81
4.1.2.2.	<i>Massas específicas e porosidade</i>	82
4.1.3.	Teor de umidade	83
4.1.4.	Composição centesimal	83
4.2.	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE PITOMBA	85
4.2.1.	Extração assistida por micro-ondas - MAE	86
4.2.1.1.	<i>Rendimento global de extração e capacidade antioxidante dos extratos de casca de pitomba</i>	87
4.2.1.1.	<i>Otimização do processo MAE da casca de pitomba</i>	93
4.2.2.	PLE e maceração para a casca de pitomba	95
4.2.3.	Identificação e quantificação de compostos bioativos dos extratos de casca de pitomba	96
4.3.	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DA CASCA E DA SEMENTE DE PITOMBA	98
4.3.1.	Extração por água subcrítica (SWE)	99
4.3.1.1.	<i>Estudo cinético</i>	99
4.3.1.2.	<i>Rendimento global e teor de proteínas</i>	100
4.3.1.1.	<i>Potencial Zeta</i>	101
4.3.2.	Extração à baixa pressão por maceração da casca e semente de pitomba	102
4.3.2.1.	<i>Rendimento global por MAC e teor de proteínas na casca</i>	103
4.3.2.2.	<i>Rendimento global na semente</i>	105

4.3.3.	Caracterização dos extratos proteicos	106
4.3.3.1.	<i>Turbidez.....</i>	<i>107</i>
4.3.3.2.	<i>Teor de Sulfidrina.....</i>	<i>108</i>
4.3.3.3.	<i>Parâmetros de cor</i>	<i>109</i>
5.	CONCLUSÃO.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113
	APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	129
	APÊNDICE B – BALANÇO DE MASSA NO PRÉ-PROCESSAMENTO	132
	APÊNDICE C – GRÁFICOS DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE: PERFIS PARA VALOR PREVISTO E DESEJABILIDADE	133
	APÊNDICE D – PERSPECTIVA INCIPIENTE DE PROCESSAMENTO (BIORREFINARIA COM PITOMBA).....	134
	ANEXO A – RDC Nº 268 DA ANVISA.....	135

1. INTRODUÇÃO

Há décadas as pesquisas científicas alertam sobre a influência dos alimentos nas células do corpo humano, a qual contribui para a longevidade ou envelhecimento precoce. No metabolismo, moléculas incompletas faltando-lhes elétrons e presentes nos líquidos celulares perturbam o ambiente das células, causando ao corpo prejuízos funcionais (BIAZZI, 2014). O termo "radical livre" é aplicado à espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), referindo-se ao elétron desemparelhado em uma destas moléculas, sob um estado de energia instável. As espécies absorvem elétrons por meio da interação com outras estruturas, seja um ácido nucléico, uma proteína ou um lipídio, promovendo nos tecidos reações de estresse oxidativo em cadeia molecular (PASSWATER, 2023).

Uma forma de combater os radicais livres é o constante uso de fontes alimentares ricas em minerais, vitaminas e antioxidantes, pois potencializam mecanismos de neutralização, sendo capazes de absorver ou tamponar o radical doando-lhe elétrons, a fim de prevenir ou estagnar a reação em cadeia, evitando danos celulares (BIAZZI, 2014; PASSWATER, 2023). Outro interesse científico tem sido a busca de fontes alternativas de proteínas para alimentação humana. As possibilidades de novas fontes biodisponíveis perpassam pelo estudo da inclusão de novas variedades de fontes vegetarianas, seja na descoberta de novas matrizes proteicas, ou pela formulação de aditivos complementares (PIRES RIBEIRO; ROBERTA MALACRIDA, 2022).

A pitomba (*Talisia esculenta*) é um fruto popular muito difundido no Nordeste do Brasil que possui propriedades relevantes. Estudos apontam que este fruto é rico em vitaminas C, A e minerais como o potássio; cálcio, magnésio, ferro e zinco, além de possuir propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antimutagênicas (QUEIROGA, 2015; NERI-NUMA et al., 2014). Para além desses aspectos, mesmo sendo uma fruta, a pitomba também é abordada na literatura como possuindo quantidade considerável de proteína, da ordem de 6-40%, em base seca.

A pitomba geralmente tem sido comercializada em feiras livres na forma de pequenos feixes contendo entre 50-70 unidades, geralmente denominados 'cachos', cujo valor unitário médio é de 2 (dois) reais. Assim, no contexto econômico a pitomba apresenta vantagem, com menor custo, quando comparada a outras matérias-primas similares, tais como a lichia e o rambutan.

A utilização da pitomba para se obter compostos de alto valor agregado apresenta-se como uma alternativa relevante, em face das vantagens até aqui apresentadas. Neste cenário,

operações que promovem, individualmente ou de forma combinada, a recuperação desses compostos, como a extração por solventes, centrifugação e técnicas cromatográficas, devem ser estudadas (MARTINS; MARTINS; BRAGA, 2021; SOBERÓN et al., 2019). Um dos métodos convencionais de extração é a maceração, que apresenta vantagens como baixo custo e a possibilidade de uso de grandes quantidades de amostra e, como desvantagens, o tempo elevado de extração e exposição do analista a solventes (JACQUES, 2005).

Outros métodos tradicionais de extração apresentam inconvenientes como alto consumo de energia e uso em larga escala de solventes tóxicos. Devido a este fato, os processos como extração assistida por micro-ondas (MAE), extração utilizando líquido pressurizado (PLE) e água subcrítica (SWE) têm sido recomendados como métodos alternativos. Estes métodos em geral apresentam vantagens, como o baixo consumo de solvente e rapidez do processo (SORITA, 2021; LIMA, 2015).

Em consulta à literatura, não foram encontrados trabalhos que envolvam a pitomba com extração assistida por micro-ondas ou em altas pressões, o que soma mais uma vantagem à pesquisa, pelo fato deste envolvimento se configurar como inovador. Desta maneira, este projeto teve como proposta estudar e avaliar os processos de extração de compostos bioativos e de proteína de coprodutos de pitomba (casca e semente), por meio de técnicas de extração alternativas e convencional: micro-ondas, líquido pressurizado, água subcrítica e maceração.

O presente trabalho está dividido em cinco seções, sendo a presente a Seção 1, contendo a introdução, os objetivos e o diagrama conceitual. A Seção 2 aborda acerca do que a literatura apresenta sobre a temática, constituindo-se uma revisão bibliográfica sobre o assunto. A seção 3, denominada de ‘materiais e métodos’ descreve as metodologias de condução dos experimentos. A quarta seção expõe os resultados do trabalho e discute seus efeitos. Finalmente, a seção 5 extrai as conclusões pontuais sobre a pesquisa e apresenta as perspectivas futuras.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Obter extratos de coprodutos da pitomba (*Talisia esculenta*) usando técnicas de extração alternativas, para avaliar o teor de compostos bioativos e/ou proteína presentes nos extratos.

1.1.2. Objetivos específicos

- Analisar físico-quimicamente as partes constituintes do fruto da pitombeira: casca, polpa e semente;
- Extrair compostos bioativos da casca, utilizando a técnica de Extração Assistida por Micro-ondas (MAE) e, avaliar experimental e estatisticamente o efeito das condições de processo MAE (tipo de solvente e temperatura), no rendimento de extração e no potencial antioxidante dos extratos;
- Caracterizar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) o perfil fenólico do extrato MAE otimizado, comparando com os perfis obtidos da Extração por Líquido Pressurizado (PLE) e Maceração (MAC) em condições similares;
- Extrair proteína da casca de pitomba, utilizando as técnicas de Extração por Água Subcrítica (SWE) e Maceração (MAC) e, avaliar o efeito das condições de processo para a extração de proteína da casca pelas técnicas SWE (temperatura e pH do solvente) e MAC (pH do solvente) e as condições de precipitação (potencial Zeta), em termos de rendimento e teor de proteínas nos extratos recuperados da casca;
- Caracterizar os extratos proteicos da casca de pitomba em termos de turbidez, teor de sulfidril e parâmetros de cor, comparando os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de extração utilizadas;
- Extrair a fração proteica da semente, utilizando a técnica de extração convencional por Maceração (MAC) e, avaliar o efeito das condições de processo (razão sólido-líquido e pH do solvente) para a extração de proteína por maceração MAC em termos de rendimento nos extratos recuperados da semente;
- Avaliar teor de proteína e parâmetro de cor do extrato MAC otimizado da semente e, comparar resultado com o extrato convencional da casca (MAC).

1.2. DIAGRAMA CONCEITUAL

Obtenção de compostos bioativos e proteína de coprodutos da pitomba (*Talisia esculenta*) usando técnicas de extração assistida por micro-ondas, líquido pressurizado, água subcrítica e maceração

Por quê?

- Valorização de uma planta muito difundida popularmente, mas pouco disseminada para fins de exploração comercial;
- Importância do estudo de matrizes naturais que tenham potencial para fortalecer a longevidade humana, ou que ofereçam alternativas de biodisponibilidade nutricional;
- A pitomba (*Talisia esculenta*) é um fruto que apresenta boas propriedades antioxidantes e contém fração proteica significativa;
- Necessidade de fortalecimento do potencial de exploração da pitomba em escala industrial.

O que consta na literatura?

- Há estudos que avaliam alguma das frações da pitomba, todavia ainda não há estudos que caracterizem a pitomba em suas diferentes partes (casca, polpa ou semente);
- O potencial antioxidante da pitomba tem sido moderadamente explorado, entretanto estudos que identifiquem ou quantifiquem compostos bioativos em alguma parte do fruto são escassos;
- A fração proteica é mencionada na literatura, porém a sua recuperação e concentração em coprodutos da pitomba ainda não foi investigada.

Hipóteses

- A caracterização da casca, polpa ou semente de pitomba pode esclarecer as peculiaridades de suas diferentes partes, fortalecendo o potencial de exploração do fruto em escala industrial;
- A identificação e quantificação de compostos bioativos e a recuperação da fração proteica em coprodutos de pitomba pode despertar o aproveitamento destes em escala alimentar ou farmacêutica;
- O uso de processos de extração verdes e tradicional aplicados a coprodutos de pitomba pode vislumbrar os caminhos mais sustentáveis para a recuperação de compostos de alto valor agregado.

Desenvolvimento

- Estudar os processos de extração convencional e não convencionais e comparar as respostas dos extratos obtidos, a fim de otimizar as condições de operação;
- Avaliar a qualidade dos extratos da casca de pitomba por meio de análises *in vitro* de conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição química por cromatografia líquida;
- Avaliar a qualidade dos extratos de coprodutos de pitomba por meio de análises de teor de proteína solúvel total e parâmetros de caracterização: turbidez, sulfidril e colorimetria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção aborda os temas descritos na literatura sobre a temática desta pesquisa, constituindo-se seu referencial teórico e subsidiando com informações pertinentes à preparação do arcabouço experimental e à discussão dos resultados. O presente capítulo explora basicamente 4 (quatro) eixos: (1) a matéria-prima; (2) as técnicas experimentais; (3) os compostos de interesse; (4) a análise estatística.

2.1. PITOMBA

O nome originário da língua tupi – *pi'tomba*, no português ‘pitomba’ (*Talisia esculenta*) designa o fruto da pitombeira (Figura 1), árvore brasileira da família das sapindáceas, de madeira útil, casca e folhas que contêm tanino, flores brancas ou rosadas e frutos comestíveis (HOUAISS; VILLAR; FRANCO, 2006). A pitombeira apresenta porte arbóreo, altura entre 6 e 12 m e tronco entre 30 e 40 cm de diâmetro, produzindo frutos acomodados em pequenos cachos, cujo período de sazonalidade costuma estender-se de fevereiro a maio (VIEIRA; GUSMÃO, 2008).

Figura 1 – Pitombeira em época de frutificação

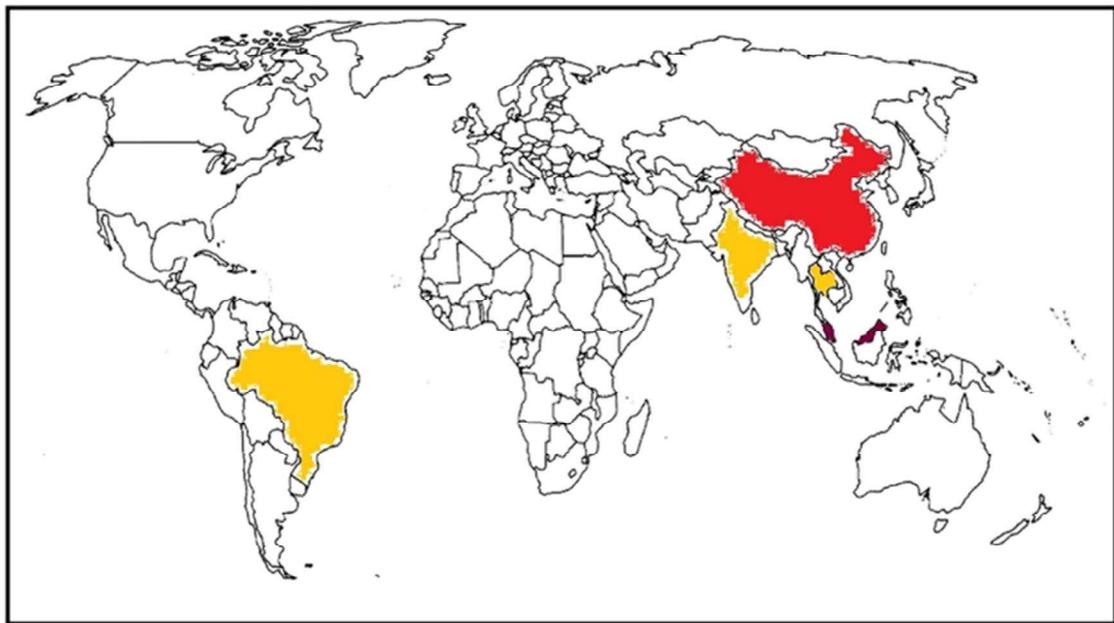


Fonte: Autor; Local: Fazenda da UFRPE, Garanhuns, PE

2.1.1. Família, taxonomia e biodiversidade

As Sapindáceas constituem uma família importante economicamente, comportando cerca de 1900 espécies, distribuídas em mais de 140 gêneros. Neste grupo vegetal, destacam-se globalmente espécies relevantes pelo uso de seus frutos (Figura 2), a exemplo da lichia [*Litchi chinensis* Sonn.] originária da China, rambutan [*Nephelium lappceum* L.] originária da Malásia, longan [*Dimocarpus longan* Lour. ou *Euphoria longana*] – originária da China, Índia, Tailândia e Sudeste Asiático, e pitomba [*Talisia esculenta* Radlk.] originária do Brasil e Peru (BUERKI et al., 2021). Apesar de suas origens, estas sapindáceas encontram-se difundidas atualmente no Brasil, além do que, em território brasileiro, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica são os biomas mais ricos na variedade da família, contabilizando mais de quatro centenas de espécies, as quais apresentam potencial econômico nas indústrias de construção civil, farmacêutica e alimentícia (PEREIRA, 2014; SACRAMENTO; ANDRADE, 2014; COUTRIM et al., 2019; DE JESUS et al., 2008; VERSLYPE; CALDAS; MACHADO, 2016; PANYATHEP et al., 2013).

Figura 2 – Distribuição geográfica da origem das principais sapindáceas



Fonte: adaptado de Giovanna [2023]

Regionalmente, verifica-se a presença de dezenas de espécies das Sapindáceas na Mata Atlântica em estados do Nordeste do Brasil, dentre os quais Pernambuco evidencia riqueza taxonômica ligeiramente maior (PEREIRA, 2014).

2.1.2. Morfologia, cultivo e uso sociocultural

A pitomba (*Talisia esculenta*) são drupas globosas de casca dura amarelada (Figura 3-c), possuindo até duas sementes em formato elíptico em coloração marrom (Figura 3-d) e polpa esbranquiçada e comestível (Figura 3-e), de sabor agridoce (HOUAISS; VILLAR; FRANCO, 2006; VIEIRA & GUSMÃO, 2008; SOUZA et al., 2016). Embora difundida pela maior parte do Brasil, é nas regiões Norte e Nordeste o que a pitombeira é mais predominante utilizada, desde as folhas e madeira, até ao fruto propriamente dito (GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2003). O estado de Pernambuco provavelmente seja o maior produtor de pitomba, pois seu cultivo está bastante enraizado à cultura e à tradição local, envolvendo diversas famílias durante a safra (SILVA et al., 2021; COELHO, 2012).

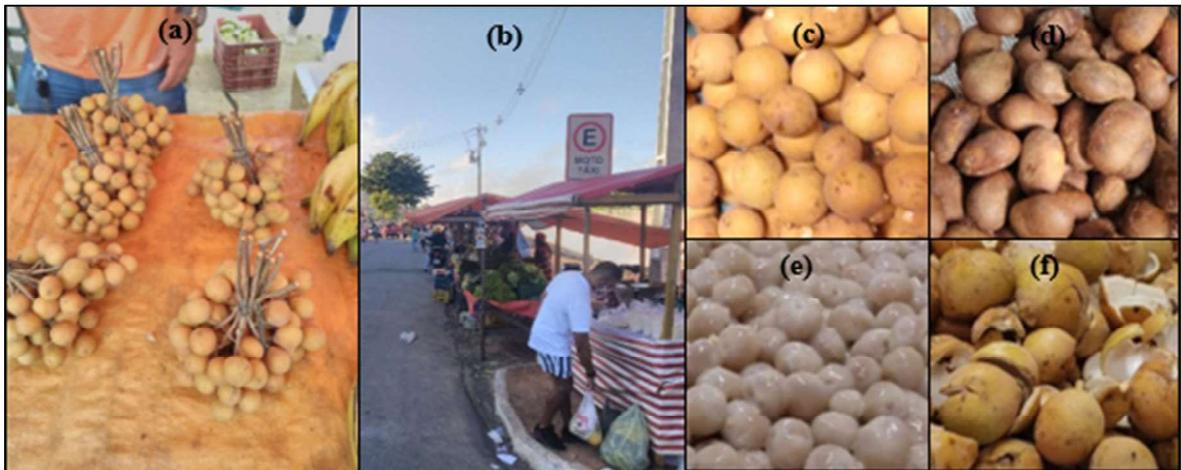
O fruto de pitomba é também denominado de ‘olho de boi’, sendo em aparência muito semelhante à longan (‘olho de dragão’), pelo fato de serem drupas globosas de casca amarelado-amarronzada e polpa esbranquiçada. A similaridade é tal que, em algumas regiões do Brasil, estudos com longan (*Dimocarpus longan*) faça referência à pitomba (*Talisia esculenta*), o que pode ser atribuído à nomenclatura popular local (LIMA, 2019; SOUZA, 2022). Entretanto os frutos diferem entre si por características específicas: (i) a coloração da casca (Figura 3-f) de pitomba é ligeiramente mais amarelada e lisa, enquanto a longan possui a casca amarronzada (castanha) com um suave ‘desenho’ texturizado; (ii) a semente da pitomba é bastante aderida à polpa, à medida que a semente da longan se desprende da polpa com facilidade; (iii) a polpa da longan tem sabor adocicado, todavia a pitomba possui sabor acidulado/adocicado (agridoce); (iv) a semente da pitomba possui coloração marrom opaco, enquanto que o caroço de longan é escuro e brilhante; (v) a pitomba se adapta a regiões tropicais, ao passo que a longan se adequa mais a regiões subtropicais (SOUZA, 2016; HOUAISS; VILLAR; FRANCO, 2006; VIEIRA; GUSMÃO, 2008; DE JESUS et al., 2008; COSTA; 2017).

Em estudo citogenético, observou-se na pitomba cariótipo cromossômico diploide com $2n = 32$, constituído por unidades de 1,0 a 2,5 μm (ÉDER-SILVA et al., 2007; ÉDER-SILVA; ARAÚJO, 2014). Há estudo que sugere a variação de massa como indicativo da possibilidade de aplicação de melhoramento genético na espécie (VIEIRA; GUSMÃO, 2008). De acordo com Corrêa (1974 *apud* GUARIM NETO et al., 2003), tanino está presente nas cascas e folhas, cuja seiva é ictiotóxica.

O fruto comumente é comercializado na forma *in natura* em feiras livres geralmente situadas no Norte-Nordeste do Brasil (Figura 3-b), apresentando valor econômico acessível, sendo um cacho (Figura 3-a) com até 70 unidades da ordem de R\$ 2,00 (dois reais).

A expressão do fruto é tão considerável no Nordeste brasileiro que em Pernambuco dá nome a uma festa religiosa, a tradicional Festa de Nossa Senhora dos Prazeres, conhecida nacionalmente como Festa da Pitomba, a qual é uma das manifestações religiosas e tradicionais mais antigas do Brasil. Esta movimentação festiva é realizada anualmente no mês de abril, no pátio do Parque Histórico Nacional dos Guararapes, considerado o berço da nacionalidade brasileira, localizado no município de Jaboatão dos Guararapes - PE. A atribuição do nome ‘Festa da Pitomba’ decorre da época da safra do fruto, a qual coincide com o período da tradição religiosa local (FERRAZ, 1998; MARTINS, 2015).

Figura 3 – Pitomba: (a) cachos; (b) feira livre; (c) fruto; (d) sementes; (e) polpa; (f) casca.



Fonte: Autor

A polpa tem sido a parte mais usualmente comestível do fruto. Apresenta-se também a forma arredondada preservando a tipologia do fruto, é translúcida com cerca de 2,5 a 3,0 cm de diâmetro, de sabor agridoce, geralmente consumida ao natural, sendo também utilizada para sucos, e geleias (SOUZA et al., 2016; RABELO, 2012; NETO; SANTANA; SILVA, 2003; BEZERRA et al., 2016). Verifica-se na literatura alguns estudos que usam a polpa de pitomba na obtenção de extratos para avaliar potencial antioxidante do fruto (SOUZA et al., 2016; NASCIMENTO FRAGA et al., 2021; NERI-NUMA et al., 2014).

As sementes da pitomba são classificadas como recalcitrantes, requerem plantio imediato, ou, podem ser armazenadas em saco de polietileno por até 25 dias em temperatura ambiente, de sorte a garantir a manutenção de sua qualidade fisiológica, a fim de que se possa obter emergência de plântula acima de 80% (SENA, 2014). Os resultados produzidos por Ursulino Alves et al. (2009) apontam germinação da ordem de 90%, quando as sementes são previamente submetidas à fermentação em água por 4 dias. A forma de contato com o solo

influencia na velocidade e crescimento inicial das plântulas, recomendando-se faixa de profundidade de 2,5 a 3cm e, posicionamento do hilo ascendente ou verticalmente (URSULINO ALVES et al., 2013).

Constata-se na semente a presença de glicoproteína lectina com efeito inibitório sobre fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae*, e sobre larvas de insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, bem como induz resposta inflamatória em ratos pelo acúmulo de células neutrófilas, devido a mecanismo relacionado com a parte ligada ao carboidrato (FREIRE et al., 2002, 2003; MACEDO et al., 2002, 2011; MACEDO; DE CASTRO; FREIRE, 2004; SANTOS et al., 2008). Há estudos que comprovam que a ingestão de folhas e sementes *in natura* de *T. esculenta* por ovinos e gados afetam o seu sistema nervoso, causando-lhes por vezes intoxicação aguda, em que sua recuperação depende do tamanho da dose ingerida. Porém, a infusão de folhas e sementes por humanos para fins de medicina popular não têm causado intoxicação. Há a possibilidade desta diferença está associada à dose de ingestão ou à suscetibilidade dos ruminantes à seiva (ALMEIDA et al., 2021; RIET-CORREA et al., 2014, 2017).

Por outro lado, Castro et al. (2019) avaliaram a extração de amido do endocarpo na utilização em *catchup* e revestimentos comestíveis. Há também na literatura alguns estudos envolvendo extratos da semente de pitomba. Com efeito, Dantas et al. (2020) por meio de extrato etanólico realizaram testes fitoquímicos, quantificação de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante (DPPH) e atividade de inibição da enzima Acetilcolinesterase. Foram identificados vários metabólitos secundários como taninos condensados, catequinas, esteroides e alcaloides.

A casca da pitomba também tem sido estudada, embora existam poucas pesquisas abordando este coproduto. Há estudo da extração por percolação exaustiva usando hexano e etanol como solventes, para avaliação da capacidade antioxidante, identificação de compostos fenólicos, bem como análise de citotoxicidade *in vitro* (FRAGA et al., 2018; 2021), e de análise bromatológica e fitoquímica (SILVA et al., 2021). Quanto à aplicação industrial, Santos et al. (2020) sugere o enriquecimento de outros produtos de alta aceitação no mercado através da possível incorporação de farinhas mistas que pudessem incluir o uso da casca de pitomba, enquanto Silva et al. (2021), ao constatar boas qualidades nutricionais em farinhas das cascas de cupuaçu e pitomba, sugere a possibilidade da troca total ou parcial da farinha de trigo na elaboração de biscoitos, pães, cookies e outras massas.

2.1.3. Composição centesimal

Em consulta à literatura, nota-se que em geral as pesquisas com pitomba relatam a caracterização físico-química do fruto. Vários autores podem ser citados, a exemplo de Silva *et al.* (2008), Marin, Siqueira e Arruda (2009), Fraga (2018), Santos *et al.* (2019) e Castro (2019), os quais determinaram umidade da ordem de 80% na polpa, além da determinação intercalada dos macronutrientes nas partes do fruto, como proteínas, lipídeos, carboidratos, fibra alimentar e resíduo mineral fixo (Tabela 1), constatando na polpa um teor de cálcio (26,7 mg/100 g de fruto), zinco (0,84 mg/100 g de fruto) e ferro (0,60 mg/100 g de fruto).

Os dados apresentados por Queiroga *et al.* (2018), ao quantificar proteínas nas partes da pitomba, mostraram um teor de 37,50% na casca e 29,94% na semente, valores significativamente destacados, que a princípio contribuiriam para uma expectativa motivacional de parte do trabalho presente, quanto ao estudo da concentração proteica destas partes constituintes.

Tabela 1 – Composição centesimal da pitomba expressa em base seca (g/100g de amostra)

Parte do fruto	Autor (ano) - parte do fruto / composição	^{1,2} Santos <i>et al.</i> (2019) - casca; Silva <i>et al.</i> (2008) - polpa	^{1,2} Fraga (2018) - casca e polpa; Castro (2019) - semente	^{1,2} Queiroga <i>et al.</i> (2019)
Casca	Proteínas	10,99 ± 0,03	6,45 ± 0,38	37,50 ± 2,50
	Lipídios	2,39 ± 0,03	0,24 ± 0,05	
	Fibra	83,67 ± 1,10	89,35 ± 1,97	
	Carboidrato n.f.			
	Cinzas	5,10 ± 0,03	3,92 ± 0,24	
Polpa	Proteínas	6,83 ± 0,12	11,07 ± 0,82	8,24 ± 0,49
	Lipídios	1,13 ± 0,06	3,60 ± 0,05	
	Fibra	14,25 ± 3,38	81,62 ± 0,62	
	Carboidrato n.f.	74,29 ± 4,10		
	Cinzas	3,46 ± 0,06	3,60 ± 0,21	
Semente	Proteínas		8,50 ± 0,04	29,94 ± 1,06
	Lipídios		0,69 ± 0,02	
	Fibra		- - -	
	Carboidrato n.f.		88,35 ± 0,44	
	Cinzas		2,46 ± 0,05	

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3; ²Resultados obtidos através da conversão de base úmida para base seca, quando necessária.

Fonte: Autor

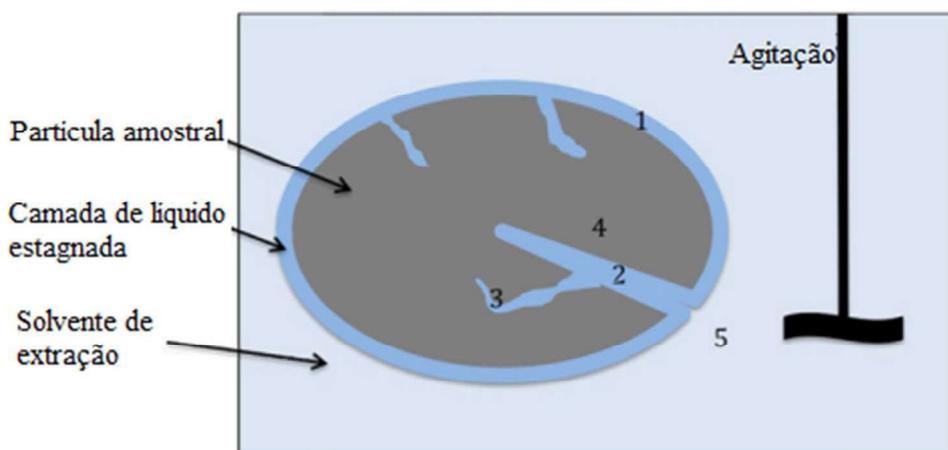
2.2. EXTRAÇÃO

Os extratos vegetais têm sido vastamente utilizados para a concentração de compostos naturais, com potencial de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (ZANDONÁ, 2021). A técnica de extração é uma operação unitária que consiste na separação ou purificação de um componente da matriz do material, a partir da prensagem (extração por pressão) ou, dos diferentes graus de solubilidade dos constituintes (extração por solventes). Nesse último caso, a técnica de extração requer a escolha apropriada de solventes de acordo com a polaridade dos compostos de interesse presentes na matriz vegetal (SANTOS, 2018).

O mecanismo da extração sólido-líquido envolve diversas etapas. A princípio, por meio do contato com o solvente líquido, o composto de interesse é primeiramente desorvido do seu local na matriz; a seguir, difunde-se através da parte orgânica da matriz até alcançar a interface matriz-fluido. A partir desta fase, o composto alvo é distribuído no extrato, em seguida difundindo-se através da fase de extração que está presente no poro, até atingir a fase conduzida pela convecção. (WALDEBÄCK, 2005; CAMEL, 2001; MUSTAFA; TURNER, 2011; ONG; CHEONG; GOH, 2006).

A extração dos compostos bioativos a partir das matrizes vegetais depende do seu posicionamento no interior da amostra, em que há cinco possibilidades atualmente conhecidas: (i) adsorvido na superfície da matriz; (ii) dissolvidos nos poros da matriz e/ou adsorvidos na superfície do poro; (iii) dissolvidos/adsorvidos em um micro/nano poro; (iv) quimicamente ligado à matriz; (v) dissolvido na solução global. (SANTOS, 2018; WALDEBÄCK, 2005; MUSTAFA; TURNER, 2011). A Figura 4 ilustra estas possibilidades.

Figura 4 – Posicionamento do analito na matriz amostral



Fonte: adaptado de Mustafa & Turner [2011]

A etapa que limita a velocidade no processo de extração depende da natureza da matriz a ser extraída. Em aplicações ambientais, a etapa de dessorção é geralmente a etapa que limita o ritmo, todavia em vegetais, a etapa que limita a velocidade é mais frequentemente a etapa de solubilização ou a etapa de difusão (CAMEL, 2001; MUSTAFA; TURNER, 2011; PAWLISZYN, 2003; SMITH, 2002).

A técnica de extração é fundamental na recuperação de componentes biológicos da biomassa de matérias-primas vegetais, a fim de proporcionar altos rendimentos e purificação de compostos com alto valor agregado, sendo aplicados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (MITRA; MISHRA, 2019). A condução do processo de extração pode ser efetuada pela aplicação de métodos convencionais ou alternativos (BEDIN, 2018; FELLOWS, 2006). A tipologia do método de extração pode influenciar fortemente a composição do extrato. Consequentemente, é importante obter um método de extração ótimo no processamento de determinado produto natural, a fim de explorar as aplicações potenciais das diferentes técnicas envolvidas no processo (CHENG et al., 2023).

2.2.1. Extrações convencionais

As extrações por solvente convencionais mais usuais têm sido os métodos de infusão (decoção), hidrodestilação, Soxhlet e maceração. Estes métodos em geral são designados tradicionais por serem realizados à pressão atmosférica, não permitindo alterar as condições da pressão e temperatura (OLIVEIRA et al., 2018; ZANDONÁ, 2021).

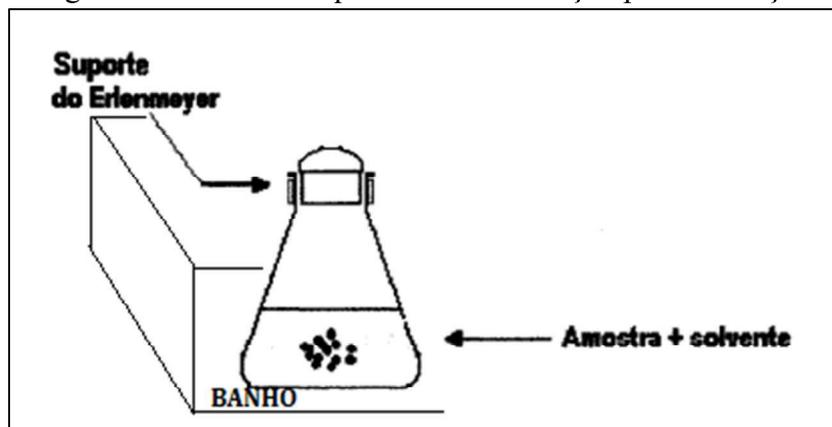
2.2.1.1. Maceração – (MAC)

A maceração é um método convencional no qual o processo de extração é realizado em um recipiente fechado, consistindo basicamente em pôr o material contendo o composto de interesse em contato com uma quantidade de solvente preestabelecida, em temperatura ambiente, durante um longo período (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do solvente extrator. Dispõe de solventes orgânicos em função da polaridade e, pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (BERTOCO JÚNIOR et al., 2021; FERRI, 1996). Fatores como tamanho da

partícula do material a ser extraído, umidade, tipo de solvente e a relação sólido-líquido podem interferir no rendimento no processo de extração (BRUM et al., 2009).

Este processo apresenta vantagens por ser uma técnica padrão, possuindo poucas variáveis de controle, tendo baixo custo e permitindo o uso de maiores quantidades de amostra, além da facilidade de sua operação (JACQUES, 2005). A Figura 5 apresenta o desenho esquemático da configuração do sistema.

Figura 5 – Desenho esquemático da extração por maceração



Fonte: adaptado de Jacques [2005]

Contudo, em geral a maceração apresenta menor rendimento e maior tempo de extração quando comparada com outros métodos, além de promover a exposição do analista a solventes e das possibilidades de saturação do solvente e de contaminação (CHENG et al., 2023; PONTES et al., 2018; JACQUES, 2005). Uma das formas de aumentar o rendimento nos processos de maceração é adicionando agitadores contínuos ou ocasionais aos extratores, tornando o processo dinâmico (BERTOCO JÚNIOR et al., 2021).

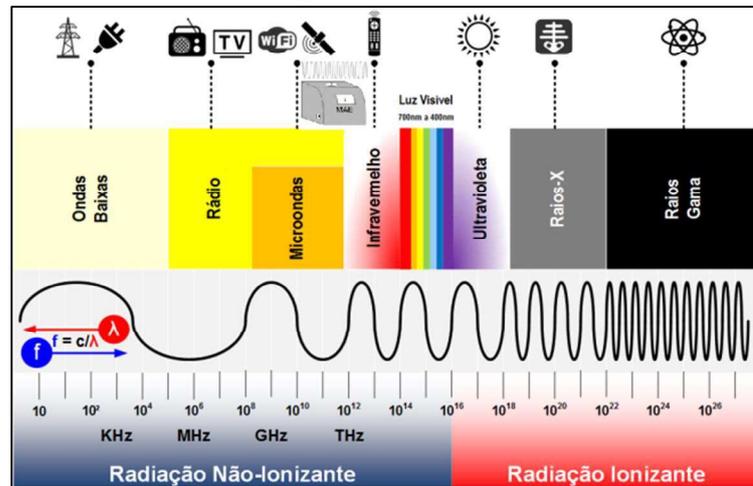
2.2.2. Extrações verdes

As extrações alternativas são aquelas que, aliadas ao conceito de biorrefinaria, contribuem para redução de desperdícios, atenuando a geração de resíduos. Por vezes denominadas de extrações verdes ou ambientalmente amigáveis, compõem cinco grupos mais estudados atualmente: extração por fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, extração por líquido-pressurizado, extração com água subcrítica e extração assistida por micro-ondas (BEDIN, 2018; TORRES et al., 2022c).

alteram a organização eletrônica da matéria. A parte visível do conjunto de frequência designa-se por “espectro visível” e, ocupa uma faixa estreita de comprimentos de onda, $\lambda = 400$ a 700 nm, desde o violeta até o vermelho (CAMPOS NUNES, 2023; MARTINS; NEVES, 2015; VILELA; 2015).

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes com frequência na faixa de 300 MHz a 300 GHz ou com comprimentos de onda de 1 m a 1 mm, posicionando-se no espectro eletromagnético entre as ondas de raios de infravermelho e ondas de rádio (Figura 7). A técnica MAE consiste no aquecimento da biomassa através de energia de micro-ondas, a fim de liberar o composto almejado da matriz para a fase líquida (MANDAL; MOHAN; HEMALATHA, 2007; BEDIN, 2018; VILELA; 2015).

Figura 7 – Espectro de ondas eletromagnéticas: faixa amarelo amarelo-âmbar micro-ondas

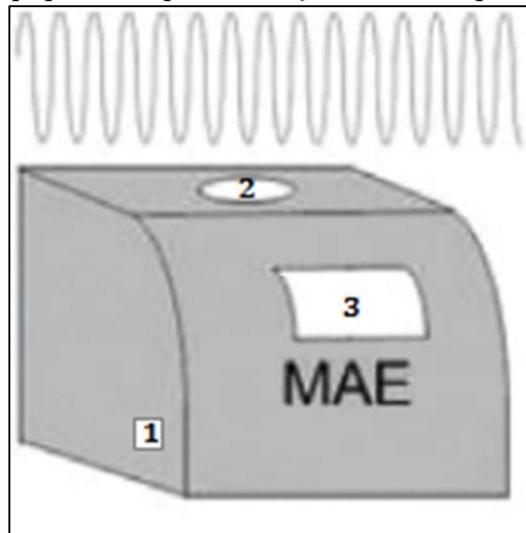


Fonte: adaptado de Campos Nunes [2023]

O uso da tecnologia de micro-ondas permite obter um bom desempenho na extração de compostos naturais. Em contraste a algumas desvantagens apresentadas pelas extrações convencionais, em geral apresenta-se como uma alternativa mais eficiente e sustentável, mais segura, de fácil aplicabilidade, proporcionando economia de energia, menor uso de solventes orgânicos e, apresentando maior gama de abrangência quando se refere ao tipo de matéria-prima e solvente que podem ser utilizados (FERREIRA, 2020; TORRES et al., 2022a). Apresenta em geral melhores rendimentos, sobretudo em matrizes vegetais, devido à ruptura de células causada pelas micro-ondas, as quais liberam os compostos alvo presentes no substrato (RODRIGUES et al., 2020a). Outra vantagem singular é que em determinados micro-ondas há a possibilidade de realização de várias amostras simultaneamente.

É importante ressaltar que o método de extração por micro-ondas requer um tempo de resfriamento e uma etapa posterior de filtração, além do necessário cuidado com compostos termo sensíveis, uma vez que neste processo as temperaturas atingidas são superiores aos pontos de ebulição, as quais podem gerar o problema de degradação destes compostos. A Figura 8 indica um design básico de um equipamento micro-ondas na assistência à extração de componentes de produtos naturais.

