



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PPGEAL – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos  
LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica

**TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA APLICADA À OBTENÇÃO DE  
EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DE  
CASCA DE JABUTICABA *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.  
Nome completo do Aluno: Gustavo Pies.  
Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira.  
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira.  
Coorientador: Prof. Dr. Jacir Dal Magro.

Florianópolis  
2017



Gustavo Pies

**TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA APLICADA À OBTENÇÃO DE  
EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DE  
CASCA DE JABUTICABA *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel**

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

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira.

Coorientador: Prof. Dr. Jacir Dal Magro.

Florianópolis  
2017

Pies, Gustavo

Tecnologia supercrítica aplicada à obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos a partir de casca de jabuticaba *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel / Gustavo Pies ; orientador, José Vladimir de Oliveira ; coorientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira , coorientador, Jacir Dal Magro. - Florianópolis, SC, 2017.

75 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

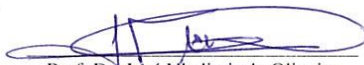
1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração Supercrítica. 3. Jabuticaba. 4. Fenólicos Totais. I. Oliveira, José Vladimir de . II. Ferreira , Sandra Regina Salvador. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA APLICADA À  
OBTENÇÃO DE EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS  
FENÓLICOS A PARTIR DA CASCA DE JABUTICABA  
*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel”**

Por

**Gustavo Pies**

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



Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

**Orientador**



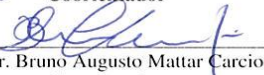
Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Coorientadora**



Prof. Dr. Jacir Dal Magro

**Coorientador**



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

**Coordenador**

**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. José Vladimir de

Oliveira



Profa. Dra. Eliane Maria Zandonai

Michielin



Prof. Dr. Haiko Hense



Dra. Kátia Suzana Andrade

**Florianópolis, 22 de fevereiro de 2017.**



*Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Miguel e Celeide, pelo dom da vida e apoio recebido.*





## AGRADECIMENTOS

À UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina e ao PPGEAL – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pelo suporte físico e acadêmico para a realização deste trabalho.

Ao LATESC, pela infraestrutura laboratorial disponibilizada.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira e aos meus coorientadores Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Salvador Ferreira e Prof. Dr. Jacir Dal Magro, pela confiança em mim depositada, pelas sugestões e conhecimentos compartilhados para a realização deste trabalho.

À acadêmica Aline Bohn, pela disponibilidade e ajuda nas análises.

À pós doutoranda Kátia Andrade pela ajuda na realização dos ensaios de extração supercrítica e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Marcelo Lanza responsável pelo Laboratório por orientar e possibilitar a utilização do LATESC em horários alternativos.

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

À empresa Aurora Alimentos pelo apoio e incentivo à formação de seus colaboradores.

Aos meus pais Miguel e Celeide Pies, ao meu irmão Willian Pies e à minha namorada Lucimara Priscila Bublitz pelo apoio e incentivo no decorrer de todo o curso.

Aos meus amigos Diego Mayer e Jaime Santos pelo incentivo e por compartilhar ideias e bons momentos durante a realização desse trabalho.

E por fim, agradeço a Deus, por ter colocado essas pessoas no meu caminho. E a todos que, embora não citados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



*"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."*

*(Dalai Lama)*



## RESUMO

A crescente demanda por compostos naturais e estudo da atividade biológica desses compostos tem impulsionado pesquisas na área de extração, e a extração supercrítica (SFE) tem se mostrado uma alternativa viável e promissora em relação aos processos de extração com uso de solventes e altas temperaturas. A extração supercrítica com suas vantagens de não-inflamabilidade, extratos sem resíduos de solventes e temperaturas baixas de extração vem se firmando como uma tecnologia limpa e com isso tem conquistado o interesse de diferentes indústrias. Devido às características da SFE, que permitem a obtenção de produtos puros, sem resíduos químicos, esta técnica de extração vem sendo muito utilizada para obtenção de compostos com alto grau de pureza, utilizados para estudos e aplicações de suas atividades biológicas. Sendo que nesta área os compostos fenólicos e antocianinas se destacam por apresentar atividade anticarcinogênica, podem atuar na inibição de enzimas oxidativas e inflamatórias demonstrando ação antialérgica, antiviral, bactericida, fungicida e anti-hemorrágica. O presente trabalho tem como objetivo estudar o processo de extração de compostos fenólicos de cascas de jabuticaba com CO<sub>2</sub> supercrítico. As extrações foram realizadas variando a pressão de 100 a 300 bar e a temperatura de 35 a 55 °C. Também foi avaliado o uso de etanol 95% como cossolvente na SFE em 100 bar e 55 °C. Após a extração foram avaliados o efeito da temperatura e pressão no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. O melhor rendimento da SFE sem cossolvente foi 0,48% nas condições de 300 bar e 55 °C, enquanto com o uso de cossolvente a 100 bar e 55 °C o rendimento foi de 4,52 %. Os melhores resultados para conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante foram percebidos a 100 bar tanto nas temperaturas de 35 e 55 °C. Com o uso de cossolvente houve uma maior extração de compostos fenólicos e conseqüentemente, maior atividade antioxidante. Os resultados obtidos indicam que as melhores condições de extração supercrítica de antocianinas de casca de jabuticaba são 100 bar e temperaturas de 35 e 55 °C.

**Palavras-chave:** Extração supercrítica. Antocianinas. Antioxidantes.



## ABSTRACT

The increasing demand for natural compounds and study of the biological activity of these compounds has been driving research in the extraction area, and supercritical extraction (SFE) has been shown to be a viable and promising alternative to solvent extraction and high temperature extraction. Supercritical extraction with its advantages of non-flammability, extracts without solvent residues and low temperatures of extraction has been established as a clean technology and with this has conquered the interest of different industries. Due to the characteristics of SFE, which allow the production of pure products without chemical residues, this extraction technique has been widely used to obtain compounds with a high degree of purity, used for studies and applications of their biological activities. In this area, the phenolic compounds and anthocyanins are distinguished by their anticarcinogenic activity. They can act in the inhibition of oxidative and inflammatory enzymes, demonstrating antiallergenic, antiviral, bactericidal, fungicidal and anti-hemorrhagic action. The present work aims to study the process of extracting phenolic compounds from jaboticaba shells with supercritical CO<sub>2</sub>. The extractions were carried out varying the pressure from 100 to 300 bar and the temperature from 35 to 55 °C. It was also evaluated the use of 95% ethanol as a cosolvent in SFE at 100 bar and 55 °C. After the extraction, the effect of temperature and pressure on total phenolic compounds and antioxidant activity were evaluated. The best yield of SFE without cosolvent was 0.48% under the conditions of 300 bar and 55 °C, while with the use of cosolvent at 100 bar and 55 °C the yield was of 4.52%. The best results for total phenolic content and antioxidant activity were observed at 100 bar at both temperatures of 35 and 55 °C. With the use of cosolvents there was a greater extraction of phenolic compounds and consequently, greater antioxidant activity. The results indicate that the best supercritical extraction conditions of jaboticaba bark anthocyanins are 100 bar and temperatures of 35 and 55 °C.

**Keywords:** Supercritical extraction. Anthocyanins. Antioxidants.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama de fases típico de uma substância pura (ATKINS, 2003).	32
<b>Figura 2:</b> Diagrama de Pressão por temperatura do CO <sub>2</sub> (ATKINS, 2003).	34
<b>Figura 3:</b> Variação da massa específica do CO <sub>2</sub> supercrítico com Pressão e Temperatura (ATKINS, 2003).	35
<b>Figura 4:</b> Planta adulta de jaboticabeira ( <i>Plinia trunciflora O.Berg</i> ). Fonte: Instituto brasileiro de Florestas.	37
<b>Figura 5:</b> Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH. Fonte: MALACRIDA e MOTTA, 2006.	42
<b>Figura 6:</b> Equipamento de Extração Supercrítica.	48
<b>Figura 7:</b> Esquema da unidade de Extração Supercrítica.	49
<b>Figura 8:</b> Sistema de rotaevaporação (Controlador de vácuo + evaporador).	50
<b>Figura 9:</b> Curva padrão do ácido gálico.	52
<b>Figura 10:</b> Cinética de extração a 150 bar e 35 °C.	56
<b>Figura 11:</b> Superfícies de resposta tridimensional da influência da pressão e da temperatura sobre a extração de compostos fenólicos.	60



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades críticas de solventes que podem ser usados na extração supercrítica.....	33
<b>Tabela 2:</b> Estrutura química das principais antocianinas encontradas na natureza.....	43
<b>Tabela 3:</b> Fontes de antocianinas.....	44
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros utilizados na extração.....	50
<b>Tabela 5:</b> Planejamento fatorial $2^2$ com três pontos centrais para estudar o efeito da temperatura e da pressão na extração supercrítica de antocianinas da casca de jaboticaba.....	51
<b>Tabela 6:</b> Rendimento global em extratos obtidos em diferentes condições de SFE com $\text{CO}_2$ supercrítico de cascas de jaboticabas.....	56
<b>Tabela 7:</b> Conteúdo de fenólicos totais de extrato de SFE de casca de jaboticaba em diferentes condições de extração.....	58
<b>Tabela 8:</b> Coeficientes de regressão do modelo para as variáveis de resposta.....	60
<b>Tabela 9:</b> Conteúdo de antocianinas monoméricas totais para os blends de amostras: (1) amostra da SFE a 100 bar com cossolvente; (2) amostra das SFE a 100 bar; (3) amostras das SFE a 200 e 300 bar.....	62
<b>Tabela 10:</b> Atividade antioxidante do extrato de SFE de casca de jaboticaba obtido em diferentes condições de extração.....	63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\rho_c$  – Densidade crítica  
 $T_c$  – Temperatura crítica  
AA – Atividade Antioxidante  
ABE – Extração por Leito Agitado (Agitated Bed Extraction)  
BHA – antioxidante sintético 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol  
BHT – antioxidante sintético 2,6-diterc-butil-p-creso)  
GAE – Equivalentes de Ácido Gálico (Equivalent Galic Acid)  
GP – antioxidante sintético  
LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica  
OH – Radical hidroxila  
OCH<sub>3</sub> – Radical metoxila  
R1 – Radical 1  
R2 – Radical 2  
SFE – Extração com Fluido Supercrítico (Supercritical Fluid Extraction)  
TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos  
TBHQ – antioxidante sintético tertiary butylhydroquinone  
TPC – Conteúdo Total de Fenólicos (Total Phenolic Content)  
UAE – Extração por Ultrassom Assitido (Ultrasound Assisted Extraction)  
x1 – Efeito 1  
x2 – Efeito 2  
 $X_{0, S/F}$  – Percentual de rendimento  
Ambiental dos Estados Unidos



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo Geral	27
1.1.2	Objetivos Específicos	27
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>29</b>
2.1	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (SFE)	29
2.1.1	Histórico	30
2.1.2	Fluido supercrítico	31
2.1.3	CO <sub>2</sub> supercrítico	33
2.1.4	Cossolvente	36
2.2	JABUTICABA	36
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES	39
2.4	ANTOCIANINAS	40
2.4.1	O uso de antocianinas em escala industrial	44
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL	47
3.2	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	47
3.3	CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	50
3.4	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO	51
3.5	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	51
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DPPH	53
3.7	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
4.1	CINÈTICA DE EXTRAÇÃO	55
4.2	RENDIMENTO	56
4.3	FENÓLICOS TOTAIS	58
4.4	ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS	62
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>

<b>6</b>	<b>SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>71</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Com o apelo nutricional da população mundial e o avanço dos estudos envolvendo produtos naturais, houve uma crescente demanda por estudos com frutas e vegetais, além da separação de componentes presentes nos mesmos. Com isso, o desenvolvimento de técnicas de extração alternativas sem uso de solventes orgânicos, com melhor seletividade e eficiência se torna necessário.