Figura 8 – *Design* do equipamento para Extração Assistida por *Micro-ondas (MAE)



*[1 – conexão USB para retirada dos dados do software; 2 – câmara de recepção da amostra (*vial*);
3 – Painel eletrônico com ecrã tátil para introdução das variáveis de processo]

Fonte: adaptado de Rodrigues *et al.* [2020]

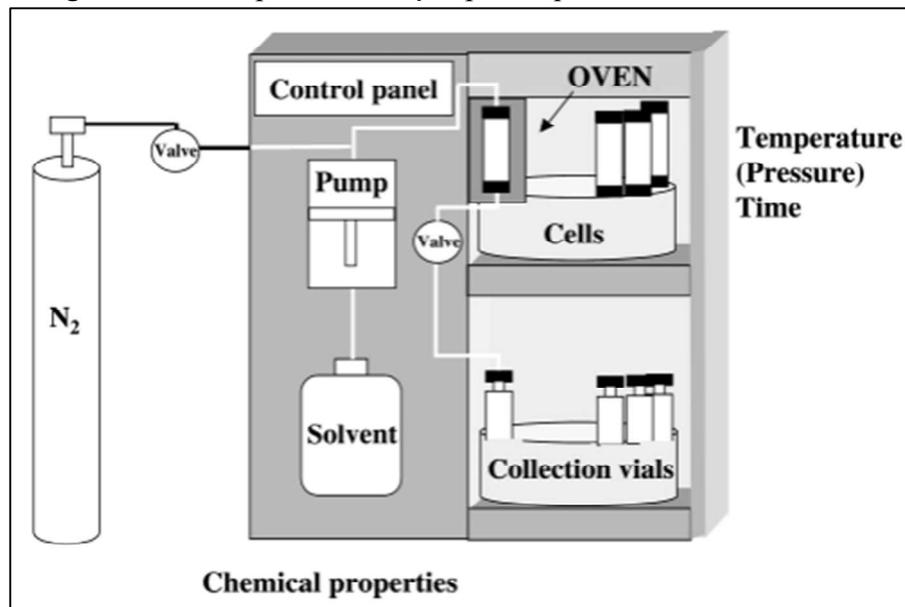
A extração MAE pode ser influenciada por vários parâmetros, tais como o solvente, potência do micro-ondas, temperatura, razão sólido-líquido e tempo. Estas condições devem ser otimizadas a fim de se obter o mais alto rendimento de processo (GULLÓN *et al.*, 2020).

Em suma, a extração assistida por micro-ondas consiste numa tecnologia inovadora de extração com aplicação múltiplas (LIMA, 2015; LA NASA *et al.*, 2021), sendo comumente empregada em extrações de compostos de diferentes fontes vegetais (FERREIRA, 2020), tais como folhas (TORRES, 2021; RAFIEE *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2020b; TORRES *et al.*, 2022a), grãos (BEDIN *et al.*, 2019; PHONGTHAI; LIM; RAWDKUEN, 2016), frutos (BONDAM *et al.*, 2022; CHENG *et al.*, 2023), cascas (MANDAL; MOHAN; HEMALATHA, 2007), sementes (IBRAHIM; OMILAKIN; BETIKU, 2019), farinhas (OCHOA-RIVAS *et al.*, 2017) e resíduos agroindustriais (WEN *et al.*, 2021).

2.2.2.2. Extração por líquido pressurizado (PLE)

A extração por líquido pressurizado (PLE) é considerada uma tecnologia promissora para a extração de uma ampla variedade de compostos biologicamente ativos de diferentes fontes naturais. Apresenta-se como uma alternativa viável aos métodos convencionais na extração de componentes de alto valor agregado de subprodutos alimentares (MACHADO et al., 2015; GULLÓN et al., 2020). Seu mecanismo de ação é ilustrado na Figura 9, a qual mostra o design do processo e os parâmetros de influência.

Figura 9 – Princípio da Extração por Líquido Pressurizado - PLE



Fonte: Camel [2001]

A técnica PLE, através da influência das condições do binômio temperatura/pressão, permite alterar as propriedades do solvente, a exemplo da redução de viscosidade, tensão superficial e polaridade, aumentando a solubilidade do analito no meio (BUBALO et al., 2018). A escolha conveniente do solvente deve levar em consideração a sua afinidade com o soluto da matriz vegetal, preferencialmente fazendo uso de insumos reconhecidos como seguros, tais como a água e o etanol (RUDKE et al., 2019). A água por sinal tem sido estudada devido ao baixo custo e às propriedades específicas para processos de extração hidrotermais e oxidativos, em que pode atuar como um solvente menos tóxico que os solventes orgânicos (SANTOS, 2018). Com o intuito de se obter maior amplitude de solubilidade, a água costuma ser empregada também em solução miscível com etanol, em que a concentração deste e a

temperatura têm sido geralmente variáveis de processo (SORITA, 2021; SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016).

Esta técnica utiliza solventes líquidos em ampla faixa de temperatura (25 a 200 °C) e pressão (3 a 200 bar), de modo a garantir que o solvente continue em seu estado líquido, o que aumenta em geral o rendimento de extração, quando comparado com o desempenho de técnicas tradicionais (MUSTAFA; TURNER, 2011).

A extração PLE apresenta quatro vantagens principais, a saber: (i) os solventes mais utilizados são etanol e água, os quais em geral são de baixo custo, ambientalmente amigáveis e não tóxicos; (ii) o processo em geral economiza energia, devido ao calor sensível do líquido ser menor do que o calor de vaporização, necessitando menos energia para aumentar a temperatura do que a geração de vapor; (iii) estudos mostram que altas quantidades de polifenóis são recuperados quando se usa temperaturas altas; (iv) a condução do processo é simples e intuitiva, haja vista a baixa complexidade do equipamento (PANJA, 2018).

Em síntese, a extração por líquido pressurizado consiste numa tecnologia alternativa de extração de compostos bioativos e macronutrientes, apresentando múltiplas aplicações (JASKI et al., 2019), tendo sido também utilizada ultimamente em extrações de compostos provenientes de diversos tipos de fontes vegetais como folhas (TORRES et al., 2021; ZANDONÁ, 2021), grãos (HERBST et al., 2021), frutos (ALIAÑO-GONZÁLEZ et al., 2020; BALLESTEROS-VIVAS et al., 2019; GARCÍA et al., 2021; VIGANÓ et al., 2022), raízes (DEBIEN et al., 2015), cascas (GARCÍA et al., 2021; RUDKE et al., 2019), sementes (FUENTES et al., 2021) e resíduos agroindustriais (PAVEZ et al., 2019; MACHADO et al. 2015).

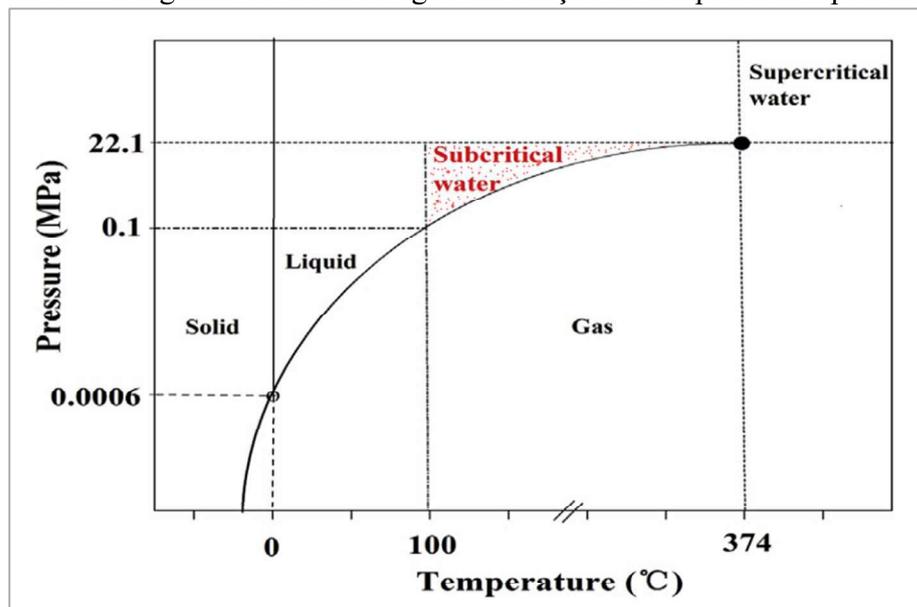
2.2.2.3. Extração por água subcrítica (SWE)

A extração por água subcrítica (SWE, do inglês *Subcritical Water Extraction*) é considerada um caso especial de Extração por Líquido Pressurizado (PLE), sendo também denominada de Extração por Água Quente Pressurizada (PHWE - do inglês, *Pressurized Hot Water Extraction*). A água subcrítica é a nomenclatura designada para expressar a água na faixa de temperatura de 100 a 374 °C, durante operações que exploram altas pressões, porém abaixo de 22 MPa, o suficiente para manter a água em estado líquido, conforme indica região com *hachura* colorida pontilhada no diagrama de fase mostrado na Figura 10. Mais comumente a água tem sido utilizada em condições mais restritas, operando na faixa de 2 a 20 atm de pressão e 80 a 180 °C de temperatura (PANJA, 2018).

A transferência de massa durante este processo de extração é potencializada com o aumento do poder de solubilização da água, o qual é concretizado pela interferência do aumento de temperatura, provocando o rompimento das ligações de aderência soluto-matriz, por intermédio da dissolução das interações moleculares, sejam pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals ou atrações dipolo-dipolo, possibilitando o arraste do soluto pela água em seu estado subcrítico, separando-o da matriz vegetal (SORITA, 2021; ZHANG et al., 2020).

Neste processo os compostos termicamente instáveis podem ser degradados com o incremento de temperatura, contudo, o aumento de pressão juntamente com o tempo curto de extração invalida o inconveniente, além do que, sob temperatura e pressão elevadas, a água subcrítica tem a polaridade e constante dielétrica modificadas, contribuindo para um processo de extração mais eficiente, por meio do aperfeiçoamento da transferência de massa (TEO et al., 2010; ZHANG et al., 2020).

Figura 10 – Diagrama de fases da água em função da temperatura e pressão



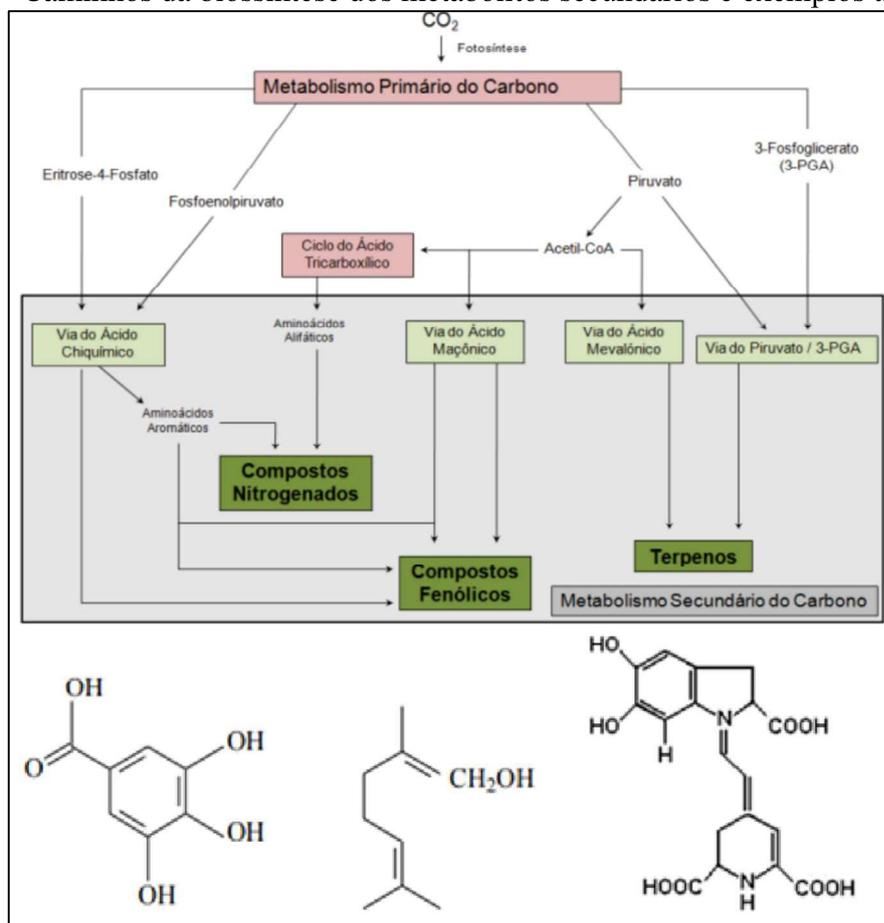
Fonte: Adaptado de Zhang et al. [2020]

A extração por água subcrítica é, portanto, uma tecnologia ambientalmente amigável, economicamente viável, rápida, escalonável e mais eficiente, quando comparada às técnicas convencionais em processos de extração, notando-se seu uso na exploração de fontes vegetais, principalmente na recuperação de proteínas e carboidratos (ÁLVAREZ-VIÑAS et al., 2021; PANJA, 2018; TORRES et al., 2022c; VARDANEGA et al., 2017).

2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS

O funcionamento das células vegetais envolve dois tipos de metabolismos: o primário e o secundário (MENEZES, 2020). O primeiro produz os metabólitos primários essenciais à vida celular, tais como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos graxos, polissacarídeos e clorofila, os quais possuem baixa atividade biológica e participam dos processos de respiração, fotossíntese e transferência de massa, sendo responsáveis pelas funções plásticas, estruturais e de armazenamento de energia (FRAGA, 2018). O segundo, é responsável por produzir os metabólitos secundários, os quais embora não sejam considerados indispensáveis à sobrevivência das plantas, são ecologicamente eficazes, contribuindo para a diferenciação de espécies sendo restritos a organismos específicos. Apresentam baixo peso molecular, estrutura complexa, alta atividade biológica, baixas concentrações e, conforme indicado e exemplificado na Figura 11, são categorizados de acordo com a rota metabólica, em terpênicos, fenólicos e compostos nitrogenados (SILVA; CORDEIRO BIZERRA; FERNANDES, 2018).

Figura 11 – Caminhos da biossíntese dos metabólitos secundários e exemplos tipológicos

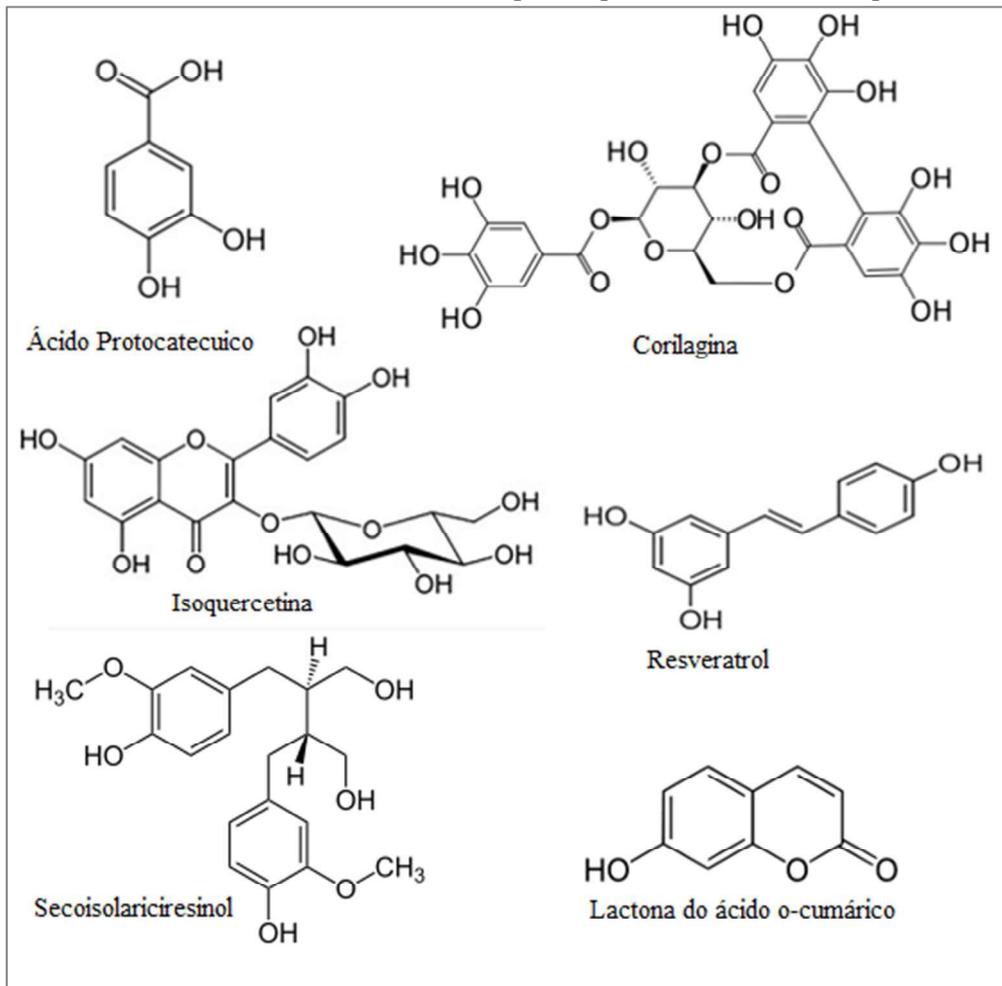


Ácido gálico (composto fenólico), geraniol (composto terpênico) e betacianidina (composto nitrogenado)

Fonte: Adaptação de Fraga [2018]; Silva, Bezerra e Fernandes [2018]; Peres [2004]

Os compostos fenólicos são os produtos de metabolismo secundário das plantas que possuem propriedades antioxidantes, podendo ser adicionados aos alimentos em pequenas quantidades, com capacidade para retardar a produção de radicais livres e a oxidação de nutrientes (BONDAM et al., 2022; GUEBOUDJI et al., 2023), sendo globalmente quantificados pelo método Folin-Ciocalteu, desenvolvido por Singleton e Rossi em 1965 (SORITA, 2021). Estes compostos são categorizados em até seis grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, cumarinas e lignanas (ver Figura 12), sendo conhecidas quase 10 mil estruturas diferentes, desde as mais simples até as mais complexas (FERREIRA, 2022; GUEBOUDJI et al., 2023; SORITA; LEIMANN; FERREIRA, 2023). Alguns autores os classificam como flavonoides e não flavonoides (CAÑADAS et al., 2020) e, sua extração efetiva sugere a possibilidade da produção de ingredientes funcionais, os quais poderiam ser introduzidos em matrizes alimentares (OLDONI et al., 2016; ROSSI et al., 2020).

Figura 12 – Estruturas moleculares de exemplos representativos de compostos fenólicos

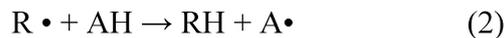


Ácido Protocatecuico (ácido fenólico); Corilagina (tanino); Isoquercetina (flavonoide); Resveratrol (estilbeno); Secoisolariciresinol (lignano); Lactona do ácido o-cumárico (cumarina)

Fonte: Adaptado de Oliveira [2016] e Sorita; Leimann; Ferreira [2023]

2.3.1. Atividade antioxidante

Em consonância com Shahidi (2005), é possível classificar os antioxidantes em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os primários em geral propiciam a remoção ou inativação dos radicais livres, formados durante a iniciação ou propagação da reação de oxidação, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, estagnando a reação em cadeia. Através das equações (1) a (6), é possível observar o princípio deste mecanismo, em que: ROO• e R• representam radicais livres; AH é uma molécula antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A• um radical antioxidante.



Os radicais antioxidantes são capazes de participar em reações com peróxido (equação 3), alcóxidos (equação 4 e 5), ou com os próprios radicais antioxidantes (equação 6), eliminando os radicais livres do sistema celular (SHAHIDI, 2005).

Os compostos fenólicos, classificados como antioxidantes primários, possuem a ação antioxidante como o principal efeito bioativo no corpo humano, a qual contribui para a captura de radicais livres espalhados pelo organismo por meio do mecanismo demonstrado, constituindo-se como aceptores de radicais livres, produzindo moléculas mais energeticamente estáveis (FERREIRA, 2022). Como agentes antioxidantes, projetam-se como aditivos naturais potenciais para serem usados na indústria de alimentos, contrastando com os aditivos sintéticos, tais como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil-galato (PG), cujo uso atual no Brasil é limitado, e até proibido em países com legislação mais restrita, a exemplo do TBHQ inutilizado no Canadá e na comunidade econômica europeia, sobretudo por seus efeitos tóxicos e carcinogênicos (CHEKER; TURELLA, 2019; LIANG; HU; LI, 2020; MESQUITA, 2021; PAN et al., 2008). Os ácidos fenólicos, juntamente com os tocoferóis são exemplos de antioxidantes naturais já utilizados atualmente (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; FERREIRA, 2022).

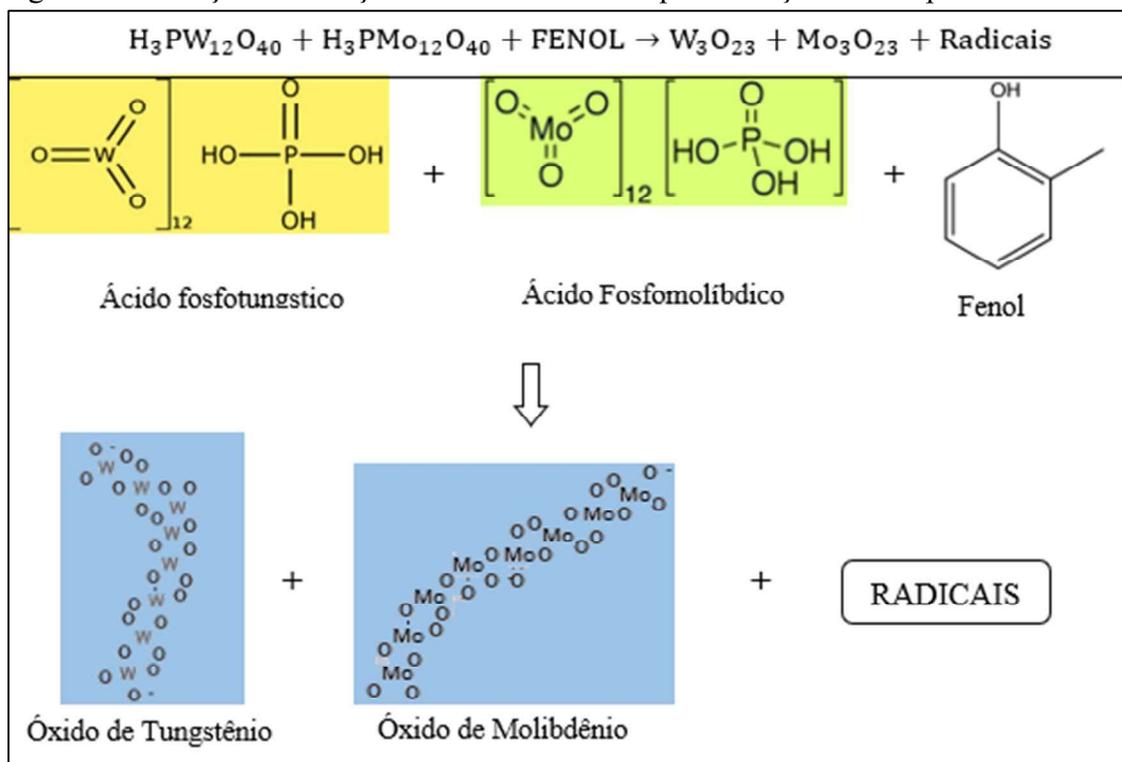
2.3.2. Ensaios de determinação

Há métodos que determinam a presença e quantificação de compostos fenólicos ou sua capacidade antioxidante, tais como os ensaios de Compostos Fenólicos Totais, DPPH e FRAP.

2.3.2.1. Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais podem ser quantificados por métodos espectrofotométricos ou cromatográficos, contudo, os ensaios em sua maioria são realizados em espectrofotômetros, seguindo os métodos de Folin-Ciocalteu, Folin-Denis ou Azul da Prússia, baseados em reações de oxirredução com íons metálicos (SORITA, 2021; SANTOS, 2018). A determinação que usa o reagente de Folin-Ciocalteu foi desenvolvida por Singleton e Rossi em 1965, e atualmente figura em um dos métodos mais utilizados. O reagente de Folin-Ciocalteu é composto pelos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico, de coloração amarelo-esverdeada, os quais, ao reagirem com os compostos fenólicos, formam em meio básico tungstênio e molibdênio azul (SILVEIRA, 2013; SANTOS, 2018), conforme indicado na Figura 13.

Figura 13 – Reação de redução ocorrida durante a quantificação de compostos fenólicos



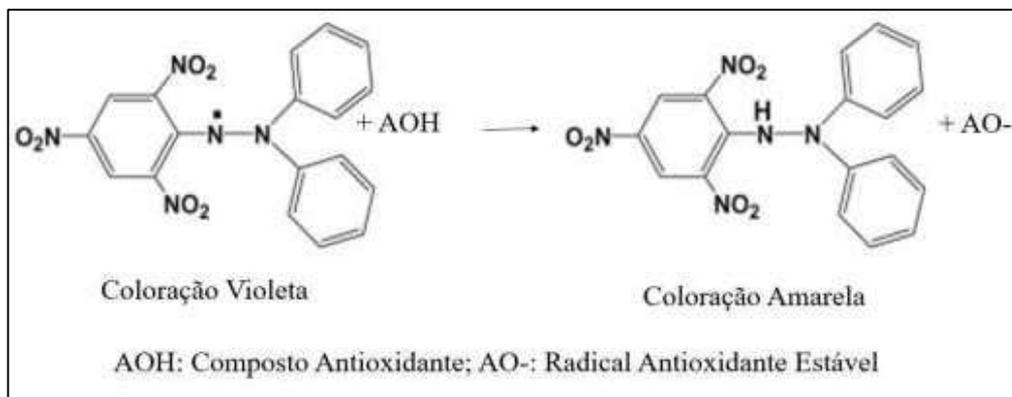
Fonte: montado pelo Autor

Analicamente, salienta-se que a reação descrita na Figura 10 é facilitada pela inclusão de uma solução de carbonato de sódio, basificando o meio (pH~10-12) e gerando um ânion denominado fenolato. O meio alcalino favorece a reação de óxido-redução, promovendo a redução dos ácidos fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelo íon fenolato, a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}), mudando a coloração da solução de amarelo-esverdeado para azulada (complexos de molibdênio-tungstênio), cuja intensidade é proporcional ao número de hidroxilas ou grupos potencialmente oxidáveis dos compostos fenólicos, em que a leitura espectrofotométrica pode ser realizada na absorvância de 760 nm (SANTOS, 2012; GRANATO et al., 2016).

2.3.2.2. DPPH

A metodologia de captura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi criada por Blois em 1958 e modificada pelo grupo de pesquisadores coordenado por Brand-Williams em 1995, tendo seu princípio baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, levando em consideração o sequestro do radical DPPH, estabilizando-o (FRAGA, 2018), conforme ilustra a Figura 14. Sua estrutura é formada por três grupos NO_2 e uma hidrazina, ligados a dois anéis aromáticos de seis membros, em que o átomo de azoto está ligado diretamente ao anel, o qual por sua vez possui um elétron desemparelhado, o que caracteriza a espécie como um radical livre (BOROSKI et al., 2015).

Figura 14 – Mecanismo de estabilização do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazina)



Fonte: Sorita [2021]

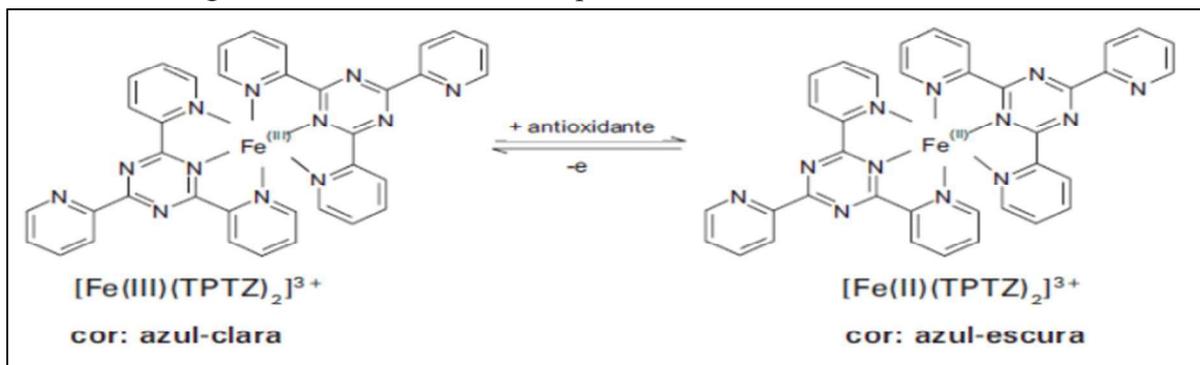
A molécula de coloração preliminar púrpura, ao ser reduzida perde sua tonalidade violeta, tornando-se amarelada. A partir da quantificação desta mudança de coloração, avalia-

se a capacidade redutora do antioxidante presente em determinado extrato (GHANI et al., 2017). Dentre os métodos para a quantificação da capacidade antioxidante o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) tem sido o mais frequentemente utilizado e, sua capacidade de redução é geralmente avaliada por método espectrofotométrico, comumente aferida na absorvância de 515 nm (FERREIRA, 2022).

2.3.2.3. FRAP

O método FRAP (do inglês, *ferric reducing antioxidant power*) foi desenvolvido por Benzie e Strain em 1996 e aperfeiçoado pelo grupo de pesquisa de Pulido em 2000, consistindo em uma análise baseada na habilidade que os compostos antioxidantes exercem na redução do Fe (3+) a Fe (2+) (FERREIRA, 2022; FRAGA, 2018), conforme detalha a Figura 15.

Figura 15 – Conversão do complexo Fe^{3+} - TPTZ em Fe^{2+} - TPTZ



Fonte: Fraga [2018]; Brito [2006]

Esta metodologia apresenta como vantagem ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, não requerendo também equipamentos complexos, além de ser uma das técnicas mais reprodutíveis e apresentar alta correlação com os teores de vitamina C e grupos fenólicos. Entretanto, como desvantagem, verifica-se que alguns compostos não são determinados por este método, a exemplo dos antioxidantes que atuam por transferência de hidrogênio, tais como os carotenoides (SHAHIDI; ZHONG, 2015). A reação de redução desenvolve coloração passível de ser quantificada por espectrometria UV-Vis, mensurada na absorvância de 593 nm (JONES et al., 2017; FRAGA et al., 2021).

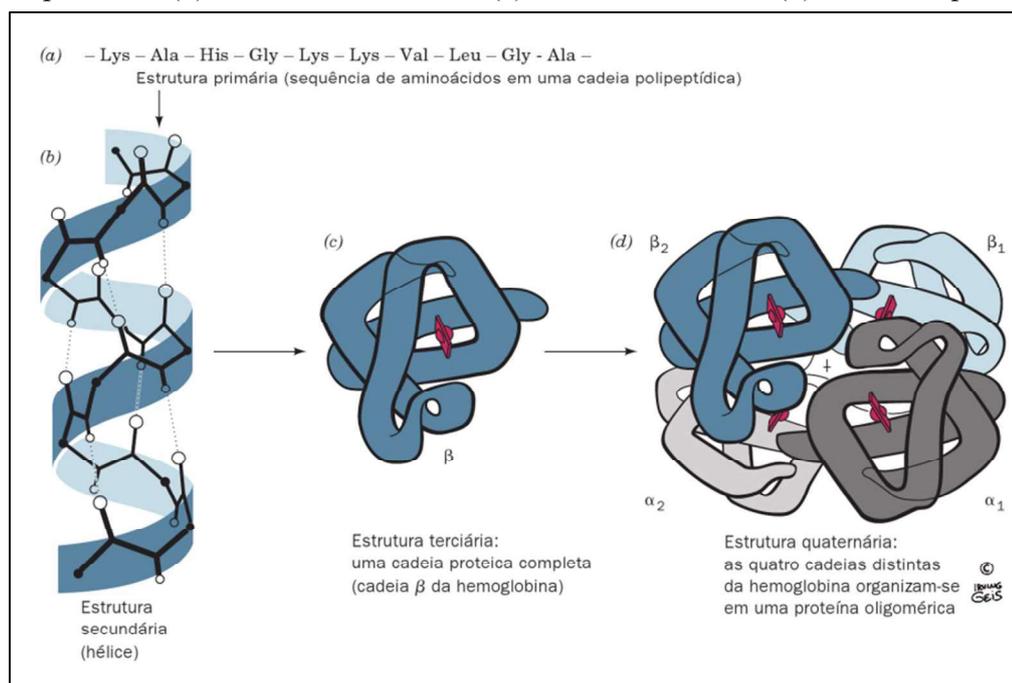
2.4. PROTEÍNAS

O nome ‘proteína’ é de origem grega e significa “de primeira importância”. Refere-se a biomoléculas consideradas compostos orgânicos complexos por apresentarem natureza coloidal, formadas essencialmente por carbono (C), hidrogénio (H), oxigénio (O) e nitrogénio (N), podendo também conter enxofre (S), fósforo (P), ferro (Fe), e cobalto (Co). Suas unidades estruturais básicas, os aminoácidos, estão unidas por elos designados ligações peptídicas (SOARES; OLIVEIRA, 2019).

2.4.1. Estrutura e classificação

Quanto à organização estrutural, as proteínas podem se apresentar em diferentes conformações (Figura 16): (i) estrutura primária, quando são formadas por ligações lineares entre os aminoácidos; (ii) estrutura secundária, referindo-se ao arranjo espacial de radicais de aminoácidos que estejam próximos na sequência linear primária; (iii) estrutura terciária, na ocasião das ligações entre os arranjos espacial de radicais de aminoácidos, formando subunidades; (iv) e estrutura quaternária, quando do arranjo espacial de subunidades e à natureza de seus contatos (CORSINO, 2009; VOET, D.; VOET, J., 2013).

Figura 16 – Hierarquia estrutural nas proteínas – exemplo clássico da hemoglobina: (a) estrutura primária; (b) estrutura secundária; (c) estrutura terciária; (d) estrutura quaternária



Fonte: Donald Voet e Judith G. Voet [2013]

As proteínas podem ser classificadas quimicamente em dois grupos: as proteínas simples, também denominadas homoproteínas, que são constituídas apenas de polipeptídios; e as proteínas conjugadas ou heteroproteínas, que contêm grupamentos adicionados aos aminoácidos, tais como carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (BEDIN, 2018). As proteínas conjugadas incluem, portanto, as Nucleoproteínas, Mucoproteínas, Glicoproteínas, Lipoproteínas, Fosfoproteínas e Metaloproteínas (SOARES; OLIVEIRA, 2019). Estudos apontam crescente demanda mundial no consumo de produtos à base de proteínas, podendo atingir 7 milhões de toneladas até 2025, correspondendo a aproximadamente 50 bilhões de dólares. As fontes biodisponíveis são as proteínas de origem animal e as de origem vegetal (NASCIMENTO; ALVES; BONOMO, 2021).

As proteínas de origem animal são em geral consideradas de alto valor nutricional, incluindo carnes, ovos, derivados do leite e do soro de leite, todavia podem estar associadas a doenças coronárias, aumento do ácido úrico na urina, alta pressão no sangue, alergenicidade, encefalite espongiforme bovina, além de serem proteínas cuja produção demanda maior consumo de água, promovendo perda de biodiversidade e mudanças climáticas (SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020; LIN et al., 2017). As proteínas de origem vegetal são opções que atendem principalmente aos mercados vegetariano, vegano e flexitariano, sendo investigadas atualmente como bom potencial para serem exploradas nas indústrias de alimentos e nutrição, atendendo as demandas nutricionais da população e reduzindo impactos ambientais. Estas proteínas estão presente dentre outras fontes em feijões, soja, ervilha, grão-de-bico, lentilha, trigo, alfafa, nozes e sementes como de abóbora, pêssego e girassol (NASCIMENTO; ALVES; BONOMO, 2021; PIRES RIBEIRO; ROBERTA MALACRIDA, 2022; RUDKE; ZIELINSKI; FERREIRA, 2023).

O valor nutricional e as propriedades funcionais da alimentação humana recebem considerável contribuição das proteínas, sobretudo por suas funções estruturais, tornando sua análise de fundamental importância para a incorporação dos extratos proteicos na formulação de alimentos, os quais podem ser obtidos por extrações convencionais ou alternativas (BEDIN, 2018).

2.4.2. Uso de novas fontes de proteína

A alta procura por água e outros recursos naturais para a fabricação em massa de produtos de origem animal tem se mostrado insustentável, em face do crescimento populacional, produzindo efeitos ambientais e econômicos indesejáveis. Neste contexto, fontes

alternativas de nutrientes, principalmente de proteínas, plantas, algas, fungos, ou resíduos agroindustriais, podem ser avaliadas para o consumo humano, com potencial de redução em impactos ambientais, no âmbito dos sistemas de produção alimentícios atualmente vigentes (OLIVEIRA,2022). Desta maneira, urge a transição de dietas ricas em produtos de origem animal para dietas ricas em alternativas mais ecológicas, proporcionando sustentabilidade ambiental e contribuição para a saúde humana, sendo que nesta transição, aumenta-se o número de flexitarianos, com o hábito de comer carne somente em algumas refeições (CAIADO; DUARTE, 2018; SIQUEIRA, 2022).

Durante o período da pandemia de COVID-19 no Brasil, estudos avaliaram a evolução dos preços da carne bovina e das principais fontes alternativas de proteína, constatando o ovo com uma trajetória mercadológica bem diferente da carne bovina. O preço do ovo teve pico em abril de 2020, seguido de queda, porém com recuperação à medida em que o consumo e preço de carnes em geral voltaram a aumentar, o que deixa evidente ser o ovo uma fonte de proteína animal que substitui as carnes em geral (DIAS, MEDEIROS E MALAFAIA, 2021).

Neste mesmo período, pesquisadores especialistas na área de Nutrição procuraram sondar as preferências dos consumidores quanto à escolha alimentar, constatando que a preocupação com a saúde é um dos fatores preponderantes na intensificação e consolidação de novas tendências alimentares, nas quais, os consumidores voltam-se para o consumo de produtos alternativos mais naturais, à base de plantas, vistos como mais saudáveis e sustentáveis (BIAZZI, 2014). Com efeito, dados levantados por empresas do ramo mercadológico mostram o aumento das vendas globais de carnes feitas de soja, ervilha e outras fontes de proteínas vegetais, sobretudo no período de deflagração da pandemia, embora se pondere que nem sempre os consumidores estiveram preparados para abandonar por completo produtos como carne, leite e ovos (SIQUEIRA, 2022).

Estudos apontam resíduos agroindustriais com potencial para fornecer proteínas à alimentação humana. Estes resíduos apresentam quantidades apreciáveis de cascas, bagaços, caroços e sementes que representam importante fonte de matéria orgânica (MARADINI FILHO; MENDONÇA; MENDITI, 2020). Outros trabalhos caracterizam o consumo atual de leguminosas, algas e insetos pela população, avaliando a possibilidade de inclusão destas alternativas alimentares nas matrizes alimentares. Os portugueses, por exemplo, mostram-se receptivos à necessidade atual de substituição de carne e pescado pelas proteínas alternativas (CAIADO; DUARTE, 2018).

Por outro lado, há evidências da importância das algas como fonte alternativa de proteínas. Pesquisas relatam que, além de apresentarem impactos mínimos ao meio ambiente,

as algas se destacam pelos altos teores proteicos (até ~ 70%) e outros compostos bioativos em sua composição, o que pode impactar positivamente na saúde dos consumidores. Microalgas, por exemplo, requerem cerca de duas vezes menos água se comparada à cadeia de produção da carne bovina, e quase 1.600 hectares a menos considerando a produção de 1 tonelada de proteína de *Chlorella*, em comparação à mesma quantidade de carne (OLIVEIRA, 2022). *Chlorella* e *Spirulina* são as espécies de microalgas que mais se destaca, devido aos seus potenciais nutricionais, bem como à alta digestibilidade da biomassa, portanto, à biodisponibilidade de tais compostos.

A despeito dos potenciais destacados anteriormente, alguns entraves retardam o crescimento mercadológico das algas. Os empecilhos consistem em algumas características das macroalgas e microalgas que dificultam sua utilização como alimento, tal qual a rigidez da parede celular e a inexistência de legislações específicas para a produção e comercialização de alimentos à base de algas (OLIVEIRA, 2022).

Uma alternativa tem se mostrado pesquisas que investigam fontes alternativas à carne a partir de micélios de fungos, bem como o interesse e percepção dos consumidores frente a esses alimentos alternativos. Há estudo que analisa a aceitação dos consumidores brasileiros em substitutos de carne à base de proteínas fúngicas, o que pode estimular o investimento e comercialização destes produtos no Brasil, promovendo uma transição mais sustentável e saudável na alimentação dos brasileiros (GONÇALVES, 2023). A produção e consumo de cogumelos comestíveis é crescente, devido a maiores informações sobre seu potencial no benefício à saúde. Cogumelos são considerados um alimento funcional, rico em substâncias bioativas que apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibiótica, além de ser uma das fontes de proteína alternativas à proteína animal. A obtenção de novos produtos processos por meio do aproveitamento da biomassa pós-colheita dos cogumelos integrados ao cultivo de tomates ou outra cultura olerícola tem despertado interesses pela exploração destes bioprodutos em escala industrial (MACHADO, 2019).

A busca pela saudabilidade por meio da mudança dos hábitos alimentares ocupa uma posição de destaque atualmente. Pesquisadores buscam estudar alimentos alternativos para a manutenção da saúde e até para o tratamento de doenças. Entre os alimentos alternativos surge o Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia Aculeata* Mill.) e o Gergelim (*Sesamum indicum* L.) (MARADINI FILHO; MENDONÇA; MENDITI, 2020; TESSARINI; PEREIRA; PEREIRA, 2021).

A Ora-Pro-Nóbis é uma planta alimentícia classificada como hortaliça não convencional, que se destaca por possuir teor elevado de proteína, fibras, vitaminas e sais minerais, além de ser de baixo custo e de fácil cultivo (TESSARINI; PEREIRA; PEREIRA,

2021). Por ser uma planta facilmente encontrada, de baixo custo e de rico valor nutricional, o ora-pro-nóbis é um forte aliado no combate à fome, além de colaborar no enriquecimento da dieta de vegetarianos e dietas restritas em proteína de origem animal. Entre seus componentes nutricionais, destaca-se a proteína vegetal, as fibras e o cálcio. Esses nutrientes são poderosos para a manutenção da saúde e são fortes aliados no combate às doenças crônicas não transmissíveis (TESSARINI; PEREIRA; PEREIRA, 2021). A valorização de proteína de folhas de ora-pro-nóbis por extrações de Biorrefino com fluidos comprimidos. Os teores de proteínas totais e de hidratos de carbono foram avaliados a partir de amostras de SWE. A SWE a 150 e 185 °C proporcionou a maior recuperação de proteínas (TORRES et al., 2022c).

O gergelim (*Sesamum indicum L.*) é uma das dez principais oleaginosas do mundo. No contexto dos resíduos agroindustriais, possui farelo ou torta que, obtidos da prensagem dos grãos para a extração do óleo, têm excelente composição de aminoácidos importantes, tais como metionina, cistina, arginina e leucina, podendo constituir excelente fonte de proteínas (MARADINI FILHO; MENDONÇA; MENDITI, 2020).

2.4.3. Precipitação por ponto isoelétrico

Em extrações alcalinas é relevante a consideração do estudo da precipitação das proteínas, a qual se dá devido à interação das moléculas de água com as moléculas deste macronutriente, cuja interação depende de fatores tais como cargas superficiais, ponto isoelétrico da biomolécula, força iônica, temperatura e pH do meio (SILVA, 2022).

O ponto isoelétrico da proteína se dá com o pH de menor solubilidade proteica, em que as proteínas apresentam carga neutra, com igual número de cargas positivas e negativas nas moléculas, quando o número de radicais ácidos desprotonados (-COO-) é igual ao número de radicais básicos protonados (-NH₃⁺), de sorte que as repulsões entre as moléculas proteicas diminuem, devido as forças eletrostáticas moleculares estarem em mínimo, permitindo que menos água interaja com as moléculas de proteína, formando uma condição favorável para que as moléculas de proteína se agreguem e formem precipitados (BIANCONI, 2021; BEDIN; 2018). Quando há uma exposição de uma proteína abaixo do seu ponto isoelétrico, ocorre uma modificação da densidade das cargas de uma maior protonação negativa para neutra e, posteriormente uma maior concentração negativa dos seus grupos laterais (FERNANDES DE SOUZA, 2015).

2.4.4. Caracterização de extratos

As características morfológicas dos extratos proteicos são fundamentais na avaliação de sua qualidade. Alguns estudos avaliam o efeito de tratamentos térmicos na estrutura e propriedades de espuma das proteínas, usando técnicas ópticas, tais como hidrofobicidade, teor de sulfidril e potencial Zeta (CHANG; JIANG; LIU, 2022a).

A presença de sulfidril – SH assume um importante papel no melhoramento de propriedades funcionais de alimentos, devido a sua alta atividade reativa. A transformação de grupos -SH em -S-S é relatada na literatura com tendo considerável contribuição na formação de glúten, gelatina e outras proteínas-base de filmes comestíveis, sendo muitas vezes resultado de tratamentos envolvendo transferência de calor ou agentes promovedores de reações de oxirredução. O teor de sulfidril (SH) está correlacionado inversamente ao dano oxidativo às proteínas (GHIZI SOUZA et al., 2021), sendo recorrentemente avaliado no estudo das propriedades de proteínas em alimentos (OU et al., 2004).

Outros pesquisadores apontam a importância da análise de turbidez e cor dos extratos, argumentando que são parâmetros de grande impacto na aceitação do produto pelos consumidores no âmbito das aplicações alimentares (NAIK et al., 2022). Há estudos que avaliam a retenção das proteínas da clara de ovo em solução durante o processamento, sugerindo potencial aplicação na indústria, por meio da fortificação proteica de bebidas com clara de ovo, em que a minimização da turbidez da solução é um parâmetro relevante de modo que a proposta seja vantajosa (LACLAIR; ETZEL, 2009; LIU et al., 2017).

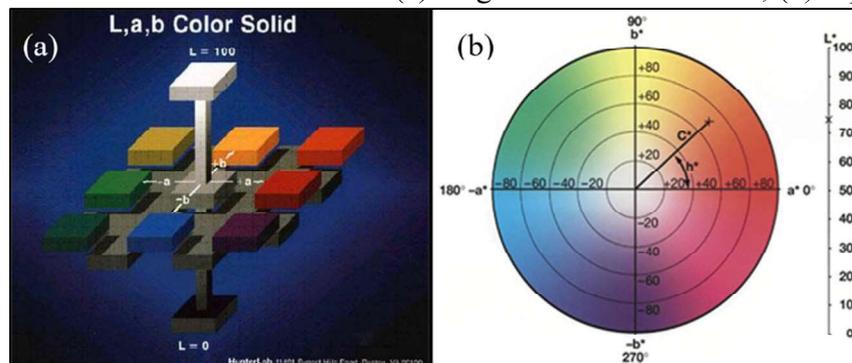
Na área de desenvolvimento de processos industriais de alimentos, o controle de processos pode ser otimizado também com a utilização da colorimetria (FERREIRA; SPRICIGO, 2014). O teor de flavonoides em méis se relaciona com a aparência, mais especificamente com a sua coloração, portanto, o uso do colorímetro pode ser útil como um indicador do teor de flavonoides (CIAPPINI et al., 2013). Há estudos que aplicam a colorimetria na avaliação de embalagens e coberturas comestíveis a base de proteínas, evidenciando a qualidade do produto sem alterar sua visualização inerente (SOBRAL, 2000).

O sistema CIE (Comissão Internacional de Iluminação, do francês *Commission International de l'Eclairage*), desenvolvido em 1976, define a sensação da cor baseado em três elementos: a luminosidade, a tonalidade e a saturação. É de consenso que as especificações de padrões de observação para uso em colorimetria são providas pela CIE em todos os países (CIE, 2017). O conceito CIE parte do princípio de que o ser humano possui três tipos de cores receptoras – vermelho, verde e azul, que todas as cores são combinações destas, e que existem

três condições que definem a existência da cor: o objeto, o iluminante e o observador (FERREIRA; SPRICIGO, 2014).

O sistema CIE $L^*a^*b^*$ fornece uma diferenciação de cores precisa em relação à percepção humana, definindo em três eixos perpendiculares (Figura 17-a): a luminosidade L^* eixo principal (preto = 0 ao branco = 100); e as duas coordenadas cromáticas, a^* (verde (-) ao vermelho (+)) e, b^* (azul (-) ao amarelo (+)) (MARTINS; MANETTI; NUNES, 2013). O espaço $L^*C^*h^\circ$ é um espaço de coordenadas representado pela luminosidade (L^*), cromaticidade (C^*) e ângulo hue (h°) (Figura 17-b). As coordenadas polares h° e C^* definem o ângulo tomado no espaço $L^*C^*h^\circ$ e a saturação, que se refere à distância radial do centro do espaço até o ponto da cor (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

Figura 17 – Sistema CIE de colorimetria: (a) diagrama Hunter $L^*a^*b^*$; (b) espaço $L^*C^*h^\circ$



Fonte: Adaptação de Martins; Manetti; Nunes [2013] e Ferreira e Sprigo [2014]

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

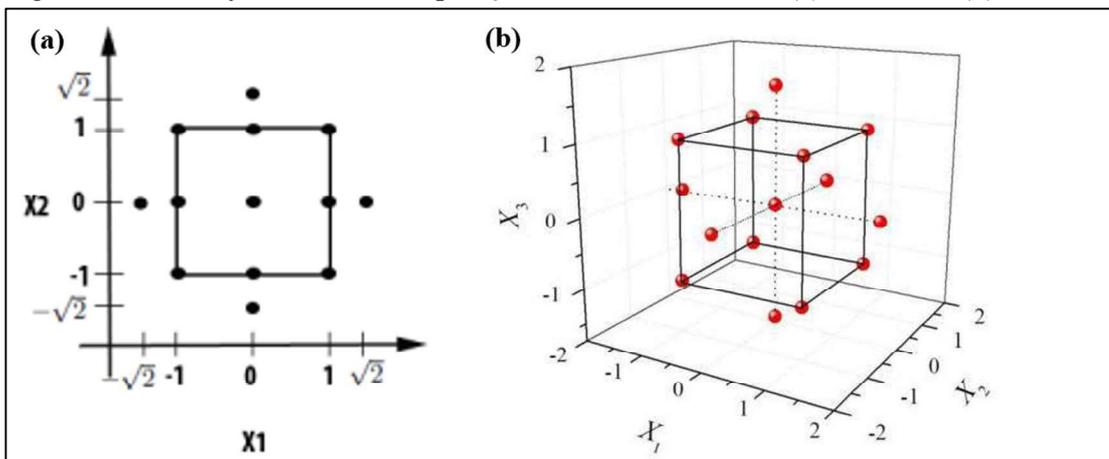
A estatística é a ciência que coleta, organiza, analisa e interpreta os dados de um grupo, sejam amostrais ou populacionais, sendo realizada através de linguagem numérica expressiva oriunda das teorias probabilísticas, tanto em estudos observacionais quanto em experimento, com o intuito de explicar a frequência da ocorrência de eventos, de forma a estimar ou possibilitar a previsão de fenômenos (DANELON; SAMPAIO, 2015; POCINHO, 2014).

A Estatística Computacional tem crescido rapidamente a partir da segunda metade do século XX, tendo um forte impacto na prática da estatística, tendo em vista que, enquanto os modelos estatísticos mais antigos eram quase sempre lineares, os computadores modernos junto com algoritmos numéricos apropriados, causaram um aumento do interesse nos modelos não lineares, os quais dependem da concepção do desenho experimental inicial e da metodologia de condução dos resultados (POCINHO, 2014).

2.5.1. Designs experimentais

O planejamento de experimentos é considerado uma das fases mais importantes da investigação científica, pelo fato de propiciar uma estrutura bem definida para a etapa de experimentos, quando bem executado. Planejamentos fatoriais completos e incompletos são bastante utilizados, bem como o delineamento composto central (DCC) ou planejamento estrela, o qual é um delineamento simétrico de segunda ordem, constituído de duas partes: o fatorial 2^k e a parte axial. Apresenta em geral as vantagens da diminuição do número de ensaios sem perder a boa precisão dos resultados (BARATA MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001; PERÁZIO, 2010). Haja vista sua adequação ao modelo e design de experimentos, o DCC tem sido aplicado nas áreas alimentícia, química e biológica. Usualmente é composto por um ou mais pontos centrais, replicados para uma melhor estimativa do erro puro e, pelos pontos axiais (Figura 18), que se situam a uma distância α dos pontos centrais e sob projeção dos pontos médios de cada nível (CLÍMACO, 2019).

Figura 18 – Planejamento de composição central com $\alpha=\sqrt{2}$: (a) 2 fatores; (b) 3 fatores



Fonte: Adaptação de Clímaco [2019] e Oliveira [2017]

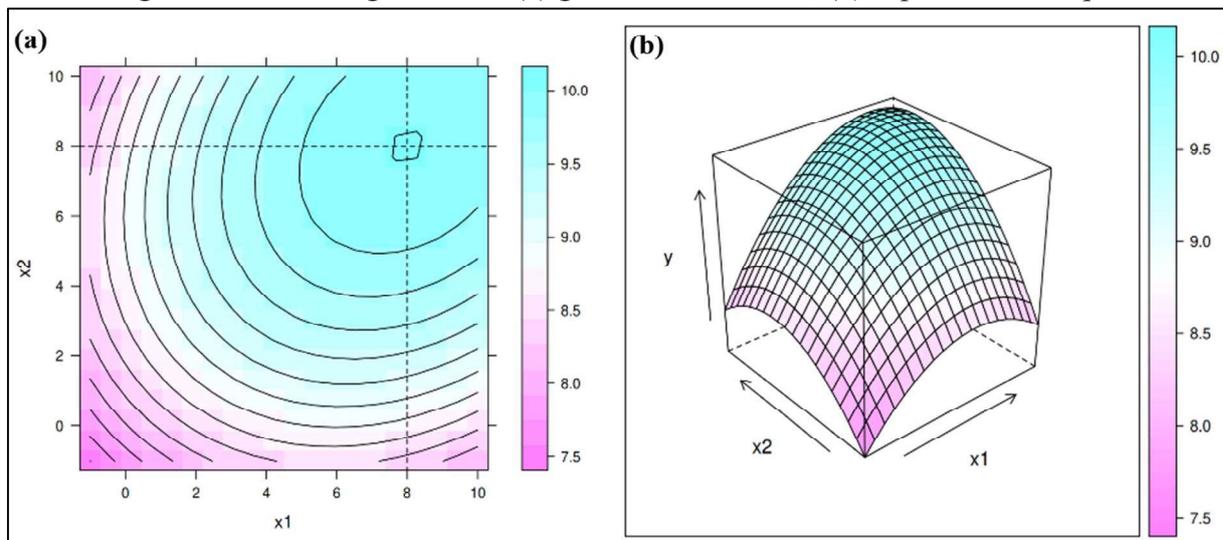
2.5.2. Metodologia de superfície de resposta (RSM)

Muitos estudos de extração reportados na literatura foram modelados e otimizados usando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM). Os planejamentos experimentais mais comumente utilizados nestes estudos são os designs Box Behnken e composto central, os quais permitem apenas o uso de parâmetros (métricas) numéricos (IBRAHIM; OMILAKIN; BETIKU, 2019; KURAM et al., 2013)

A concepção experimental fatorial junto à metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma alternativa à técnica de ‘uma variável de cada vez’, que não é capaz de avaliar o efeito interativo de diferentes fatores nos resultados, além de exigir mais tempo e esforço. A RSM é uma ferramenta estatística capaz de resolver essa complexidade, fornecendo uma estratégia de investigação sistemática e eficiente, no estudo do efeito das variáveis de entrada e suas interações (HONG; HAIYUN, 2010).

De acordo com Mayer (2017), a metodologia de superfície de resposta é aplicada consoante condições, diretrizes e etapas pré-estabelecidas. Há duas condições básicas: (i) quando o interesse é otimizar uma resposta influenciada por diversos fatores; (ii) quando a forma da relação da resposta com os fatores é desconhecida. A MSR é um procedimento sequencial, cuja primeira etapa é encontrar uma aproximação adequada para a relação resposta-fator, geralmente através de polinômios de baixo grau. Esta análise pode ser vislumbrada como “subindo o morro” de uma superfície, onde o topo representa a resposta máxima, sendo que geralmente o caminho ascendente de maior inclinação é a linha que passa pelo centro da região de interesse e é perpendicular aos contornos da superfície ajustada. Os experimentos são conduzidos então ao longo do caminho ascendente de maior inclinação até que mais nenhum aumento seja observado na resposta, gerando o modelo, o qual é exemplificado graficamente na Figura 19.

Figura 19 – Modelagem RSM: (a) gráfico de contorno; (b) superfície de resposta

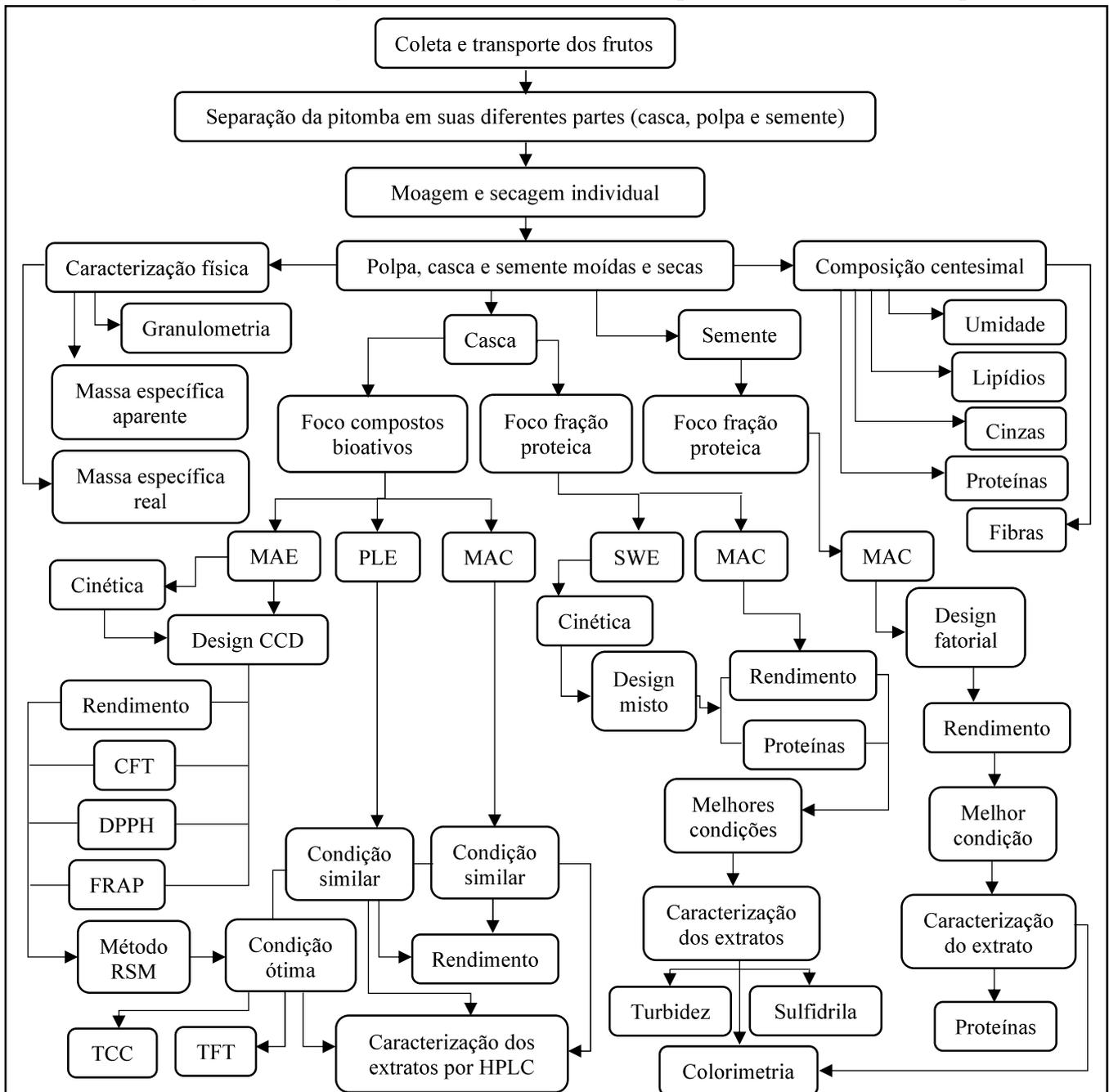


Fonte: Adaptado de Mayer [2017]

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção descreve os insumos e as metodologias empregadas durante os experimentos realizados com o material de estudo, a fim de exibir os procedimentos necessários para a reprodução dos resultados. Na Figura 20 é apresentado um diagrama esquemático dos ensaios realizados no processamento. Na sequência são descritos os procedimentos empregados para o desenvolvimento desta pesquisa.

Figura 20 – Diagrama dos ensaios realizados no processamento da matéria-prima



Fonte: Elaborado pelo Autor

3.1. OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Os frutos da pitombeira (*Talisia esculenta*) *in natura* foram adquiridos em feira livre, situada na cidade de Garanhuns – PE, mais precisamente aos 8°53'01" de latitude Sul e 36°28'43" de longitude Oeste, entre os meses de abril e maio de 2022. Os frutos eram procedentes do sítio Estrela, localizado na comunidade quilombola que envolve a tríade Estrela-Estivas-Castanhinho, pertencente à zona rural do município. A matéria-prima foi acondicionada em saco plástico rafia verde em polipropileno, próprio para frutas e legumes e, então transportada até ao Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa (CENLAG) da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), onde se deu a imediata etapa de pré-processamento.

3.2. PRÉ-PROCESSAMENTO

O pré-processamento das amostras de pitomba foi realizado na Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), incluindo o Laboratório de Ensino (LABENS), o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LACTAL) e o CENLAG, no segundo trimestre de 2022.

Os frutos (1.000 unidades) foram selecionados seguindo a metodologia de Queiroga (2015) com adaptações. Parte dos frutos (300 unidades) foram pesados em balança semianalítica (Bematech modelo AS-110), descascados manualmente com auxílio de chave torquês e em seguida, foram despulpados manualmente com auxílio peneira inox de malha 35 *mesh* da série Tyler. As porções separadas (casca, polpa e semente) foram novamente pesadas e destinadas às etapas de secagem e moagem, separadamente para cada parte do fruto (casca, polpa e semente). Alternativamente ao trabalho manual, utilizou-se uma despulpadora de frutas (Linha Nobre, modelo DES-60) para separar semente da polpa da quantidade restante dos frutos (700 unidades), acelerando o processo de obtenção de material da semente.

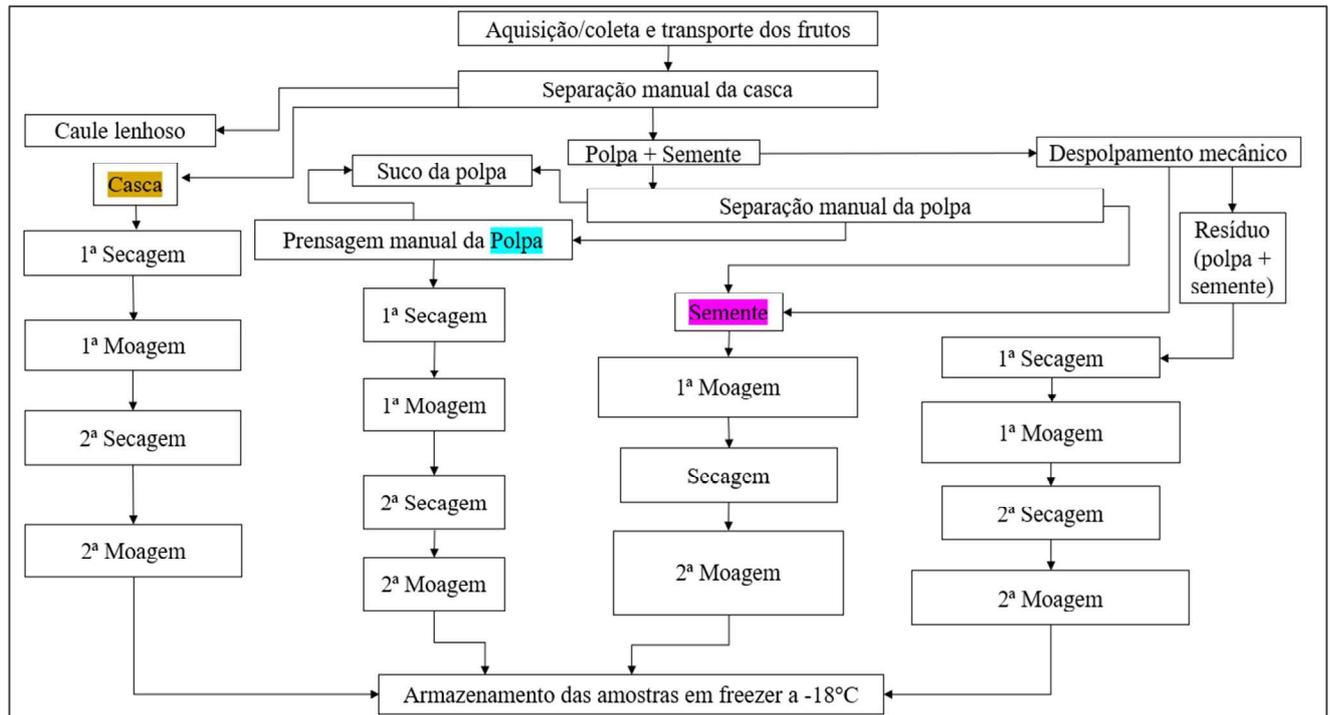
A secagem, à baixa temperatura, foi conduzida em estufa (Biopar modelo GM-11) com controle de temperatura (40 °C). A moagem foi conduzida em moinhos tipo faca (Marconi, modelo MA340; SOLAB, modelo SL-30), utilizando-se crivo de 1 ou 2 mm, exceto a primeira etapa de moagem da polpa, que se deu em almofariz com pistilo.

A casca foi submetida à primeira secagem por 24 h; seguida de moagem em moinho, com crivo de 2 mm; depois conduzida a segunda etapa de secagem por mais 24 h e, segunda etapa de moagem com crivo de 1 mm.

A polpa foi conduzida à primeira etapa de secagem por 72 h, seguida de moagem em almofariz com pistilo; partindo para a segunda etapa de secagem por 24 h e, segunda moagem em moinho tipo faca com crivo de 2 mm.

A semente foi submetida à etapa de secagem (48 h) entre as moagens em moinho com crivos de 2 e 1 mm, respectivamente. A Figura 21 mostra o diagrama esquemático do pré-processamento.

Figura 21 – Diagrama do pré-processamento da matéria-prima



Fonte: Elaborado pelo autor

Após redução de tamanho e de umidade, as amostras (casca, polpa e semente) foram acondicionadas em embalagens fechadas de polietileno transparentes e armazenadas em freezer (Brastemp modelo BRM44) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguindo para etapa de caracterização.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

A etapa de caracterização foi realizada no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), situado no Centro Tecnológico (CTC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a partir do mês de outubro de 2022. Com exceção das análises de fibras, granulometria e colorimetria, os ensaios foram realizados no Laboratório de

Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC). As partes do fruto em pó foram caracterizadas física e quimicamente.

3.3.1. Caracterização física

A caracterização física explorou a distribuição granulométrica, incluindo o cálculo do diâmetro médio das partículas, as massas específicas aparente e real e, conseqüentemente sua porosidade.

3.3.1.1. Distribuição granulométrica

A distribuição de tamanho de partícula das amostras (casca, polpa e semente) moídas foi determinada no LASIPO, através de sistema de agitação mecânico *Dist*, por 1 hora, com massa de amostra inicial de 17 g, pesada em balança analítica (Shimadzu, classe I, modelo AY220), utilizando um conjunto de peneiras (Bronzinox, da série *Richards*: 16, 20, 40, 60, 100, 140 e 200 *mesh*).

3.3.1.1.1. Diâmetro médio das partículas

Ao serem obtidas as frações retidas em cada peneira, utilizou-se as equações (7) e (8) para cálculo do diâmetro médio das partículas, as quais foram empregadas por Pessoa et al. (2015), levando em consideração o diâmetro médio superficial.

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i^3}}} \quad (7) \quad \Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (8)$$

Em que \bar{d}_s equivale ao diâmetro médio superficial da partícula (mm), n o número de frações (adm), d_i a abertura da peneira i (mm), m_i a massa retida na peneira i (g), m_t a massa total da amostra (g).

3.3.1.2. Massa específica aparente

A massa específica aparente ρ_a foi calculada diretamente pela razão m/V da amostra, seguindo a metodologia de Cremasco (2012). As amostras foram postas em cadinhos de volume

conhecido (10,5 cm³) e pesadas em balança analítica, precisão 0,0001 g (Shimadzu, classe I, modelo AY220).

3.3.1.3. *Massa específica real*

A massa específica real ρ_r foi determinada no LATESC utilizando-se um picnômetro a gás hélio (Micrometrics, AccuPyc II 1340), o qual segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos. O picnômetro é composto por duas câmaras: uma é utilizada para a inserção da amostra (massa m e volume Vc); outra é uma câmara de referência (volume Vc) conectada a um transdutor de pressão. A câmara da amostra é preenchida com gás hélio até uma dada pressão (Pc), a qual é salva e a válvula que conecta as duas câmaras é aberta, permitindo obter uma pressão de equilíbrio entre as duas câmaras (Pr), também registrada. A massa específica real ρ_r é obtida pela equação (9), após n repetições do procedimento no *software* acoplado ao equipamento.

$$\rho_r = \frac{m \cdot n}{\sum_{i=1}^n \left(Vc_i + \frac{Vr}{1 - \frac{Pc_i}{Pr}} \right)} \quad (9)$$

Uma vantagem deste método está na sua capacidade para aferir somente o volume da amostra desprezando o volume de todos os poros (MARKL et al., 2018; SORITA, 2021).

3.3.1.4. *Porosidade*

A partir da relação entre as massas específicas aparente e real obtém-se o valor da porosidade do material, ε_p , seguindo a equação (10), proposta por Cremasco (2012).

$$\varepsilon_p = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (10)$$

3.3.2. **Composição centesimal**

A caracterização físico-química das amostras (casca, polpa e semente), apresentando sua composição centesimal, foi conduzida por ensaios em triplicata segundo as normas elaboradas pela *Association of Official Agricultural Chemists* – AOAC (2000), para determinação de umidade, lipídio, cinzas, proteína e fibra bruta.

3.3.2.1. *Umidade*

As cápsulas vazias devidamente limpas foram secas a 105 °C em estufa de circulação de ar (Deleo, Brasil) e, taradas em balança analítica (Shimadzu, classe I, modelo AY220). Pesou-se nas cápsulas $m_{b,u} = 3$ g de amostra homogeneizada, a qual foi seca a 105°C em estufa por 5 horas até peso constante. O teor de umidade $U(\%)$ foi calculado de acordo com a equação (11), a qual descreve o percentual de água evaporado, após a secagem em relação ao peso da amostra úmida.

$$U(\%) = \frac{m_{b,u} - m_{b,s}}{m_{b,u}} \quad (11)$$

Em que $m_{b,u}$ representa a massa da amostra em base úmida e $m_{b,s}$ equivale a massa da amostra em base seca.

3.3.2.2. *Lipídios*

A determinação do teor de lipídios das amostras (casca, polpa e semente) foi realizada por extração em Soxhlet com 150 mL de hexano e 5 g de amostra, após a determinação de umidade (razão 1:30 m/v). O aparato conta com mantas aquecedoras (Fizatom 05A) e banho termostaticado (Microquímica, modelo MQBTZ 99-20).

Neste ensaio, a amostra é posta em um cartucho poroso, o qual é colocado na câmara de extração, que é suspensa acima do balão que contém o solvente e abaixo de um condensador. O balão é aquecido e o calor evapora o solvente que se move na fase gasosa em direção ao condensador, o qual é convertido em um líquido que goteja no cartucho que contém a amostra. A câmara de extração é projetada de modo que quando o solvente em torno da amostra for superior à altura máxima do sifão, o líquido transborda para o balão onde é aquecido, e evapora, completando um ciclo (DOS SANTOS et al., 2015).

Após 6 h de extração, o balão contendo o líquido foi conduzido a evaporadores rotativos à vácuo (Fizatom, modelos 802 e 802D), acoplados a banho termostático (Microquímica, modelo MQBMP) para remoção do solvente e, conseqüentemente, separação da fração lipídica no balão de origem.

3.3.2.3. Cinzas

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a metodologia oficial nº 923.02 e 943,05 (AOAC, 2000). Foram pesados 5 g de amostra em um cadinho previamente seco em mufla (CALLMEX modelo Lavoisier 400) a 250 °C por 60 minutos. Inicialmente, a amostra foi queimada em chama até toda a fumaça colorida ser eliminada, com o intuito de evitar combustão no interior da mufla. O aquecimento da mufla foi realizado em função degrau, a cada 50 °C, até atingir a temperatura de incineração. A amostra foi então incinerada em mufla a 550 °C por um período 24 horas. Após a incineração, a mufla foi desligada e quando a temperatura atingiu 250 °C, o cadinho foi transferido para um dessecador até atingir temperatura ambiente. Em seguida, o cadinho com a amostra foi pesado e o teor de cinzas determinado, de acordo com a equação (12):

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_{\text{pos_incineração}}}{m_{\text{amostra_inicial}}} \quad (12)$$

3.3.2.4. Proteína

O teor de proteínas foi determinado através do método de Kjeldahl AOAC (2000), com adaptações para micro-Kjeldahl. Foi analisado o conteúdo de nitrogênio total da amostra, utilizando o fator de conversão nitrogênio-proteína geral de 6,25 conforme convencionado, uma vez que não há relatos na literatura sobre o fator de conversão nitrogênio-proteína para a pitomba.

A análise foi dividida em três etapas, sendo elas digestão, destilação e titulação. Inicialmente foram pesadas 20 a 50 mg de amostra em papel manteiga, que foram transferidas juntamente com o papel para o tubo de Kjeldahl. Foram adicionados a mesma massa de mistura catalítica (K₂SO₄ e CuSO₄) e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A digestão da amostra foi realizada no bloco digestor com controlador de temperatura (TECNAL modelo TE-04025). O processo foi iniciado a 50 °C, tendo aumento na temperatura, em função degrau, a cada 25 °C, até que a temperatura atingisse 375 °C. A digestão foi mantida até que fosse obtido um líquido límpido transparente de tonalidade azul-esverdeada, fato que aconteceu em torno de 5 horas.

O processo de destilação foi iniciado após a amostra atingir a temperatura ambiente. Foram adicionados ao tubo de Kjeldahl contendo a amostra digerida: 3 mL de água destilada e 4 gotas de fenolftaleína. Acoplou-se ao destilador de nitrogênio (TECNAL, modelo TE-0364)

um erlenmeyer contendo 5 mL de ácido bórico a 4%, adicionado de indicador misto. O tubo Kjeldahl foi então acoplado ao destilador e adicionado de uma solução de NaOH 40%, até que solução se tornasse rosa (aproximadamente 20 mL).

Para a etapa de titulação, foram coletados 75 mL do destilado em 5 mL da solução saturada de ácido bórico contendo indicador misto. O destilado foi titulado em bureta volumétrica com solução HCl 0,1 N padronizada até viragem (mudança da coloração verde para rosa), anotando-se o volume gasto de HCl. Em seguida, foi calculada a porcentagem de proteína bruta através da equação (13).

$$\%proteína \left(\frac{g}{100g \text{ dry matter}} \right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot n \cdot f \cdot 0,14}{m} \quad (13)$$

Em que: V_a é o volume gasto de HCl na titulação da amostra (mL); V_b o volume gasto de HCl na titulação do branco (mL); n o fator de correspondência de proteína-nitrogênio (geral 6,25); f o fator de correção do ácido clorídrico; e m a massa da amostra em base seca (g).

3.3.2.5. *Fibras*

Os ensaios de fibra bruta foram realizados pela metodologia AOAC 962,09 (2000) em determinador de fibras (TECNAL, modelo TE-146 – 5/50) situado no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) do EQA/CTC/UFSC. Pesou-se 2 g de amostra seca desengordurada e, transferiu-se para o tubo digestor. Adicionou-se 150 mL de H₂SO₄, adaptou-se o tubo no equipamento com refluxo e mante-se a solução em ebulição por 30 minutos para a digestão ácida. Em seguida, filtrou-se a solução em funil Buchner, e lavou-se o tubo e o resíduo com água destilada para retirada do ácido. Transferiu-se o papel para o funil e, com o auxílio de 150 mL de NaOH 1,25%, retornou-se o resíduo para o frasco de digestão, deixando por mais 30 minutos sob digestão básica. A solução foi filtrada em papel filtro previamente pesado. Retirou-se todo resíduo do tubo com água destilada quente. Lavou-se o material do filtro com 20 mL de álcool etílico e, em seguida, com 20 mL de éter etílico. Os papéis contendo os resíduos foram secos em estufa com circulação de ar (Deleo, Brasil) a 105 °C. O teor de fibra foi então calculado por gravimetria.

3.3.2.6. Carbohidratos não fibrosos

A quantificação dos carboidratos não fibrosos foi realizada através de cálculos de diferença entre a porcentagem total da amostra (100%) e as porcentagens de proteína, fibra, umidade, lipídios e cinzas.

3.4. PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Os ensaios de determinação de rendimento de extração pelas principais técnicas não convencionais foram precedidos da avaliação da cinética de extração para definição do tempo de processo. As curvas cinéticas foram realizadas para as técnicas MAE e SWE considerando a massa de extrato coletada em tempos pré-definidos de processo. Os procedimentos seguidos para a realização dos ensaios de extração e para a coleta de extratos são descritos na sequência.

3.4.1. Cinética da extração MAE

Os ensaios foram desenvolvidos no LATESC por meio da utilização de equipamento propagador de micro-ondas (em inglês, *Microwave Reactor for Synthesis*) da marca Anton Paar, modelo *Monowave 200*, de acordo com a primeira etapa da metodologia de Mazzutti et al. (2017) com modificações.