Processos tradicionais de extração, como a extração com solventes orgânicos deixam resíduos no extrato. A extração com fluido supercrítico é uma técnica ambientalmente segura e eficiente para materiais sólidos. A tecnologia supercrítica tem sido muito empregada em processos de extração, devido à necessidade de obter compostos com alto grau de pureza para uso na indústria alimentícia e farmacêutica.

O uso de cossolventes (etanol e água) no processo de extração com fluido supercrítico (SFE – Supercritical Fluid Extraction) possibilita a extração de substâncias mais polares, possuindo grande potencial de uso na indústria de alimentos e farmacêutica (TAYLOR, 1996).

Do ponto de vista industrial, a otimização de operações com fluidos supercríticos, que geralmente envolvem o contato de uma fase sólida com um fluido supercrítico, requer o conhecimento dos aspectos termodinâmicos (solubilidade e seletividade) e dos aspectos cinéticos (taxa de transferência de massa) do processo. Os aspectos termodinâmicos definem a máxima concentração de soluto obtida na fase supercrítica, como função das condições de operação (temperatura e pressão do solvente) e da composição da fase condensada, e os aspectos cinéticos representam a descrição e, eventualmente, a predição da taxa na qual o soluto é transferido da fase condensada para a fase supercrítica (DEBENEDETTI & REID, 1986).

A jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel), tem despertado grande interesse entre os produtores rurais devido à sua alta produtividade, rusticidade e aproveitamento de seus frutos in natura ou pela indústria alimentícia. No Brasil, a comercialização da jabuticaba tem aumentado anualmente.

Essa fruta possui um grande interesse econômico devido às muitas formas que é usada. Em função do seu sabor, os frutos são frequentemente consumidos frescos. As jabuticabas são muitas vezes utilizadas para a produção de sucos, vinhos, licores, vinagre, geléias e compotas de frutas. A jabuticaba é um fruto tropical de grande valor

sensorial e nutricional, pois possui alto teor de carboidratos, fibras, vitaminas e sais minerais tais como ferro, cálcio e fósforo, além de compostos fenólicos, os quais apresentam um efeito benéfico à saúde (RUFINO et al., 2010).

Antocianinas consistem no maior e mais importante grupo de pigmentos aquasolúveis naturais sendo responsáveis por cores que vão desde laranja e vermelho a violeta e azul de diversas flores, frutos e folhas (CAVALCANTI, SANTOS, e MEIRELES, 2011; REYNERTSON *et al.*, 2006). Além de sua capacidade colorífica diversas são as atividades biológicas atribuídas às antocianinas como: atividade anticarcinogênica (HAGIWARA *et al.*, 2001), antioxidante (WANG *et al.*, 2000) e antiviral (KAPADIA *et al.*, 1997).

O poder antioxidante de uma planta, por exemplo, pode ser atribuído ao conteúdo de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto oxidação dos lipídios. Além da captura de radicais livres, esses compostos podem atuar como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI *et al.*, 1995).

Diante disso, as antocianinas representam uma alternativa atrativa como fonte de pigmentos vegetais de alto poder corante. Além de ser empregada como agente antioxidante na indústria farmacêutica. Assim o presente trabalho tem como objetivo principal estudar o emprego do processo de extração supercrítica na obtenção dos extratos de casca de jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel). Este estudo visa extrair compostos fenólicos da casca de jabuticaba e determinar a composição de antocianinas dos extratos obtidos nas extrações supercríticas com e sem cossolvente.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa consiste em avaliar o processo de extração de compostos fenólicos e antocianinas da casca de jabuticaba utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das variáveis de processo como temperatura e pressão na extração de compostos fenólicos da casca de jabuticaba;
- Avaliar a influência do uso de cossolvente na extração e comparar com os extratos obtidos sem o uso de cossolvente;
- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais pelo método do reagente Folin-Ciocalteu.
- Determinar as antocianinas monoméricas totais pelo método de pH diferencial;
- Determinar pelo método DPPH a atividade antioxidante dos extratos obtidos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (SFE)

Processos de extração convencionais baseiam-se no uso de grandes quantidades de solventes orgânicos e a aplicação de calor e/ou agitação (LUQUE DE CASTRO *et al.*, 1998). As principais desvantagens são as grandes quantidades de solvente requeridas, degradação térmica, e a presença de resíduo de solventes orgânicos, o que é frequentemente inaceitável na indústria de alimentos (LOPEZ-SEBASTIANL *et al.*, 1998). Dentre os novos métodos de extração existentes, o que utiliza fluido supercrítico têm se tornado foco de estudos, já que este possui várias vantagens em relação aos demais métodos, peças condições brandas de operação, ausência de resíduos após a extração, dentre outras (SANTOS *et al.*, 2011).

O processo de extração supercrítica consiste em usar um fluido supercrítico, quando suas condições de temperatura e pressão em que se encontram são maiores que os seus valores críticos. As variações das propriedades de estado acima do ponto crítico podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (SANDLER, 1989).

A SFE tem vantagens consideráveis em comparação com as técnicas convencionais. O solvente pode ser facilmente removido da mistura mediante redução da pressão e/ou o ajuste da temperatura. Além disso, existe uma exigência de energia menor em comparação com outros métodos, e a extração pode ser mais rápida, conforme a matéria prima, devido à baixa viscosidade, alta difusividade, e poder solvente adequado do fluido supercrítico.

A tecnologia supercrítica utilizando como solvente o CO<sub>2</sub> é considerada uma tecnologia limpa, sendo este considerado um solvente GRAS (Generally Recognized as Safe). O dióxido de carbono utilizado pode ser reciclado ou incorporado ao meio ambiente. A utilização do dióxido de carbono mantém o extrato isento de traços residuais de solvente, resultando assim em um produto mais puro em relação à outras metodologias de extração (BRAGA, 2005).

Devido às propriedades dos fluidos supercríticos, como a alta difusividade e baixa viscosidade, ocorre um aumento do poder de difusão do fluido na matriz. A facilidade de difusão aliada à densidade alta do fluido, melhora a solvatação da matriz pelas moléculas do fluido e, portanto aumenta a transferência de massa entre a matriz e o fluido, permitindo desta maneira extrações mais eficientes, utilizando volume

menor de solvente e tempo menor de extração se comparado aos processos de extração convencional (LOU et al. 1993).

O poder de solvatação de um solvente aumenta não somente a solubilidade de um certo produto, como o número de compostos solubilizáveis. Os aromas e óleos essenciais são extraídos utilizando-se o solvente em condições próximas ao seu ponto crítico, enquanto que oleoresinas de especiarias e óleos vegetais são extraídas em condições de altas pressões, acima do ponto crítico (BROGLE, 1982).

A SFE apresenta diversas vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais de extração e separação. O elevado potencial de solubilidade que os fluidos apresentam quando estão nas condições supercríticas; as baixas temperaturas críticas de alguns solventes supercríticos permitem a extração de produtos termossensíveis, sem a alteração nas propriedades dos compostos extraídos; as propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser grandemente variadas, tanto pelo ajuste apropriado da temperatura e da pressão quanto pela introdução de agentes aditivos que mudem a polaridade dos gases; os extratos quase não sofrem hidrólise, oxidação, esterificação, caramelização ou alterações térmicas, por isso representam melhor o material original; com a adição de cossolventes, permite-se a extração diferencial de solutos não polares até solutos de polaridade alta; não permanece solvente residual nos extratos obtidos.

Além disso, as propriedades destes solventes podem ser variadas, tanto pelo ajuste apropriado de pressão e temperatura, quando pela adição de cossolvente que mudam a polaridade dos gases. O CO<sub>2</sub> é inerte, não inflamável e como solvente, depois da água, é o de menor custo, além de poder ser reutilizado, baixando o custo operacional (MAUL, 1999).

### **2.1.1 Histórico**

A primeira observação de uma fase supercrítica foi feita pelo Barão Cagniard de La Tour em 1822. Ele observou visualmente que os limites entre gás e líquido desapareciam quando a temperatura de certos materiais era elevada em um frasco fechado (TAYLOR, 1996).

O interesse por esta aplicação de extração supercrítica foi evocado pela rápida escalada e incerta disponibilidade de solventes derivados do petróleo no início dos anos 1980, e também por possíveis problemas à saúde causados pelo uso de solventes hidrocarbonetos e hidrocarbonetos clorados (SOVOVA, 1994).

Conforme TAYLOR (1996), os primeiros pesquisadores a perceberem o poder de solvatação dos fluidos supercríticos foram

Hannay e Hogarth, em 1879. Através de estudos de solubilidade do cloreto de cobalto II, do cloreto de ferro III, do brometo de potássio e do iodeto de potássio em etanol no estado supercrítico ( $T_c=243\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c=62\text{ atm}$ ), detectando que suas concentrações em etanol supercrítico, era maiores do que as previstas por suas pressões de vapor.

A extração com fluido supercrítico, em escala industrial, teve seu início na Alemanha, no final dos anos 70, com o processo de remoção de cafeína do café. Processo que se destacou devido a utilização de uma tecnologia limpa, sem resíduos, uso de solventes não-tóxicos, extração de produtos de alta qualidade e manutenção das propriedades organolépticas do produto (MAUL, 1999).

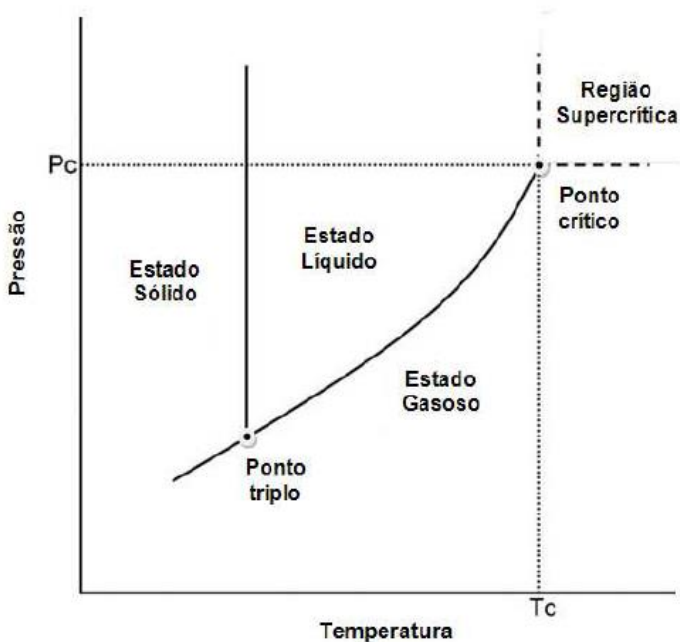
Outras aplicações que tiveram crescente desenvolvimento incluem o tingimento de fibras têxteis (buscando a redução da emissão de efluentes líquidos), a extração de contaminantes do solo (metais pesados e pesticidas) (PERRUT, 2001).