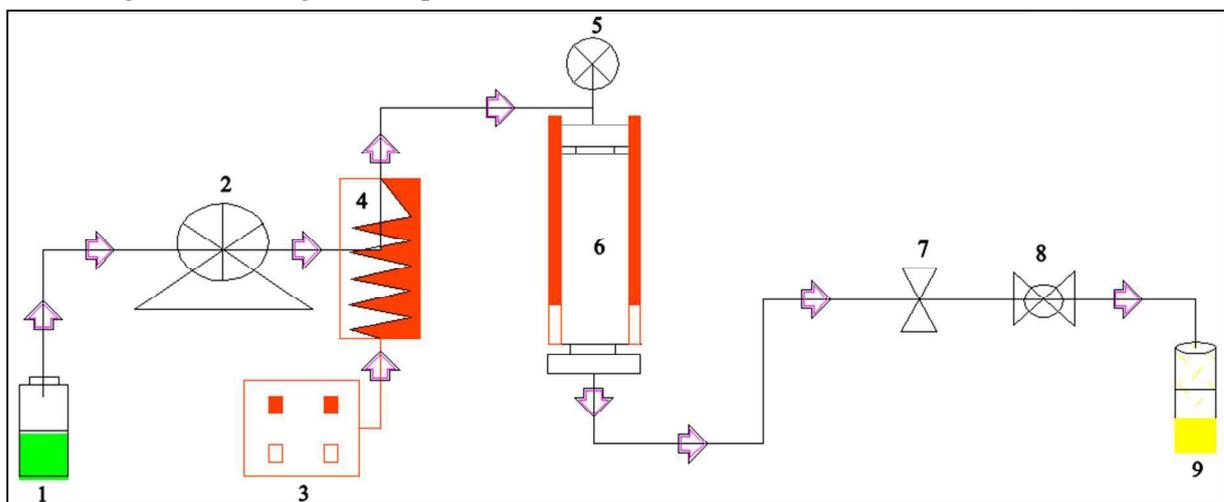
Pesou-se 1 g de amostra (casca), a qual foi dissolvida em 20 mL de solução etanol-água em tubo próprio para o micro-ondas com capacidade para 30 mL. Definiu-se preliminarmente os seguintes parâmetros para condução do processo: temperatura de 100 °C; agitação de 1.000 rpm; e a razão etanol:água de 1:1 como solvente. Os ensaios foram conduzidos em duplicata para os tempos de 1 a 60 minutos, intercalados na seguinte sequência: $t(min) = \{(1,0); (2,5); (5,0); (10,0); (12,5); (60,0)\}$. Os extratos obtidos foram resfriados a 55 °C e, filtrados para remoção do solvente em evaporador rotativo a vácuo. Após o cálculo de rendimento, os extratos foram armazenados em frascos âmbar a -18 °C.

3.4.2. Cinética da extração SWE

Os experimentos iniciais da extração SWE foram desenvolvidos no empregando-se uma unidade de extração com líquido pressurizado (*self-assembled*), conforme diagrama

mostrado na Figura 22. Os procedimentos foram conduzidos seguindo a metodologia de Rodrigues et al. (2020) e Battistella Lasta et al. (2019) com algumas adaptações. Pesou-se 5 g de amostra, a qual foi introduzida no interior da câmara de extração (aço inoxidável AISI 316), respeitando a ordem de camadas: algodão, esferas de vidro (~20 mL), algodão, amostra (5 g) e por fim algodão. As esferas de vidro foram utilizadas a fim de evitar a formação de caminhos preferenciais. Em seguida, através de uma bomba de alta eficiência, o solvente (água destilada sonicada) foi bombeado para a câmara de extração em fluxo de 4,0 mL/min, a qual foi mantida na temperatura de extração (100 °C) pela célula de aquecimento, até a pressão desejada (100 bar). Ao atingir a pressão de operação, procedeu-se lentamente a abertura das válvulas, a fim de manter a pressão constante. O tempo de extração foi iniciado quando a primeira gota de extrato alcançou o recipiente de coleta. A passagem contínua do solvente pela câmara de extração, solubilizando os compostos da amostra e, arrastando-os através do fluxo do sistema, caracterizou o processo dinâmico de extração. O extrato obtido foi conduzido ao liofilizador (Liotop, modelo L101) para completa remoção do solvente. Após o cálculo do rendimento de cada amostra coletada para a construção da cinética de extração, os extratos foram armazenados em frascos âmbar a -18 °C para análises subsequentes.

Figura 22 – Diagrama esquemático da unidade de PLE/SWE do LATESC/UFSC



1 – Reservatório de solvente; 2 – Bomba para solvente; 3 – Painel termostático; 4 – Célula de aquecimento; 5 – Manômetro; 6 – Câmara de extração; 7 – Válvula de bloqueio; 8 – Válvula *back pressure*; 9 – Coleta do extrato
Fonte: elaborado pelo autor em software BricsCad 2020, adaptado de Sorita [2021]

O ensaio de cinética foi conduzido continuamente até 3 horas de extração. A análise da cinética de extração se deu em tempos intercalados na seguinte sequência: $t(\text{min}) = (2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 70; 80; 90; 105; 120; 135; 150; 165; 180)$,

através da obtenção da curva cumulativa de rendimento e da taxa mássica de migração da matriz extraível para o solvente.

3.4.3. Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

A extração assistida por micro-ondas (MAE) foi conduzida com o intuito de ser a principal técnica para extrair compostos bioativos da casca de pitomba e para avaliar os efeitos de parâmetros de processo na qualidade final dos extratos.

As condições da extração realizadas no micro-ondas foram as mesmas descritas no item 3.4.1, exceto o tempo de processo, que foi definido com base na cinética de extração. O estudo consistiu na avaliação do efeito das variáveis de processo (variáveis de entrada): temperatura de extração e tipo de solvente (concentração da mistura etanol/água).

Um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) 2^2 , contendo 3 pontos centrais e 4 pontos axiais ($\alpha = \sqrt{2}$), foi realizado para determinação das influências da concentração etanol/água e da temperatura na qualidade dos extratos (Tabela 2). Os valores das variáveis de entrada (independentes) foram escolhidos considerando os limites de concentração e temperatura do processo.

Tabela 2 – Faixas de valores das variáveis utilizadas na MAE

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
C (concentração de etanol em %)	0	15	50	85	100
T (temperatura em °C)	58	70	100	130	142

Fonte: elaborado pelo autor

O *design* completo consistiu em 11 combinações (Tabela 3), cuja implementação foi realizada em triplicata, resultando, portanto, em 33 experimentos.

O rendimento de extração e o potencial antioxidante dos extratos, aferida pelas respostas de teor de fenólicos totais, pelo método Folin-Ciocalteu, e atividade antioxidante, pelos métodos DPPH e FRAP, constituíram as variáveis resposta (dependentes) a este planejamento, em que as análises realizadas seguiram os passos de 3.5 e 3.6.1 a 3.6.3, respectivamente. O tratamento inicial dos dados foi realizado utilizando-se o *software*

Microsoft Excel® 2023 (Microsoft Co., USA) e a análise estatística foi conduzida no *Statistica*© 1984-2018 versão 13.5.0.17 (TIBCO Software, Inc) com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3 – Relação de ensaios do planejamento DCCR - MAE

Ensaio	X1 (Concentração de etanol %)	X2 (Temperatura °C)
1	(-1)	15
2	(-1)	15
3	(+1)	85
4	(+1)	85
5	(-∞)	0
6	(+∞)	100
7	(0)	50
8	(0)	50
9	(0)	50
10	(0)	50
11	(0)	50

Fonte: elaborado pelo autor

3.4.3.1. Otimização - RSM

A otimização numérica das superfícies de resposta segue a proposta desenvolvida por Derringer e Suich, que utiliza a função desejabilidade (Equação 14), de acordo com a metodologia de Martins, Manetti e Nunes (2013):

$$D = \left[\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right]^{1/\sum r_i} \quad (14)$$

Onde: n é o número de respostas, i é cada resposta, r_i é o número correspondente ao grau de importância de cada resposta e d_i é obtido pela equação 15.

$$d_i = \left[\frac{Y_i - Low_i}{High_i - Low_i} \right] \quad (15)$$

Em que: Y_i é o valor obtido para cada resposta e $High_i$ e Low_i são seus respectivos limites superior e inferior.

3.4.4. Extração por Líquido Pressurizado (PLE)

A extração por líquido pressurizado (PLE) foi realizada com o intuito de ser uma alternativa à extração MAE para obtenção de compostos bioativos da casca de pitomba. Realizou-se 1 (um) experimento e sua replicata. O procedimento adotado foi similar ao descrito em 3.4.2, levando em consideração, entretanto, as modificações nos parâmetros de processo: (i) solvente etanol/água na razão otimizada do processo MAE (em 3.4.3.1); (ii) temperatura ótima obtida em 3.4.3.1; (iii) fluxo de solvente e massa de amostra adaptados de acordo à similaridade da condição ótima obtida na extração por micro-ondas (3.4.3).

3.4.5. Extração por Água Subcrítica (SWE)

A extração por água subcrítica (SWE) foi realizada com o intuito de ser a principal técnica para extrair proteína da casca de pitomba e para avaliar os efeitos de parâmetros de processo na qualidade final destes extratos. As condições da extração foram as mesmas descritas em 3.4.2, exceto o tempo de processo, que foi definido com base na cinética de extração. O estudo consistiu na avaliação do efeito das variáveis de processo (variáveis de entrada): temperatura de extração e pH do solvente (água).

Um planejamento fatorial completo com *design* misto 4x2 foi desenvolvido para avaliar o efeito das condições de extração (Tabela 4) no rendimento de recuperação da fração proteica e na sua qualidade. A temperatura foi variada em quatro níveis, em faixas de 20 °C, desde a temperatura amena de 40 °C, com o intuito de evitar a desnaturação proteica da matriz extraível, até 100 °C, a fim de explorar as condições de água subcrítica. O pH do solvente (água) foi variado em dois níveis: uso da água sonicada sem adição hidróxido de sódio (pH 7,5) e, ajuste do pH da água para 9,0.

Tabela 4 – Faixas dos fatores na extração de proteína SWE

Fatores	Níveis codificados e reais das variáveis independentes			
	-1	-1/3	+1/3	+1
T (°C)	40	60	80	100
pH	7,5	-	-	9,0

Fonte: elaborado pelo autor

O *design* completo consistiu em 8 combinações (Tabela 5), cuja realização se deu em duplicata, resultando, portanto, em 16 experimentos.

Tabela 5 – Relação de ensaios do planejamento fatorial 4x2 – SWE

Ensaio	X1 (Temperatura °C)		X2 (Potencial de H)	
1	(-1)	40	(-1)	7,5
2	(-1/3)	60	(-1)	7,5
3	(+1/3)	80	(-1)	7,5
4	(+1)	100	(-1)	7,5
5	(-1)	40	(+1)	9,0
6	(-1/3)	60	(+1)	9,0
7	(+1/3)	80	(+1)	9,0
8	(+1)	100	(+1)	9,0

Fonte: elaborado pelo autor

O rendimento de extração e o teor de proteína do extrato, determinado pelo método de Kjeldah constituíram as variáveis resposta (dependentes) a este planejamento, em que as análises realizadas seguiram os passos descritos nos itens 3.5 e 3.3.2.4. O tratamento inicial dos dados foi realizado utilizando-se o *software Microsoft Excel®* 2023 (Microsoft Co., USA) e a análise estatística foi conduzida no *Statistica©* 1984-2018 versão 13.5.0.17 (TIBCO Software, Inc), utilizando-se, para a diferença de médias, o teste T de *Tukey* com intervalo de confiança de 95%.

3.4.6. Maceração (MAC)

A extração convencional por maceração (MAC) foi realizada alternativamente ao método MAE na obtenção de compostos fenólicos da casca de pitomba (solvente etanol/água na razão otimizada do processo MAE) e, ao SWE para a obtenção de proteína da casca de pitomba (solvente água). Também foram realizados ensaios de maceração para a recuperação de proteína da semente (solvente água), com a finalidade de comparar o seu rendimento com o dos extratos proteicos da casca. Os ensaios da maceração foram conduzidos à temperatura ambiente (30 °C).

O procedimento de operação padrão dessa técnica consistiu em submeter as amostras, com seus respectivos solventes, em Erlenmeyer parcialmente imerso em banho com temperatura controlada e movimento mecânico de agitação. Em geral, pesou-se 2 g de amostra

em balança analítica (Shimadzu, classe I, modelo AY220) com precisão de 0,0001 g e aferiu-se volume de 100 mL do solvente em proveta graduada. A amostra foi depositada no respectivo solvente em béquer de 150 mL para ajuste de pH, quando pertinente. Após a padronização do pH, a solução do béquer foi transferida para erlenmeyer de 250 mL e fechada com plástico filme, a qual foi transferida para o banho com temperatura controlada (30 °C) e agitação contínua por no mínimo 1 hora em equipamento próprio para maceração (Banho Dubnoff, *Ethirktechnology*).

Posteriormente, a solução contendo o extrato foi transferida para tubos Falcon de 50 mL e seguiu para etapa de centrifugação em centrífuga de tubos (Quimis, modelo Q222T) em rotação de 3.400 rpm, por 15 minutos. A seguir, retirou-se a porção sobrenadante contendo o extrato, descartando-se a fase não solubilizada. O extrato recuperado seguiu para etapa de remoção do solvente, em evaporadores rotativos ou liofilizador, já referenciados. Após cálculo de rendimento global por gravimetria, o extrato sólido foi armazenamento sob temperatura de congelamento (-18 °C) em freezer (Consul, modelo CVU26F) para análises posteriores.

3.4.6.1. Maceração com amostras da casca (MACc)

As condições de processo da maceração com amostras da casca de pitomba foram adaptadas para cada fim: (i) alternativa ao método MAE na obtenção de compostos fenólicos da casca; (ii) alternativa ao método SWE para a obtenção de proteína da casca; (iii) comparação com a maceração de amostras da semente. A Tabela 6 mostra uma síntese das condições destes processos.

Tabela 6 – Condições de processo na maceração com amostras da casca de pitomba (MACc)

Nº	Foco	Solvente	Razão do solvente	pH	Razão sólido - líquido (g/mL)	Tempo (h)
-	alternativo à MAE	Etanol/Água	(ótima MAE)	-	3/60	3
MAC-1	alternativo à SWE	Água	-	7	2/96	2
MAC-2	alternativo à SWE	Água	-	8	2/96	2
MAC-3	alternativo à SWE	Água	-	9	2/96	2
MAC-4	alternativo à SWE	Água	-	10	2/96	2
MAC-5	alternativo à SWE	Água	-	11	2/96	2
MACc	comparativo à MACs ¹	Água	-	11	2/100	17

¹ **MACs:** uma forma de identificar a maceração com amostras da semente (MACs), em contraste com a maceração das amostras da casca (MAC ou MACc).

3.4.6.2. Maceração com amostras da semente (MACs)

Quanto ao delineamento experimental das extrações com a semente, um planejamento fatorial completo com *design* 3² foi desenvolvido para avaliar a melhor condição de extração. Fixou-se a temperatura em 30 °C e o tempo de extração em 17 h. Os fatores escolhidos foram a razão sólido-líquido e o pH, variando em três níveis. O *design* completo consistiu em 9 combinações (Tabela 7), cuja realização se deu em duplicata, resultando, portanto, em 18 experimentos.

Tabela 7 – Relação de ensaios do planejamento fatorial 3² – MACs

Ensaio	Razão sólido-líquido (g/100mL)	pH
MACs-1	0,5	8
MACs-2	0,5	9,5
MACs-3	0,5	11
MACs-4	1,0	8
MACs-5	1,0	9,5
MACs-6	1,0	11
MACs-7	2,0	8
MACs-8	2,0	9,5
MACs-9	2,0	11

Fonte: elaborado pelo autor

3.5. RENDIMENTO GLOBAL

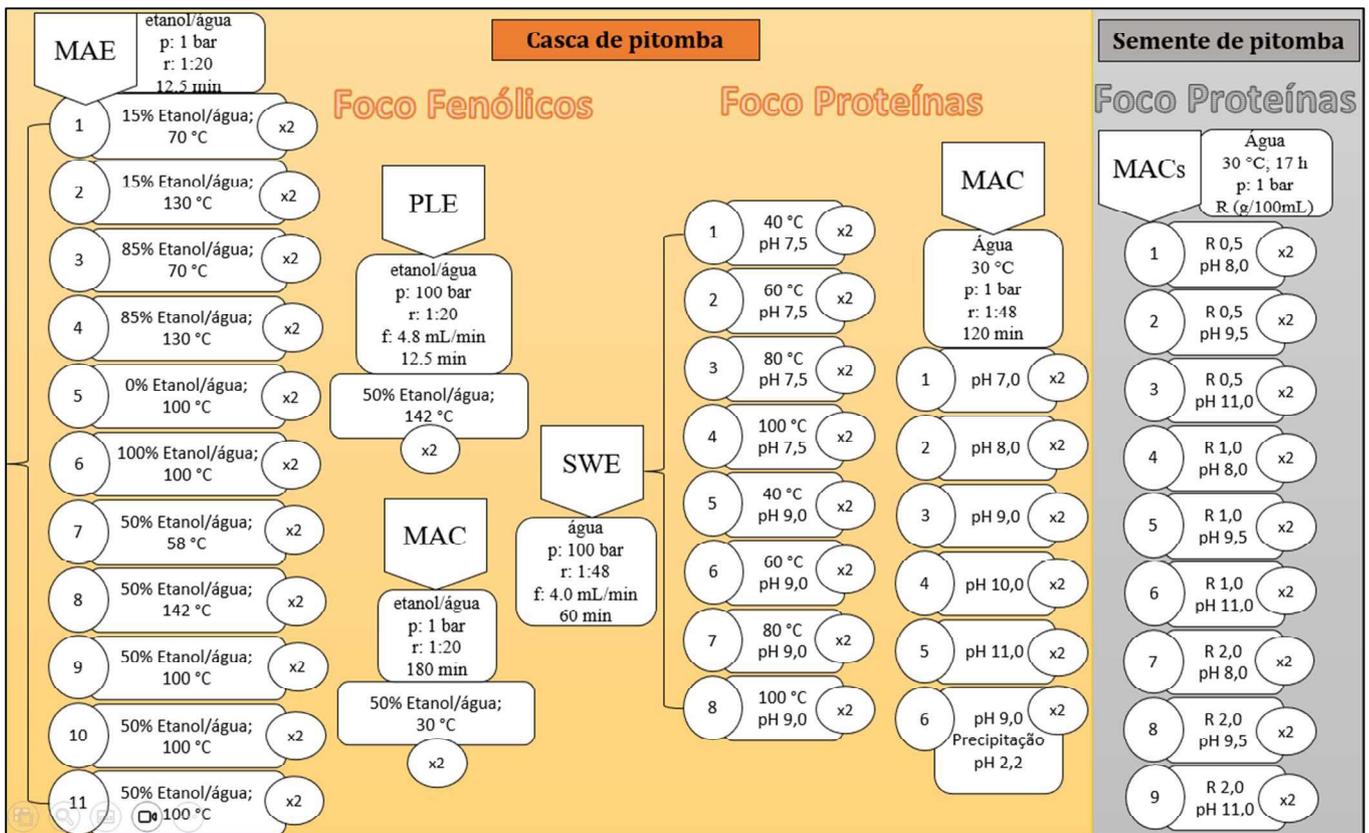
O cálculo do rendimento global de extração (X_0) levou em consideração o percentual de migração da matriz sólida para a fase líquida, em determinadas condições de extração. Nos experimentos, tomou-se o cuidado de manter a razão sólido-líquido obtida nos ensaios de cinética de extração. Os procedimentos em geral foram realizados em duplicata e, o rendimento global (X_0) foi calculado pela razão da massa de extrato (m_e) em função da massa de amostra em base úmida (ver Equação 16).

$$X_0 = \frac{m_e}{m_a} \times 100 \quad (16)$$

A massa de extrato obtida no final do processo foi aferida em balança analítica (Shimadzu, Classe I, modelo AY220) e acondicionada em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Consul, modelo CVU26F) até a realização dos ensaios seguintes.

O rendimento de processo foi determinado para as diferentes técnicas de extração, em função da parte da matéria-prima avaliada (casca ou semente), e das variáveis de processo estudadas (temperatura, pressão, tipo de solvente, razão sólido-líquido, pH), conforme descrito na Figura 23, que representa um diagrama experimental.

Figura 23 – Diagrama experimental: p \equiv pressão; r \equiv razão sólido-líquido; f \equiv fluxo do solvente



Fonte: elaborado pelo autor

3.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos da casca de pitomba recuperados por meio de extração assistida por micro-ondas (MAE) foram avaliados em termos de teor de compostos fenólicos totais (CFT) e capacidade antioxidante (captura do radical DPPH, poder de redução do íon férrico - FRAP). Os resultados constituíram variáveis resposta ao planejamento delineado em 3.4.3.1. Para a condição otimizada da MAE, avaliou-se ainda os teores de carotenoides e flavonoides totais.

3.6.1. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Obteve-se a quantidade de compostos fenólicos totais dos extratos por meio do método Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). A fim de se obter uma curva analítica de ácido gálico, preparou-se uma solução padrão de ácido gálico (Dinâmica, Brasil, 99% pureza) com concentração de 2 mg mL^{-1} (10 mg de ácido gálico em 5 mL de água). Em tubo eppendorf de 2,0 mL, diluiu-se alíquotas da solução de ácido gálico (2 mg mL^{-1}) para a obtenção de frações finais entre $2,0 - 0,031 \text{ mg mL}^{-1}$.

A seguir, preparou-se uma solução padrão 20% (m/v) de carbonato de sódio (20 g de carbonato de sódio em 100 mL de água). Em seguida, diluiu-se as amostras em 1 mL dos seus respectivos solventes, formando assim a solução mãe do extrato. A reação de oxidação foi realizada em tubos eppendorfs de 2,0 mL, nos quais foram adicionados sequencialmente: (i) 600 μL de água destilada; (ii) 10 μL da solução de extrato, ou 10 μL das soluções de ácido gálico na construção da curva analítica, ou 10 μL do respectivo solvente utilizado em cada extração para o branco; (iii) 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA, 99% pureza), aguardando-se 1 minuto de reação; (iv) 150 μL da solução de carbonato de sódio (20% m/v); (v) 190 μL de água.

Após homogeneização em agitador de tubo vórtex (Fizatom, modelo 772), os tubos eppendorfs foram deixados em repouso por 2 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo devido, pipetou-se 300 μL de cada amostra em microplacas (em triplicata), submetendo-as à leitura em espectrofotômetro (Epochh Biotek, Santa Clara, modelo CA-95051), em comprimento de onda de 760 nm, localizado no LATESC. Representou-se a curva analítica de ácido gálico por um gráfico de absorvância *versus* concentração de ácido gálico (mg mL^{-1}), que se tornou a curva analítica padrão para detecção da equivalência em concentração de ácido gálico nas amostras, e está apresentada no Apêndice A. Os valores de absorvância média para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva analítica padrão, através da substituição dos valores de absorvância média obtidos para cada amostra na equação da curva analítica. Logo, o teor de compostos fenólicos totais (CFT) é expresso em mg GAE g^{-1} de extrato e mg GAE g^{-1} de sólido seco conforme as Equação 17 e 18.

$$CFT \left(\frac{\text{mgGAE}}{\text{gextrato}} \right) = \frac{\text{mgGAE} \cdot \text{mL}^{-1}}{C_{\text{extrato}} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})} \times \frac{1000 (\text{mg})}{\text{g}} \quad (17)$$

$$CFT \left(\frac{\text{mgGAE}}{\text{g sólido seco}} \right) = CFT \left(\frac{\text{mgGAE}}{\text{gextrato}} \right) \times X_0 \quad (18)$$

Em que GAE representa o equivalente em ácido gálico, obtido pela curva analítica padrão, C_{extrato} representa a concentração do extrato ($\text{mg extrato mL}^{-1}$) e X_0 o rendimento de extração (%), definido em 3.4.3.

3.6.2. Determinação de AA pelo método de captura do radical DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante (AA) pelo método do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazina (DPPH) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por (MENSOR et al., 2001; TORRES et al., 2022). Usou-se o reagente Trolox (Sigma Aldrich, USA, 97% pureza) como padrão para a curva de calibração, produzida com 6 diluições diferentes ($50 - 300 \mu\text{mol L}^{-1}$) em etanol, gerando coeficiente de determinação de $(R^2) = 0,9946$, cujos resultados foram expressos em $\mu\text{mol}_{TE} \cdot \text{g}^{-1}$ (TE – Equivalente em Trolox).

Em princípio os extratos liofilizados foram diluídos em tubos eppendorfs de 2,0 mL nos seus respectivos solventes de extração em concentrações de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Na sequência, uma solução estoque de DPPH ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi preparada, adicionando-se 5,2 mL de DPPH (Sigma Aldrich, USA, 99,5% pureza) em 19,8 mL de etanol e, armazenada em frasco âmbar. O meio reacional se compôs pela adição em microplacas de: $50 \mu\text{L}$ de cada extrato com $250 \mu\text{L}$ da solução de DPPH (amostras); ou $50 \mu\text{L}$ do extrato e 250 do respectivo solvente (branco); ou $50 \mu\text{L}$ do solvente e 250 da solução de DPPH (controle).

Decorridos 30 minutos de reação ao abrigo da luz, aferiu-se as absorbâncias em espectrofotômetro (Epochh Biotek, Santa Clara, modelo CA-95051), no comprimento de 517 nm . Correlacionou-se os valores de absorbância encontrados com a curva padrão de Trolox de concentrações entre 50 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, a qual se encontra no Apêndice A. Ao passo que se obteve o percentual de redução do radical DPPH através da Equação 19, para cada extrato (em triplicata), determinou-se a atividade antioxidante em $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ extrato usando a curva de calibração.

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{Abs_{\text{controle}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})}{Abs_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (19)$$

3.6.3. Determinação de AA pelo método de redução do íon férrico (FRAP)

Determinou-se a atividade antioxidante (AA) expressa pela capacidade de redução do íon férrico pela metodologia de Benzie e Strain (1996). Necessitou-se previamente de quatro

soluções: (i) tampão acetato de sódio 0,3 molar (pH 3,6); (ii) ácido clorídrico 40 mmol L⁻¹; (iii) cloreto férrico 20 mmol L⁻¹; (iv) TPTZ.

A composição de cada solução é descrita a seguir: (i) tampão acetato de sódio 0,3 mol L⁻¹ (pH 3,6) formada por 1,87 g de acetato de sódio anidro (Êxodo, Brasil, 99,8% pureza), 16 mL de ácido acético glacial (Sigma Aldrich, USA, 99,7% pureza) e água; (ii) ácido clorídrico P.A.-A.C.S. (Synth, Brasil) 40 mmol L⁻¹ (3,31 mL de HCl em 1 L de água); (iii) solução de cloreto férrico P.A (Synth, Brasil) (FeCl₃.6H₂O, 20 mmol L⁻¹) - 0,135 g de FeCl₃.6H₂O em 25 mL de água e; (iv) solução TPTZ (Sigma Aldrich, USA, 99% pureza) - 2,4,6 – trifidril-s-tiazina 10 mmol L⁻¹ - 0,01927 g de TPTZ e 6 mL da solução ii (ácido clorídrico – 40 mmol L⁻¹).

A solução FRAP foi formada com a adição de 60 mL da solução tampão de acetato de sódio (solução i) com 6 mL da solução de TPTZ (solução iv) e 6 mL da solução de cloreto férrico - FeCl₃.6H₂O, 20 mmol L⁻¹ (solução iii). A reação se deu com a adição de 10 µL de cada amostra diluída em seu respectivo solvente e 290 µL da solução FRAP. Considerou-se um branco para cada solvente (10 µL de cada solvente + 290 µL da solução FRAP). A reação completa ocorreu ao final de 30 minutos, ao abrigo da luz. A seguir, leu-se as microplacas em espectrofotômetro (Epochh Biotek, Santa Clara, modelo CA-95051) no comprimento de onda de 593 nm. Construiu-se a curva padrão (Apêndice A), utilizando-se do Trolox (Sigma Aldrich, USA, 97% pureza) como referência. Os resultados são expressos em µmol TE.g⁻¹ extrato.

3.6.4. Teor de Carotenoides Totais (TCC)

O teor de carotenoides totais (do inglês *Total Carotenoid Content* - TCC) foi determinado a partir da metodologia de Kuhnen et al. (2009), com modificações. Diluiu-se o extrato em uma solução de metanol, hexano e acetona na proporção 2:1:1 (v/v/v), a seguir colocados em banho ultrassom (Ultronique, modelo Q3.0/37A) por 2 minutos e, em seguida, foram centrifugados por 15 minutos a 3.400 rpm (Quimis, modelo Q222T). O sobrenadante coletado constituiu o material de análise nas microplacas, por meio da leitura em espectrofotômetro (Epochh Biotek, Santa Clara, modelo CA-95051), no comprimento de onda de 450 nm. Obteve-se o teor de carotenoides totais do extrato através da curva padrão de β-caroteno (Sigma Aldrich, USA, 97% pureza), preparada com 10 mg de β-caroteno diluído em 50 mL da mistura metanol/hexano/acetona 2:1:1 (v/v/v), formando concentrações de 2 a 55 µg mL⁻¹ (presente no Apêndice A). A absorvância foi lida a 450 nm. Os resultados estão expressos

em miligramas equivalentes em β -caroteno por grama de extrato ($\text{mg}\beta\text{-CE}/\text{g}_{\text{extrato}}$). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os valores numéricos estão expressos em termos de média \pm desvio padrão amostral.

3.6.5. Teor de Flavonoides Totais (TFT)

A determinação do teor de flavonoides totais (do inglês *Total Flavonoid Content - TFC*) foi realizada de acordo com Zhishen et al. (1999) com modificações. Preparou-se uma solução de NaNO_2 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), AlCl_3 ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e NaNO (1 mol L^{-1}). O meio reacional foi conduzido em *ependorf* da seguinte maneira: adicionou-se $125 \mu\text{L}$ do extrato diluído em 1 mL de água e $60 \mu\text{L}$ de NaNO_2 . Após a incubação da reação em banho maria (ALB, modelo 250C) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos, procedeu-se com a adição de $60 \mu\text{L}$ de AlCl_3 , em que se constatou mudança de cor. Após agitação em agitador de tubo vórtex (Fizatom, modelo 772), armazenou-se a solução sob o abrigo de luz. Após 6 minutos, adicionou-se $400 \mu\text{L}$ de NaNO , seguindo-se de agitação. Finalmente, retirou-se alíquota de $300 \mu\text{L}$ para leitura em placa em espectrofotômetro (Epochh Biotek, Santa Clara, modelo CA-95051) no comprimento de onda de 510 nm .

O teor de flavonoides foi calculado com base em curva padrão de catequina com concentrações de $0,025$ a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (constante no Anexo II). Os resultados estão expressos em $\text{mg}_{\text{CatE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$.

3.7. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE

Os extratos obtidos nas diferentes técnicas aplicadas constituíram os materiais de análise da presença de compostos bioativos na casca de pitomba e, da possível concentração do teor de proteína na casca e semente de pitomba.

3.7.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (bioativos) foram identificados e quantificados por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*).

3.7.1.1. Preparação das amostras

As amostras para análise foram preparadas no LATESC, conforme a metodologia usada por Schulz (2015), com modificações. Transferiu-se os extratos liofilizados (0,2 g) para tubos de Falcon de 50 mL, adicionados de 25 mL de hexano e, desengordurados com auxílio de banho ultrassom (Ultronique, modelo Q3.0/37A) por 15 minutos a 25 °C, seguindo-se de centrifugação a 3.400 rpm por 15 minutos (Quimis, modelo Q222T). Removeu-se o sobrenadante e, submeteu-se o resíduo a uma segunda extração com hexano. Na sequência, as amostras foram acondicionadas em capela de exaustão (modelo OR) por 10 minutos, para remoção completa do solvente.

Adicionou-se às amostras previamente desengorduradas 5 mL de metanol e 5 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e, as quais foram submetidas à hidrólise ácida a 85 °C por 30 minutos, em estufa com circulação de ar (Deleo, Brasil). Em seguida, ajustou-se a solução para pH 2 com NaOH 6 mol L⁻¹ e, submetendo-a à extração por partição com 10 mL de éter etílico e à centrifugação a 3.400 rpm por 15 minutos (Quimis, modelo Q222T). O resíduo foi submetido a mais dois ciclos de partição com éter etílico e, os sobrenadantes combinados foram rotaevaporados até completa secagem (Fisatom, modelo 802). Suspendeu-se por fim o extrato residual em metanol com volume aferido para 1 mL, centrifugação a 3.400 rpm por 20 minutos e, diluição decimal em metanol:água (70:30), antes da injeção em sistema HPLC–ESI-MS/MS.

3.7.1.2. Análise HPLC–ESI-MS/M

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – CFM da UFSC, no mês de dezembro de 2022, utilizando cromatógrafo HPLC (Tecnologia Agilent[®], Modelo 1,200, Alemanha).

A separação dos compostos foi realizada em coluna cromatográfica (tamanho de partícula 4.6 µm, 150 mm, 2,0 mm). Efetuou-se a análise cromatográfica usando-se de gradiente de fase móvel composto de metanol em água (95%) e de ácido fórmico em água (0,1%). A taxa de fluxo foi de 250 µL min⁻¹. A separação se deu a 30 °C através de eluição em gradiente fragmentado, como a seguir: 0-5 min, 10% A; 5-7 min, 90% A; 7-10 min, 90% A; 10-17 min, 10% A. Acoplou-se o sistema HPLC ao sistema de espectrometria de massa, de quadrupolo simples, Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada). Realizou-se a análise dos dados e o controle do sistema HPLC–ESI-MS/M em *software* versão 1.5.1. Os

experimentos foram conduzidos usando ionização por electrospray (TurbolonSpray™ – eletrospray – ESI) em modo de íon negativo, mantendo a capilaridade em 4500 V. Utilizou-se como parâmetros MS/MS: gás em cortina, 10 psi; temperatura de 400 °C; gás 1, 45 psi; gás 2, 45 psi.

O tratamento dos resultados dados foi realizado utilizando-se o *software Microsoft Excel*® 2023 (Microsoft Co., USA) e a análise estatística posterior foi conduzida no *Statistica*© 1984-2018 versão 13.5.0.17 (TIBCO Software, Inc), utilizando-se, para a diferença de médias, o teste T de *Tukey* com intervalo de confiança de 95%.

3.7.2. Proteína

A quantificação do percentual de proteínas dos extratos foi feita pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2000) enquanto o estudo identificação de ponto isoelétrico foi realizado pelos ensaios de Potencial Zeta.

3.7.2.1. Potencial Zeta

Os ensaios de Potencial Zeta (ZP x pH) foram realizados no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas – LINDEN da UFSC, seguindo metodologia prescrita em literatura (ANASTÁCIO et al., 2019).

O potencial das partículas dos diferentes diluidores foram obtidos usando dispersão de luz, através do Zetasizer Nano ZS Malvern. As análises foram realizadas em triplicata. As medidas do PZ foram obtidas através da equação de Smoluchowski (20) como valores médios da mobilidade eletroforética.

$$D = \frac{\mu_q \cdot k_B \cdot T}{q} \quad (20)$$

Em que: D é o coeficiente de difusão; μ_q é a mobilidade elétrica da partícula carregada; k_B é a constante de Boltzmann; e q é a carga elétrica da partícula.

3.7.2.2. Kjeldahl

A quantificação de proteínas nos extratos obtidos foi efetuada de acordo com as diretrizes descritas no item 3.3.2.4, com o intuito de avaliar a concentração do macronutriente promovidas pela extração.

3.7.2.1. *Recuperação de proteína*

O percentual de recuperação de proteína na matriz vegetal foi calculado de acordo com a metodologia de Ahluwalia et al. (2020), relativo ao teor de proteína extraída da matéria-prima (porção recuperável pelo solvente), e expressa pela equação 21.

$$\text{Rec. de proteína (\%)} = \frac{M_1 \cdot P_f}{M_2 \cdot P_i} \times 100 \quad (21)$$

Em que M_1 é a massa do extrato, M_2 é a massa da amostra inicial, P_f é o teor de proteína do extrato e P_i é o teor de proteína da amostra inicial.

3.8. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS

A qualidade dos extratos proteicos foi avaliada por três características: turbidez, teor de sulfidrila e parâmetro de cor.

3.8.1. **Turbidez**

A determinação da turbidez foi realizada consoante a metodologia de Chang, Jiang e Liu (2022b). Preparou-se os extratos em solução de 1 mg/mL (massa do extrato liofilizado / volume de respectivo solvente) em tubos eppendorfs de 2,0 mL. Transferiu-se as amostras para cubetas de quartzo de 3 mL. A leitura se deu em espectrofotômetro UV-VIS (PG Instruments, modelo T90) em comprimento de onda de 500 nm. Como controle, usou-se o fosfato de buffer. Os resultados de turbidez foram expressos por meio da absorbância.

3.8.2. **Teor de Sulfidrila**

O teor do grupo sulfidrila livre (SH livre) foi determinado de acordo com o método de Wang et al. (2023). Dissolveu-se 20 mg ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) em 5 mL de Tris-glicina de buffer, composto de 5,2 g de Tris, 3,45 g de glicina e 0,6 g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em 500 mL de água deionizada, pH 8,0. Como reagente de Ellman, usou-se o Tris-glicina de buffer.

Diluiu-se o extrato proteico até uma concentração de 5 mg/mL pela adição de Tris-glicina de buffer. O mesmo reagente buffer contendo 8 mols ureia e 2,5% SDS foi explorado para determinar o total de grupos SH. Adicionou-se em 4 mL das amostras diluídas uma

alíquota de 40 μ L do reagente de Ellman. Posteriormente, incubou-se a mistura ao abrigo da luz, por 30 minutos, aferindo-se ao final a absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, modelo Lambda 45) em comprimento de onda de 412 nm. O total do teor de sulfidril (grupos SH) está expresso em absorbância de 412 nm.

3.8.3. Parâmetros de Cor

Os parâmetros de cor dos extratos proteicos liofilizados recuperados da maceração (MAC) ou da extração por líquido pressurizado (PLE) foram avaliados em colorímetro (Delta Vista, model 450 G SN 7012003357, São Leopoldo-RS, Brasil), localizado no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) do EQA/CTC/UFSC. Calcularam-se os valores dos ângulos de tonalidade (H^*), do índice de brancura (W_i) e do croma (C), levando em consideração os parâmetros L^* , a^* , e b^* , seguindo as equações 22-25, em consonância com metodologia adotada em literatura (NAIK et al., 2022) com adaptações, bem como a diferença total de cor (ΔE) com base na equação 17 (FERREIRA; SPRICIGO, 2014).

$$H^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (22)$$

$$W_i = L^* - 3b^* \quad (23)$$

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (24)$$

$$\Delta E = [((\Delta L^*) \cdot 2 + (\Delta a^*) \cdot 2 + (\Delta b^*) \cdot 2) \cdot 0,5] \quad (25)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção apresenta e discute os resultados obtidos por meio da pesquisa experimental. Está organizada em três subseções: (1) caracterização da pitomba em suas diferentes partes; (2) extração de compostos bioativos da casca de pitomba; (3) extração de proteína da casca e da semente de pitomba.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA PITOMBA EM SUAS DIFERENTES PARTES

A princípio obteve-se a proporção da massa fresca em relação às partes da pitomba (casca, polpa e semente). Logo após, seguiu-se com a distribuição gravimétrica das frações obtidas durante o pré-processamento dos frutos, seguida da caracterização físico-química do material pré-processado.

4.1.1. Pré-processamento

Ao ser avaliada a proporção da massa fresca das partes da pitomba, utilizou-se uma amostra de 50 frutos, quantidade referente a 1 (um) cacho após seleção. Os resultados são apresentados na Tabela 8, em comparação com dados da literatura. Verifica-se que a amostra dos frutos *in natura* apresenta 36,43% de casca, 38,74% de polpa e 24,83% na semente. O percentual de cada parte do fruto evidencia a importância da valorização dos coprodutos da pitomba (casca e semente), além da polpa do fruto, com o intuito de agregar valor à matéria vegetal, pelo potencial uso integral de sua matriz em escala produtiva. Com efeito, embora exista variação da proporção da massa, cada parte do fruto contribui, em geral, com um terço da massa global do fruto.

Tabela 8 – Dados da literatura quanto ao percentual das partes do fruto de pitomba

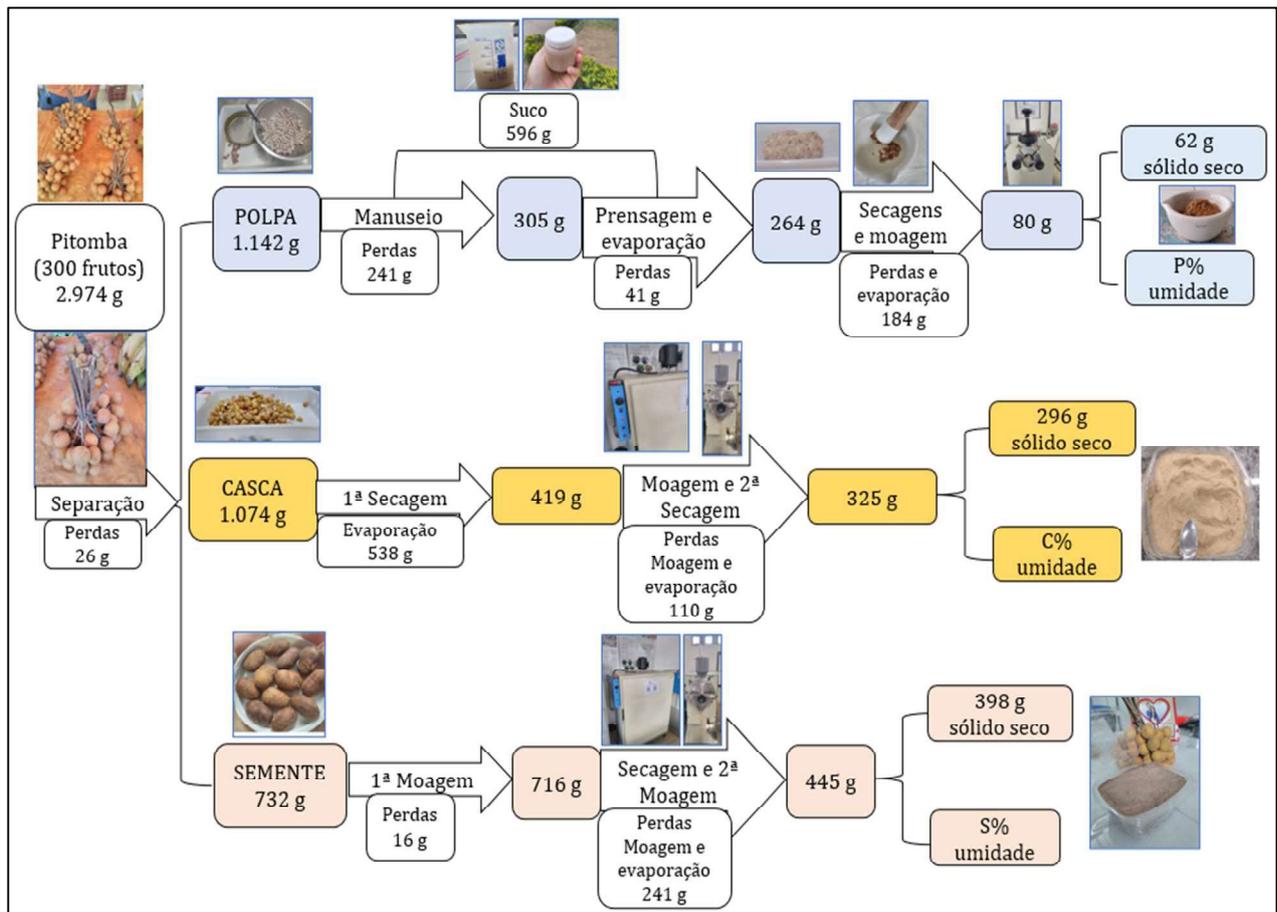
Parte do fruto / Autor (ano)	Vieira e Gusmão (2008)	Queiroga <i>et al.</i> (2018)	Fraga <i>et al.</i> (2018)	Trabalho atual
Tamanho amostral (n)	50	20	3	50
Casca	47,80 ± 3,53	23,24 ± 9,61	44,60 ± 2,22	36,43 ± 1,81
Polpa	22,30 ± 0,70	39,16 ± 12,89	15,40 ± 1,27	38,74 ± 1,74
Semente	29,89 ± 1,00	37,60 ± 10,94	40,00 ± 13,00	24,83 ± 1,49

Fonte: elaborado pelo autor

O rendimento em polpa encontrado no presente trabalho (38,74%) é substancialmente maior do que os 15,40% encontrado por Fraga (2018), embora tenha similaridade com os dados obtidos por Queiroga et al. (2018), que foi de 39,16%. O percentual da casca (36,43%) supera os 23,24% alcançado por Queiroga et al. (2018) e, aproxima-se dos valores publicados por Vieira e Gusmão (2008) e Fraga (2018), 47,80% e 44,60%, respectivamente. A proporção da semente apresenta valor levemente abaixo do apresentado por Vieira e Gusmão (2008) que foi de 29,89%. É importante salientar que, conforme pontua Sviech (2021), os dados de autores diferentes para um mesmo fruto dificilmente se harmonizam, pois, a composição dos frutos depende da sazonalidade, condições do solo, clima, variedade e grau de maturidade. Além disso, os desvios padrão amostrais apresentados pelos diferentes autores são variados.

A distribuição gravimétrica durante o pré-processamento avaliou a variação em massa, provocada pelas perdas durante o pré-processamento manual dos frutos de pitomba, envolvendo as etapas de separação, moagem e secagem. O balanço de massa é mostrado na Figura 24.

Figura 24 – Fluxograma do balanço de massa no pré-processamento manual dos frutos



Fonte: elaborado pelo autor

A quantidade de frutos usada para fins de cálculo do balanço de massa foi de 5 (cinco) cachos de pitomba (300 frutos), relativa às unidades que foram submetidas à etapa de separação integralmente manual das partes do fruto. Os dados completos do balanço de massa constam no Apêndice B. Durante o pré-processamento, as maiores perdas em massa da matriz vegetal se deram pela redução do teor de umidade, seguida da manipulação da polpa, incluindo o manuseio com a separação, prensagem e evaporação.

Os valores mássicos apresentados no fluxograma (Figura 24) permitiram o cálculo do teor de umidade do fruto *in natura*, o que possibilitou a comparação com os resultados presentes em literatura (Tabela 9).

Tabela 9 – Dados de teor de umidade para a casca, polpa e semente de pitomba

Autor (ano) / Parte do fruto	Silva <i>et al.</i> (2008) - polpa; Cardoso <i>et al.</i> (2015) - semente	Queiroga <i>et al.</i> (2018)	Fraga <i>et al.</i> (2018)	Santos (2019) – casca; Castro <i>et al.</i> (2019) - semente	Trabalho atual
Casca	-	-	58,42 ± 0,64	66,50 ± 0,36	64,46 ± 1,42
Polpa	83,16 ± 0,73	80,73 ± 1,23	80,58 ± 0,10	-	80,47 ± 1,78
Semente	43,67 ± 2,52	-	-	43,20 ± 0,15	44,43 ± 1,03

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n ≥ 3.

Fonte: elaborado pelo autor

A umidade das cascas de pitomba *in natura* (66,46%) muito se aproximou aos dados obtidos por Fraga *et al.* (2018) e Santos (2019), 58,42% e 66,50%, respectivamente. Analogamente, os teores de umidade da polpa (80,47%) e da semente (44,43%) foram similares aos valores encontrados em literatura (QUEIROGA *et al.*, 2018; SILVA, 2008; FRAGA, 2018; CARDOSO *et al.*, 2015; CASTRO *et al.*, 2019; ÉDER-SILVA; ARAÚJO, 2014), apresentando coerência com os dados científicos pré-existentes. A umidade do material pré-processado (casca, polpa e semente moídas e secas) se deu na caracterização físico-química mostrada a seguir.

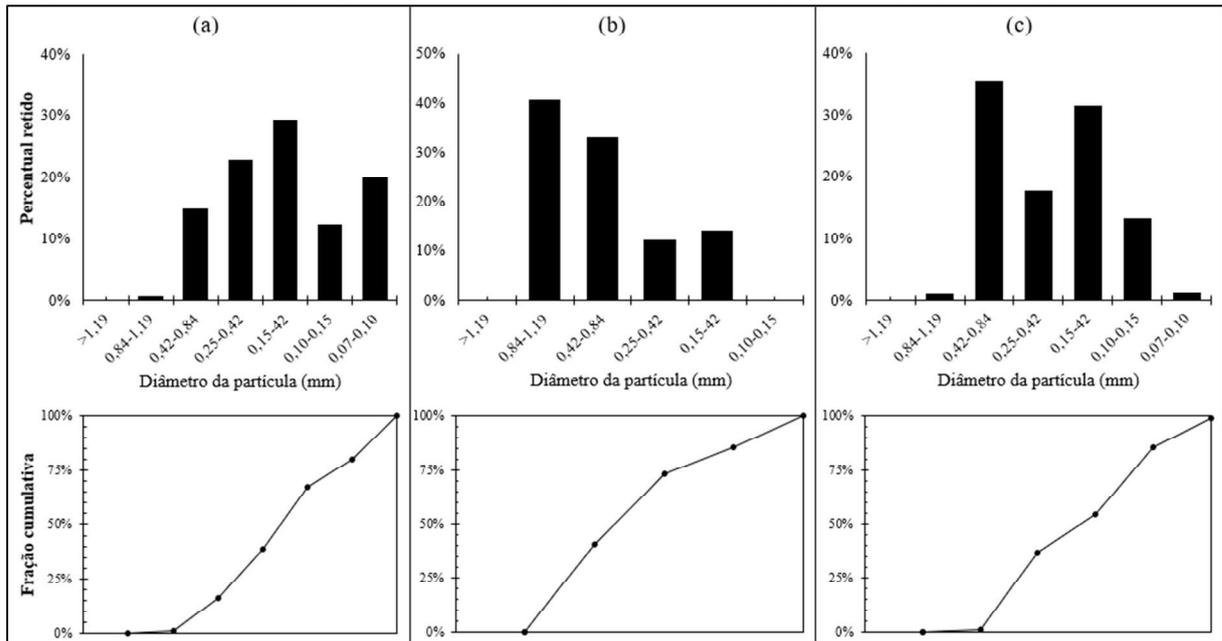
4.1.2. Caracterização física

As amostras secas de casca, polpa e semente de pitomba foram caracterizadas fisicamente como segue.

4.1.2.1. Distribuição granulométrica e diâmetro médio

A distribuição granulométrica das partículas das amostras de (a) casca; (b) polpa; (c) semente, após moagem e separação em peneiras é apresentada na Figura 25. A partir da distribuição granulométrica foi determinado o tamanho médio de partículas para cada amostra.

Figura 25 – Distribuição granulométrica - partes do fruto: (a) casca; (b) polpa; (c) semente



Fonte: elaborado pelo autor

A Tabela 10 apresenta os diâmetros médios superficiais das frações diferentes partes do fruto, considerando os dados de granulometria.

Tabela 10 – Diâmetro médio superficial do material

Fração do fruto	¹ Diâmetro (mm)
Casca	0,12 ± 0,02
Polpa	0,30 ± 0,03
Semente	0,17 ± 0,02

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

Fonte: elaborado pelo autor

De acordo com a Organização Internacional de Normalização, os sólidos são categorizados como sólidos grosseiros, finos e ultrafinos, a depender do tamanho da partícula (TANNOUS; ROCHA, 2011). A partir da moagem realizada, os dados da Tabela 10 indicam

que a amostra de polpa se classifica como sólido fino ($0,30 \leq \text{diâmetro} < 4,7 \text{ mm}$), ao passo que as amostras de casca e de semente se caracterizam como sólidos ultrafinos (diâmetro $< 0,30 \text{ mm}$). Além disso, conforme a classificação de Cremasco et al. (2012), os materiais analisados categorizam-se como pó, pelo fato de seus diâmetros se situarem na faixa de 1 a 500 μm .

Estudos apontam que a caracterização do diâmetro da partícula é importante na definição de parâmetros de processo para a recuperação de compostos de interesse, como compostos fenólicos e proteína, pois a formação do leito de partículas para a extração interfere nos mecanismos de transferência de massa. Bedin (2018) avaliou a influência do diâmetro médio do pó de arroz em extrações de proteína, esperando que sua diminuição aumentasse o rendimento de extração, embora não tenha obtido confirmação significativa. Por outro lado, Arias et al. (2020) consideraram a importância do diâmetro de partícula no estudo de extrações supercríticas de flavonoides de orégano mexicano, onde o tamanho das partículas foi considerado como variável independente (em dois níveis) no design fatorial utilizado, sendo que o fato de o tamanho de partícula não ter desempenhado efeito significativo na extração foi atribuído à proximidade numérica dos níveis dos diâmetros das partículas no design experimental.

Em ambos os estudos – Bedin (2018) e Arias et al. (2020), as etapas subsequentes do processo utilizaram os lotes originais de granulometria, o que se seguiu também neste trabalho.

4.1.2.2. Massas específicas e porosidade

Por meio dos ensaios picnométricos das amostras secas das três partes do fruto, obteve-se a massa específica aparente (ρ_a), a massa específica real (ρ_r) e o índice de vazios ou porosidade (ε), cujos valores estão registrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Massas específicas e porosidade do material

Fração do fruto	${}^1\rho_a (g \cdot cm^{-3})$	${}^1\rho_r (g \cdot cm^{-3})$	${}^1\varepsilon$
Casca	$0,43 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,01$	$71,63 \pm 1,43$
Polpa	$0,57 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,01$	$62,30 \pm 1,25$
Semente	$0,73 \pm 0,03$	$1,48 \pm 0,01$	$50,80 \pm 1,02$

¹Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n = 3.

Fonte: elaborado pelo autor

Os materiais apresentam massas específicas distintas, como valores entre 0,43 e 0,73 de densidade aparente, indicando menor densidade para a casca e maior para a semente de

pitomba. Esses dados de densidade e porosidade são importantes para a caracterização dos leitos fixos de partículas quando da avaliação dos mecanismos de transferência de massa envolvidos nos processos de extração.

4.1.3. Teor de umidade

O teor de umidade presente nas amostras foi quantificado, conforme metodologia descrita no item 3.3.2.1 e está registrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Teores de umidade de água no fruto e efetividade da secagem

Fração do fruto	^{1,2} Umidade in natura (%)	² Umidade do pó (%)
Casca	64,46 ± 1,42	8,93 ± 0,11
Polpa	80,47 ± 1,78	22,68 ± 0,75
Semente	44,43 ± 1,03	10,59 ± 0,09

¹Resultados extraídos da Tabela 9; ²Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

Verifica-se que a casca e a semente foram secas com maior efetividade, tendo seus teores de umidade reduzidos na ordem de 10%, a qual está dentro da recomendação feita por Martínez e Vance (2008 apud ALVES et al., 2019), os quais estipulam a faixa de 3 a 10% como margem segura, sem impacto na degradação do produto. A umidade obtida do pó da casca (8,93%) neste trabalho foi semelhante ao encontrado por Silva et al. (2021), que foi de 9,69%.

As etapas de secagem neste trabalho foram, portanto, eficazes no objetivo de eliminar a maior parte da água presente na matéria-prima (casca, polpa e semente), visando seu emprego na sequência dos estudos (a partir do item 4.2) para valorização do fruto (especialmente da casca de pitomba).

4.1.4. Composição centesimal

De posse dos teores de umidade descritos em 4.1.3, foi possível avaliar a composição centesimal das amostras em base seca, cujas frações constam quantificadas na Tabela 13. O termo ‘carboidrato não fibroso’ utilizado refere-se ao teor de carboidratos obtido por diferença, subtraindo-se inclusive a fibra bruta.

Tabela 13 – Composição centesimal do material em base seca (g / 100g de amostra b.s.)

Composição	¹ Casca	¹ Polpa	¹ Semente	¹ Fruto inteiro
Proteína	7,14 ± 0,45	10,78 ± 0,13	8,31 ± 0,78	8,05 ± 0,46
Lipídios	0,82 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,51 ± 0,02
Fibra bruta	41,29 ± 0,28	3,28 ± 0,14	1,40 ± 0,20	17,18 ± 0,21
Carboidratos não fibrosos	45,60 ± 0,80	83,15 ± 0,33	87,48 ± 1,06	70,73 ± 0,74
Cinzas	5,15 ± 0,05	3,08 ± 0,05	2,54 ± 0,06	3,61 ± 0,06

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

Fonte: elaborado pelo autor

Constata-se que a pitomba em geral possui minerais (3,61%), é rica em carboidratos (70,73% da composição em base seca) e tem baixo teor de gorduras (0,51%). Sua casca é rica em fibras (41,29%). A polpa desidratada possui maior concentração de proteína, a qual também está presente significativamente na casca e semente (7,14 - 8,31%), tornando-lhes matrizes vegetais com teor proteico similar ao do arroz integral cruz, que é de 8,31% b.s., de acordo com a tabela TACO (DAG et al., 2011).

Em consulta à literatura, nota-se que a maioria dos autores obteve composições semelhantes para pitomba, como constam na Tabela 14. Neste contexto, Fraga (2018), avaliando as frações da casca e da polpa, encontrou elevado teor de carboidratos, baixa fração lipídica e quantidades de proteína similares ao demonstrado neste trabalho. No que diz respeito à semente, os dados aqui apresentados são praticamente idênticos aos de Castro (2019), que também avaliou a composição do endocarpo da pitomba. Outros pesquisadores também sinalizaram constituição similar (SILVA, 2008; SANTOS et al., 2020). A composição centesimal apontada neste trabalho, portanto, corrobora o perfil químico característico do fruto estudado.

Por outro lado, verifica-se alguns dados em obra científica que divergem da concepção até aqui apresentada. Queiroga et al. (2018), ao quantificar proteínas nas partes da pitomba, mostrou teor de 37,50% na casca e 29,94% na semente, valores destacadamente superiores ao restante dos resultados encontrados na coleção de obras sobre o fruto. A princípio, a consulta aos dados publicados por este autor tinha contribuído na motivação de parte do trabalho presente, quanto do estudo da concentração proteica, entretanto, estes parecem superestimados.

Tabela 14 – Composição centesimal do material expressa em base seca (g / 100g de amostra): dados do autor para a pitomba em comparação com a literatura

Parte do fruto	Autor (ano) - parte do fruto / composição	^{1,2} Santos et al. (2020) - casca; Silva et al. (2008) - polpa	^{1,2} Fraga (2018) - casca e polpa; Castro (2019) - semente	^{1,2} Silva et al. (2021) – casca; Queiroga et al. (2019) – polpa e semente	^{1,3} Trabalho atual - casca, polpa e semente
Casca	Proteínas	10,99 ± 0,03	6,45 ± 0,38	17,62 ± 0,12	7,14 ± 0,45
	Lipídios	2,39 ± 0,03	0,24 ± 0,05	4,24 ± 0,21	0,82 ± 0,02
	Fibra bruta			58,37 ± 2,02	41,29 ± 0,28
	Carboidrato T.	83,67 ± 1,10	89,35 ± 1,97	75,11 ± 0,44	86,89 ± 1,08
	Cinzas	5,10 ± 0,03	3,92 ± 0,24	3,03 ± 0,11	5,15 ± 0,05
Polpa	Proteínas	6,83 ± 0,12	11,07 ± 0,82	8,24 ± 0,49	10,78 ± 0,13
	Lipídios	1,13 ± 0,06	3,60 ± 0,05		0,53 ± 0,01
	Fibra	14,25 ± 3,38			3,28 ± 0,14
	Carboidrato T.	88,58 ± 3,62	81,62 ± 0,62		85,60 ± 0,19
	Cinzas	3,46 ± 0,06	3,60 ± 0,21		3,08 ± 0,05
Semente	Proteínas		8,50 ± 0,04	29,94 ± 1,06	8,31 ± 0,78
	Lipídios		0,69 ± 0,02		0,27 ± 0,02
	Fibra				1,40 ± 0,20
	Carboidrato T.		88,35 ± 0,44		88,88 ± 0,86
	Cinzas		2,46 ± 0,05		2,54 ± 0,06

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3; ²Resultados obtidos através da conversão de base úmida para base seca, quando necessária; ³Dados do autor.

Fonte: elaborado pelo autor

A caracterização físico-química realizada nesta pesquisa está, em suma, alinhada com os dados científicos existentes, salvo poucas exceções em literatura que apresentam perfil divergente. A exploração subsequente da pesquisa atual se dará através do estudo da presença e quantificação de compostos bioativos na casca, bem como a abordagem paralela da tentativa de concentração do teor proteico nos dois coprodutos (casca e semente) da pitomba.

4.2. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE PITOMBA

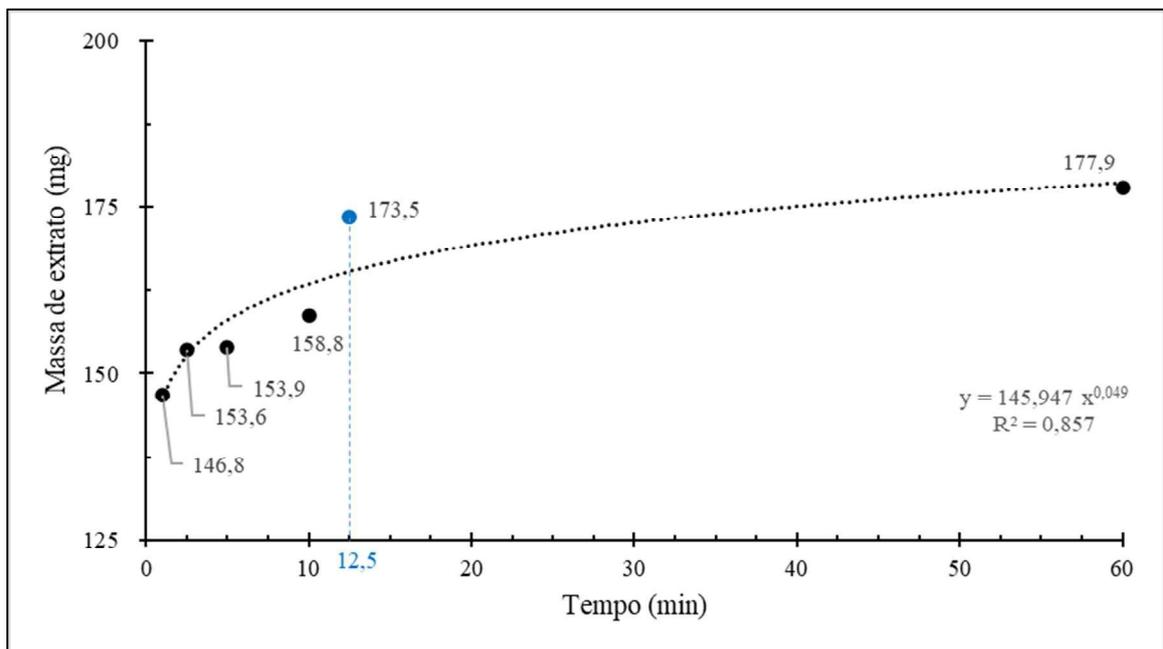
Esta etapa experimental é constituída pela extração e quantificação de compostos bioativos na casca. Os extratos principais foram obtidos através da extração assistida por micro-ondas (MAE).

4.2.1. Extração assistida por micro-ondas - MAE

Definiu-se preliminarmente os seguintes parâmetros para condução do processo: temperatura de 100 °C; agitação de 1.000 rpm; e como solvente foi empregada a mistura de etanol/água com 50% v/v. O objetivo da cinética de extração foi a determinação do tempo de processo, adequado para o estudo de determinação do rendimento de extração considerando diferentes parâmetros de operação.

A cinética de extração, construída com coletas de amostra (extrato recuperado) em tempos pré-definidos até 60 minutos de extração, é apresentada na Figura 26, que mostra a massa de extrato recuperado em função do tempo de processo.

Figura 26 – Curva de cinética de extração da casca de pitomba em micro-ondas empregando a mistura etanol/água 50% v/v como solvente



Fonte: elaborado pelo autor

É perceptível o aumento da recuperação de extrato em função do tempo de extração. Uma linha de tendência com modelo de potência foi ajustada aos dados para avaliar a disposição natural dos pontos. Nota-se que o resultado obtido no tempo de 12,5 minutos é similar (96%) ao conseguido por 1 hora de extração. Isto indica que no tempo de 12,5 minutos o processo se encontra na etapa difusional de extração. Por conseguinte, o processo da extração de compostos da casca de pitomba em micro-ondas, usando como solvente a mistura de etanol/água, teve o tempo de processo estabelecido em 12,5 minutos, para ser aplicado nos ensaios de rendimentos (apresentado a seguir). Este resultado é similar ao encontrado por Torres et al. (2022b) em que,

usando solvente etanol/água, obteve tempo de processo de 15 minutos, quando avaliou a extração assistida por micro-ondas de compostos bioativos presentes em folhas de ora-pro-nóbis.

4.2.1.1. *Rendimento global de extração e capacidade antioxidante dos extratos de casca de pitomba*

A partir da definição do tempo de processo em 12,5 minutos, os ensaios de MAE com a casca de pitomba foram conduzidos seguindo as condições apresentadas no delineamento experimental de 3.4.3. Os resultados dos ensaios são apontados na Tabela 15, a qual reúne os valores de rendimento de extração, conteúdo de fenólicos totais (CFT), e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. Com estes resultados, é possível vislumbrar as influências da concentração de etanol e da temperatura na qualidade dos extratos.

Tabela 15 – Matriz de planejamento MAE incrementada com valores de variáveis resposta

Nº Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes			
	% Etanol	T °C	¹ Rendimento (%)	¹ CFT (mg _{GA} /g _{ext})	¹ DPPH (µmol _{TE} /g _{ext})	¹ FRAP (µmol _{TE} /g _{ext})
1	15	70	16,80 ± 0,72	49,27 ± 0,37	163,26 ± 4,12	190,79 ± 12,14
2	15	130	20,29 ± 0,32	73,68 ± 2,11	338,53 ± 23,87	334,82 ± 5,41
3	85	70	9,63 ± 0,55	88,53 ± 2,69	266,31 ± 3,05	207,42 ± 13,65
4	85	130	10,96 ± 0,37	91,01 ± 2,58	451,37 ± 5,98	345,71 ± 15,15
5	0	100	15,63 ± 0,28	30,39 ± 0,14	90,66 ± 16,45	198,60 ± 2,54
6	100	100	8,08 ± 0,02	61,96 ± 1,78	414,27 ± 16,93	215,24 ± 25,41
7	50	58	16,18 ± 0,50	103,27 ± 0,58	512,16 ± 35,96	340,06 ± 2,66
8	50	142	22,86 ± 0,44	160,69 ± 10,27	601,57 ± 15,14	497,38 ± 14,06
9	50	100	18,52 ± 0,30	93,04 ± 0,71	509,54 ± 41,84	433,49 ± 9,26
10	50	100	18,49 ± 0,55	93,12 ± 3,24	495,90 ± 2,74	431,24 ± 6,19
11	50	100	18,54 ± 0,67	93,33 ± 5,12	493,24 ± 25,22	425,35 ± 14,24

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

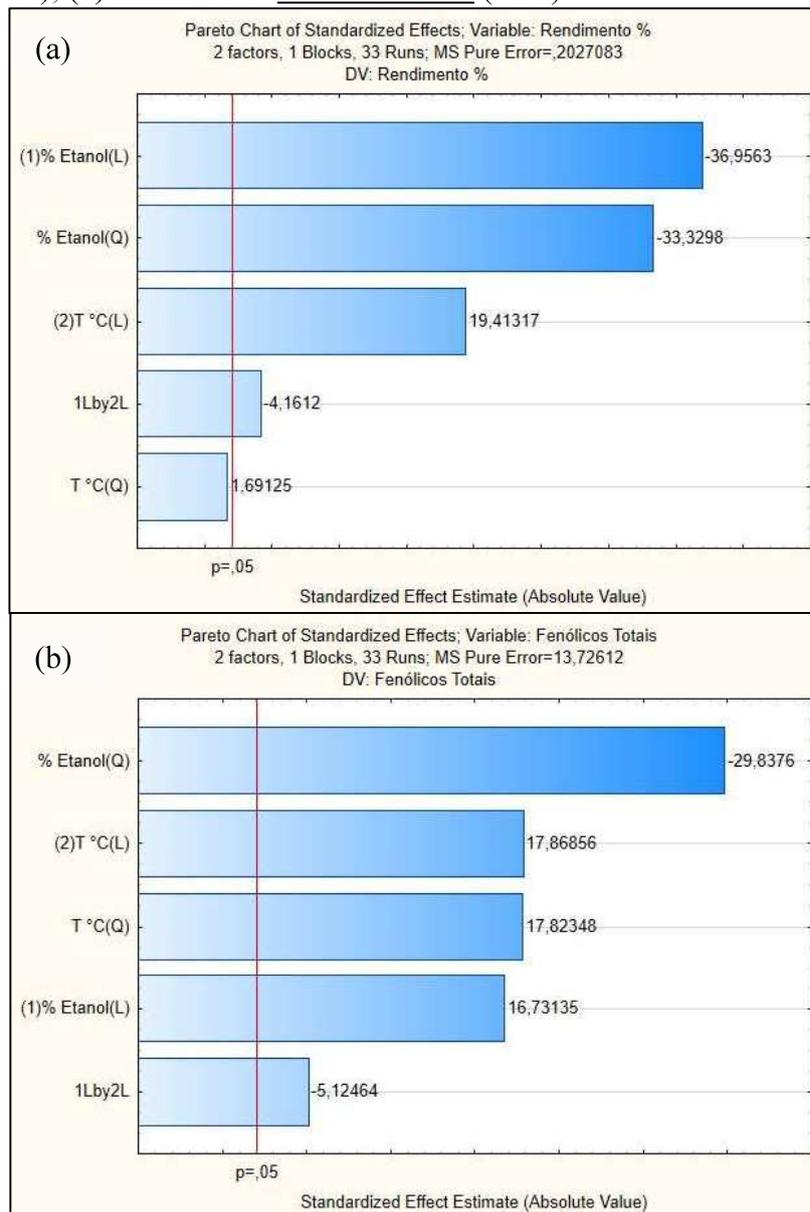
Fonte: elaborado pelo autor

Analisando-se os valores contidos na Tabela 17, verifica-se em geral boa reprodutibilidade no ponto central (ensaios 9,10 e 11). Os rendimentos de extração variaram na faixa de 8,08 a 22,86%, o teor de fenólicos totais de 30,39 a 160,69 (mg_{GA}/g_{ext}), e a atividade antioxidante aferida pelos métodos DPPH e FRAP de 90,66 a 601,57 µmol_{TE}/g_{ext}.

A análise estatística relativa às duas primeiras respostas (rendimento de extração e conteúdo de fenólicos totais) está ilustrada nos diagramas de Pareto da Figura 27, de forma

padronizada. Considerou-se os efeitos principais das variáveis independentes (1-concentração de etanol e 2-temperatura) e de sua interação, para um limite de confiança mínimo de 95% ($p < 0,05$).

Figura 27 – Diagramas de Pareto relativos à MAE da casca de pitomba para: (a) rendimento da extração (R%); (b) conteúdo de fenólicos totais (CFT)



Fonte: elaborado pelo autor em *software Statistic*

As influências significativas são aquelas que aparecem à direita da linha vertical em vermelho, indicativa do limite de rejeição da hipótese nula. Os termos (L), (Q) e 'by' referem-se à indicação do tipo de influência na análise, podendo ser linear, quadrática ou por interação entre os fatores, respectivamente.

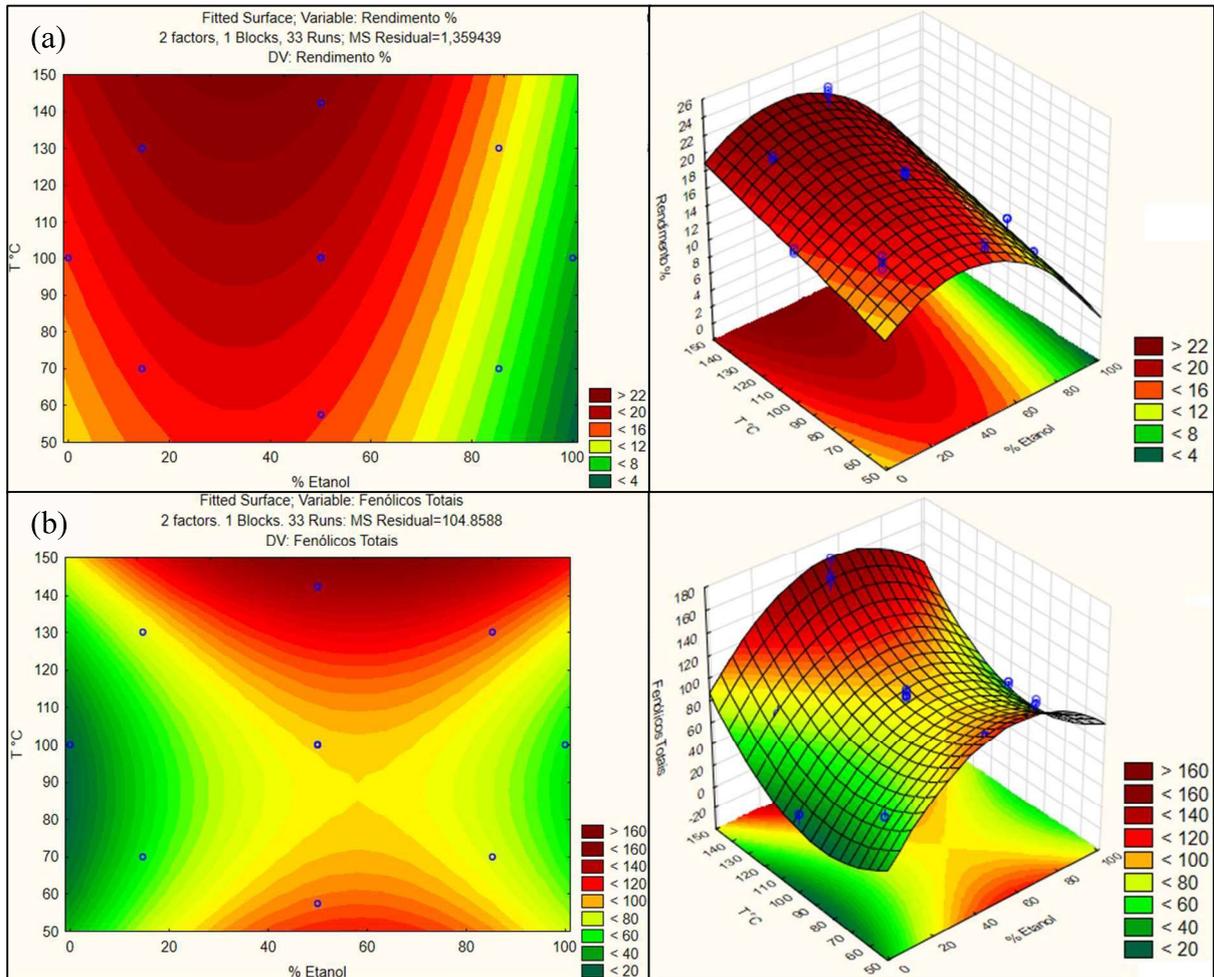
Deste modo, para o rendimento de extração (Figura 27-a), observa-se que a os fatores (1-concentração de etanol e 2-temperatura) em termos lineares e a interação entre eles ('1Lby2L') apresentam influência significativa ($p < 0,05$). O mesmo não ocorre, contudo, com a influência quadrática da temperatura, que aparece graficamente à esquerda da linha vertical. Quanto ao conteúdo de fenólicos totais (Figura 27-b), verifica-se que ambos os fatores em suas formas linear e quadrática, bem como a interação entre eles, apresentaram significância estatística.

Em particular, ao se avaliar a influência da concentração de etanol no rendimento de extração, nota-se que os efeitos obtidos são negativos (Figura 27-a), pressupondo que maiores rendimentos serão alcançados ao serem evitadas altas concentrações de etanol no solvente. Por outro lado, concentrações muito baixas de etanol (próximas ou iguais a zero) reduziria o impacto do efeito no rendimento, em face da concentração ser pequena. Sendo assim, maiores rendimentos de extração serão encontrados em concentrações intermediárias de etanol no solvente. Por sua vez, a análise da influência da concentração de etanol sobre o conteúdo de fenólicos totais mostra um efeito quadrático negativo e um efeito linear positivo (Figura 27-b), o que evidencia que maiores conteúdos de fenólicos serão encontrados em condições afastadas dos extremos (0% ou 100% de etanol). Desta maneira, concentrações medianas de etanol no solvente são preferíveis, o que compactua com o entendimento de autores que relacionam os diferentes índices de polaridades da água e do etanol com a capacidade sinérgica de ampliar a solubilidade de compostos fenólicos em matrizes vegetais (SORITA, 2021; TORRES, 2021).

Por outro lado, ao se avaliar a influência da temperatura nas respostas, observa-se que os efeitos exercidos são todos positivos (nas formas linear e quadrática), ou seja, que maiores temperaturas potencializam tanto o rendimento de extração, quanto a quantidade de fenólicos no extrato. Isto está condizente com as considerações de Wang et al. (2008), Ghafoor et al. (2009) e González-Centeno et al. (2015), que mostram esta tendência na extração de compostos bioativos, sobretudo devido às modificações de permeabilidade nas paredes celulares, facilitando o processo de transferência de massa. Do aumento da temperatura também decorre a diminuição da viscosidade dos extratos e o aumento da solubilidade dos compostos fenólicos, o que favorece o ritmo de extração (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016).

A influência da concentração de etanol e da temperatura no rendimento de extração e no conteúdo de fenólicos totais pode ser visualizada graficamente na Figura 28. Os pontos em azul apontam as condições nas quais foram realizados os experimentos.

Figura 28 – Superfícies de resposta de variáveis dependentes em função da concentração de etanol e temperatura no processo MAE: (a) rendimento; (b) fenólicos totais



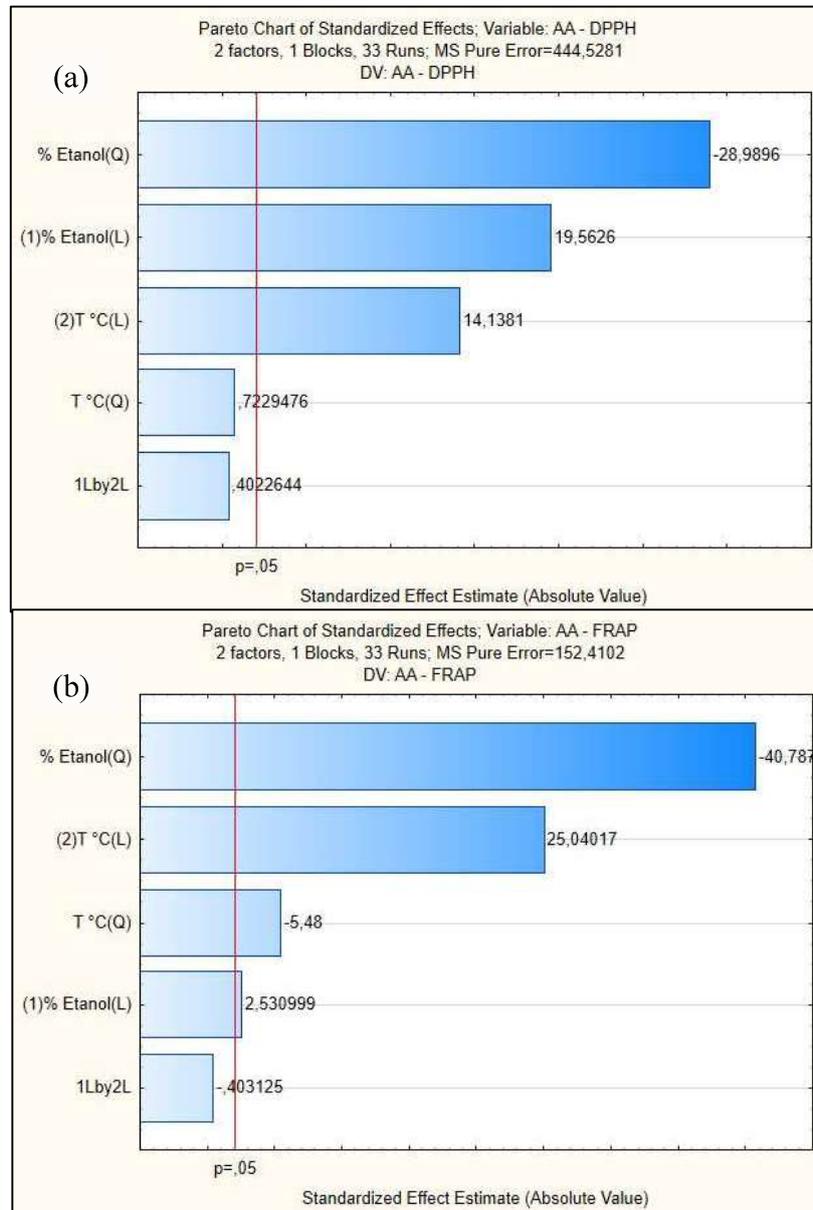
Fonte: elaborado pelo autor em *Software Statistic 13.5.0.17*.