Nas duas últimas décadas numerosos artigos técnicos e científicos relatando aplicações da SFE para extração de óleos essenciais, oleoresinas e outros materiais aromáticos de muitas matrizes vegetais foram desenvolvidos. Entre estes estudos podemos destacar a SFE foi usada para obter óleos vegetais de sementes de amêndoa (MARRONE et al., 1998), palma (CORRÊA et al., 2001), oliva (ESQUÍVEL et al., 1999), óleo essencial de pimenta-do-reino (FERREIRA; FERREIRA et al.; 1996, 1999), coentro (ILLÉS et al., 2000), oleoresina de calêndula (JOCHMANN; DANIELSKI, et al.; 2000, 2001a), oleoresina de cavalinha (FERREIRA et al.; MICHIELIN et al.; 2001, 2001). Outros estudos foram desenvolvidos para a recuperação de substâncias valiosas de diferentes extratos, como a extração de antioxidantes do farelo de arroz (SARMENTO et al., 2001), recuperação de carotenóides e lipídios da polpa de buriti (FRANÇA et al., 1999), extração dos glicosídeos da stévia (YODA, 2001) dentre outros. Estes estudos avaliaram parâmetros cinéticos, termodinâmicos, modelagem do processo de transferência de massa ou a composição química dos extratos.

### **2.1.2 Fluido supercrítico**

Do ponto de vista termodinâmico, o diagrama de fases de uma substância é uma representação gráfica que demonstra as condições de temperatura e pressão em que as diferentes fases de uma determinada substância são termodinamicamente mais estáveis. As curvas que separam as regiões de cada fase, denominadas curvas de equilíbrio,

forneem os valores de pressão e temperatura nos quais as diferentes fases coexistem em equilíbrio, conforme pode ser observado na figura 1 (ATKINS, 2003).



**Figura 1:** Diagrama de fases típico de uma substância pura (ATKINS, 2003).

Fluidos supercríticos apresentam propriedades características de gases e de líquidos. Possui compressibilidade semelhante a um gás, enchendo completa e uniformemente um recipiente, dissolução de solutos, como um líquido (quando suficientemente comprimidos), a viscosidade é baixa como a de um gás (produzindo baixas quedas de pressão em colunas de mercúrio) e a difusão é intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade.



**Tabela 1:** Propriedades críticas de solventes que podem ser usados na extração supercrítica.

Solvente	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (bar)
Dióxido de carbono	31,10	73,76
Etano	32,30	48,84
Etanol	240,75	61,40
Etileno	9,30	50,36
Propano	96,70	42,45
Propileno	91,90	46,20
Ciclohexano	280,30	40,73
Benzeno	289,00	48,94
Tolueno	318,60	41,14
Clorotrifluormetano	28,90	39,21
Triclorofluormetano	198,10	44,70
Amônia	132,50	112,77
Água	374,20	220,48

FONTE: DIEHL, 2008.

Para a aplicação da tecnologia supercrítica, existe uma série de substâncias que podem ser usadas como fluido supercrítico, principalmente compostos polares. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos dessas substâncias, e suas respectivas temperaturas críticas ( $T_c$ ) e pressões críticas ( $P_c$ ).

Em alimentos e produtos farmacêuticos, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o fluido mais utilizado como solvente, seja como fluido supercrítico ou líquido subcrítico, uma vez que suas características se assemelham a de um solvente ideal (FERREIRA, 1996).

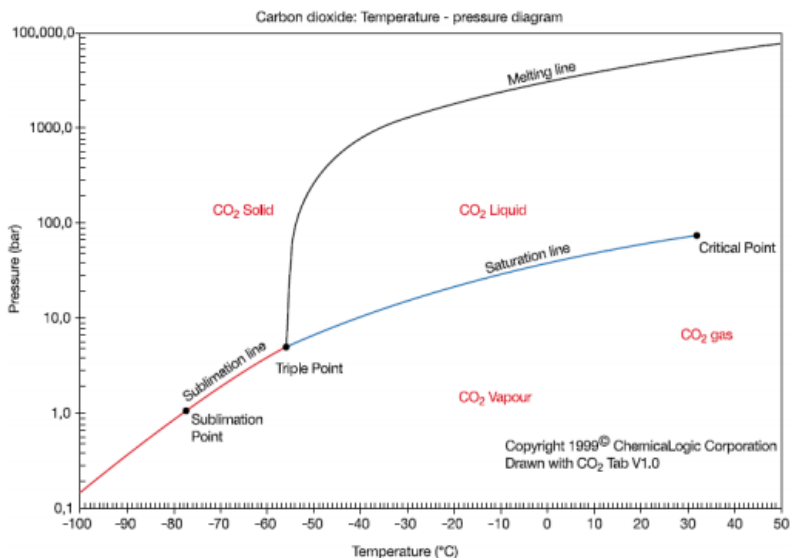
O dióxido de carbono supercrítico é essencialmente um solvente não polar, e seu poder solvente varia consideravelmente com a densidade. Portanto, permite extrair grande variedade de substâncias, dependendo da pressão aplicada (ARAÚJO, 1999).

### 2.1.3 $\text{CO}_2$ supercrítico

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) supercrítico, assim como a maioria dos fluidos supercríticos, tem a densidade próxima à de um líquido,

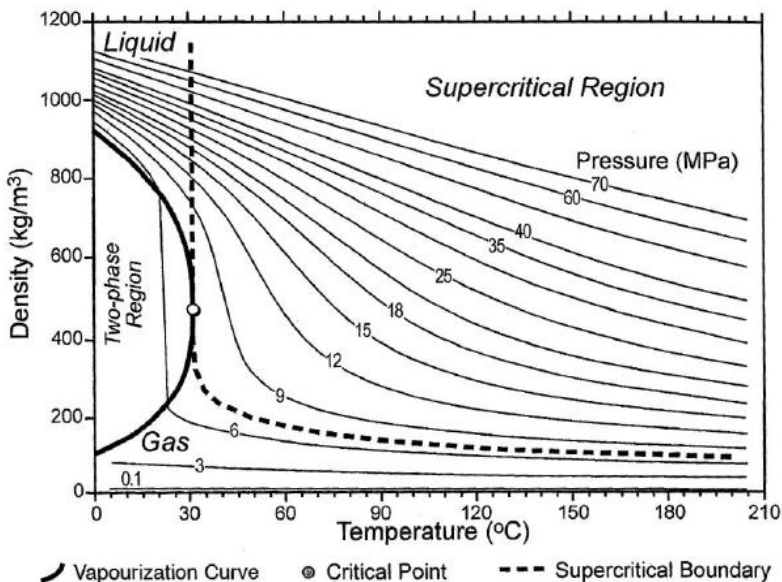
baixa viscosidade e se difunde como um gás. Estas características lhe conferem excelentes qualidades de extração.

Entre as razões que o  $\text{CO}_2$  supercrítico é indicado para SFE pode-se citar a sua baixa temperatura crítica,  $T_c = 31,04^\circ\text{C}$ , permitindo que as extrações sejam realizadas a uma temperatura que não prejudique as propriedades organolépticas e químicas dos extrato e sua pressão crítica,  $P_c = 73,76 \text{ bar}$ , de fácil obtenção para o  $\text{CO}_2$  em um processo de produção industrial. O diagrama de fases e a variação de densidade do  $\text{CO}_2$  são apresentados nas figuras 2 e 3, respectivamente.



**Figura 2:** Diagrama de Pressão por temperatura do  $\text{CO}_2$  (ATKINS, 2003).

O  $\text{CO}_2$  apresenta viscosidade baixa como a de um gás, alta densidade como os líquidos e difusão intermediária entre gases e líquidos. Pouca variação na temperatura causa grandes variações na densidade do solvente, facilitando a extração de diversos componentes presentes na matéria prima. A variação da densidade do  $\text{CO}_2$  com a variação da temperatura é expressa na figura 3.



**Figura 3:** Variação da massa específica do  $\text{CO}_2$  supercrítico com Pressão e Temperatura (ATKINS, 2003).

O  $\text{CO}_2$  é inerte, não oferece riscos de reações secundárias, como oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas; é seguro, inofensivo, não explosivo, não poluente e não tóxico; possui polaridade próxima a do pentano e do hexano, solventes apolares comumente usados em extrações tradicionais por solventes.

Além disso, é versátil, já que os parâmetros de extração do  $\text{CO}_2$  supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de cossolventes, polares e apolares, e também pela seleção das condições de temperatura e pressão (MAUL, 1999). Estas propriedades dão flexibilidade e permitem adequação das condições de extração para as necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e ao produto final desejado.

A desvantagem do dióxido de carbono supercrítico é que os compostos polares muitas vezes são difíceis de extrair. Essa dificuldade pode ser facilmente resolvida usando pequenas quantidades de modificadores orgânicos ou cossolventes (DANH *et al.*, 2009).

#### 2.1.4 Cossolvente

A adição de um solvente auxiliar ao CO<sub>2</sub>, denominado cossolvente ou modificador, tem sido proposta com intuito de aumentar a solubilidade de compostos-alvo polares e também possibilitar o controle da seletividade do processo de extração, proporcionando a utilização de pressões menos elevadas (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; SINKO, 2006; PEREIRA e MEIRELES, 2010). Os cossolventes são selecionados de modo a proporcionar o aumento das interações moleculares do solvente supercrítico com os compostos de interesse.

Os solventes mais utilizados como modificadores em processos de extração com fluido supercrítico são o metanol e o etanol, os quais são capazes de realizar interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com moléculas do soluto contendo grupos funcionais polares (HAMBURGUER *et al.*, 2004; KOPCAK e MOHAMED, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2008).

O etanol empregado na extração de compostos com atividade antioxidante, de fontes naturais tem a vantagem de, assim como o CO<sub>2</sub>, apresentar toxicidade mais baixa em comparação com outros cossolventes. O etanol é amplamente utilizado para melhorar a eficiência da extração de compostos relativamente polares, tais como os ácidos fenólicos e flavonoides, e pode ser facilmente removido do produto final por meio de destilação e evaporação (RAWSON *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos citam o uso de etanol como cossolvente. Penedo e Coelho, 1997 constataram que o emprego de 5 % de etanol como cossolvente na extração de ácidos graxos livres de óleos vegetais aumentou a eficiência para 65,3% para o óleo de soja e 55,8% para o óleo de castanha do Pará. BADALYAN, WILKIRSON e CHUN (1998) observaram que o uso do etanol (2 %, em massa), como cossolvente aumentou o rendimento de óleo essencial em aproximadamente 10 % para gengibre australiano em comparação com o rendimento obtido com CO<sub>2</sub> líquido puro a 25 °C.

## 2.2 JABUTICABA

Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2016), a fruticultura tem se destacado como um dos mais importantes segmentos econômicos do agronegócio brasileiro, sendo responsável por inserir o Brasil entre os três maiores produtores de frutas do mundo, atrás apenas da China e Índia. A área cultivada com frutas já ultrapassou a casa dos

2,2 milhões de hectares em todos os estados brasileiros, com volumes estimados em 43,6 milhões de toneladas. Dessa produção, 47% é destinada ao sistema agroindustrial e 53% para a comercialização de frutas frescas.

A jabuticaba (figura 4), nativa do Brasil encontrada em ampla região no Brasil que vai do Pará ao Rio Grande do Sul (PEREIRA, 2003). O fruto é uma baga sub-globular suave que é de cor roxa quando maduro, tem um diâmetro de 1,6 - 2,2 cm e contém 1 - 4 sementes. A casca é fina e muito frágil, e a polpa tem um branco de cor translúcida, é doce e ligeiramente ácida (WHALEN *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2011). Por causa das características similares aos da uva, muitos produtos podem ser feitos a partir da jabuticaba, como o vinho, suco, geleia, licor e vinagre (ANDERSEN *et al.*, 1988).



**Figura 4:** Planta adulta de jabuticabeira (*Plinia trunciflora* O.Berg). Fonte: Instituto brasileiro de Florestas.

A jabuticaba tem alto teor de taninos, vitamina C e de flavonóides, em especial na sua casca, o que indica um grande potencial antioxidante e, assim, um possível papel na prevenção de várias doenças relacionadas com o stress oxidativo. (MORTON, 1987, GIACOMETTI *et al.*, 1994, ZANATTA *et al.*, 2005),

A jabuticaba mostra-se um fruto de grande valor nutricional e funcional. Na medicina popular a jabuticaba é utilizada para vários fins, entre estes é mencionada a decocção da casca, como remédio para a asma e o consumo da polpa que, por sua composição auxilia a digestão e mobilidade intestinal do bolo alimentar. Com isso a obtenção de compostos fenólicos e antocianinas da jabuticaba se tornam atraente, principalmente com uso de tecnologia supercrítica que não deixa resíduos de solventes no extrato obtido.

Poucos são os estudos dos compostos bioativos da jabuticaba, dentre eles, Araújo (1999) estudou a composição química, potencial antioxidante e hipolipidêmico da farinha da casca de *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba) através de ensaios com aplicação da farinha da casca de jabuticaba na dieta dos ratos, verificando efeito hipocolesterolemiantes e hipotrigliceridemiante, sendo este maior com o aumento da quantidade suplementada. Leite-Legatti *et al* (2012) incubou células tumorais com amostras extraídas da jabuticaba com solvente (etanol 95%; 1,5 N HCl 85:15 v/v), constatando efeito antiproliferativo contra leucemia e células tumorais da próstata. Meireles *et al* (2011) fez a avaliação econômica de diferentes condições de Extração Supercrítica (EFS) com etanol 20% v/v de resíduo de produção de geleia, determinando que a condição de extração em 323 K e 20 MPa teve a maior produção de compostos antioxidantes e com o menor custo de produção.

Cavalcanti (2013) fez avaliação econômica da extração de antocianinas de resíduo de produção de geleia de jabuticaba utilizando líquido pressurizado (PLE) e fluido supercrítico, concluindo que extratos aquosos obtidos via SFE e PLE foram os mais rentáveis. Kuhn (2014) utilizou o extrato hidroalcoólico 70% de casca de jabuticaba na ração de jundiás e administrou por 15 dias aos animais, constatando que o extrato preveniu o dano oxidativo em jundiás expostos a um fator físico de estresse. Sacchet *et al* (2015) avaliou os efeitos antidepressivos e antioxidantes do extrato aquoso de *P. trunciflora*, no qual foram identificadas cinco diferentes antocianinas. A *P. trunciflora* mostrou poder de redução férrico significativo e atividade de eliminação de radicais DPPH *in vitro* e peroxidação lipídica reduzida tanto *in vitro* como *in vivo*. Ao nível comportamental, *P. trunciflora* (400 e 800 mg / kg, i.p.) dependente da dose reduziu o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda em ratinhos machos suíços.

### 2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser compreendidos como um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais, normalmente baixas quando comparadas às concentrações dos substratos oxidáveis, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato pela reação com os radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e aumentando a vida útil de uma grande variedade de alimentos (HALLIWELL, 1990). Podem ser divididos em sintéticos, substâncias utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se o BHT, BHA, GP, TBHQ (SOUSA *et al.*, 2007) ou naturais tais como: tocoferol (vitamina E), caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (SOUSA *et al.*, 2007).

O conteúdo de compostos antioxidantes é influenciado pela estrutura química, método de extração empregado, tamanho das partículas da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas (BARNES *et al.*, 2009). Por essas razões, nenhum método de extração é totalmente eficiente na extração de todos os fenólicos ou de uma classe específica de compostos fenólicos em alimentos. A solubilidade dos polifenóis é determinada pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenólicos, interação de fenólicos com outros constituintes do alimento e formação de complexos insolúveis. Os solventes mais frequentemente utilizados para a extração de compostos fenólicos incluem metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante, como o método de formação do complexo fosfomolibdênio ou a atividade antioxidante em relação à redução de um radical, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (BRANDWILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O método DPPH baseia-se na redução do Mo+6 para Mo+5 com subsequente formação do complexo fosfato-Mo+5, que se distingue por sua coloração verde em pH ácido e absorção máxima em 695 nm. Este método destaca-se pela sensibilidade e pela facilidade de reprodução, avaliando-se a atividade antioxidante relativa (AAR) ao efeito desempenhado pela vitamina C (ARBOS *et al.*, 2004).

O crescente interesse por alimentos naturais e evidências de que alguns compostos antioxidantes sintéticos podem promover o desenvolvimento de alguns efeitos colaterais como alergias e possíveis

ações promotoras de câncer, tem aumentado a demanda por compostos naturais com atividade similar. Antioxidantes naturais na indústria de alimentos são importantes não apenas devido a sua utilidade como método de prevenção da oxidação, mas também pelos efeitos benéficos na saúde humana (IBAÑEZ *et al.*, 2003).

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (RAZAVI *et al.*, 2008; SACCHETTI *et al.*, 2005).

## 2.4 ANTOCIANINAS

O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (anthos = flores; kianos = azul), foi inventado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes são atribuídas a pigmentos quimicamente similares aos que deram origem ao “flor azul” (BROUILLARD, 1982).

As antocianinas são um tipo de pigmento funcional responsável por uma ampla gama de cores presentes em vegetais, flores, frutos, e produtos derivados (KONG *et al.*, 2003).

Com a mesma origem biossintética dos outros flavonóides naturais, as antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, porém, ao contrário dos outros flavonóides, as antocianinas absorvem fortemente na região visível do espectro, conferindo uma infinidade de cores, dependendo do meio de ocorrência (BROUILLARD, 1982).

As antocianinas são moléculas polares e, conseqüentemente, são mais solúveis em solventes polares do que em apolares. Além disso, a sua solubilidade depende de alguns fatores o que incluem as condições do meio tal como o valor de pH. Dessa maneira, os métodos convencionais de extração de antocianinas envolvem, normalmente, solventes polares em meios acidificados (BARNES *et al.*, 2009).

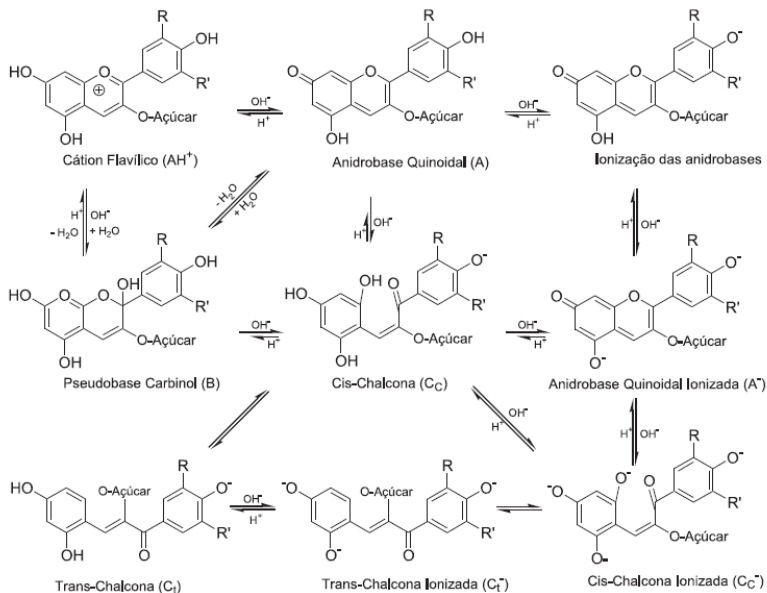
Devido sua solubilidade em água, as antocianinas ocorrem nos tecidos de plantas dissolvidas no fluido da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido (HAYASHI, 1962). As antocianinas mais comumente encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina. A nomenclatura dos



pigmentos é derivada da fonte (do vegetal) em que eles foram primeiramente isolados (HARBORNE, 1994).

As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao(s) açúcar(es) na molécula de antocianina (STRINGHETA, 1991).

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, apresentam diferentes estruturas em função do pH. De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico ( $AH^+$ ). Para um meio com pH maior que 2, é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (B). Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 6, devido à predominância da espécie pseudobase carbinol. Em valores de pH acima de 6,0, tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto anidrobases quinoidais (A) podem formar a espécie cis-chalcona ( $C_c$ ). A formação desta ocorre com a ruptura do anel heterocíclico o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível. A formação da cis-chalcona a partir da anidrobases quinoidais pode ocorrer por dois caminhos diferentes: de maneira direta, resultado de um aumento brusco de pH, ou com a formação das espécies anidrobases ionizadas ( $A^-$ ), possivelmente provenientes de um aumento gradual de base entre os valores de pH 6,5 e 9. Ao iniciar-se a ionização das antocianinas, são formadas estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas cis e trans, apresentando coloração amarelada. Baseando-se em trabalhos anteriores (BOBBIO, 2001 e TERCI, 2002) juntamente com estudos recentes, sugere-se que as possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH podem ser representadas pela Figura 5.



**Figura 5:** Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH. Fonte: MALACRIDA e MOTTA, 2006.

As diferenças estruturais entre as antocianinas individuais são resultado do número de grupos hidroxilas na molécula, do grau de metilação desses grupos, da natureza e do número de açúcares (glicosídeo) ligados à molécula e da posição da ligação e da natureza e número de ácidos alifáticos e aromáticos ligados aos açúcares na molécula (Tabela 2) (GUEDES, 2004).

De acordo com SADILOVA *et al.* (2007), para se obter um rendimento elevado de antocianinas no extrato, os solventes são geralmente ligeiramente acidificados para facilitar a libertação e solubilização de antocianinas a partir do tecido de frutos e para estabilizar as antocianinas, mas também porque a maior estabilidade destes compostos é conseguida em meio ácido.