Analogamente, a análise estatística relativa às duas últimas respostas (determinação da capacidade antioxidante dos extratos da casca de pitomba pelos métodos DPPH e FRAP) está ilustrada nos diagramas de Pareto da Figura 29.

Neste aspecto, para a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH (Figura 29-a), observa-se que os fatores em termos lineares (1L \equiv concentração de etanol e 2L \equiv temperatura) e o segundo fator em termos quadráticos (2Q \equiv quadrado da concentração de etanol) apresentam influência significativa ($p < 0,05$). O mesmo não ocorre, contudo, com a influência quadrática da temperatura e a interação linear entre os fatores, cujo efeito é desprezível, para o limite de confiança utilizado.

Quanto à atividade antioxidante determinada pelo método FRAP (Figura 29-b), verifica-se que, exceto a interação entre os fatores, todas as outras influências, em suas formas linear e quadrática, apresentam significância estatística.

Figura 29 – Diagramas de Pareto relativos à MAE da casca de pitomba para determinação da atividade antioxidante pelos métodos: (a) DPPH (b) FRAP

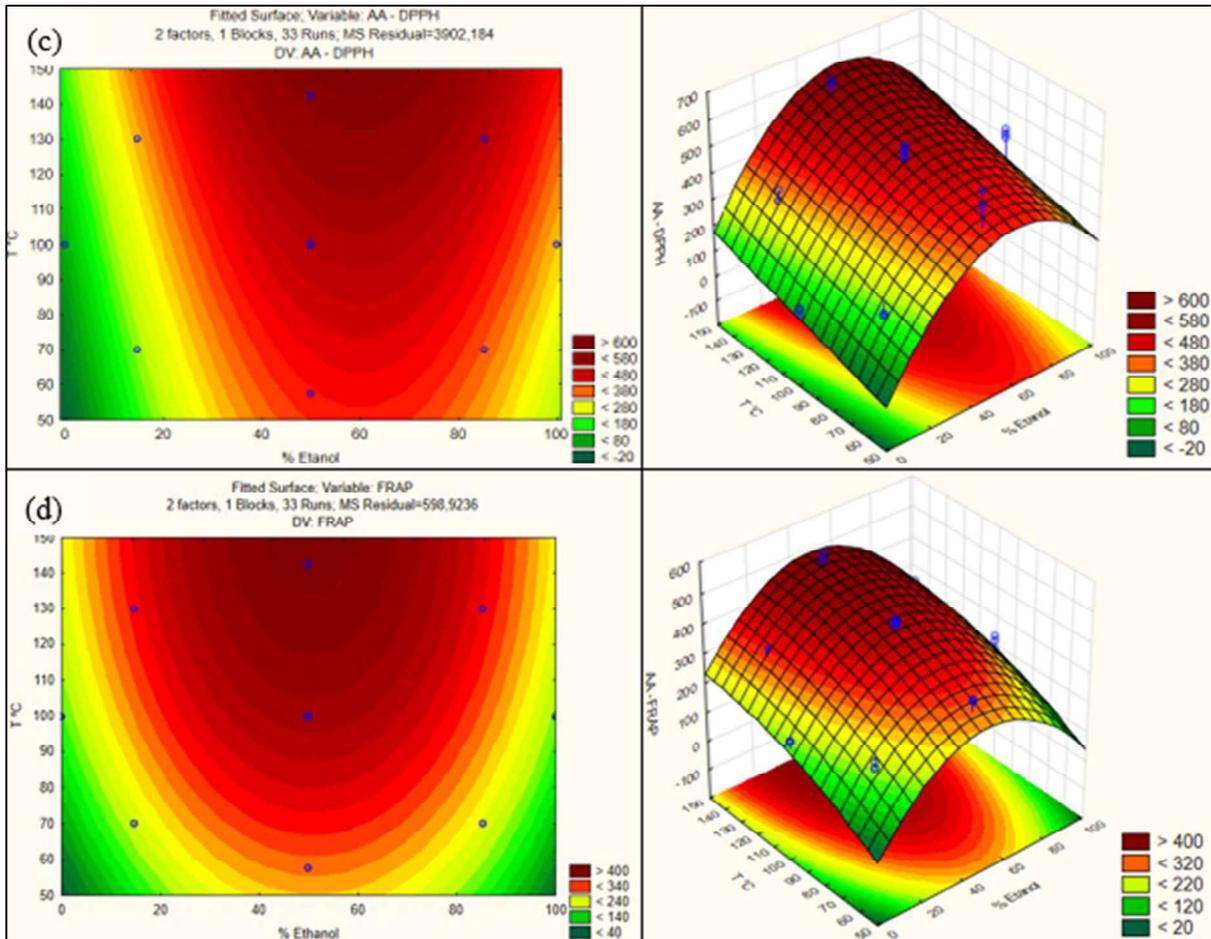


Fonte: elaborado pelo autor em *software Statistic*

A análise da influência da concentração de etanol sobre a atividade antioxidante determinada por ambos os métodos utilizados (Figura 29) mostra efeitos lineares positivos e efeitos quadráticos negativos, corroborando a tendência recente de que, na extração MAE aplicada à casca de pitomba com foco no potencial antioxidante, concentrações intermediárias de etanol contribui para melhores resultados. Quanto à temperatura, os efeitos significativos e fortes mostram serem positivos, o que confirma maior atividade antioxidante em condições de maiores temperaturas. A influência da concentração de etanol e da temperatura na atividade

antioxidante pode ser visualizada graficamente na Figura 30. Os pontos em azul apontam as condições nas quais foram realizados os experimentos.

Figura 30 – Superfícies de resposta de variáveis dependentes em função da concentração de etanol e temperatura no processo MAE: (c) AA – DPPH; (d) AA – FRAP.



Fonte: elaborado pelo autor em *Software Statistic 13.5.0.17*.

Os modelos preditivos obtidos da análise estatística dos resultados para estimar as variáveis resposta, a partir das variáveis independentes, são mostrados nas equações (26) a (29), seguindo os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em variáveis codificadas, com o valor de coeficiente de determinação ($R_2 > 0,90$).

$$R(\%) = 18,691 - 3,396 \cdot X_1 - 3,700 \cdot X_1^2 + 1,784 \cdot X_2 - 0,541 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (26)$$

$$CFT = 93,163 - 12,653 \cdot X_1 - 26,857 \cdot X_1^2 + 13,513 \cdot X_2 + 16,043 \cdot X_2^2 - 5,481 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (27)$$

$$AA_{DPPH} = 503,044 + 84,192 \cdot X_1 - 149,587 \cdot X_1^2 + 60,846 \cdot X_2 \quad (28)$$

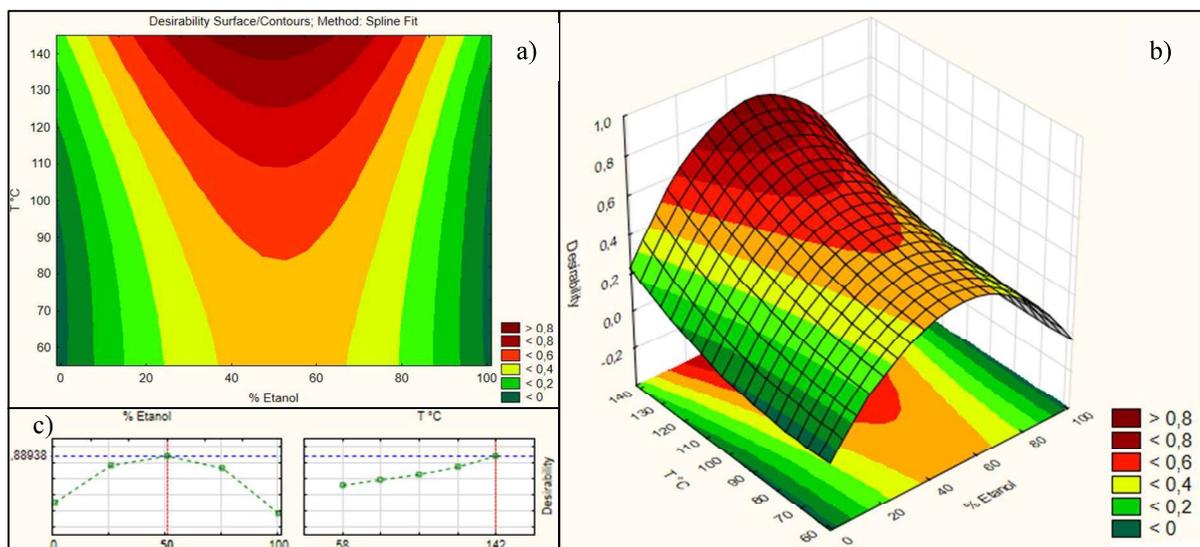
$$AA_{FRAP} = 430,029 + 6,378 \cdot X_1 - 3122,339 \cdot X_1^2 + 1 + 63,101 \cdot X_2 - 16,437 \cdot X_2^2 \quad (29)$$

Em que: $R(\%)$ \equiv Rendimento global de extração; CFT \equiv Compostos Fenólicos Totais; AA_{DPPH} \equiv Atividade Antioxidante – DPPH; AA_{FRAP} \equiv Atividade Antioxidante – FRAP; X_1 = variável codificada correspondente à concentração de etanol no solvente (%); X_2 = variável codificada correspondente à temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

4.2.1.1. Otimização do processo MAE da casca de pitomba

Com base nos modelos obtidos, procedeu-se à otimização do processo de acordo com o item 3.4.3.1, de modo a obter uma combinação que satisfaça os requerimentos de todas as quatro respostas, a fim de se obter uma condição ótima. A função desejabilidade foi construída com base nas superfícies de resposta obtidas anteriormente (S1-Rendimento, S2-CFT, S3-DPPH, S4-FRAP), levando em consideração o intervalo de desejabilidade de 0 a 1, em que o valor mais próximo ao valor unitário representa a condição ótima do processo. Como indicado na Figura 31, por meio da maximização de todas as respostas, obteve-se o valor de desejabilidade global máximo de 0,889, indicando como condições ótimas de processo a máxima temperatura (142°C) e o solvente etanol:água, razão 1:1, já experimentadas pelo Ensaio MAE-8. Os gráficos complementares da função desejabilidade e a relação com os valores preditos constam no Apêndice C.

Figura 31 – Função desejabilidade e otimização da extração MAE: a) gráfico de contorno; b) superfície de resposta; c) valores preditos em função da desejabilidade.



Fonte: elaborado pelo autor em *Software Statistic 13.5.0.17*.

A caracterização preliminar do extrato ótimo obtido da casca de pitomba por meio da técnica MAE é relatada na Tabela 16, a qual indica o rendimento, os compostos fenólicos totais, o teor de flavonoides totais, teor de carotenoides totais e atividade antioxidante, aferida pelos métodos DPPH e FRAP.

Tabela 16 – Qualidade do extrato de casca de pitomba obtido por MAE da condição otimizada (MAE-8): $t = 12,5$ min; $r = 1:20$ (g/mL); $C_{EtOH} = 50\%$; $T = 142$ °C

Análise	Resultado
Rendimento (%)	$22,86 \pm 0,44^a$
Fenólicos Totais - CFT (mg_{GAE}/g_{ext})	$160,69 \pm 10,27$
Flavonoides Totais - TFT (mg_{CatE}/g_{ext})	$58,97 \pm 4,13$
Carotenoides Totais - TCC ($mg_{\beta-CarE}/g_{ext}$)	$8,97 \pm 0,53$
AA (%) - DPPH	$86,41 \pm 2,90$
AA-DPPH ($\mu mol_{TE}/g_{ext}$)	$601,57 \pm 15,14$
AA-FRAP ($\mu mol_{TE}/g_{ext}$)	$497,38 \pm 14,06$

Fonte: elaborado pelo autor

Verifica-se que o teor de fenólicos totais ($160,69$ mg g⁻¹) obtido da casca da pitomba foi superior ao encontrado por Pan et al. (2008), na análise da atividade antioxidante a partir de extratos da casca de longan por meio de extração assistida por micro-ondas, em que obtiveram teor de fenólicos totais de $96,78$ mg g⁻¹, utilizando concentração de etanol de 95% e temperatura de 80 °C. O teor de flavonoides totais ($58,97$ mg g⁻¹) encontrado supera o resultado encontrado por Fraga et al. (2021) que, avaliando o quantitativo de flavonoides em extratos etanólico da casca de pitomba por percolação exaustiva, encontraram um teor de $19,12$ mg g⁻¹.

A atividade antioxidante dos extratos da casca de pitomba determinada pelos métodos DPPH e FRAP foram de $601,57$ e $497,38$ $\mu mol_{TE}/g_{ext}$, respectivamente. A capacidade de sequestro de radical DPPH correspondente (percentual de inibição AA) foi de 86,41%. Neste contexto, Silva et al. (2021), avaliando a capacidade antioxidante de farinha de casca de pitomba, a partir de extrato hidroalcolico, na proporção 30:70 (etanol:água), obteve percentual de inibição de 10,15%. Por outro lado, Souza (2022), ao mensurar a capacidade antioxidante da casca de longan¹ pelos métodos DPPH e FRAP, obteve em extrato etanólico valores de $152,342$ e $50,817$ $\mu mol_{TE}/g_{ext}$, respectivamente.

¹ O autor no TCC usa a nomenclatura pitomba (*Talisia esculenta*) para descrever o estudo com a longan (*Dimocarpus longan* ou *Euphoria longana*), em face da similaridade entre os frutos. Ver a seção da revisão, item 2.4.2, que inclui as diferenças entre as espécies, que por vezes são confundidas.

O rendimento de extração encontrado na MAE aplicada à casca de pitomba (22,86%) foi usado para comparação preliminar do desempenho desta técnica com PLE e maceração (MAC), em condições similares, como a seguir.

4.2.2. PLE e maceração para a casca de pitomba

A influência da técnica de extração no rendimento global obtido da casca de pitomba pode ser conferida na Tabela 17, cujos dados incluem os resultantes das extrações alternativas à extração assistida por micro-ondas (MAE), a saber: extração por líquido pressurizado (PLE) e método convencional por maceração (MAC). As condições de processo destes métodos (PLE e MAC) foram baseadas na condição ótima obtida para MAE, ou seja, o solvente empregado foi a mistura etanol:água na razão 1:1 e, para PLE também foi mantida a temperatura ótima da MAE.

Tabela 17 – Perfil técnico e desempenho das extrações PLE e MAC aplicadas à casca de pitomba: (a) extração por líquido pressurizado; (b) método convencional por maceração

Amostras	Condição de operação	^{1,2} Rendimento (%)
(a) PLE aplicada às mesmas condições de concentração do solvente e temperatura da MAE otimizada	Temperatura 142 °C Pressão 100 bar Massa 3 g Fluxo 4,8 mL min⁻¹ (Razão 1:20) Tempo 12,5 minutos	15,81 ± 0,19 ^b
(b) MAC aplicada à mesma condição de concentração do solvente da MAE otimizada	Temperatura ambiente Pressão ambiente Massa 3 g Volume 60 mL (Razão 1:20) Tempo 3 horas	14,51 ± 0,21 ^c

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n ≥ 2; ²letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa (p<0,05) para o Teste de Tukey

Fonte: elaborado pelo autor

Nota-se que PLE aplicada à casca de pitomba com o foco na recuperação de compostos bioativos apresentou rendimento de extração de 15,81%, a partir da replicação da condição ótima da MAE, que foi com solvente etanol/água na razão 50% (v/v) e temperatura de 142 °C.

Neste aspecto, considerando o teor de fenólicos e a atividade antioxidante em amora, usando extração por líquido pressurizado, Machado et al. (2015) encontraram melhor condição de processo com solvente etanol + água (50% v/v) a 100 °C, usando a pressão de operação de 7,5 Mpa (~75 bar). Quanto à MAC, o rendimento de extração obtido foi de 14,51%. Também usando maceração, Lima (2019) obteve rendimento de 33,5% a partir de extratos de longan², usando solvente etanol/água na razão 30/70 (v/v).

Com o emprego do mesmo solvente, as técnicas resultaram em rendimentos estatisticamente diferentes entre si, para a recuperação de compostos da casca de pitomba, seguindo a ordem MAE > PLE > MAC, ratificando preliminarmente a assertividade da escolha da técnica MAE na referida extração.

Outros estudos também relatam maior eficiência da extração MAE na recuperação de compostos fenólicos de fontes vegetais. De fato, Amorim (2020), avaliando a obtenção de compostos bioativos da casca de tipuana tipu (amendoim-acácia), e Cheng et al. (2023), comparando técnicas de extração na avaliação de perfil fenólico e capacidade antioxidante de polpa de jaca, constataram a extração MAE como o melhor método dentre outras categorias, tais como PLE e extração assistida por ultrassom (UE). Semelhantemente, Taamalli et al. (2012) e Zekovic et al. (2017) obtiveram maiores resultados na recuperação de compostos fenólicos por meio da técnica MAE em extratos de folhas de oliveira e de sálvia, respectivamente. Esta melhor eficiência pode resultar do aquecimento peculiar da biomassa através de energia de micro-ondas, uma vez que, ao liberar o composto almejado da matriz para a fase líquida, ocorre previamente a ruptura de células, devido as moléculas de água presentes na matriz entrarem em ressonância causada pelas micro-ondas, o que possivelmente potencializa a liberação dos compostos alvo presentes no substrato.

4.2.3. Identificação e quantificação de compostos bioativos dos extratos de casca de pitomba

A quantificação de compostos bioativos, com foco especial para os compostos fenólicos, foi realizada por HPLC, e os resultados, apresentados na Tabela 18, mostram que os extratos avaliados (MAE, MAC e PLE) apresentaram grande diversidade de componentes fenólicos, categorizados em ácidos fenólicos, aldeídos e cumarinas. Com efeito, a Tabela 18

² O autor no TCC também usa a nomenclatura pitomba (*Talisia esculenta*) para descrever o estudo com a longan (*Dimocarpus longan* ou *Euphoria longana*), em face da similaridade entre os frutos. Verificar a seção da revisão, item 2.4.2, que inclui as diferenças entre as espécies, que por vezes são confundidas.

detalha o perfil fenólico presente nos extratos da casca de pitomba obtidos pelas diferentes técnicas empregando a mistura etanol/água 50% (v/v).

Os ácidos fenólicos apresentam-se como grupo majoritário, constituindo a fração principal de compostos fenólicos encontrados na casca de pitomba, sobretudo ácidos protocatequínico, para-aminobenzoico, vanílico, gálico, para-cumárico, além dos ácidos siríngico, ferúlico, salicílico, clorogênico, sinápico e cafeico. Outro grupo importante na composição fenólica da casca de pitomba são os flavonoides, compondo-se de isoquercetina, rutina e taxifolina. Encontram-se ainda as cumarinas (escopoletina e umbeliferona) e os aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído e coniferaldeído).

Tabela 18 – Perfil fenólico de extratos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*) em ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$)

Compostos	MAE	MAC	PLE
Ácidos Fenólicos			
1 Ácido 4-aminobenzóico	107,0 ± 9,6	< LOD	< LOQ
2 Ácido cafeico	3,0 ± 0,0	2,9 ± 0,4	< LOQ
3 Ácido clorogênico	4,4 ± 0,0	8,2 ± 0,1	3,5 ± 0,0
4 Ácido ferúlico	8,9 ± 1,4	9,7 ± 1,3	28,0 ± 0,0
5 Ácido gálico	28,6 ± 1,4	15,5 ± 0,9	18,1 ± 3,6
6 Ácido p-cumárico	25,6 ± 1,4	31,5 ± 0,6	13,9 ± 2,6
7 Ácido protocatequínico	566,7 ± 12,7	90,6 ± 13,6	130,1 ± 18,9
8 Ácido salicílico	11,6 ± 1,0	7,7 ± 1,1	7,9 ± 0,6
9 Ácido sinápico	3,0 ± 0,7	< LOQ	2,2 ± 0,3
10 Ácido siríngico	11,8 ± 2,8	8,2 ± 1,3	11,3 ± 2,7
11 Ácido vanílico	84,5 ± 7,3	51,3 ± 10,3	69,1 ± 9,2
Aldeídos fenólicos			
12 Coniferaldeído	8,1 ± 0,4	< LOD	< LOD
13 Siringaldeído	52,3 ± 2,8	< LOD	< LOQ
14 Vanilina	99,1 ± 14,9	2,9 ± 0,4	10,4 ± 1,3
Cumarinas			
15 Escopoletina	20,0 ± 0,3	20,3 ± 1,4	18,0 ± 2,4
16 Umbeliferona	< LOQ	1,5 ± 0,2	< LOQ
Flavonoides			
17 Isoquercetina	11,8 ± 2,1	36,8 ± 1,5	11,3 ± 1,4
18 Rutina	< LOD	51,8 ± 1,6	< LOQ
19 Taxifolina	< LOQ	6,8 ± 1,4	< LOQ
Total de ácidos fenólicos	855,1 ± 39,4	225,7 ± 30,6	284,2 ± 39,3
Total de flavonoides	11,8 ± 4,2	95,4 ± 4,4	11,3 ± 1,4
Outros fenólicos	179,5 ± 18,4	24,7 ± 2,1	28,3 ± 3,7
Total de compostos fenólicos quantificados	939,4 ± 51,26	345,8 ± 36,05	323,8 ± 43,25

< LOD = não detectado; < LOQ = não quantificado.

Fonte: elaborado pelo autor

O Ácido Protocatequínico (ou Protocatecuico) foi o composto fenólico quantificado com maior concentração nos extratos avaliados [$566,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (MAE); $130,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (PLE); $90,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (MAC)]. Este composto fenólico tem sido bastante estudado devido ao seu alto potencial antioxidante *in vivo* e *in vitro* (MENEZES, 2017). Há estudos que apontam o uso deste composto no combate à oxidação lipídica (DA SILVA, 2016), e como anti-inflamatório em células intestinais (OLIVEIRA, 2014), bem como na associação de propriedades antitumorais, sobretudo no tratamento de osteossarcoma³ (KARINA; OLIVEIRA, 2022), o que valoriza a qualidade dos extratos obtidos.

Os compostos fenólicos quantificados neste trabalho não são mencionados integralmente em literatura como constituinte da casca de pitomba. Trabalhos como os de Neri-Numa et al. (2014), Fraga et al. (2021) e Souza et al. (2016), quando vistos de forma agregada, demonstram a identificação de compostos presentes na pitomba, embora não quantifiquem compostos fenólicos na casca. Sendo assim, o trabalho atual amplifica o potencial da casca de pitomba, para ser utilizada como ingrediente rico em antioxidantes.

Quanto à avaliação das técnicas empregadas, as extrações alternativas (MAE e PLE) demonstram serem processos mais eficientes e mais rápidos para recuperar ácidos fenólicos da casca de pitomba do que métodos convencionais (MAC). De fato, a Tabela 18 indica a ordem de recuperação de ácidos fenólicos como: ensaios MAE > ensaios PLE > ensaio MAC. Por outro lado, a amostra recuperada por MAC produziu um extrato mais rico em flavonoides. Em linhas gerais, a extração assistida por micro-ondas (MAE) se comporta com maior eficiência, devido liderar também a recuperação de compostos fenólicos não classificados como ácidos fenólicos ou flavonoides. Neste contexto, Torres et al. (2022b) quando quantifica compostos bioativos em folhas de ora-pro-nóbis também constata que a extração MAE é mais eficiente que a tradicional.

4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DA CASCA E DA SEMENTE DE PITOMBA

Esta etapa experimental é constituída pela recuperação da fração proteica de coprodutos da pitomba (casca e semente). Os extratos da casca foram obtidos através da extração por água subcrítica (SWE), que foi a técnica avaliada como alternativa à extração tradicional por maceração (MAC). A semente foi avaliada para a recuperação da fração proteica

³ Osteossarcoma é um tipo de tumor ósseo, maligno primário, que atinge sobretudo idosos e adolescentes ou jovens, mais incidentemente na segunda década de vida (KARINA; OLIVEIRA, 2022).

empregando-se o método tradicional de maceração (MAC), para efeitos comparativos com os resultados obtidos com a casca do fruto.

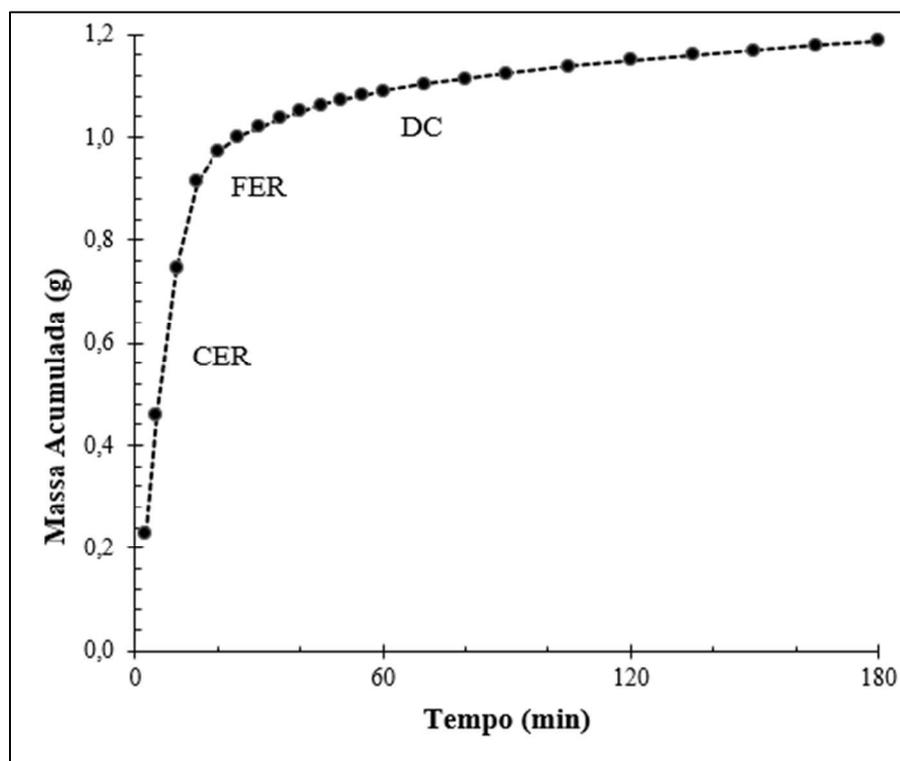
4.3.1. Extração por água subcrítica (SWE)

A princípio foram definidos os seguintes parâmetros de extração a alta pressão a partir da casca da pitomba: temperatura de 100 °C; pressão de 100 bar; água sonicada sem ajuste de pH como solvente. O objetivo inicial foi construir a cinética de extração para estabelecer o tempo de processo, para os ensaios de rendimento.

4.3.1.1. Estudo cinético

A cinética foi conduzida até 180 minutos de extração, avaliando-se o percentual de massa acumulado, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, conforme delineado no item 3.4.2. A curva de cinética de extração está representada na Figura 32, onde é possível visualizar os períodos de extração à taxa constante (CER), à taxa decrescente (FER) e o período difusional (DC).

Figura 32 – Curva de cinética de extração da casca em unidade SWE



Fonte: elaborado pelo autor

Nota-se que a partir de 1 hora de cinética, além da extração ter atingido a etapa difusional, com baixa taxa de recuperação de soluto (g/h) é mínima, não surtindo efeitos significativos que justifiquem a manutenção da extração por maior período, sob pena de aumentar os gastos energéticos. Conseqüentemente, o processo da extração da fração proteica da casca de pitomba pela técnica de água subcrítica, usando como solvente água destilada sonicada, teve o tempo estabelecido em 60 minutos.

4.3.1.2. Rendimento global e teor de proteínas

A partir da fixação do tempo de processo em 60 minutos, a condução dos ensaios de extrações SWE com a casca de pitomba, seguindo a aplicação do desenho experimental de 3.4.5, resultou nos dados indicados na Tabela 19, a qual contém os valores referentes ao percentual de rendimento, teor de proteínas e, ao percentual de recuperação de proteína na casca, por meio dos quais é possível constatar as influências do pH e da temperatura de extração na característica dos extratos. Os valores referidos foram calculados conforme as diretrizes de 3.5, 3.3.2.4 e 3.7.2.1, respectivamente.

Tabela 19 – Matriz de planejamento SWE incrementada com variáveis resposta

Ensaio	pH	T (°C)	^{1,2} Rendimento (%) b.s.	^{1,2} Proteína kjeldahl (%)	Recuperação proteína (%)
1	7,5	40	14,41 ± 2,89 ^{e,f}	10,26 ± 0,30 ^{d,e,f}	20,72
2	7,5	60	16,15 ± 0,50 ^{c,d,e}	9,21 ± 0,01 ^{d,e,f}	20,85
3	7,5	80	16,18 ± 0,33 ^{c,d,e}	9,06 ± 0,39 ^{e,f}	20,54
4	7,5	100	19,28 ± 1,27 ^{a,b,c,d}	8,34 ± 0,00 ^f	22,53
5	9	40	18,01 ± 0,76 ^{b,c,d,e}	11,25 ± 1,49 ^{c,d,e}	28,38
6	9	60	19,80 ± 0,07 ^{a,b,d}	11,82 ± 1,45 ^{b,c,d}	32,81
7	9	80	20,30 ± 1,31 ^{a,b}	8,11 ± 0,78 ^f	23,06
8	9	100	23,00 ± 0,01 ^a	8,46 ± 0,35 ^f	27,27

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n ≥ 2; ²letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa (p<0,05) para o Teste de Tukey

Fonte: elaborado pelo autor

Verifica-se que os ensaios 4, 6, 7 e 8 apresentaram maiores rendimentos de extração, sem diferença significativa entre eles. Quanto ao teor de proteínas, os ensaios 1, 2, 5 e 6 alcançaram maiores recuperações, sem diferença significativa no teor proteico dos extratos. O ensaio 6 (SWE-6) apresentou, simultaneamente, maior rendimento e maior teor proteico no extrato,

alcançando a maior recuperação de proteínas (32,81%) da casca de pitomba. Desta maneira, as melhores condições do processo apontam para a temperatura de 60 °C e o solvente com pH ajustado para 9,0.

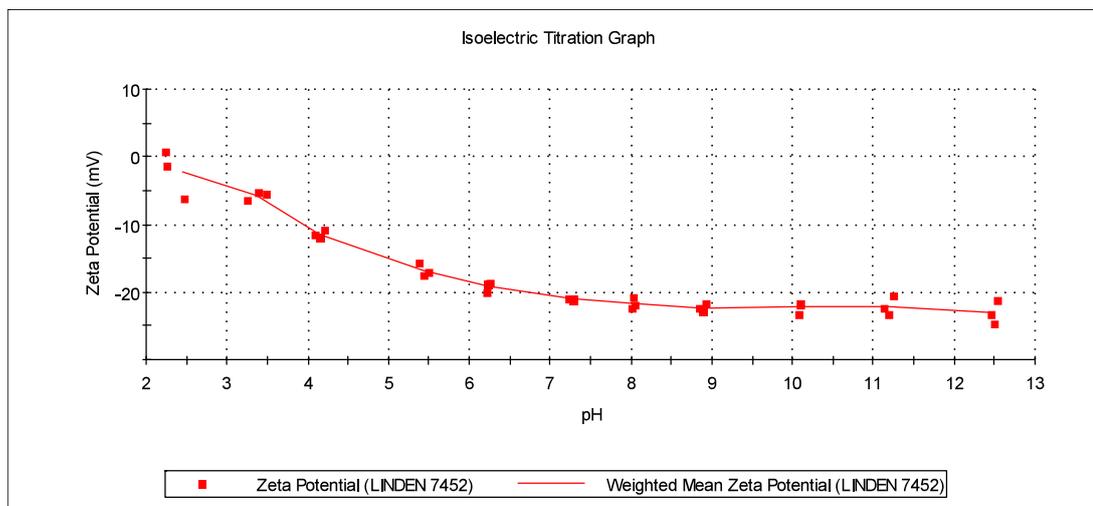
A análise dos resultados mostra que o rendimento de extração e a recuperação de proteínas aumentam quando o pH de extração aumenta. Neste aspecto, Bora e Ribeiro (2004) quando avaliaram extratos proteicos de macadâmia observaram que maiores rendimentos eram alcançados para pH mais elevados. Isso também foi constatado por Theerakulkait, Chaiseri e Mongkolkanchanasiri (2006) ao extraírem a fração proteica do farelo de arroz, e por Jarpa-Parra et al. (2014) ao avaliar o processo de extração de proteína de lentilha. Esta tendência pode ser associada ao fato de que proteínas extraídas a pH alcalinos possuem predominância de espécies carregadas negativamente devido à desprotonação dos grupos amina e à ionização dos grupos carboxílicos, o que possibilita o aumento da interação proteína-solvente. A repulsão eletrostática resultante deste fenômeno com as proteínas facilita sua separação, bem como favorece sua interação com o solvente, facilitando assim a extração (BEDIN et al., 2019).

A temperatura do processo também interfere direta e positivamente no rendimento de extração, isto é, em temperaturas mais elevadas (condição de água subcrítica), o rendimento de extração foi superior (23,00%). Este fato pode ser explicado pelo amolecimento do tecido da amostra, causado por maiores temperaturas, melhorando a taxa de difusão (MARAN; PRIYA, 2016). Quanto à influência da temperatura do processo na recuperação da fração proteica, nota-se que a condição intermediária ($T = 60$ °C) na faixa estudada para pH 9 foi mais eficaz, provavelmente devido a favorecer a extração sem perdas por desnaturação ou degradação térmica.

4.3.1.1. *Potencial Zeta*

O Potencial Zeta dos extratos brutos obtidos da extração SWE com a casca de pitomba tem perfil indicado na Figura 33. Nota-se que as cargas apresentadas no gráfico não são nulas, o que sugere que as forças de atração intermoleculares permanecem oferecendo resistência à agregação das partículas solubilizadas ao longo da variação do pH, o que não favorece à formação de precipitados. Tendo em vista que a maioria dos experimentos realizados pelas técnicas de extração por água subcrítica se deram em temperaturas superiores a 50 °C, há a possibilidade da ocorrência de desnaturação das moléculas de proteína, a qual dificultaria a determinação do potencial Zeta e, por conseguinte à precipitação, como indica Bianconi (2021).

Figura 33 – Curva de potencial Zeta em função do potencial de hidrogênio ($Z_p \times \text{pH}$) para amostras de extrato obtido em extração SWE com água sonicada sem adição de NaOH

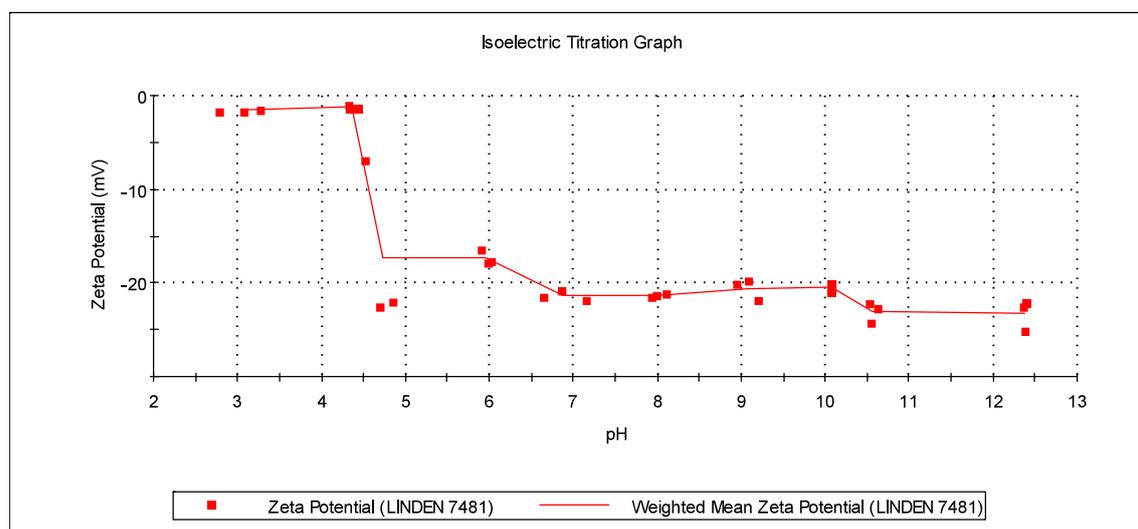


Fonte: Análise do Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN)

4.3.2. Extração à baixa pressão por maceração da casca e semente de pitomba

Os parâmetros para condução do processo à pressão atmosférica na maceração – MAC com a casca de pitomba foram: temperatura de 30 °C; água sonicada com pH ajustado (7-11) como solvente; tempo de processo de 2 h. Esta técnica foi empregada para a recuperação da fração proteica a partir da casca de pitomba para servir de comparação com a técnica a alta pressão (SWE). O potencial Zeta dos extratos brutos obtidos da extração MAC com a casca é representado na Figura 34.

Figura 34 – Curva de potencial Zeta em função do potencial de hidrogênio ($Z_p \times \text{pH}$), amostras de extrato obtido em extração convencional em temperatura ambiente, pH 9



Fonte: Análise do Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN)

Nota-se que as cargas apresentadas no gráfico não são nulas, o que sugere que as forças de atração intermoleculares permanecem oferecendo resistência à agregação das partículas solubilizadas, ao longo da variação do pH. Entretanto, graficamente é perceptível que a partir de pH~4,7 há uma mudança significativa na intensidade do módulo das cargas proteicas, o que possivelmente favorecesse à formação de precipitados na faixa $2,2 < \text{pH} < 4,3$. Uma vez que a MAC foi realizada a 30 °C, isto indica que não ocorreu desnaturação das moléculas de proteína, possibilitando à precipitação. A partir desta conjuntura, procedeu-se com a observação dos experimentos com maior rendimento (subseção a seguir), avaliando-se, por meio da redução do potencial de hidrogênio do extrato solubilizado até $\text{pH} = 2,2$, a possível formação de precipitados após nova etapa de centrifugação.

4.3.2.1. Rendimento global por MAC e teor de proteínas na casca

Os ensaios da extração MAC da casca foram conduzidos de acordo as condições estipuladas no item 3.4.6.1, somadas à condição de precipitação (4.3.2), cujos resultados estão indicados na Tabela 20, a qual contém os valores de rendimento, teor de proteínas e percentual de recuperação de proteína na casca (em relação ao teor de proteína na casca), vislumbrando as influências do pH e da precipitação na característica dos extratos.

Tabela 20 – Desempenho da extração convencional por maceração (MAC) da casca de pitomba (*Talisia esculenta*) utilizando como solvente água destilada com pH ajustado

Ensaio	pH	^{1,2} Rendimento (%) b.s.	^{1,2} Proteína kjeldahl (%)	Recuperação proteína (%)
1	7	11,71 ± 0,72 ^f	10,04 ± 0,40 ^{d,e,f}	16,47
2	8	15,83 ± 1,31 ^{c,e}	10,23 ± 0,05 ^{d,e,f}	22,70
3	9	18,83 ± 1,30 ^{b,d}	11,41 ± 0,37 ^{b,c,d,e}	30,12
4	10	20,87 ± 0,54 ^{a,b}	13,85 ± 0,95 ^b	40,52
5	11	21,10 ± 0,83 ^{a,b}	13,70 ± 0,44 ^{b,c}	40,52
³ 6	⁹ + prec. 2,2	1,76 ± 0,01 ^g	24,64 ± 0,17 ^a	6,07

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, $n \geq 2$; ²letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey; ³extração seguida de precipitação.