**Tabela 2:** Estrutura química das principais antocianinas encontradas na natureza.

<b>Estrutura base</b>	<b>Aglicona</b>	<b>Substituição glicosídica</b>	<b>Acilação (esterificação das hidroxilas do açúcar)</b>
<b>R1</b>	R <sub>2</sub>		
<b>H</b>	H	Pelargonidina	D-glicose
<b>OH</b>	H	Cianidina	D-galactose
<b>OH</b>	OH	Delfinidina	D-xilose
<b>OCH<sub>3</sub></b>	H	Peonidina	L-ramnose
<b>OCH<sub>3</sub></b>	OH	Petunidina	L-arabinose
<b>OCH<sub>3</sub></b>	OCH	Malvidina	Rutinose
			Soforose
			Sambubiose
			Gentiobiose
			Ácidos cinâmicos
			p-cumárico
			Ferúlico
			Caféico
			ácidos alifáticos
			acético
			malônico
			succínico

Fonte: MALACRIDA e MOTTA, 2006.

Antocianinas consistem no maior e mais importante grupo de pigmentos hidrossolúveis naturais sendo responsáveis por cores que vão desde laranja e vermelho a violeta e azul de diversas flores, frutos e folhas (CAVALCANTI, SANTOS, e MEIRELES, 2011; REYNERTSON *et al.*, 2006). Além de sua capacidade colorífica diversas são as atividades biológicas atribuídas às antocianinas como: atividade anticarcinogênica (HAGIWARA *et al.*, 2001), antioxidante (WANG *et al.*, 2001) e antiviral (KAPADIA *et al.*, 1997).

Além disso, tais compostos podem atuar na inibição de enzimas oxidativas e inflamatórias demonstrando ação antialérgica, antiviral, bactericida, fungicida, antitumoral e antihemorrágica (EINBOND *et al.*, 2004; REYNERTSON *et al.*, 2008). Além disso, podem reduzir o risco de doenças coronárias através da modulação da proteção arterial (COLANTUONI *et al.*, 1991), inibição da agregação de plaquetas (MORAZZONI e MAGISTRETTI, 1990) ou proteção endotelial (YOUJIM *et al.*, 2002).

### 2.4.1 O uso de antocianinas em escala industrial

Existem aproximadamente 400 antocianinas diferentes catalogadas (KONG *et al.*, 2003). Contudo, é como corante natural que as antocianinas encontram sua maior aplicação podendo atuar como agentes coloríficos em produtos alimentícios, cosméticos, fármacos, tecidos, tintas, dentre outros.

Embora as antocianinas estejam largamente distribuídas na natureza, encontram-se poucas fontes que possam ser utilizadas pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, como podem ser vistos exemplos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Fontes de antocianinas.

<b>Antocianina</b>	<b>Fonte</b>
Cianidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, jambolão, morango, amora, maçã, azeitona, jabuticaba.
Cianidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, cereja, figo, marmelo.
Peonidina-3-glicosídeo	Uva, cereja, jabuticaba.
Malvidina-3-glicosídeo	Uva, vinho.
Malvidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, feijão, inhame.
Cianidina-3-galactosídeo	Maçã, cacau.
Cianidina-3p-cumarilsoforosídeo-5-glicosídeo	Repolho roxo.
Pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo	Rabanete.
Pelargonidina-3-glicosídeo	Morango, tamarindo.
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjela, feijão, uva, romã.
Delfinidina-3-cafeoilglicosídeo-5-glicosídeo	Berinjela.
Petunidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, feijão, mirtilo, laranja.

Fonte: MALACRIDA, MOTTA, 2006.

A principal função da adição de corantes em produtos alimentícios é proporcionar a melhoria na aparência dos mesmos, deixando-os mais parecidos aos produtos naturais e mais agradáveis, portanto, aos olhos do consumidor, que, desta forma, é estimulado a consumir o produto, já que a aparência tem um papel importantíssimo na aceitação desses produtos (FAVARRO, 2008).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Jaboticabas (*Myrciaria cauliflora*) foram adquiridas no mercado local (Chapecó – SC, Brasil). Os frutos foram descascados manualmente e separadas as cascas. Passaram por um processo de secagem em estufa com circulação e renovação de ar da Tecnal, modelo TE-394/2 por 48 h em temperatura de 35 °C. A análise de umidade foi realizada na mesma estufa utilizando o método descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985) secagem a 105 °C até peso constante. Após secas as cascas apresentavam 20 % de umidade, foram trituradas e armazenadas em frasco de vidro.

#### 3.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRTICO

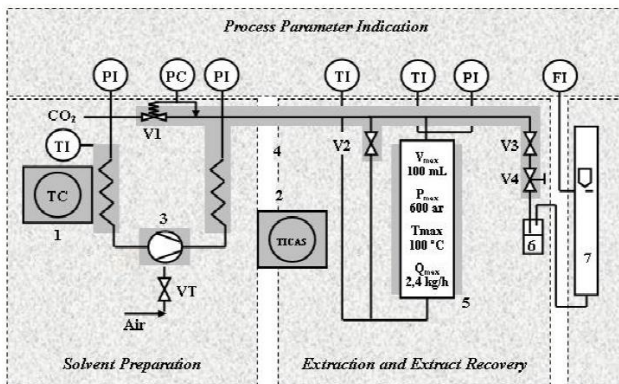
Os ensaios de extração supercrítica foram realizados em uma unidade de extração no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), desenvolvida pelo Laboratório Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), na Alemanha (Zetzel *et al.*, 2003). A unidade de Extração Supercrítica constitui-se de um cilindro de CO<sub>2</sub> com tubo pescador (White Martins Ltda, Joinville, SC, Brasil), que alimenta a linha de extração, que passa imersa em um banho termostático de resfriamento (Thermo Haake C10 - K10) programado para manter a temperatura inferior a 0°C, garantindo assim que o solvente siga no estado líquido à bomba (Maximator M111 CO<sub>2</sub>), que trabalha suprida por uma linha de ar comprimido e filtrado. A pressão de operação desejada é regulada através da válvula V1 (Tescom Cat N° 26-1761-24-161). A bomba é alimentada com o solvente, que é então pressurizado a uma pressão pré-estabelecida em V1, e encaminhado à linha de extração, passando ao extrator, que se constitui de um cilindro encamisado de aço inox com extremidades rosqueadas de 33,5 cm de comprimento, 2,042 cm de diâmetro interno e volume interno de 100 mL. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (Thermo Haake DC30 – B30). Toda a tubulação onde se encontram conectadas as válvulas V1 a V6 é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) a uma temperatura de 65 °C. A tubulação da saída do extrator é conectada à V3 (Sitec Microvalve 710.3012) e em seguida à V4 (Sitec Shutoff Valve

710.3010) por onde o fluxo de  $\text{CO}_2$  é regulado. Após passar pela V4, o extrato é coletado em tubos âmbar, onde também é conectado um rotômetro (ABB Automation Products 10 A 61) para medição do fluxo de  $\text{CO}_2$ , regulado na V3 e V4. As Figuras 6 e 7 mostram a foto e o esquema de funcionamento do equipamento, respectivamente.



**Figura 6:** Equipamento de Extração Supercrítica.





**Figura 7:** Esquema da unidade de Extração Supercrítica.

Onde: VT - Válvula de controle de frequência da bomba. V1 - Válvula reguladora de pressão. V2 - Válvula de entrada do extrator (Autoclave valve 10V2071 Maximator Cat N° 3710.0104). V3 - Válvula da saída do extrator (Sitec Shutoff 710.3010). V4 - Microválvula (controla a velocidade de escoamento) (Sitec Microvalve 710.3012). PI1 - Manômetro do cilindro (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10). PI2 - Manômetro da bomba (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10). PI3 - Manômetro do extrator (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10).

Cascas de jaboticabas trituradas com 20 % de umidade (15 gramas) foram adicionadas em um leito de extração de 67,6 mm. O leito de extração foi composto por uma camada de esferas de vidro de diâmetro médio de 2 mm, uma camada contendo a amostra de casca de jaboticaba e uma camada de algodão. As esferas de vidro foram utilizadas com o objetivo de completar o volume do extrator. Após completar o volume do extrator, foi feita uma pressurização do sistema apenas com CO<sub>2</sub> para retirada do ar da coluna de extração. Em seguida, injetou-se o solvente extrator na coluna, nas condições de operação (100 a 300 bar e 35 a 55° C). O período de extração dinâmico foi de 2,5 horas, com vazão de CO<sub>2</sub> de 0,6 Kg/h. Para a extração com uso de cossolvente utilizou-se uma bomba que adicionava, com vazão controlada, o cossolvente no sistema. O extrato foi recolhido em um frasco âmbar.

Após o término da extração as tubulações do equipamento foram lavadas com 30 mL de etanol PA para recolher o extrato que ficou nas tubulações. Em seguida, o solvente foi removido por evaporação num sistema de rotaevaporação (Figura 8) à 35 °C, com um

controlador de vácuo (Novatécnica, modelo NT-613) acoplado em um evaporador.



**Figura 8:** Sistema de rotaevaporação (Controlador de vácuo + evaporador).

O tempo de extração foi determinado através da cinética de extração na condição de 150 bar de pressão e 35 °C de temperatura.

### 3.3 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Alguns parâmetros são utilizados no processo de SFE. Entre eles podem-se citar a pressão e a temperatura de extração, a massa de material vegetal, a massa específica do componente a ser extraído e do material vegetal, a porosidade do leito de extração, as dimensões (diâmetro, altura e volume) do leito e o tempo de extração. Os principais parâmetros utilizados para a extração estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Parâmetros utilizados na extração.

Parâmetro	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Pressão (bar)	100	200	300
Temperatura (°C)	35	45	55
Vazão de CO <sub>2</sub> (Kg/h)	0,6	0,6	0,6
Tempo de extração (h)	2,5	2,5	2,5

O planejamento experimental baseia-se em um fatorial 2<sup>2</sup> com 3 pontos centrais, totalizando 7 ensaios. Será examinado os efeitos do aumento da temperatura e da pressão sobre o rendimento de extração de antocianinas da casca de jabuticaba. No fatorial os níveis são 35, 45 e 55°C para a temperatura, e 100, 200 e 300 bar de pressão. Os pontos

centrais serão 45 °C para a temperatura e 200 bar de pressão. A matriz de planejamento, é apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5:** Planejamento fatorial  $2^2$  com três pontos centrais para estudar o efeito da temperatura e da pressão na extração supercrítica de antocianinas da casca de jabuticaba.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	x1	x2
1	35	100	-1	-1
2	55	100	+1	-1
3	35	300	-1	+1
4	55	300	+1	+1
5	45	200	0	0
6	45	200	0	0
7	45	200	0	0

Também foi realizada uma SFE com uso de 5% de etanol PA como cossolvente em pressão de 100 bar e 55 °C de temperatura, para comparação com a SFE sem cossolvente.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O percentual do rendimento de extração obtido a uma determinada razão ( $X_{0,S/F}$ ) foi calculado relacionando a massa total de extrato ( $M_{extrato}$ ) e a massa de alimentação de matéria-prima ( $F$ ) em base seca, de acordo com a equação 1 abaixo:

$$X_{0,S/F} = \left( \frac{M_{extrato}}{F} \right) * 100 \quad (1)$$

O rendimento global foi dado como a soma entre o rendimento obtido no frasco de coleta, na coluna de adsorção e no frasco de limpeza com etanol após evaporação do solvente.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

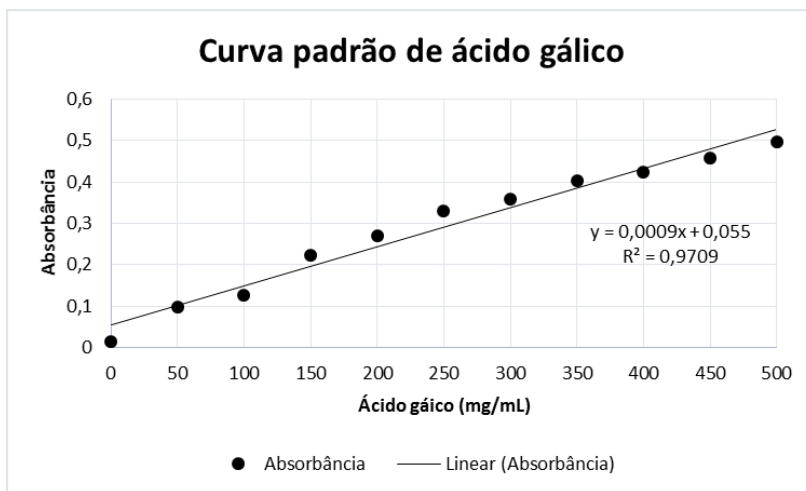
Para a determinação do teor de fenólicos totais (TPC – *total phenolic content*) dos extratos utilizou-se o método do reagente Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON *et al* (1999), com algumas adequações para extratos vegetais.

Para a curva padrão de ácido gálico (Figura 10) pipetar 0; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; 1,0 mL da solução estoque de ácido gálico (0,05 ppm) em balões volumétricos de 10 mL, com a finalidade de serem obtidas as concentrações de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mg/L.

Para a amostra, separar 0,01 g de amostra, dilui-se em 6 ml de etanol PA e solubilizou-se utilizando o ultrassom. Em seguida, foi separado 100 µL de cada uma das concentrações com pipeta automática e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Adicionar 2 mL de água destilada, agitar e adicionar 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e misturar bem.

Depois de 30 segundos e antes de 8 minutos, adicionar 1,5 mL de solução de carbonato de sódio a 20 %. Agitar bem e adicionar água até completar 10 mL. Deixar repousar por 2 horas a 25 °C ao abrigo da luz. Medir a absorbância em espectrofotômetro de cada solução no comprimento de onda de 765 nm.

Representar graficamente a absorbância versus a concentração de ácido gálico (mg/ml). Utilizar água destilada como branco e como controle negativo todos os reagentes menos a amostra.



**Figura 9:** Curva padrão do ácido gálico.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DPPH

O radical DPPH é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. A técnica foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental na Universidade Comunitária da Região de Chapecó, de acordo com Brand - Williams *et al.* (1995), com algumas modificações e constitui-se da incubação dos extratos de jabuticaba (concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 320 µg/mL) por 24 horas a 25° C, em uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,06 mM com posterior leitura da absorbância em 517 nm. O percentual de inibição do radical DPPH foi calculado, convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a equação 2:

$$AA\% = 100 - \frac{Abs, amostra - Abs, branco}{Abs, controle} \quad (2)$$

Etanol (1,0 ml) mais solução de extrato da casca de jabuticaba (2,5 mL) foi usado como um branco. Solução de DPPH (1,0 ml; 0,3 mM) mais etanol (2,5 mL) foi utilizada como um controle negativo. Os controles positivos foram aqueles que utilizaram as soluções-padrão.

Após, o valor do EC50, definido como a quantidade do antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, em um determinado intervalo de tempo, foi determinada por regressão linear através da curva da concentração dos extratos vs. atividade antioxidante (%). A atividade antioxidante de cada extrato foi expressa pelo EC50.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

O conteúdo de antocianinas monoméricas totais (Total Monomeric Anthocyanins – TMA) foi determinada no Laboratório de Análise Instrumental na Universidade Comunitária da Região de Chapecó, utilizando o método de pH diferencial descrito por Giusti e Wrolstad (2001) adaptada, que se baseia na transformação estrutural do cromóforo antocianina em função do pH. Um espectrofotômetro de UV-Vis (Hitachi, modelo L-3010, Tokyo, Japão) foi usada para medidas no comprimento de onda de absorbância máxima (cerca de 520 nm) e 700

nm, utilizando água destilada como um branco. Duas diluições da mesma amostra foram preparados: um com ácido clorídrico / cloreto de potássio, tampão de pH = 1,0 e o outro com acetato de sódio / ácido acético, tampão de pH = 4,5.

Para uma alíquota de 1,0 mL de amostra diluída, foram adicionados 1,8 mL da solução de cloreto de potássio (pH 1,0) e acetato de sódio (pH 4,5) e deixadas em repouso durante 25 minutos ao abrigo da luz, em seguida foram realizadas as leituras de absorvância de cada solução no comprimento de onda máximo e a 700 nm. O fator de diluição (DF) foi determinado (volume final por volume da amostra original). O teor de antocianinas foi calculada como cianidina-3-glucósido (PM = 449,2 g/mol e  $\epsilon$ ) = 26.900 L/mol cm<sup>-1</sup>) e os resultados foram expressos em mg /100 g de material seco.

Para a quantificação das antocianinas totais foram consideradas as absorvâncias a 520 e 700nm apenas da solução de pH 1,0 e os cálculos realizados de acordo com a equação 3.

$$AT = \left[ \frac{(Abs_{520} - Abs_{700})_{pH1,0} * 10^3 * PM * fd}{\epsilon} \right] * 100 \quad (3)$$

Onde:

AT são as antocianinas totais expressas em mg de cianidina-3-glucósido, antocianina majoritária, em 100g de amostra;

(Abs<sub>520</sub> e Abs<sub>700</sub>) pH<sub>1,0</sub> são os valores de absorvância da amostra diluída na solução tampão pH 1,0 lidos a 520 e 700 nm, respectivamente;

PM é o peso molecular da cianidina-3-glucósido;

fd é o fator de diluição dado pela razão volume da diluição, em litros, por massa de amostra, em gramas;

$\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar da cianidina 3-glucósido em solução tampão pH 1,0 à 520 nm, cujo valor é de 26.900 Lcm<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>;

100 é utilizado para expressar o valor por 100 gramas de amostra.

Para a quantificação das antocianinas monoméricas foram consideradas as absorvâncias a 520 e 700 nm das amostras diluídos nas soluções tampão pH 1,0 e 4,5 e os cálculos de acordo com a equação 4.

$$AM = AT - \left[ \frac{(Abs_{520} - Abs_{700})_{pH4,5} * 10^3 * PM * fd}{\epsilon} \right] * 100 \quad (4)$$

Onde:

AM são as antocianinas monoméricas expressas em mg de cianidina-3- glucosídeo, antocianina majoritária, presentes em 100g de amostra.

AT são as antocianinas totais expressas em mg da antocianina predominante em 100g de amostra;

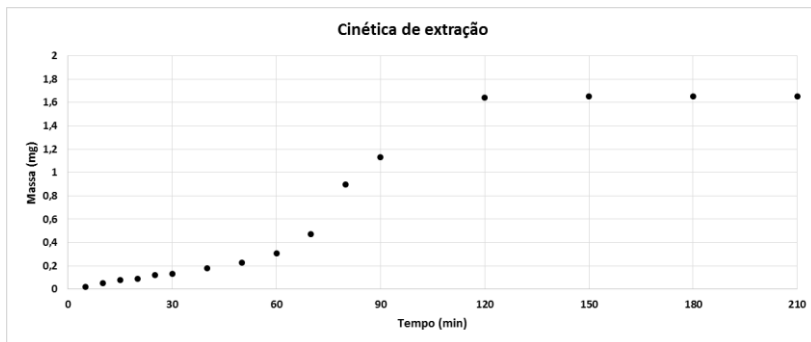
(Abs520 e Abs700) pH 4,5 são as absorvâncias lidas da solução em pH 4,5 nos comprimentos de onda 520 e 700 nm, respectivamente.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

De acordo com Sovová (1994) a curva típica de extração é caracterizada por três fases distintas: uma para o tempo inicial, quando ocorre a transferência apenas do soluto exposto (predomínio da transferência de massa ocorre devido a convecção na fase fluida), a segunda para o tempo intermediário, onde tanto o soluto exposto como uma porção contida nas células se transferem (os efeitos convectivos na fase fluida quanto os difusionais na fase sólida determinam a velocidade de extração) e, finalmente, uma terceira para o período final em que apenas o soluto do interior das células se transfere (predomínio do fenômeno difusivo no sólido).

Percebe-se (Figura 10) que nos 60 minutos iniciais de extração houve pouco araste de extrato e, conseqüentemente um baixo rendimento da extração. Isso pode ser explicado por existir uma fase de equilíbrio entre o CO<sub>2</sub> e o material vegetal. E, é possível constatar que após um período de 150 minutos a quantidade de extrato obtido da casca de jabuticaba (15 g) é constante. Tendo em vista que, após este período, tem-se um gasto energético adicional sem obter quantidades consideráveis de extrato, tomou-se este como o tempo padrão. Fixou-se a variável tempo, a fim de garantir que a etapa de difusão fosse alcançada, reafirmando que tempos maiores de processo não apresentaram um incremento considerável na massa de extrato obtida.



**Figura 10:** Cinética de extração a 150 bar e 35 °C.

## 4.2 RENDIMENTO

Os rendimentos da extração supercrítica de compostos fenólicos da casca de jabuticaba são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Rendimento global em extratos obtidos em diferentes condições de SFE com CO<sub>2</sub> supercrítico de cascas de jabuticabas.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
100	35	0,1625
100	55	0,3308
200	45	0,4249
200	45	0,4265
200	45	0,3141
300	35	0,4433
300	55	0,4882
100 *	55	4,5208

\*Extração com uso de cossolvente.

Pode-se observar que quando se aumenta a pressão à temperatura constante ocorre um aumento da taxa de extração em todas as etapas do processo, conforme esperado, devido ao aumento da densidade (e poder de solvatação) do CO<sub>2</sub> supercrítico (YAMINI et al., 2002). Desta forma para as maiores pressões temos os maiores rendimentos. Isso pode ser explicado pelo fato que com o aumento da pressão em temperatura constante, aumenta a densidade, condutividade



térmica e a viscosidade do CO<sub>2</sub> extraíndo uma maior variedade de compostos, não somente o composto desejado. Outro fator que pode influenciar em maior rendimento em pressões mais altas é o fato que em pressões mais elevadas favorecem a liberação do soluto do interior da partícula.

Michielin et al. (2001), estudando a SFE de cavalinha observaram que a região da inversão das isotermas se encontra entre 120 e 150 bar, onde a 120 bar houve a predominância do efeito da densidade na solubilização da oleoresina e de 150 a 250 bar o principal efeito foi o da pressão de vapor, ou seja, a 120 bar o aumento da temperatura de 30 °C para 40 °C indicou a redução do rendimento, enquanto que acima de 150 bar observou-se um aumento de rendimento com a mesma variação de temperatura.