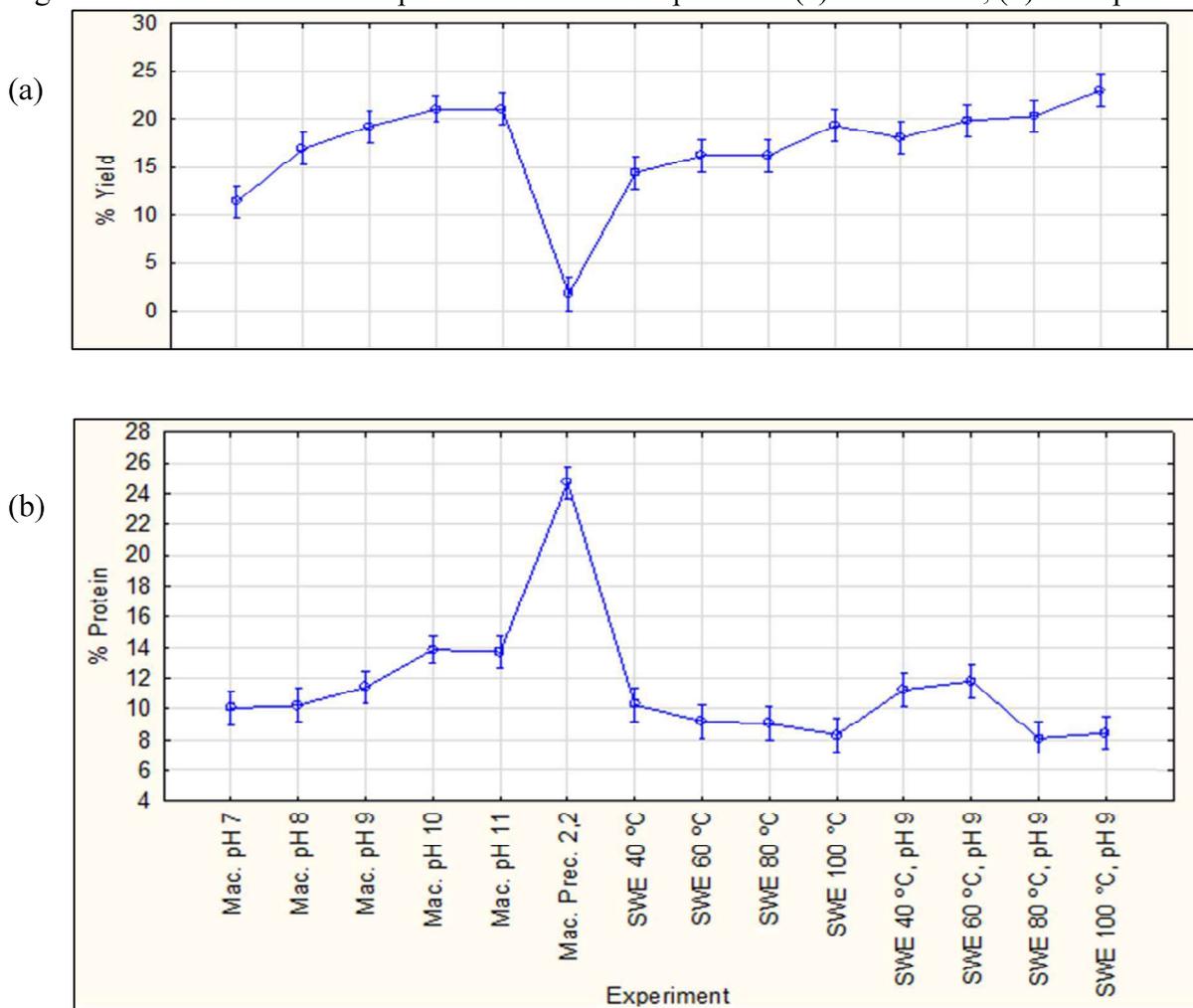
Fonte: elaborado pelo autor

É constatado que os ensaios MAC-4 e MAC-5 apresentaram o maior rendimento (~ 21% sem diferença significativa) e foram realizados com os maiores valores de pH, dentro da faixa estudada. Quanto ao teor de proteínas, a amostra obtida da precipitação (MAC-6) possui maior

concentração (24,64%), embora apresente baixo rendimento (1,76%). Dentre as amostras não precipitadas, os ensaios MAC-3, MAC-4 e MAC-5 lideram a recuperação de proteína, não se distinguindo-se entre si estatisticamente, indicando a faixa $9 \leq \text{pH} \leq 11$ como desejável.

Tendo em vista que o teor de proteínas na casca de pitomba pré-processada (matriz vegetal) é de 7,14%, verifica-se que as melhores extrações convencionais (ensaios MAC-4 e MAC-5) praticamente duplicaram a concentração (13%), um valor similar ao teor proteico da farinha de rosca, que é de 12,63% b.s. segundo Dag et al. (2011), o que parece realçar a proposta de Santos et al. (2020), os quais sugerem o enriquecimento de outros produtos de alta aceitação no mercado através da possível incorporação de farinhas mistas que pudessem incluir o uso da casa de pitomba. A fim de serem comparadas as extrações de proteína da casca de pitomba com base nas técnicas aplicadas neste estudo, apresenta-se a Figura 35, a qual ilustra os dados de rendimento e teor de proteína obtidos da extração MAC concatenados com os resultados observados na extração SWE.

Figura 35 – Perfil dos extratos proteicos da casca de pitomba: (a) rendimento; (b) % de proteína



Fonte: elaborado pelo autor, usando software *Statistica*© 1984-2018 versão 13.5.0.17 (TIBCO Software, Inc)

Nota-se que quando se avalia o rendimento de extração (do inglês ‘%Yield’ – Figura 35-a), o aumento do pH da água e da temperatura dentro dos limites experimentais contribuem positivamente. É fato que os maiores rendimentos na extração convencional (MAC) se deram na faixa de maior pH (≥ 9), ao passo que SWE os maiores rendimentos foram obtidos no uso da água em condição subcrítica (SWE – 100°C).

Por outro lado, a avaliação de teor de proteína (Figura 30-b) mostra que também há contribuição positiva promovida pelo incremento do pH, e há evidência que a relação com a temperatura do processo é praticamente inversa, em que os melhores resultados são obtidos em temperaturas amenas, $30 \leq T \leq 60$ (MAC, PLE-5 e PLE-6), em que possivelmente não tenha havido o fenômeno da desnaturação.

Um caso particular são os resultados das amostras provenientes da extração por maceração seguida de precipitação (Ensaio Mac. Prec. 2,2). Apesar de terem apresentado menor rendimento, dentre todo arcabouço experimental, foram as amostras que lograram maior eficácia na concentração proteica (24,64%), superando o triplo da concentração na matriz vegetal (7,14%). Muito embora não se tenha atingido o percentual mínimo estipulado em legislação para ser considerado um concentrado proteico (50%), sua concentração se assemelha ao de um hidrolisado proteico, como aponta a Resolução N° 268/2005 da Anvisa (Anexo-A). Os extratos identificados com maior teor de recuperação em proteínas seguiram para a etapa de caracterização.

4.3.2.2. *Rendimento global na semente*

Os ensaios da extração MAC da semente (MACs) foram conduzidos de acordo as condições estipuladas no item 3.4.6.2, cujos resultados consistem rendimento de extração, os quais estão registrados na Tabela 21.

Verifica-se que o ensaio MAC_S-3 apresentou maior rendimento (36,55%), não diferindo estatisticamente do ensaio MAC_S-6 (33,89%), indicando que menores razões sólido-líquido e o maior pH da água dentro dos limites do delineamento abordado são preferíveis na obtenção do maior rendimento de extração.

O extrato MAC_S-3 foi então avaliado quanto ao teor de proteínas e o percentual de recuperação de proteína, alcançando teores de 15,26 % e 67,10%, respectivamente, recuperando 2/3 da matéria proteica presente na matriz vegetal.

Tabela 21 – Desempenho da extração convencional por maceração (MAC) da semente de pitomba (*Talisia esculenta*) utilizando água destilada com pH ajustado como solvente

Ensaio	Razão sólido líquido (g/100mL)	pH	^{1,2} Rendimento (%) b.s.
1	0,5	8	20,97 ± 0,71 ^d
2	0,5	9,5	26,45 ± 0,15 ^{b,c}
3	0,5	11	36,55 ± 1,81 ^a
4	1,0	8	20,38 ± 0,88 ^d
5	1,0	9,5	25,17 ± 0,34 ^c
6	1,0	11	33,89 ± 1,16 ^a
7	2,0	8	18,17 ± 1,83 ^d
8	2,0	9,5	20,09 ± 0,07 ^d
9	2,0	11	29,61 ± 0,13 ^b

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão, n ≥ 2; ²letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa (p < 0,05) para o Teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

Finalmente, tendo em vista o procedimento de comparar a extrações convencionais da semente e casca da pitomba (ambas por 17 h) e, considerando que a razão sólido-líquido utilizada a princípio nos experimentos com a casca havia sido definida em 2g/100g (item 3.4.6.1), optou-se por caracterizar o extrato da semente com esta razão pré-definida (MAC_S-9). O Ensaio MAC_S-9 apresenta o segundo melhor rendimento (categoria ‘b’ no teste de Tukey) e mantém o pH da otimização (pH=11). Desta forma, este seguiu para a etapa de caracterização de colorimetria.

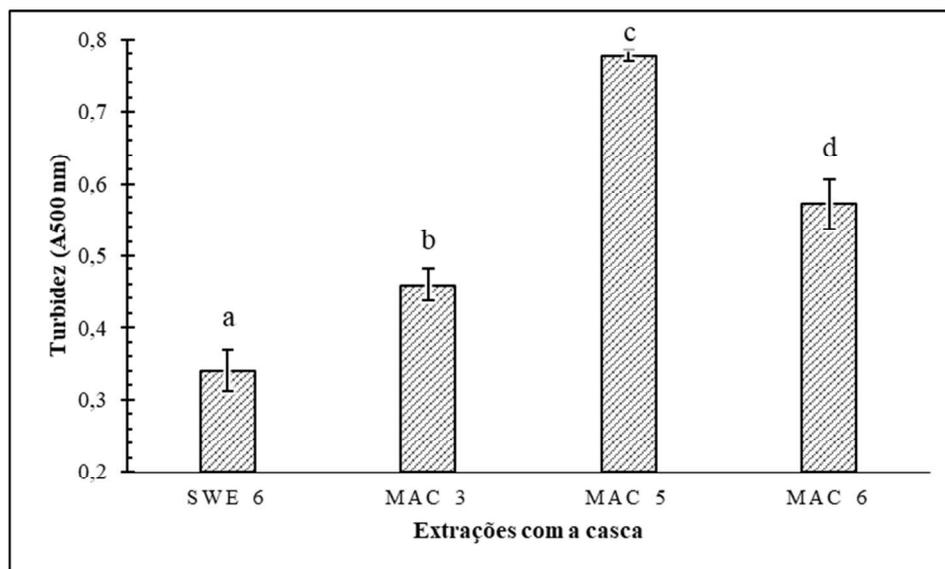
4.3.3. Caracterização dos extratos proteicos

Os extratos proteicos foram caracterizados a partir dos conceitos de turbidez, teor de sulfidril e parâmetros de colorimetria, tendo em vista que: a minimização da turbidez da solução é um parâmetro relevante em aplicações industriais (LIU et al., 2017); maiores teores de grupos sulfidril estão associados à possibilidade de maior potencial antioxidante e valor nutricional agregado às proteínas (FONSECA et al., 2015); e os parâmetro de cor influenciam a aparência e, conseqüentemente, a aceitação do produto no mercado (NAIK et al., 2022).

4.3.3.1. Turbidez

O parâmetro da turbidez foi avaliado nos melhores extratos provenientes da casca da pitomba, a saber: SWE-6, MAC-3, MAC-5 e MAC-6, à altura de absorbância de 500 nm, conforme mostra a Figura 36. Nota-se que todas as amostras diferem entre si estatisticamente.

Figura 36 – Efeito das condições de extração na turbidez dos extratos da casca de pitomba



Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 2$; letras diferentes no gráfico indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

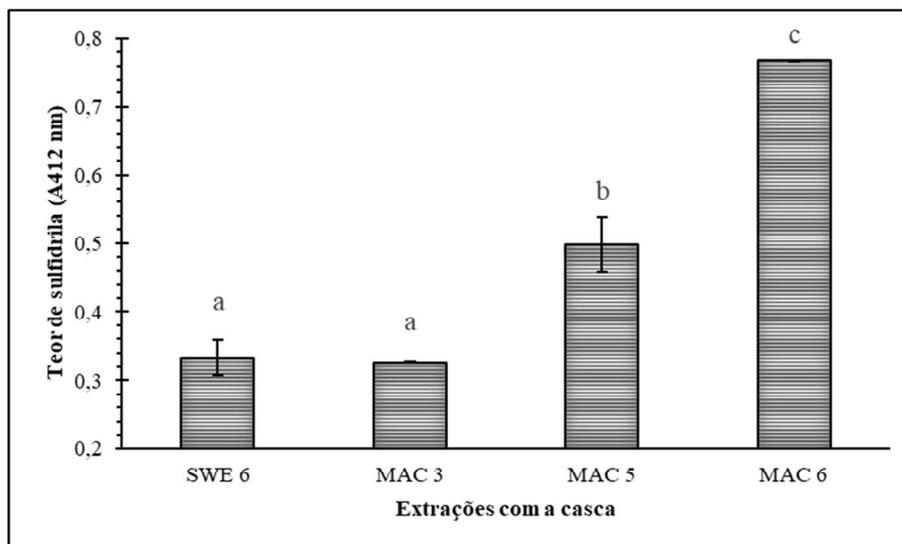
Os extratos SWE-6 e MAC-3 apresentaram valores de turbidez mais baixos, provavelmente devido às condições de extração em pH 9, fator que pode ter aproximado a turbidez de extratos provenientes de técnicas diferentes. O Ensaio MAC-5 decorre da extração conduzida com pH 11, o que pode ter influenciado na obtenção da maior turbidez dos extratos. Finalmente, o extrato MAC-6, proveniente da extração a pH 9, apresenta turbidez intermediária, possivelmente decorrente da influência da etapa de precipitação *a posteriori*.

Em suma, o extrato ótimo da extração por água subcrítica (SWE-6), conduzido no menor pH da faixa preferível ($9 \leq \text{pH} \leq 11$) e à temperatura de 60 °C, assumiu a melhor performance de turbidez ($\text{Abs} < 0,4$), apresentando-se o líquido mais límpido. Chang, Jiang e Liu (2022b), analisando o efeito do tratamento térmico em proteína de clara do ovo, perceberam uma relação entre o aumento de temperatura com o incremento da turbidez, cujo pico máximo foi atingido a 90 °C, associando este fenômeno à formação de aglomerados devido à desnaturação térmica das moléculas. Todavia, a influência da temperatura não foi avaliada pois maiores variações de temperatura de extração seriam necessárias para detectar sua influência na turbidez dos extratos.

4.3.3.2. Teor de Sulfidrila

O teor de sulfidrila foi avaliado (ver Figura 37) através de absorvância em 412 nm. Nota-se que houve diferença significativa entre os extratos provenientes da maceração (MAC).

Figura 37 – Efeito das condições de extração no teor de sulfidrila dos extratos proteicos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*)



Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 2$; letras diferentes no gráfico indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

A amostra MAC-6, proveniente da maceração seguida de precipitação, apresentou maior teor de sulfidrila dos extratos, sendo preferível. Esta característica pode ser decorrente do extrato apresentar maior concentração de proteínas, devido à precipitação, ou de menor suscetibilidade da proteína a danos oxidativos durante o processo, como realça Ghizi Souza et al. (2021).

O teor de sulfidrila dos extratos da maceração que não passaram pela etapa de precipitação, foram $MAC-5 > MAC-3$, sendo que estes ensaios diferem apenas no pH, MAC-3 (pH = 9) e MAC-5 (pH = 11), assim podemos sugerir a influência do pH no desdobramento do conteúdo livre de SH nos extratos, haja vista a possível formação de ligações S-S por oxidação de SH ou reação de troca de SH/S-S, como indicam Chang, Jiang e Liu (2022b) e Mine et al. (1990). O teor de sulfidrila do extrato SWE se comportou com similaridade ao teor do extrato MAC conduzido no mesmo pH do solvente (MAC-3), não diferindo estatisticamente, o que endossa a sugestão.

4.3.3.3. Parâmetros de cor

Os resultados médios e o desvio padrão de colorimetria dos extratos estão representados na Tabela 25, juntamente com os parâmetros de ângulo de tonalidade (H^*), índice de brancura (W_i) e índice croma (C^*).

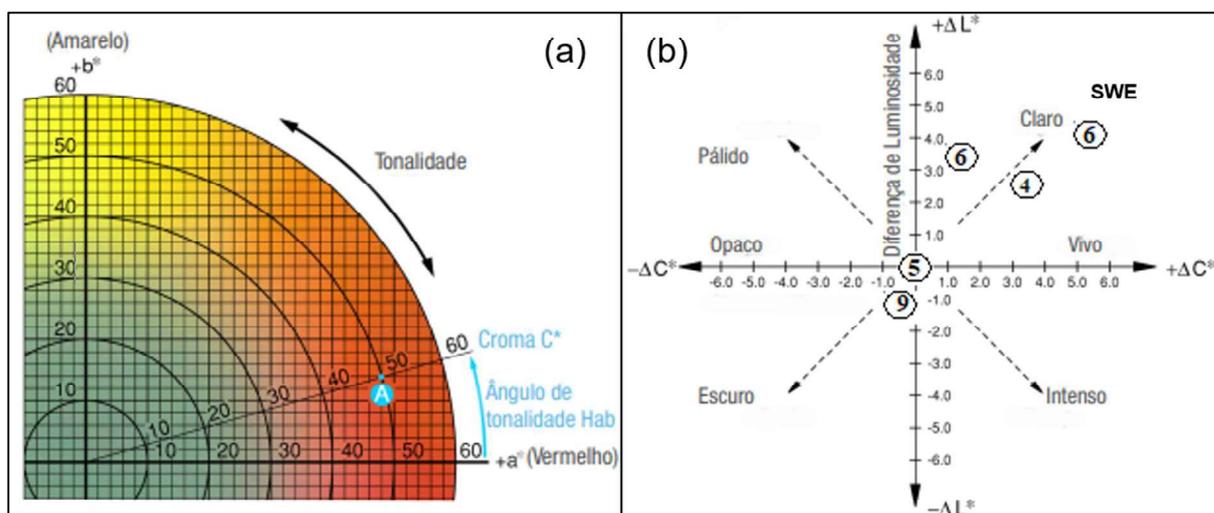
Tabela 22 – Parâmetros de cor dos extratos obtidos com pitomba: c ≡casca; s ≡semente.

Ensaio	${}^{1,2}L^*$	${}^{1,2}a^*$	${}^{1,2}b^*$	${}^{1,2}H^\circ$	${}^{1,2}W_i$	${}^{1,2}C^*$
PLE $_c$ -6	$6,53 \pm 0,62^a$	$4,05 \pm 0,27^a$	$5,81 \pm 0,15^a$	$55,15 \pm 2,47^a$	$-10,92^a$	$7,09^a$
MAC $_c$ -4	$4,95 \pm 0,01^b$	$3,32 \pm 0,21^{a,b}$	$3,82 \pm 0,02^{a,b}$	$49,07 \pm 1,97^a$	$-6,53^{a,b}$	$5,07^a$
MAC $_c$ -5	$2,39 \pm 0,01^{c,d}$	$0,94 \pm 0,01^c$	$1,39 \pm 0,01^{b,c}$	$55,93 \pm 0,00^a$	$-1,78^b$	$1,68^b$
MAC $_c$ -6	$3,51 \pm 0,10^c$	$2,37 \pm 0,38^b$	$4,49 \pm 1,48^a$	$61,56 \pm 4,19^a$	$-9,96^{a,b}$	$5,08^a$
MAC $_s$ -9	$1,64 \pm 0,13^d$	$0,81 \pm 0,21^c$	$1,10 \pm 0,25^c$	$53,56 \pm 2,96^a$	$-1,68^b$	$1,38^b$

¹Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 2$; ²letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) para o Teste de Tukey.

Nota-se que os extratos proteicos apresentam em geral baixa luminosidade (valores de L^* próximos de 0), coordenadas cromáticas positivas ($a^* > 0$ e $b^* > 0$), com leve tendência a cores quentes, baixo índice de saturação (C^*), demonstrando serem amostras com tendência à opacidade, baixos índices de brancura ($W_i < 0$), indicando serem amostras mais escuras e, ângulo de tonalidade sem diferença significativa, atuando no mesmo quadrante (Figura 38-a).

Figura 38 – Colorimetria dos extratos proteicos da pitomba: (a) representação do 1º quadrante do espaço $L^*C^*h^\circ$; (b) Diferença de cor, usando o extrato MAC-5 como referência.



Fonte: (a) Sensing Americas, [s.d.]; (b) elaborado pelo autor, adaptado de Sensing Americas, [s.d.].

Utilizando-se o extrato MAC-5 como referência (Figura 38-b), verifica-se que o extrato proveniente da extração SWE se apresenta como a amostra mais límpida, clara e viva, tornando-se de aparência preferível. A coloração do extrato da semente (MACs-9) não difere estatisticamente do extrato da casca nas mesmas condições (amostras 9 e 5 na ilustração).

5. CONCLUSÃO

A pitombeira é uma sapindácea bastante difundida no Brasil, cujo delicioso fruto, bastante consumido *in natura* e de baixo custo, pode ser mais bem explorado por suas propriedades funcionais. A pitomba é de fato rica em componentes presentes não somente na polpa, como também na casca e semente, as quais podem ser aproveitadas na recuperação de compostos de alto valor agregado, tais como fenólicos e proteína, por meio de técnicas ambientalmente amigáveis, a exemplo das extrações por micro-ondas (MAE) e água subcrítica (SWE).

A extração MAE, aplicada na recuperação de compostos bioativos da casca, demonstrou ser a técnica mais eficiente, produzindo extratos com mais alta capacidade antioxidante e maior conteúdo fenólico. O melhor desempenho da extração foi encontrado na temperatura de 142 °C, usando solvente misto água-etanol em proporção equitativa (MAE-8). Estas condições replicadas na PLE e MAC produziram perfis fenólicos diferentes, em que os principais compostos quantificados nas amostras das extrações alternativas MAE e PLE foram ácidos fenólicos, enquanto nas amostras da extração convencional MAC foram flavonoides.

O ácido protocatequínico se apresentou como principal fenólico presente em cascas de pitomba, o que é uma constatação relevante, em face de seu poder antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral, desejável inclusive em tratamentos de osteossarcoma. Outros 18 (dezoito) compostos bioativos foram quantificados na casca: ácidos fenólicos (para-aminobenzoico, vanílico, gálico, para-cumárico, siringico, ferúlico, salicílico, clorogênico, sinápico e cafeico); flavonoides (isoquercetina, rutina e taxifolina); cumarinas (escopoletina e umbeliferona); e aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído e coniferaldeído).

Quanto à recuperação de proteína da casca, usando-se água como solvente, o maior rendimento de extração foi obtido por SWE, em temperatura de 100 °C e pH 9 (SWE-8: 23,00%). Quanto à concentração e proteína, o melhor desempenho desta técnica (SWE-6) apresentou teor de proteína de 12%, além de apresentar menor turbidez e aparência preferível, caracterizando-se amostra mais límpida, clara e viva, quando avaliada pelos parâmetros colorimétricos. O maior teor de proteína foi alcançado na MAC em 30 °C e pH 9, seguida de precipitação a pH 2,2 (MAC-6), o qual foi de 24,64%. MAC-6 apresentou maior teor de sulfidrila e tem similaridade com a categoria de hidrolisado proteico vegetal, segundo a Resolução N° 268/2005 da ANVISA.

A extração MAC, aplicada à recuperação de proteína da semente usando água como solvente em temperatura de 30 °C e pH 11 apresentou maior rendimento (MAC_{S-9}: 36,55%), cuja concentração de proteína atingiu 15,26%, além de apresentar teor de recuperação de proteína de 67,10%.

Os resultados obtidos neste trabalho, portanto, apontam para a valorização da pitomba como matéria-prima com potencial uso na recuperação sistemática de compostos de alto valor agregado (fenólicos e proteína), os quais podem ser explorados pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas ou de cosméticos.

Sugestão de trabalho futuros:

- Estudos complementares podem ser realizados futuramente para ampliar a minúcia do conhecimento desta matriz vegetal, a fim de subsidiar a construção de um anteprojeto de biorrefinaria para a recuperação desses compostos, como as recomendações a seguir:

- Aplicar os dados de densidade e porosidade na caracterização dos leitos fixos de partículas quando da avaliação dos mecanismos de transferência de massa envolvidos nos processos de extração;
- Caracterizar mais abrangentemente os extratos proteicos obtidos da casca e semente de pitomba, explorando outros parâmetros importantes, como solubilidade, digestibilidade e toxicidade *in vivo*;
- Avaliar possibilidade de concentrar ou isolar proteína de pitomba através de técnicas complementares, a exemplo do processo de filtração por membrana;
- Verificar de maneira interdisciplinar, junto a grupos de estudos agrônômicos, a sondagem e prática de melhoramento genético na espécie *Talisia esculenta*;
- Realizar a avaliação de custo das etapas envolvidos nos processos de recuperação dos compostos de alto valor agregado, a fim de avaliar financeiramente a montagem de uma biorrefinaria com produtos de pitomba;
- Desenvolver *scale-up* e montar as linhas de processo da biorrefinaria com base na gama de estudos desenvolvidos com o fruto e processos industriais atualmente existentes com outras sapindáceas (ver Apêndice D).

REFERÊNCIAS

AHLUWALIA, S. et al. Optimization of protein extraction from detoxified *Jatropha* seed cake using response surface methodology and amino acid analysis. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 1087–1100, 1 fev. 2020.

ALIAÑO-GONZÁLEZ, M. J. et al. Extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) using an experimental design methodology. part 1: Pressurized liquid extraction. **Agronomy**, v. 10, n. 2, 28 jan. 2020.

ALMEIDA, V. M. et al. Encephalopathy caused by *Talisia esculenta* intoxication in pregnant ewes and their newborn lambs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 6, p. 1128–1132, 1 nov. 2021.

ÁLVAREZ-VIÑAS, M. et al. Subcritical Water for the Extraction and Hydrolysis of Protein and Other Fractions in Biorefineries from Agro-food Wastes and Algae: a Review. 1947.

ALVES, J. DOS S. et al. Simultaneous extraction of oil and bioactive compounds from pecan nut using pressurized solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 153, 1 nov. 2019.

ANASTÁCIO, E.; BICCA DODE, M. E.; GHELLER, S. M. M. HÄDRICH, G.; DORA, C. L.; VARELA JUNIO, A. S. Potencial Zeta de nanoestruturas de LDL sobre a motilidade e integridade de membrana de espermatozoides criopreservados. **XXI Encontro de Pós-Graduação**. 5ª Semana Integrada – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 4 p., 2013.

ANDRADE, R. A. Farming rambutan. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 79–85, 1 jan. 2014.

ARIAS, J. et al. Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO₂ after steam distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 146, 1 abr. 2020.

BALLESTEROS-VIVAS, D. et al. A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, in vitro assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 2: Characterization of bioactive compounds from goldenberry (*Physalis peruviana* L.) calyx extracts using hyphenated techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1584, p. 144–154, 11 jan. 2019.

BARATA MATEUS, N.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

BATTISTELLA LASTA, H. F. et al. Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 1 set. 2019.

BEDIN, S. Extração de proteína do farelo de arroz: processo alcalino, por ultrassom e micro-ondas. **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 147 p., 2018.

BEDIN, S. et al. Implication of microwaves on the extraction process of rice bran protein. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 4, p. 1653–1665, 2019.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of “antioxidant power”: the frap assay analytical biochemistry. **Analytical Biochemistry**, n. 239, p. 70-76, 1996.

BERTOCCO JÚNIOR, F. D. et al. Efeitos de diferentes técnicas extrativas na obtenção da β -ecdisona proveniente de *Pfaffia glomerata*: um estudo de revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e24610414147, 9 abr. 2021.

BIANCONI, F. Z. Estudo preliminar da viabilidade de extração da proteína de soja para a eletrofiliação. **Monografia (graduação)** – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Departamento de Engenharia de Materiais. Curso de Engenharia de Alimentos. Londrina, PR, 48 p., 2021.

BIAZZI, E. O maravilhoso poder das plantas. – 22. Edição ampliada e atualizada. – Tatuí, SP: Casa Publicadora Brasileira, 2014.

BONDAM, A. F. et al. Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 maio 2022.

BORA, P. S.; RIBEIRO, D. Note: Influence of pH on the extraction yield and functional properties of macadamia (*macadamia integrifolia*) protein isolates. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 4, p. 263–267, ago. 2004.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. DE. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1^o ed. Curitiba: Appris, 2015.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 26 fev. 2009.

BUERKI, S. et al. An updated infra-familial classification of Sapindaceae based on targeted enrichment data. **American Journal of Botany**, v. 108, n. 7, p. 1234–1251, 1 jul. 2021.

CAIADO, M.; DUARTE, R. Perspetivas futuras para a sustentabilidade alimentar novas fontes de proteína na alimentação dos portugueses. **Tese (Mestrado)**. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa. Porto, 2018.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices - Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls. **AnalystRoyal Society of Chemistry**, 2001.

CAMPOS NUNES, A. Rádio de galena: das linhas invisíveis de faraday às ondas eletromagnéticas. **Monografia (graduação)** - Universidade Federal do Pampa. Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia. Itaquí, 33 p., 2023.

CAÑADAS, R. et al. Overview of neoteric solvents as extractants in food industry: A focus on phenolic compounds separation from liquid streams. **Food Research International**, Elsevier Ltd, , 1 out. 2020.

CASTRO, D. S. Extração e utilização do amido do endocarpo da pitomba na elaboração de catchup e no desenvolvimento de revestimentos comestíveis. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Campina Grande. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Centro de Tecnologia e Recursos Naturais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. Campina Grande, PB, 134 p., 2019.

CHANG, K.; JIANG, W.; LIU, J. Effect of subcritical water treatment on the structure and foaming properties of egg white protein. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 1 mar. 2022a.

CHANG, K.; JIANG, W.; LIU, J. Effect of subcritical water treatment on the structure and foaming properties of egg white protein. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 1 mar. 2022b.

CHENG, M. et al. Comparison of microwave, ultrasound and ultrasound-microwave assisted solvent extraction methods on phenolic profile and antioxidant activity of extracts from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp. **LWT**, v. 173, 1 jan. 2023.

CHIBA, M. L.; BARAÑANO, A. G. The Potential Scenario for the Biodiesel Production Chain in Espírito Santo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, 2016a.

CHIBA, M. L.; BARAÑANO, A. G. The Potential Scenario for the Biodiesel Production Chain in Espírito Santo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, 2016b.

CLÍMACO, G. N. Otimização da Extração de Compostos Bioativos da Beterraba por Metodologia de Superfície de Resposta e Método de Bootstrap. **Dissertação (mestrado)** Universidade Estadual De Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento do Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia De Alimentos. Maringá, 43 p. 2019.

CORSINO, J. **Bioquímica**. Ed. UFMS, Campo Grande, MS, 213 p., 2009.

COUTRIM, R. L.; NASCIMENTO, J. S.; SANTOS, F. O.; JOSÉ, A. R. Caracterização físico-químico de frutos de rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). **IX SEAGRUS Semana de Agronomia da UESB**. Inovações tecnológicas e suas contribuições para uma agropecuária sustentável. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2019.

DA SILVA, J.; DE BRITO, E. S.; FERREIRA, S. R. S. Biorefinery of Cashew By-Products: Recovery of Value-Added Compounds. **Food and Bioprocess Technology Springer**, 1 maio 2022.

DANTAS, L. V. B. et al. Avaliação fitoquímica, quantificação de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante e antiacetilcolinesterase do extrato etanólico da *Talisia esculenta* (pitomba). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 60597–60602, 2020.

DE CASTRO, D. S. et al. Isolation and characterization of starch from pitomba endocarp. **Food Research International**, v. 124, p. 181–187, 1 out. 2019.

DE JESUS, N.; MARTINS, A. B. G. BARBOSA, J. C. Desenvolvimento de frutos de longan (*Dimocarpus longan* Lour) na região de Jaboticabal-SP. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal-SP, v. 30, n. 1, p. 159-164, mar. 2008.

DE SOUZA, M. P. et al. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS. **Food Research International**, v. 83, p. 87–94, 1 maio 2016.

DEBIEN, I. C. N. et al. Pressurized Liquid Extraction as a Promising and Economically Feasible Technique for Obtaining Beta-Ecdysone-Rich Extracts from Brazilian Ginseng (*Pfaffia glomerata*) Roots. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 50, n. 11, p. 1647–1657, 24 jul. 2015.

DOS SANTOS, S. et al. Extração de lípidios: método soxhlet. **XX Seminário interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão**. Fundação Universidade de Cruz Alta. Cruz Alta, RS, 2015.

ÉDER-SILVA, E. et al. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal-SP, v. 29, n. 1, p. 110-114, abr. 2007.

ÉDER-SILVA, E.; ARAÚJO, D. R. Qualidade fisiológica, aspectos morfométricos e número de cromossomos da espécie *Talisia esculenta* Radlk. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n.3, p. 275-282, jul-set, 2014.

ENIS, A.; MACHADO, V. Cultivo integrado do cogumelo *Pleurotus ostreatus* e tomate (*Solanum lycopersicum*). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Tocantins Campus Universitário de Gurupi Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Gurupi – TO, 2019.

FERNANDES DE SOUZA, C. J. Formação de complexos coacervados a partir das proteínas da clara de ovo e polissacarídeos. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ, 162 p., 2015.

FERREIRA, D. F. Processos verdes de extração de produtos naturais de materiais vegetais com ultrassom e micro-ondas. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Santa Maria, RS. 116 p., 2020.

FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C. Colorimetria-princípios e aplicações na agricultura. 2014.

FERREIRA, B. L. Extração de compostos bioativos do resíduo do processamento da goiaba (*Psidium guajava*) utilizando líquidos iônicos. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, 125 p., 2022.

FREIRE, M. G. M. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 275–280, 2003.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGO, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. 2002. **Plant Physiol. Biochem.** n. 40 p. 61–68, 2002.

FOOD INGREDIENTES BRASIL, Dossiê antioxidantes, **Revista Food ingredientes Brasil**, nº6, 2009.

FRAGA, L. N. Compostos bioativos, capacidade antioxidante e citotoxicidade da casca e polpa da pitomba (*Talisia esculenta* (st. hil.) raldk). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Sergipe. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição. São Cristóvão/Se, 131 p. 2018.

FUENTES, J. A. M. et al. Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 398, 11 fev. 2021.

GARCÍA, P. et al. Recovery of Bioactive Compounds from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Using Pressurized Liquid Extraction. **Foods**, v. 10, n. 203, 2021.

GEOVANNA, L.; GONÇALVES, F. Avaliação do perfil de diferentes grupos alimentares em relação ao consumo de micélios de fungos como proteína alternativa. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico.

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Curso de engenharia de alimentos. Florianópolis, 2023.

GHANI, M. A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry Elsevier Ltd**, 1 set. 2017.

GHIZI SOUZA, M. et al. Marcadores de dano oxidativo na doença de Fabry. **Ciência em Movimento – Biociências e saúde**, v. 23, n. 47, dez. 2021.

GRANATO, D. et al. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry Elsevier B.V.**, , 1 jun. 2016.

GUARIM NETO, G.; RODRIGUES SANTANA, S.; VALDETE BEZERRA DA SILVA, J. Repertório botânico da “pitombeira” (*talisia esculenta* (a. St.-hil.) Radlk.-sapindaceae). **Acta Amazonica**, v.33, n.2, p. 237-242, fev. 2003.

GUEBOUDJI, Z. et al. Maceration and liquid–liquid extractions of phenolic compounds and antioxidants from Algerian olive oil mill wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 2, p. 3432–3439, 1 jan. 2023.

GULLÓN, B.; GAGAOUA, M.; BARBA, F. J.; GULLÓN, P. ZHANG, W.; LORENZO, J. M. Seaweeds as promising resource of bioactive compounds: overview of novel extraction strategies and design of tailored meat products. **Trends in Food Science & Technology**, n. 100, p. 1-18, 31 mar. 2020.

HERBST, G. et al. Pressurized liquid extraction of brewer’s spent grain: Kinetics and crude extracts characterization. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 102, p. 370–383, 25 out. 2021.

HO, K. Y. et al. 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.

HONG, C.; HAIYUN, W. Optimization of volatile fatty acid production with co-substrate of food wastes and dewatered excess sludge using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5487–5493, 2010.

IBRAHIM, A. P.; OMILAKIN, R. O.; BETIKU, E. Optimization of microwave-assisted solvent extraction of non-edible sandbax (*Hura crepitans*) seed oil: A potential biodiesel feedstock. **Renewable Energy**, v. 141, p. 349–358, 1 out. 2019.

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. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Porto Alegre, 158 p., 2005.

JARPA-PARRA, M. et al. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. **LWT**, v. 57, n. 2, p. 461–469, 2014.

JONES, A. et al. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 967, p. 93–101, 15 maio 2017.

KUHNEN, S. et al. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 284–290, jul. 2009.

KURAM, E. et al. Optimization of cutting fluids and cutting parameters during end milling by using D-optimal design of experiments. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 159–166, 2013.

LA NASA, J. et al. Microwave-assisted solvent extraction and double-shot analytical pyrolysis for the quali-quantitation of plasticizers and microplastics in beach sand samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, 5 jan. 2021.

LACLAIR, C. E.; ETZEL, M. R. Turbidity and protein aggregation in whey protein beverages. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, set. 2009.

LAIZO, W. et al. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Effect of the Aqueous Extracts of the Seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on Fall Armyworm. **Braz. arch. biol. technol.** v, v. 51, n. 2, p. 373–383, [s.d.].

LIANG, R.; HU, Y.; LI, G. Monodisperse pillar[5]arene-based polymeric sub-microsphere for on-line extraction coupling with high-performance liquid chromatography to determine antioxidants in the migration of food contact materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1625, 16 ago. 2020.

LIBERATO, M. C. T. C.; OLIVEIRA, M. S. C. **Bioquímica**. Editora da Universidade Estadual do Ceará – EdUECE. Fortaleza, 205 p. 2019.

LIGIA, M. et al. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta** n. 1571, p. 83-88, 2002.

LIMA, D. M.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B; FARFÁN, J. A.; NONATO, C. V.; LIMA, M. T. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO 4 Edição Ampliada e Revisada** Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2011.

LIMA, K. V. L. Extração por micro-ondas: uma alternativa para extração de fitoquímicos. **Monografia (Graduação)** – Universidade Federal do Maranhão, Curso de Química. São Luís, 40 p., 2015.

LIMA, S. S. Obtenção de extratos de casca, polpa e semente da pitomba (*Talisia esculenta*). **Monografia (graduação)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Departamento Acadêmico de Alimentos. Curso de Engenharia de Alimentos. Campo Mourão, PR, 36 p., 2019.

LIU, Y. F. et al. Effects of pH, temperature and pulsed electric fields on the turbidity and protein aggregation of ovomucin-depleted egg white. **Food Research International**, v. 91, p. 161–170, 1 jan. 2017.