A SFE a 100 bar, 55 °C e com uso de 5% (v/v) de etanol PA como cossolvente teve rendimento de 4,52 %, quase dez vezes maior que o melhor rendimento de SFE sem cossolvente. Resultado que indica a influência da polaridade dos solventes nos rendimentos dos extratos obtidos uma vez que a matriz vegetal em questão é rica em compostos polares como ácidos fenólicos e flavonóides (REYNERTSON *et al.*, 2008). E para a extração de certas classes de composto, um cossolvente é freqüentemente usado com o CO<sub>2</sub> para aumentar sua polaridade e logo seu poder solvente.

O rendimento elevado com o uso de etanol PA também foi percebido por outros autores. CHANG *et al* (2000) extraíram óleo essencial de chá verde comercial com dióxido de carbono adicionando como cossolventes água e etanol, concluindo que o etanol a 95% resulta em rendimento quatro vezes maior comparado à adição de água como cossolvente. WANG *et al* (2001) realizaram extração supercrítica com dióxido de carbono em raízes de ginseng, adicionando etanol 6% (molar) como cossolvente, obtendo maior rendimento em relação à extração com dióxido de carbono puro.

Braga (2005) concluiu que o dióxido de carbono possui pouca habilidade para dissolver moléculas polares mesmo em condições de altas densidades, porém esta característica pode ser modificada pela adição de pequenas quantidades de substâncias polares, tais como água e etanol.

O uso de cossolvente eleva a densidade da mistura, o que aumenta as interações físicas dipolo/dipolo, dipolo/dipolo induzido e dipolo induzido/dipolo induzido e, conseqüentemente, o poder de extração e solvatação do CO<sub>2</sub> supercrítico. As interações químicas também aumentam com o uso de cossolvente, pois as moléculas dos

álcoois utilizados podem formar ligações como as pontes de hidrogênio (KOPACK, 2005). Os cossolventes aumentam o rendimento e alteram a seletividade do processo com a mudança das características do solvente. A polaridade e interações específicas com o soluto, como pontes de hidrogênio, favorece a interação com sítios ativos da matriz sólida, a qual aumenta a capacidade do CO<sub>2</sub> de extrair eficientemente os compostos desejados (DÍAZ-REINOSO et al.2006).

No caso da extração sem o uso de cossolvente, o maior rendimento não indica o maior conteúdo de fenólicos totais e de atividade antioxidante como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8.

### 4.3 FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais observado nas diferentes condições de extração são apresentados na Tabela 7. O melhor resultado encontrado foi nas condições de 100 bar. Percebe-se que com o aumento da pressão houve uma redução no conteúdo de fenólicos totais conforme Figura 11. Também é possível perceber a influência da temperatura na extração. Nos ensaios com temperaturas de 35 °C o conteúdo de fenólicos totais foi maior se comparado as extrações a 55 °C, indicando degradação térmica dos compostos em estudo.

**Tabela 7:** Conteúdo de fenólicos totais de extrato de SFE de casca de jabuticaba em diferentes condições de extração.

<b>Pressão (bar)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>mgGAE/g</b>
100	35	235 ± 2,31
100	55	204 ± 5,05
200	45	175 ± 6,25
200	45	174 ± 2,50
200	45	171 ± 6,29
300	35	85 ± 2,60
300	55	84 ± 4,51
100*	55	536 ± 5,0

\*Extração com uso de cossolvente.

Uma possível explicação para este comportamento é a proximidade do ponto crítico na temperatura de 30°C onde pequenas alterações nas condições de operação provocam grandes variações na

densidade do solvente, e conseqüentemente nos valores de solubilidade e rendimento.

Resultado semelhante foi encontrado por Meireles (2011), que observou que o aumento da pressão (100-300 bar) do sistema proporcionou um aumento e, subseqüentemente, uma diminuição na concentração de compostos antioxidantes presentes nos extratos supercríticos em ambas as temperaturas. Este fenômeno indica a alta susceptibilidade da solubilidade de compostos antioxidantes para a densidade, umidade e pressão de vapor do sistema.

No entanto, ambas as condições de pressão e temperatura tiveram grande influência sobre a recuperação de compostos antioxidantes. Ao contrário, para o rendimento global, um aumento na temperatura e pressão resultou numa diminuição da recuperação do composto antioxidante. Isto é provavelmente devido ao fato de que a maioria destes compostos antioxidantes, como a vitamina C, polifenóis e antocianinas, são instáveis e altamente susceptíveis a degradação térmica (CAVALCANTI, 2013).

Em estudos com vinhos, Corrales, Butz e Tauscher (2008) tiveram uma percepção semelhante, o aumento da temperatura ou da pressão aumentou a degradação de antocianinas e formação de produtos de condensação em vinhos que contribuíram para a cor, características organolépticas e alterações nutricionais (perda de capacidade antioxidante).

A análise de regressão foi realizada com os dados experimentais e os coeficientes do modelo foram avaliados para a significância ( $p < 0,05$ ). A análise de regressão dos dados mostrou que a recuperação de compostos fenólicos foi significativamente ( $p < 0,05$ ) afetada pela pressão, temperatura e sua interação. A relação do teor de fenólicos, pressão e temperatura de extração é representada na Figura 11 e foi linear com valor de  $R^2$  de 0,959.

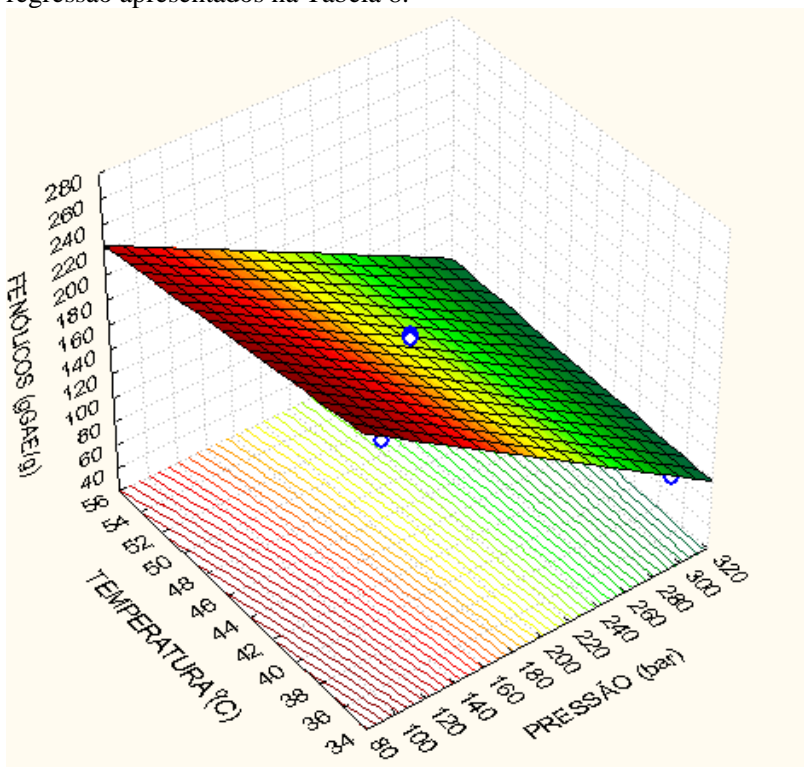
A relação entre as variáveis de processo e o teor de compostos fenólicos (MgGAE/g) é apresentada na equação 5, omitindo todos os coeficientes de regressão que foram insignificantes.

$$Y = 398,2518 - 1,0054 * X_1 - 2,2575 * X_2 + 0,0073 * X_1 * X_2 \quad (5)$$

**Tabela 8:** Coeficientes de regressão do modelo para as variáveis de resposta.

Factor	Regression coefficients	Std.Err.
Mean	398,2518	83,4100
(1)PRESSÃO (bar)	-1,0054	0,3737
(2)TEMPERATURA (°C)	-2,2575	1,8130
1 by 2	0,0073	0,0081

Em que Y é o teor de compostos fenólicos no extrato de cascas de jabuticaba,  $X_1$  é a pressão de extração (Bar),  $X_2$  é a temperatura de extração (°C). A equação foi baseado nos dados de coeficientes de regressão apresentados na Tabela 8.

**Figura 11:** Superfícies de resposta tridimensional da influência da pressão e da temperatura sobre a extração de compostos fenólicos.

Reynertson *et al.* (2008) investigaram os compostos fenólicos totais da fruta jabuticaba e encontraram o valor de 31,6 mgGAE/g de fruta. Como a maior parte da fruta é polpa que é muito rica em água, o resultado ficou abaixo do encontrado neste trabalho, que investigou cascas de jabuticabas desidratadas, com 20 % de umidade. Reynertson *et al.* (2008) também estudaram a composição de compostos fenólicos de 14 espécies de frutas do gênero *Myrtaceae* via extração com leito agitado associado com ultrassom obtendo 2,78 mg EAG/g de matéria-prima seca. Santos *et al.* (2010) avaliaram a composição e os custos dos extratos obtidos a partir da casca de jabuticaba pelos métodos de extração ABE (Extração por Leito Agitado), UAE (Extração Assistida por Ultrassom) e ABE + UAE alcançando teores de compostos fenólicos de cerca de 23, 26 e 34 mg EAG/g de matéria-prima seca, respectivamente. Santos e Meireles (2011) estudaram a otimização da extração de compostos bioativos a partir da casca de jabuticaba utilizando dióxido de carbono a alta pressão obtendo rendimento máximo 14,4 mgGAE/g material seco a 80°C e 135 bar.

Na extração com o uso de cossolventes o conteúdo de fenólicos totais encontrado foi de  $536 \pm 5,0$  mgGAE/g, valor bem acima dos valores encontrados nos extratos usando SFE sem cossolvente do presente trabalho e dos demais autores citados acima. O dióxido de carbono como fluido supercrítico, é um solvente com alta eficiência na extração de óleo devido a sua natureza apolar, extraindo eficientemente compostos bioativos apolares, como misturas complexas de óleo essencial, ésteres, terpenos, ácidos graxos, ceras, resinas e pigmentos naturais. A extração dos compostos bioativos polares pode ser obtida adicionando pequenas quantidades de outros solventes (cossolventes), por exemplo, etanol.

O fato do CO<sub>2</sub> ser apolar indica que o uso de concentrações de cossolvente (5%) propiciaram maiores teores de compostos fenólicos nos extratos. Este comportamento já era esperado, pois o etanol atua como modificador de polaridade e sendo mais polar que o CO<sub>2</sub>, favorece a extração destes compostos, os quais têm características polares, diferentemente, do óleo.

Cavalcanti (2013), verificou que os rendimentos máximos na SFE de casca de jabuticaba foram obtidos a 60 °C utilizando o cossolvente etanol. A 100 bar encontrou 31 mgGAE/g e a 200 bar conseguiu 75 mg GAE/g.

#### 4.4 ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS

O teor de antocianinas monoméricas totais foi determinado para três blends diferentes de extratos, devido à pouca quantidade de amostras para a análise. A primeira amostra continha apenas o extrato da SFE com uso de cossolvente, a segunda amostra continha a misturas dos extratos das SFE a 100 bar e a terceira amostra continha um blend com os demais extratos da SFE a 200 e 300 bar. O resultado encontrado é apresentado na Tabela 9.