MACEDO, M. L. R. et al. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 24–33, 2011.

MACEDO, M. L. R.; DE CASTRO, M. M.; FREIRE, M. D. G. M. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* Lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 56, n. 2, p. 84–96, jun. 2004.

MACHADO, A. P. F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J. L.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 3 jan. 2015.

MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Microwave Assisted Extraction-An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, jan-may, 2007.

MARADINI FILHO, A. M.; MENDONÇA, L. O.; MENDITI, N. DA S. Aproveitamento de resíduos agroindustriais na alimentação humana. Em: **Ciência e Tecnologia dos Alimentos–Volume 7**. [s.l.] Editora Poisson, 2020.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 792–799, 1 jan. 2016.

MARKL, D. et al. Characterisation of pore structures of pharmaceutical tablets: A review. **International Journal of Pharmaceutics Elsevier B.V.**, 1 mar. 2018.

MARTINS, D.; MARTINS, R. C.; BRAGA, M. E. M. Biocompounds recovery from olive mill wastewater by liquid-liquid extraction and integration with Fenton's process for water reuse. **Environmental Science and Pollution Research Springer**, n. 28, p. 29521–29534, 2021.

MARTINS, M. J.; NEVES, I. V. Propagação e radiação de ondas eletromagnéticas. Escola de Engenharia. Editora LIDEL, 28 p.

MAYER, F. P. Metodologia de Superfície de Resposta – Introdução. Disciplina de Controle de Processos Industriais. Curso de Estatística. Laboratório de Estatística e Geoinformação. Universidade Federal do Paraná – UFPR, 2017. Disponível em: <http://leg.ufpr.br/~fernandomayer/aulas/ce074/msr.html>. Acesso em: 05/07/2023.

MAZZUTTI, S. et al. Intensified aqueous-based processes to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 64–71, 1 jan. 2017.

MENEZES, V. G. Efeito do ácido protocatecuico sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal. Petrolina, 81 p., 2017.

MESQUITA, M. S. Potencial de migração de antioxidantes de embalagem de polietileno para os alimentos e a relação com a saúde humana: uma revisão sistemática. **Tese (doutorado)** – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 207 p., 2021.

MITRA, M.; MISHRA, S. Multiproduct biorefinery from *Arthrospira* spp. towards zero waste: Current status and future trends. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, 3 out. 2011.

NAIK, M. et al. Pulsed ultrasound assisted extraction of protein from defatted Bitter melon seeds (*Momordica charantia* L.) meal: Kinetics and quality measurements. **LWT**, v. 155, 1 fev. 2022.

NASCIMENTO FRAGA, L. et al. Mass spectrometry characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity of the peel and pulp extracts of Pitomba. **Food Chemistry**, v. 340, 15 mar. 2021.

NASCIMENTO, P. A.; ALVES, A. N.; BONOMO, R. C. F. Processos de separação e purificação de proteínas de origem vegetal: uma revisão. Rev. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 5**. Editora Científica Digital, 2021. p. 335–351.

NERI-NUMA, I. A. et al. Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*). **LWT**, v. 59, n. 2P2, p. 1233–1238, 2014.

OCHOA-RIVAS, A. et al. Microwave and Ultrasound to Enhance Protein Extraction from Peanut Flour under Alkaline Conditions: Effects in Yield and Functional Properties of Protein Isolates. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 3, p. 543–555, 1 mar. 2017.

OLDONI, T. L. C. et al. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306–312, 14 jul. 2016.

OLIVEIRA, E. B. Avaliação das atividades biológicas de compostos fenólicos: naturais (cumarina) e derivados comerciais (3-hidroxycumarina e 4-hidroxycumarina). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 123 p. 2016.

OLIVEIRA, P. S. et al. Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 5, p. 1551–1562, 1 out. 2018.

OLIVEIRA, R. J. C. Estudo comparativo do potencial anti-inflamatório e antioxidante da cianidina-3-glucósido e do ácido protocatecuico em células intestinais. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Departamento de Ciências da Vida. Coimbra, 80 p., 2014.

ONG, E. S.; CHEONG, J. S. H.; GOH, D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. **Journal of Chromatography A**, 21 abr. 2006.

OU, S. et al. An improved method to determine SH and -S-S- group content in soymilk protein. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 317–320, nov. 2004.

PAN, Y. et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan Lour.*) peel. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1264–1270, 1 fev. 2008.

PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Current Opinion in Food Science** Elsevier Ltd, , 1 out. 2018.

PANYATHEP, A. et al. Antioxidant and anti-matrix metalloproteinases activities of dried longan (*Euphoria longana*) seed extract. **ScienceAsia**, v. 39, n. 1, p. 12–18, 2013.

PAVEZ, I. C. et al. Obtaining an extract rich in phenolic compounds from olive pomace by pressurized liquid extraction. **Molecules**, v. 24, n. 17, 27 ago. 2019.

PAWLISZYN, J. **Sample preparation: Quo vadis?** **Analytical Chemistry**, n. 75, p. 2543-2558, 1 jun. 2003.

PERÁZIO, B. A. A. Efeitos dos pontos axiais e centrais sobre a eficiência do delineamento composto central. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria. Viçosa, MG, 68 p., 2010.

PEREIRA, L. A. A família sapindaceae na floresta atlântica do nordeste oriental. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Recife, 127 p., 2014.

PESSOA, A. S. et al. Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 101, p. 95–103, 2015.

PHONGTHAI, S.; LIM, S. T.; RAWDKUEN, S. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 146–154, 1 jul. 2016.

PIRES RIBEIRO, F.; ROBERTA MALACRIDA, C. A biodiversidade brasileira como fonte de proteínas alternativas: produzindo carne a partir das plantas. **Aprendendo Ciência**, v. 11, n. 1, p. 33–37, 2022.

POCINHO, M. O livro que explica a estatística que precisa em 13 aulas IBM-SPSS & Excel ESTeSC View project Psicometria View project. 2014.

QUEIROGA A. X. M. Caracterização física, química e funcional dos frutos da pitombeira (*talisia esculenta*). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar. Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais. Pombal, PB, 36 p., 2015.

QUEIROGA, A. X. M. DE et al. Physical, Chemical-Physical Characterization and Determination of Bioactives Compounds of the Pimtoqueira Fruits (*Talisia esculenta*). **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 1, p. 303, 15 dez. 2018.

RAFIEE, Z. et al. microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. **j. anim. plant sci.** n. 21, p. 738-745, 2011.

REIS SILVA, M. I. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.6, set. n. 6, p. 1790–1793, 2008.

RIET-CORREA, F. et al. Poisoning by *Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk in sheep and cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 3, p. 412–417, 2014.

RIET-CORREA, F. et al. Toxic plants affecting the nervous system of ruminants and horses in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1357–1368, 1 dez. 2017.

RODRIGUES, L. G. G. et al. Subcritical water extraction and microwave-assisted extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, 1 nov. 2020a.

RODRIGUES, L. G. G. et al. Subcritical water extraction and microwave-assisted extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, 1 nov. 2020b.

ROSSI, Y. E. et al. Polyphenols of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin as bioprotectors of normal cells. Studies of cytotoxicity, cytoprotection and interaction with ROS. **Journal of Functional Foods**, v. 67, 1 abr. 2020.

RUDKE, A. R. et al. Optimization of green PLE method applied for the recovery of antioxidant compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) shell. **Food Chemistry**, v. 298, 15 nov. 2019.

RUDKE, C. R. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. From Biorefinery to Food Product Design: Peach (*Prunus persica*) By-Products Deserve Attention. **Food and Bioprocess Technology Springer**, 1 jun. 2023.

SAMPAIO, N. A. S.; DANELON, M. C. T. M. Aplicações da Estatística nas Ciências. Associação Educacional Dom Bosco. Coordenação de Pós-Graduação Lato-Senso em Educação Matemática – Universidade Estadual Paulista. 2015.

SANTOS, L. G. Método de difusão radial: validação e otimização do processo de extração para doseamento de taninos de espécies medicinais da Caatinga. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 80 p., 2012.

SANTOS, N. C. et al. Modelagem matemática aplicada a cinética de secagem das cascas de pitomba (*Talisia esculenta*). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. e46921986, 1 jan. 2020.

SANTOS, R. K. S. Utilização de água subcrítica e métodos convencionais de extração para a valorização de resíduos do processamento de graviola (*Annona muricata*). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Tecnologia e Geociências. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Recife, 87 p. 2018.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125-131, 6 ago. 2015.

SENA, L. H. M. Conservação de sementes e produção de mudas de pitombeira. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Ciência Florestal. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais Recife, 124 p., 2014.

SHAHIDI, F. Bailey's industrial oil and fat products. – 6th ed./edited by Fereidoon Shahidi. Bailey, Alton Edward, 1907-1953.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods** Elsevier Ltd, 1 out. 2015.

SILVA, F. DE A.; CORDEIRO BIZERRA, A. M.; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L. (urucum). **HOLOS**, v. 2, p. 484–498, 11 jun. 2018.

SILVA, G. M. DA et al. Obtenção de farinhas das cascas de cupuaçu e pitomba: análise bromatológica e fitoquímica. Em: **Extensão Rural: Práticas e Pesquisas Para o Fortalecimento da Agricultura Familiar - Volume 1**. Editora Científica Digital, 2021. p. 431–449.

SILVA, R. P. M. Correlação entre a distribuição dos derivados do ácido protocatecuico e a sua eficácia no combate à oxidação lipídica. Universidade de Vigo. Escola de Engenharia. Universidade do Minho. Universidade do Porto. Faculdade de Ciências. Departamento de Química e Bioquímica. Tecnologia e Ciência Alimentar. 2016.

SILVEIRA, A. L. C. Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia. **Dissertação (mestrado)**. Instituto Politécnico de Castelo Branco. Escola Superior Agrária. Programa de Inovação e Qualidade Alimentar. Castelo Branco, Portugal, 2013.

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

SIQUEIRA, K. B. Novas tendências guiam o mercado de alimentos. Mercado & Negócios. **Agroanalysis**. Jul – 2022.

SOBERÓN, L. F. et al. Method for phenol recovery from “alperujo”: numerical optimization and predictive model. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 8, p. 1641–1650, 1 ago. 2019.

SOUZA, M. P. Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos mari-mari (*Cassia leiandrai*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*). **Tese (doutorado)** - Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Exatas e da Terra. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Manaus, 129 p., 2016.

SOUZA, P. S. Extração de compostos bioativos de cascas e sementes de pitomba (*talasia esculenta*) utilizando solventes eutéticos. **Monografia (graduação)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Engenharia de Alimentos. Campo Mourão, PR. 45 p., 2022.

SORITA, G. D. Biorrefino do subproduto do processamento do amendoim (*Arachis hypogea* L.) para a recuperação de compostos de alto valor agregado. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 188 p., 2021.

SORITA, G. D.; LEIMANN, F. V.; FERREIRA, S. R. S. Phenolic Fraction from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) By-product: Innovative Extraction Techniques and New Encapsulation Trends for Its Valorization. **Food and Bioprocess Technology** Springer, , 1 abr. 2023.

SVIECH, F. Influência da composição no processo de congelamento de pitanga (*eugenia uniflora* l.) E araçá (*psidium cattleianum*). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 116 p. 2021.

TAAMALLI, A. et al. Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 791–798, 25 jan. 2012.

TEO, C. C. et al. Pressurized hot water extraction (PHWE). **Journal of Chromatography A**, abr. 2010.

TESSARINI, S.; PEREIRA, J. E.; PEREIRA, R. M. S. Ora-Pro-Nóbis: Ampliando os Conhecimentos de sua Utilização na Alimentação a Partir da Educação Alimentar e Nutricional (EAN). **Revista de Ensino, Educação e Ciências Humanas**, v. 22, n. 3, p. 317–324, 30 set. 2021.

THEERAKULKAIT, C.; CHAISERI, S.; MONGKOLKANCHANASIRI, S. Extraction and Some Functional Properties of Protein Extract from Rice Bran. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, n. 40, p. 209-214, 2006.

TORRES, T. M. S. Biorefinery of ora-pro-nobis leaves for the recovery of neuroprotective, antioxidante and protein fractions. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 227 p., 2021.

TORRES, T. M. S. et al. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, 1 jan. 2021.

TORRES, T. M. S. et al. Phenolic compounds recovered from ora-pro-nobis leaves by microwave assisted extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2022a.

TORRES, T. M. S. et al. **Phenolic compounds recovered from ora-pro-nobis leaves by microwave assisted extraction. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2022b.

TORRES, T. M. S. et al. Protein valorization from ora-pro-nobis leaves by compressed fluids biorefinery extractions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 76, 1 mar. 2022c.

TURELLA, C. C. B. Desenvolvimento e avaliação de filmes incorporados de extratos naturais e determinação da oxidação em filés de tilápia. **Tese (doutorado)**. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia, 101 p. 2019.

URSULINO ALVES, B. et al. Germinação e vigor de sementes de *Talisia esculenta* (St. Hil) Radlk em função de diferentes períodos de fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, out-dez/2009.

URSULINO ALVES, E. et al. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Talisia esculenta* (A. St. Hil) Radlk em função de profundidades e posições de semeadura. **Article Biosci. J.**, v. 29, n.2, p. 328-339, Mar./Apr. 2013.

VARDANEGA, R. et al. Obtaining prebiotic carbohydrates and beta-ecdysone from Brazilian ginseng by subcritical water extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 42, p. 73–82, 1 ago. 2017.

VERSLYPE, N. I.; CALDAS, R. M. M.; MACHADO, J. Potential for lychee crop in Mata Norte Pernambucana - Brazil. **Revista Geama**, v.2, n.3, jul-set. 2016.

VIEIRA, F. A.; GUSMÃO, E. Biometria, armazenamento de sementes e emergência de plântulas de *Talisia esculenta* radlk. (sapindaceae). **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v. 32, n.4, p. 1073-1079, jul./ago., 2008.

VILELA, K. S. F. R. Metodologias para o ensino de física das radiações. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Ouro Preto, MG, 23 p., 2015.

VIGANÓ, J. et al. Techno-economic evaluation for recovering phenolic compounds from acai (*Euterpe oleracea*) by-product by pressurized liquid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, 1 jan. 2022.

VITÓRIA, A.; OLIVEIRA, D. E. Algas como fonte alternativa de proteínas e outros nutrientes para a alimentação humana: do cultivo à aplicação. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Medicina. Curso de Graduação em Nutrição. Uberlândia, 2022. [78 p.]

WALDEBÄCK, M. Pressurized Fluid Extraction: A Sustainable Technique with Added Values. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 107. **Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala**, 2005.

WANG, R. et al. Combination of pulsed electric field and pH shifting improves the solubility, emulsifying, foaming of commercial soy protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 134, 1 jan. 2023.

WEN, L. et al. Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques. [s.d.].

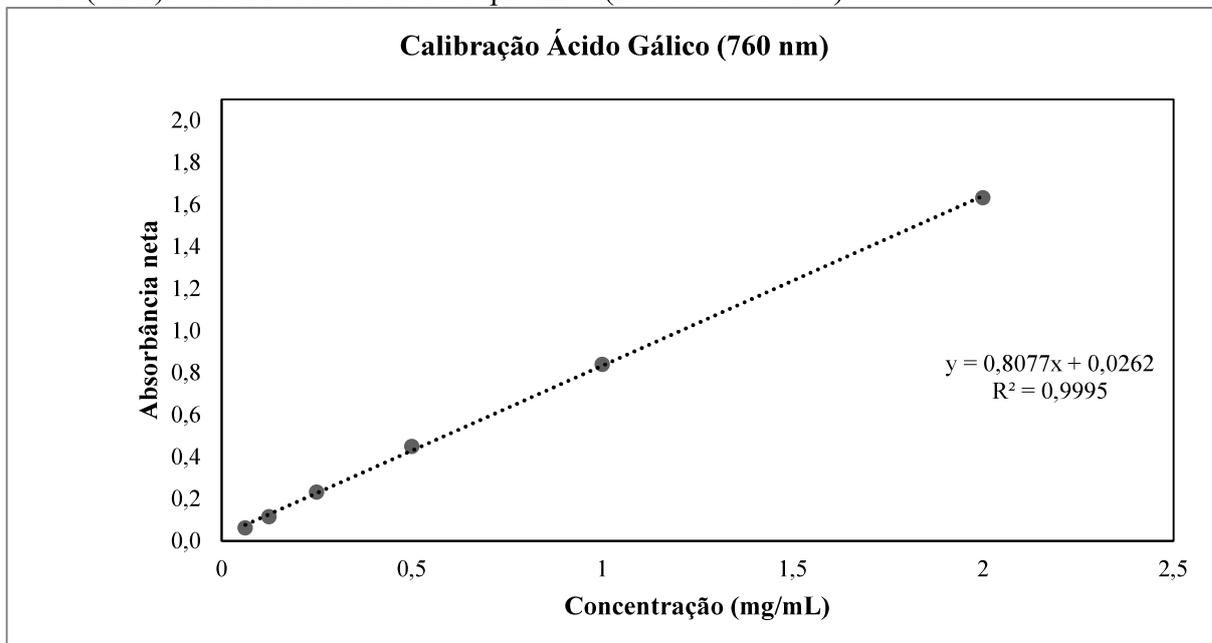
ZANDONÁ, G. P. Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades. **Tese (doutorado)** – Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia ‘Eliseu Maciel’. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Pelotas, RS, 105 p., 2021.

ZEKOVIĆ, Z. et al. Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery—Ultrasound versus microwave-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 49–59, 1 maio 2017.

ZHANG, J. et al. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2020.

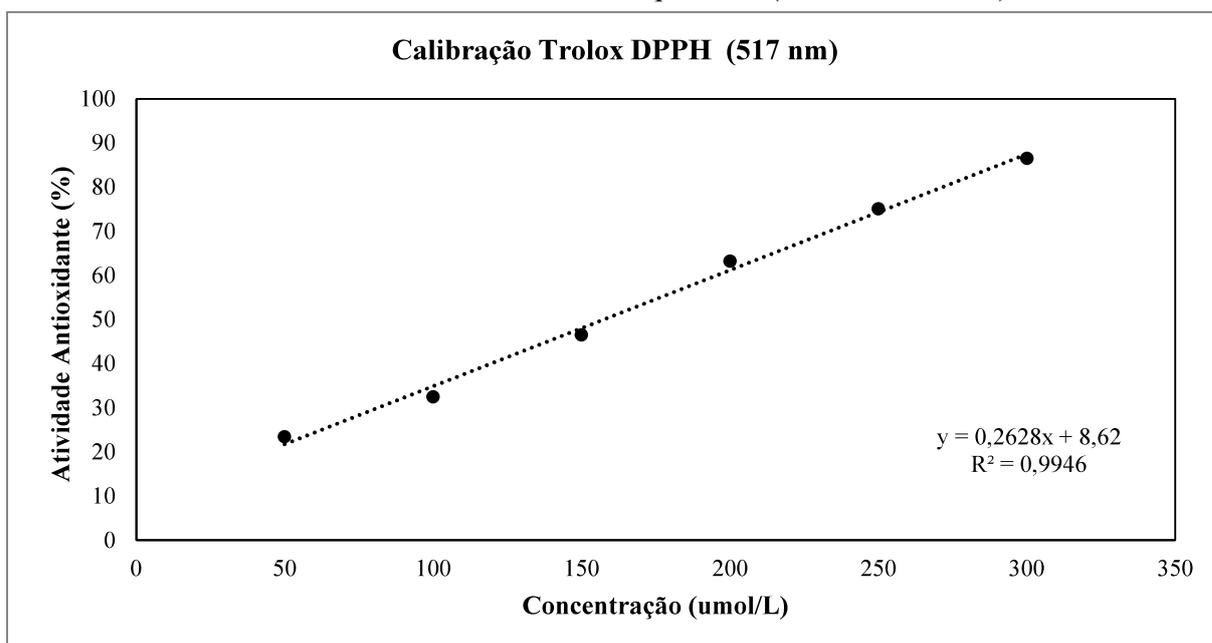
APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Figura 39 – Curva analítica de ácido gálico utilizada na quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*)



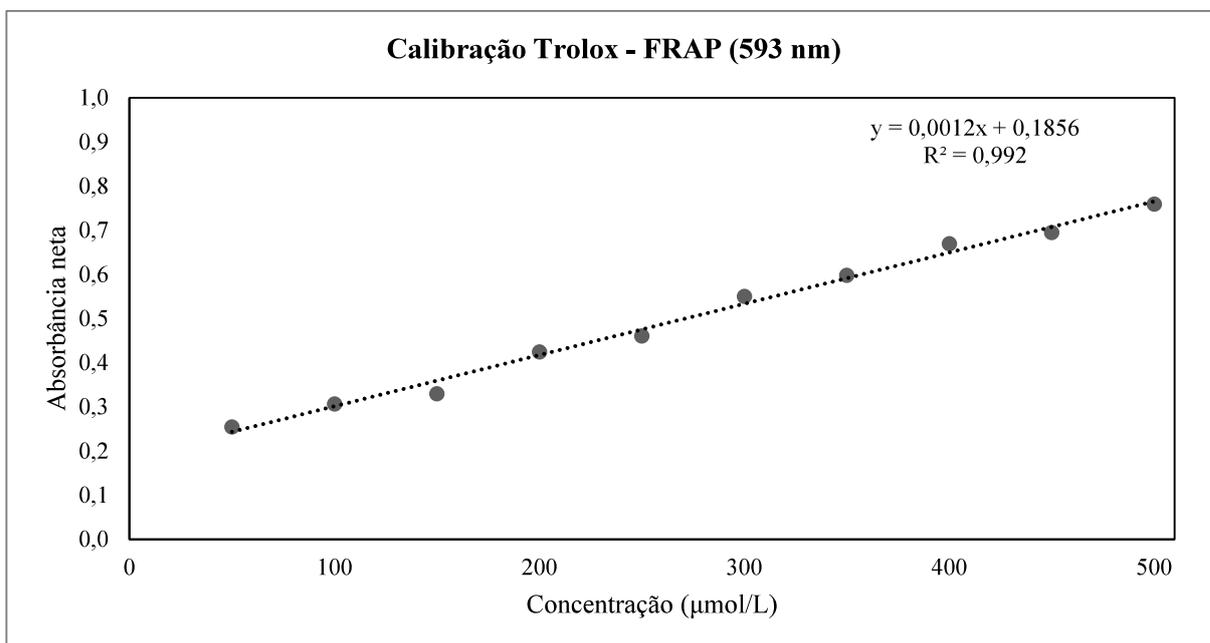
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 40 – Curva analítica de Trolox utilizada na mensuração da capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH dos extratos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*)



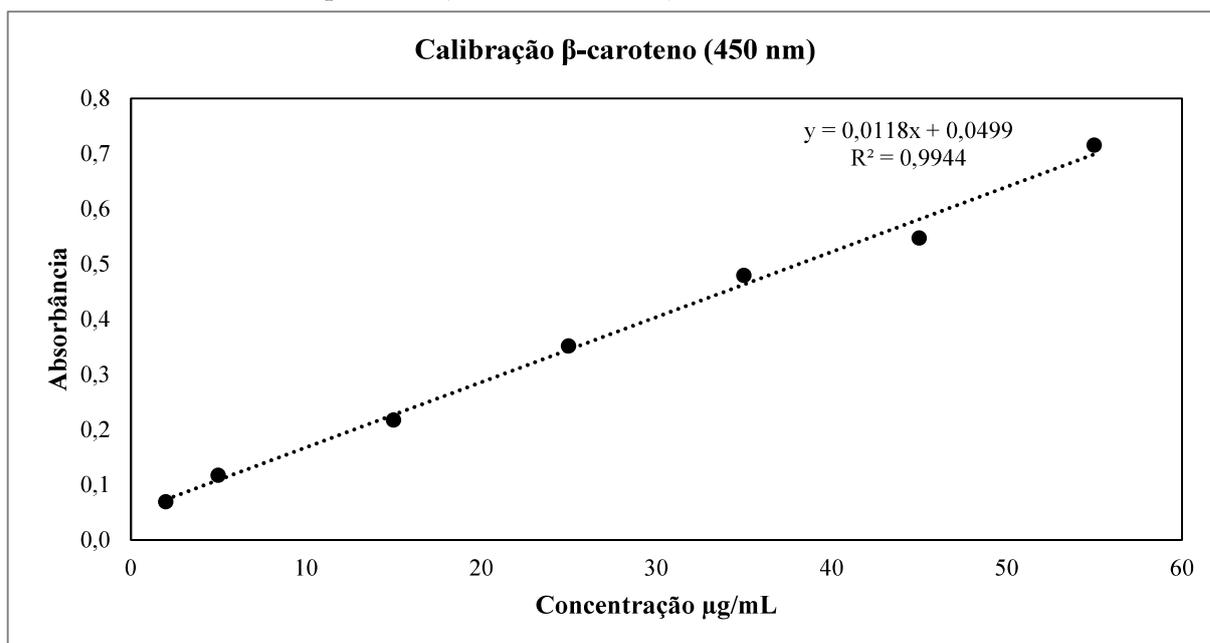
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 41 – Curva analítica de Trolox utilizada na mensuração da capacidade antioxidante pelo método de redução do íon férrico dos extratos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*)



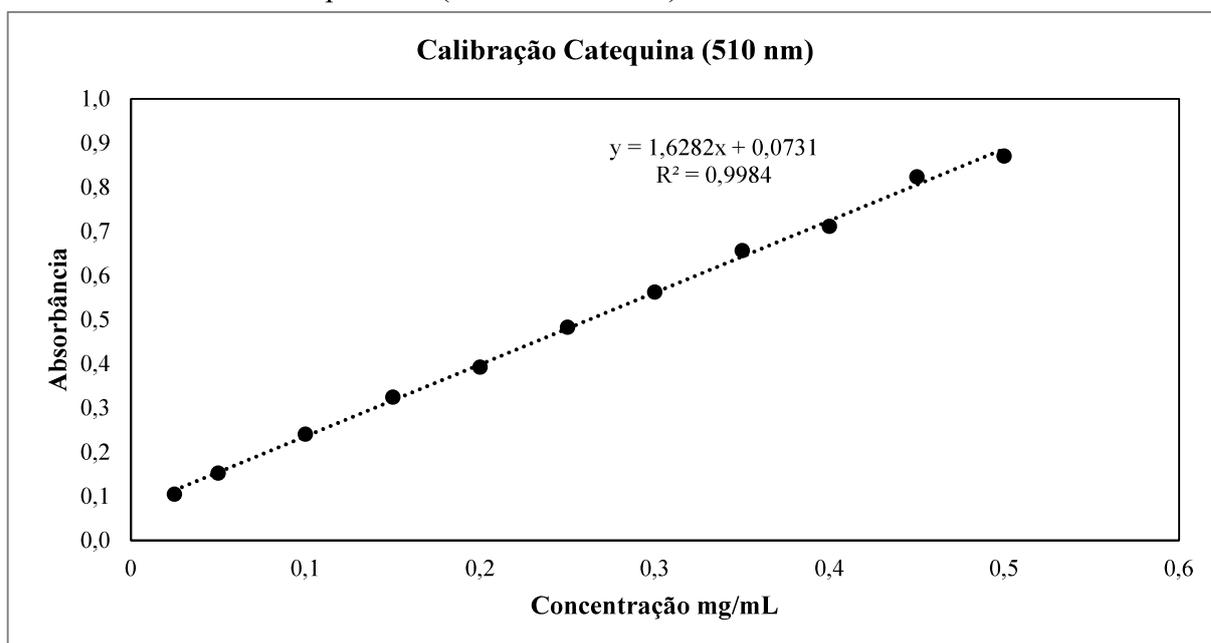
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 42 – Curva analítica de β -caroteno utilizada na quantificação de carotenoides totais (TCC) dos extratos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*)



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 43 – Curva analítica de catequina utilizada na quantificação de flavonoides totais (TFT) dos extratos da casca de pitomba (*Talisia esculenta*)



Fonte: elaborado pelo autor

APÊNDICE B – BALANÇO DE MASSA NO PRÉ-PROCESSAMENTO

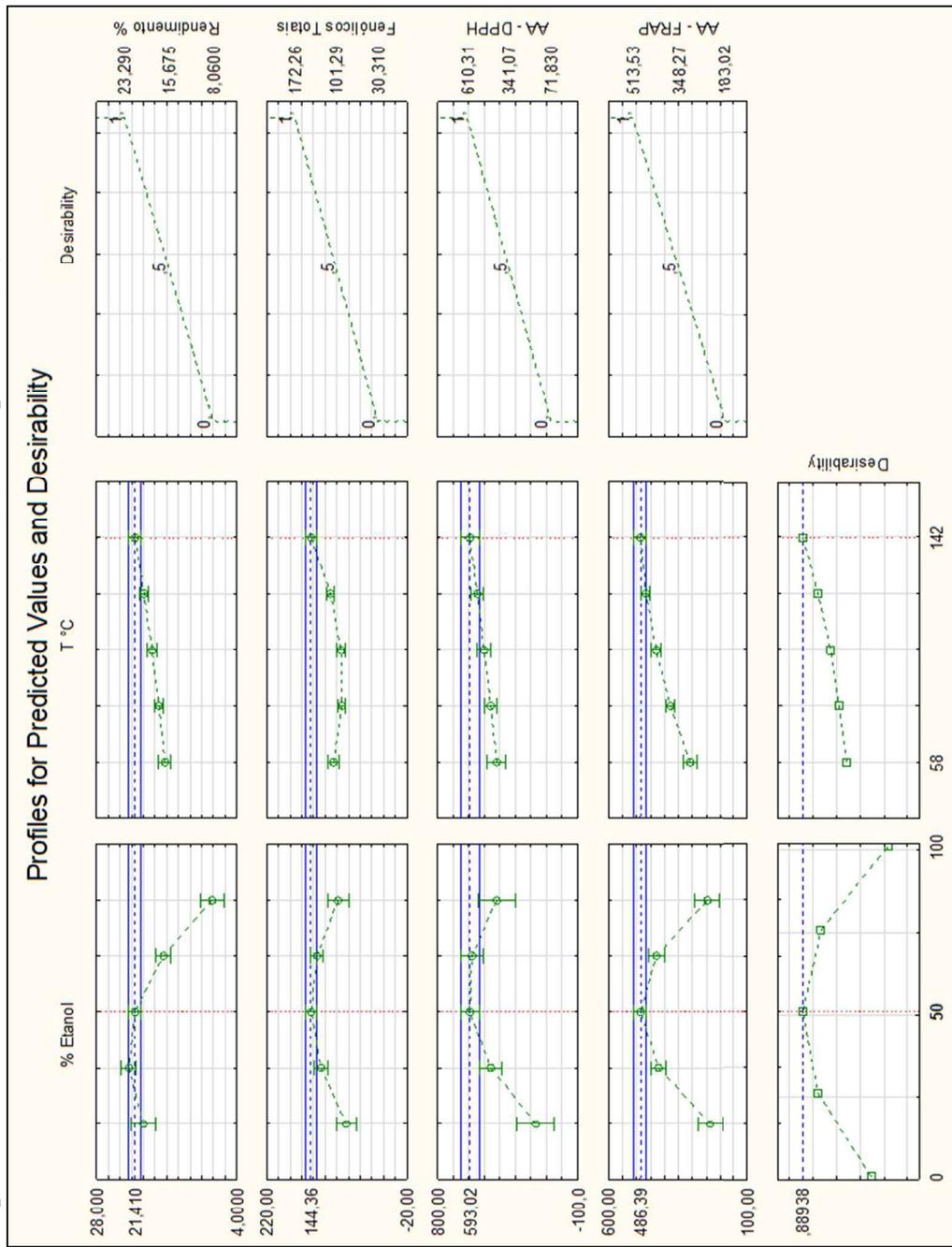
Tabela 23 – Distribuição gravimétrica - etapas de pré-processamento da matéria-prima

Partes do fruto e pré-processamento	massa (kg)	Proporção (%)
Quantidade do fruto inteiro	2,974	100,0
Perdas na separação	0,026	0,9
<u>Casca</u>	<u>1,074</u>	<u>36,4</u>
Casca após 1ª secagem (24h)	0,419	14,1
Casca, após moagem e 2ª secagem (24h)	0,325	10,9
Perdas na moagem	0,094	3,2
Casca – sólido seco	0,296	13,0
<u>Polpa</u>	<u>1,142</u>	<u>38,7</u>
Perdas na separação	0,241	8,1
Suco	0,596	20,0
Perdas por prensagem e evaporação	0,041	1,4
Polpa prensada	0,264	8,9
Polpa após secagens (96h)	0,084	2,8
Polpa após secagens e moagens	0,080	2,7
Perdas na moagem	0,004	0,1
Polpa – sólido seco	0,062	2,1
<u>Semente</u>	<u>0,732</u>	<u>24,8</u>
Semente após 1ª moagem	0,716	24,1
Semente após moagens e secagem (48h)	0,445	15,0
Perdas nas moagens	0,016	0,5
Semente – sólido seco	0,398	13,4
Umidade na casca	0,692	64,5
Umidade na polpa	0,919	80,5
Umidade na semente	0,325	44,4

Fonte: elaborado pelo autor

APÊNDICE C – GRÁFICOS DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE: PERFIS PARA VALOR PREVISTO E DESEJABILIDADE

Figura C1 – Gráfico da função desejabilidade, perfis para valor previsto e desejabilidade do rendimento (%), conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante determinadas pelos métodos DPPH e FRAP. Efeito dos fatores: etanol (%) e temperatura (°C) na MAE de *Talisia esculenta*.



Fonte: elaborado pelo autor, usando o *software em Software Statistic 13.5.0.17*.

título: Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005

ementa não oficial: Aprova o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA PRODUTOS PROTÉICOS DE ORIGEM VEGETAL".

publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005

órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

alcance do ato: federal - Brasil

área de atuação: Alimentos

relacionamento(s):

atos relacionados:

- [Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977](#)
- [Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965](#)
- [Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961](#)
- [Decreto nº 691, de 13 de março de 1962](#)
- [Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969](#)
- [Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988](#)
- [Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990 \(**Código de Defesa do Consumidor** \)](#)
- [Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993](#)
- [Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997](#)
- [Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998](#)
- [Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998 \(**Versão Republicada - 30.03.1998** \)](#)
- [Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999](#)
- [Resolução nº 386, de 05 de agosto de 1999](#)
- [Resolução nº 22, de 15 de março de 2000](#)
- [Resolução nº 23, de 15 de março de 2000](#)
- [Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001](#)
- [Resolução RDC nº 234, de 19 de agosto de 2002](#)
- [Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002](#)
- [Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002](#)
- [Lei nº 10674, de 16 de maio de 2003](#)
- [Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003](#)
- [Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003](#)
- [Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003](#)

revoga:

- [Resolução nº 14 de junho de 1978](#)
- [Resolução nº 15 de abril de 1978](#)



[Versão para impressão](#)



[Enviar por email](#)

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº. 268, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c do Art. 111, inciso I, alínea "b" § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº. 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 29, de agosto de 2005,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população;

considerando a necessidade de atualização da legislação sanitária de alimentos, com base no enfoque da avaliação de risco e da prevenção do dano à saúde da população;

considerando que os regulamentos técnicos da ANVISA de padrões de identidade e qualidade de alimentos devem priorizar os parâmetros sanitários;

considerando que o foco da ação de vigilância sanitária é a inspeção do processo de produção visando a qualidade do produto final;

adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA PRODUTOS PROTÉICOS DE ORIGEM VEGETAL", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 01(um) ano a contar da data da publicação deste Regulamento para adequarem seus produtos.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Revogam-se as disposições em contrário, em especial, a Resolução CNNPA nº. 14/78 e a Resolução CNNPA nº. 15/78.

Art. 5º Esta Resolução de Diretoria Colegiada entra em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO PARA PRODUTOS PROTÉICOS DE ORIGEM VEGETAL

1. ALCANCE

Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os Produtos Protéicos de Origem Vegetal.

2. DEFINIÇÃO

2.1. Produtos Protéicos de Origem Vegetal: são os alimentos obtidos a partir de partes protéicas de espécie(s) vegetal(is), podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas com exceção daquelas não convencionais para alimentos. Podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto.

2.2. Glúten de trigo: é o produto obtido do grão do trigo ou farinha de trigo pela separação dos constituintes não protéicos (amido e outros carboidratos).

3. DESIGNAÇÃO

Os produtos devem ser designados de "Proteína" ou "Extrato" ou "Farinha", conforme o teor protéico mínimo, ou "Glúten", seguido do(s) nome(s) comum(ns) da(s) espécie(s) vegetal(is) de origem. Na designação, pode(m) ser usada(s) expressão(ões) consagrada(s) pelo uso, processo de obtenção, forma de apresentação, finalidade de uso e ou característica específica. Quando adicionados de outro(s) ingrediente(s), o(s) mesmo(s) deve(m) fazer parte da designação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4.1. BRASIL. Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 abr. 1965. Seção 1.

4.2. BRASIL. Decreto - Lei nº. 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 out. 1969. Seção 1.

4.3. BRASIL. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção 1.

4.4. BRASIL. Lei nº. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 set. 1990. Suplemento.

4.5. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 1.428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 dez. 1993. Seção 1.

4.6. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 ago. 1997. Seção 1.

4.7. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jan. 1998. Seção 1.

4.8. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Seção 1.

4.9. BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 mai. 2004. Seção 1.

4.10. BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 386 de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 ago. 1999, Seção 1.

4.11. BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 22, de 15 de março de 2000. Procedimentos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 mar. 2000. Seção 1.

4.12. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 23, de 15 de março de 2000. Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 mar. 2000. Seção 1.

4.13. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

4.14. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 234, de 19 de agosto de 2002. Regulamento Técnico sobre aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas Funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 ago. 2002. Seção 1.

4.15. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2002. Seção 1.

4.16. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 nov. 2002. Seção 1.

4.17. BRASIL. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 mai. 2003. Seção 1.

4.18. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 175, de 08 de julho de 2003. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 jul. 2003. Seção 1.

4.19. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

4.20. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

4.21. CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex General Standard for vegetable protein products (VPP). CODEX STAN 174-1989. Codex Alimentarius, Roma, Itália, 4p.

4.22. CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex Standard for wheat protein products including wheat gluten. CODEX STAN 163-1987, rev. 1-2001. Codex Alimentarius, Roma, Itália, 4p.

5. REQUISITOS ESPECÍFICOS

5.1. Os produtos devem apresentar em sua composição os seguintes teores de proteína:

- Proteína texturizada de soja: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 50,0 % (g/100 g)

- Proteína concentrada de soja: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 68,0 % (g/100g)

- Proteína isolada de soja: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 88,0 % (g/100 g)
- Extrato de soja:
- pó: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 40,0 % (g/100 g)
- líquido: proteína (N x 6,25) - mínimo 3,0 % (g/100 g)
- Farinha de soja desengordurada: proteína b.s. (N x 6,25)- mínimo 45,0%(g/100 g)
- **Proteína hidrolisada vegetal: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 25,0 % (g/100 g)**
- Glúten de trigo: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 60,0 % (g/100 g)
- Outros produtos protéicos: proteína b.s. (N x 6,25) - mínimo 40,0 % (g/100 g)

b.s. = base seca

6. REQUISITOS GERAIS

6.1. Os produtos devem ser obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam e ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor. Deve ser obedecida a legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação.

6.2. Os produtos devem atender aos Regulamentos Técnicos específicos de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação; Contaminantes; Características Macroscópicas, Microscópicas e Microbiológicas; Rotulagem de Alimentos Embalados; Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados; Informação Nutricional Complementar, quando houver; e outras legislações pertinentes.

6.3. A utilização de ingrediente e proteína vegetal, que não são usados tradicionalmente como alimento, pode ser autorizada desde que seja comprovada a segurança de uso, em atendimento ao Regulamento Técnico específico.