**Tabela 9:** Conteúdo de antocianinas monoméricas totais para os blends de amostras: (1) amostra da SFE a 100 bar com cossolvente; (2) amostra das SFE a 100 bar; (3) amostras das SFE a 200 e 300 bar.

Amostra	Blend	Antocianinas (mg/100g)
1	Cossolvente	314,05 a
2	100 bar	327,58 a
3	200 e 300 bar	83,93 b

Obs: Resultados das ordens seguidas por letras distintas indicam diferença significativa entre grupos considerando-se cada nível individualmente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O conteúdo de antocianinas totais é bem semelhante para os extratos das SFE a 100 bar e 55 °C com uso de solvente e o blend de extratos das SFE a 100 bar, isso mostra que com o uso de cossolvente é possível aumentar o rendimento da extração de compostos fenólicos totais, porém não há um aumento da extração de antocianinas que é o composto desejado, enquanto que no blend com extratos das SFEs a 200 e 300 bar apresentou menor teor de antocianinas totais.

Os resultados de rendimento de antocianinas monoméricas reportados na literatura são bastante diversos variando não só com os métodos de extração, solventes e condições operacionais utilizados como também com a variedade da matéria-prima, época da colheita e tipos de pré-tratamento da matéria-prima utilizados.

De acordo com Terzi (2002) a jabuticaba apresenta entre 310 e 315 mg de antocianinas por 100 g da fruta, valor considerado alto quando comparado com outras frutas, como a amora (de 261 a 292 mg/100g) e uva (227 a 235mg/100g). Rufino *et al* (2007), utilizando método convencional, obtiveram teor de antocianinas de 4,12 mg/100g de matéria-prima (b.s.). Santos *et al* (2010) avaliaram a otimização de extração de antocianina a partir de casca de jabuticaba utilizando ABE,

UAE, ABE + UAE e Soxhlet. Os teores de antocianinas variaram em torno de 4,5 a 6 mg EC3G/g de matéria-prima seca de acordo com os métodos de extração utilizados. Por outro lado, Terzi (2002) obteve um teor de antocianinas em torno de 314 mg/100g de matéria-prima (b.s.) obtidos por maceração por 24 h em metanol com razão S/F (3:1, v/m) a partir de casca de jabuticaba, valores semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

Os dados recentes mostraram que a principal contribuição para o conteúdo de fenólicos totais de toda a fruta de jabuticaba veio da casca (ABE *et al.*, 2012), o que corrobora os dados presentes. Tem sido relatado que o conteúdo de antocianinas monoméricas em cascas de jabuticaba Sabará eram cerca de 205 e 66 vezes maior do que na polpa e sementes, respectivamente (LIMA *et al.*, 2011).

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O percentual de atividade antioxidante das extrações está apresentado na Tabela 10. A atividade antioxidante é diretamente proporcional ao conteúdo de fenólicos totais. As melhores atividades antioxidantes ( $85 \pm 0,43$  e  $81 \pm 2,56$  %) foram detectadas nas amostras com maiores conteúdos de fenólicos totais ( $235 \pm 2,31$  e  $204 \pm 5,05$  mgGAE/g), enquanto que a menor atividade antioxidante ( $34 \pm 1,42$  %) foi detectada nas amostra com menor conteúdos de fenólicos totais ( $84 \pm 4,51$ mgGAE/g). Como também proposto por Jacobo-Velázquez *et al* (2009).

**Tabela 10:** Atividade antioxidante do extrato de SFE de casca de jabuticaba obtido em diferentes condições de extração.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	DPPH (%)	EC50 (µg/g)
100	35	$85 \pm 0,43$	$55 \pm 0,22$
100	55	$81 \pm 2,56$	$55 \pm 1,13$
200	45	$52 \pm 1,06$	$69 \pm 0,47$
200	45	$50 \pm 0,98$	$70 \pm 0,55$
200	45	$51 \pm 1,02$	$69 \pm 0,77$
300	35	$34 \pm 1,42$	$77 \pm 0,63$
300	55	$56 \pm 1,26$	$66 \pm 0,56$
100*	55	$89 \pm 0,39$	$52 \pm 0,17$

A atividade antioxidante dos extratos de SFE sem uso de cossolvente de *Plinia trunciflora* foram maiores quando comparados com a atividade antioxidante de extratos obtidos por SFE a pressão intermediária de 200 bar para as temperaturas 50 e 60 °C, com valores de  $15,31 \pm 0,08$  % e  $EC_{50}$  de  $2,8 \pm 0,9$  mg/mL (CAVALCANTI, 2013). Nesse caso o acréscimo de temperatura teve em geral um efeito negativo (CAVALCANTI, 2013) na atividade antioxidante dos extratos o que provavelmente está relacionado com a degradação térmica de compostos termossensíveis como é o caso de alguns antioxidantes.

Vários estudos têm mostrado que o tratamento com aquecimento pode reduzir a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total nos extratos (CHAN *et al.*, 2009). A utilização de extração com fluido supercrítico (SFE) pode reduzir significativamente os problemas relacionados com a degradação térmica dos compostos (PRONYK; MAZZA, 2009), e facilita a recuperação do solvente devido à volatilidade do fluido.

Outros estudos apresentam a atividade antioxidante de extrações com uso de solventes e processos convencionais. Kuhn (2014) verificou a atividade antioxidante de cascas de jabuticaba em extrato hidroalcoólico 70% ( $95,20 \pm 0,21$  %), extrato etanólico 99% ( $93,10 \pm 0,43$  %) e pelo extrato aquoso ( $92,30 \pm 0,78$  %). Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo com a SFE a 100 bar, 55 °C e com etanol PA ( $89,74 \pm 0,39$  %), sendo que em extrações convencionais ou com uso de cossolventes orgânicos há tendência de maior extração de compostos antioxidantes pelo fato do composto em estudo ser polar e os solventes etanol e água também. Também é possível verificar que com o uso de cossolventes houve uma maior extração de compostos fenólicos ( $536,8 \pm 5,0$  mgGAE/g), porém nem todos esses compostos apresentam atividade antioxidante.

Outra forma de mensurar a atividade antioxidante é pela concentração efetiva ( $EC_{50}$  – *effective concentration*), é definida como a concentração de extrato ou amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial da solução controle do radical DPPH. Dessa maneira, quanto menor os valores de  $EC_{50}$  maiores são os valores de atividade antioxidante de forma que o percentual de atividade antioxidante (AA) e  $EC_{50}$  são inversamente proporcionais.

Os melhores resultados encontrados de concentração do extrato SFE de casca jabuticaba para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 %, foi de  $55,04 \pm 0,22$  e  $55,39 \pm 1,13$  µg/g, nas condições de extração a 100 bar a 35 °C e 55 °C, respectivamente. Enquanto para a extração com uso de etanol 95% como cossolvente o  $EC_{50}$  foi de 52,97



$\pm 0,17 \mu\text{g/g}$ , valores inferiores ao encontrado em extratos etanólico 99% de *Plinia trunciflora* ( $\text{EC}_{50} = 93,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ ) (KUHN, 2014), cupuaçu ( $\text{EC}_{50} = 177,0 \pm 12 \mu\text{g/g}$ ) e manga ( $\text{EC}_{50} = 145,0 \pm 20 \mu\text{g/g}$ ) (EINBOND *et al.*, 2004). Porém, esse valor é superior se comparado a extrato hidroalcoólico 70% de *Plinia trunciflora* ( $\text{EC}_{50} = 24,79 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ ) (KUHN, 2014).



## 5 CONCLUSÃO

O aumento da pressão e da temperatura apresentaram efeito negativo na extração de compostos fenólicos e antocianinas. Tanto o aumento da temperatura quanto da pressão resultou em uma extração menor de compostos fenólicos e antioxidantes. Já o uso de cossolvente resultou na extração de uma gama maior de compostos fenólicos, porém com baixa extração de antocianinas, que para o processo em estudo não é bom, pois deseja-se extrair antocianinas com elevado grau de pureza.

O melhor rendimento encontrado na SFE sem cossolvente foi 0,48% nas condições de 300 bar e 55 °C, enquanto que com o uso de cossolvente a 100 bar e 55 °C com o rendimento foi de 4,52 %. Os melhores resultados para conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram percebidos a 100 bar, sendo  $204,7 \pm 5,05$  mgGAE/g na temperatura de 35 °C e  $235 \pm 2,31$  mgGAE/g a 55 °C para conteúdo de fenólicos totais e  $85 \pm 0,43$  % na temperatura de 35 °C e  $81 \pm 2,56$  % a 55 °C para atividade antioxidante. Com o uso de cossolvente houve uma maior extração de compostos fenólicos ( $536 \pm 5,0$  mgGAE/g) e conseqüentemente, maior atividade antioxidante EC50 52,97, porém não houve aumento da extração de antocianinas, o composto de interesse.

Os resultados obtidos indicam que as melhores condições de extração supercrítica de antocianinas de casca de jaboticaba são 100 bar, apesar do baixo rendimento em extrato nessas condições.

Os resultados encontrados indicam que para a extração de antocianinas de casca de jaboticaba utilizando a tecnologia supercrítica em escala industrial, o uso de cossolvente não é interessante pois não apresenta aumento na extração de antocianinas, além do composto extraído apresentar traços de solvente.



## 6 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para a continuidade deste trabalho podem ser destacados os seguintes itens:

- Purificação e quantificação das antocianinas presentes no extrato por técnicas cromatográficas;
- Estudar a estabilidade das antocianinas por técnicas de encapsulamento e secagem;
- Estudar a influência de parâmetros operacionais, como vazão de solvente e diâmetro de partícula no rendimento da extração;
- Avaliar propostas de aumento de escala e viabilidade econômica de processo de SFE para obtenção de antocianinas da casca de jaboticaba em escala industrial.
- Desenvolvimento de um produto alimentício com a aplicação de antocianinas extraídas da casca de jaboticaba.



## 7 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. Rio de Janeiro: Globo, 1988, 203 p.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127, 183–198, 2002.
- ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: teoria e prática*. 2.ed., Viçosa, ed. UFV cap.17, p.374-375, 1999.
- ARBOS, K. A.; VILLAS-BOAS, L. B.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de diferentes técnicas de cultivo sobre o potencial antioxidante de crucíferas. **Alimentos e Nutrição**, 15 (1), 55-61, 2004.
- ATKINS, P. K. *Físico-Química – Fundamentos*, 3. Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003.
- AZEVEDO, A. B. A. *et al.* Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 25, p. 543-552, 2008.
- BADALYAN, A. G.; WILKIRSON, G. T.; CHUN, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. *Journal of Supercritical Fluids*, 13, 319–324, 1998.
- BARNES, J.S.; NGUYEN, H.P.; SHEN, S.; SCHUG, K.A.. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, 2009, p. 4728–4735.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.; *Química de processamento de alimentos*, Varela: São Paulo, 3ª ed., 2001.

BRAGA, M. E. M. Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. Campinas, SP, 2005.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BROGLE, H. CO<sub>2</sub> as a Solvente: its properties and applications. **Chemistry and Industry**. 385-390, 1982.

BROUILLARD, R. Anthocyanins as food colors; Markakis, P., ed.; Academic Press: New York, 1982, cap. 1.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, 2011, p. 499-509.

CAVALCANTI, R.N. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from pomegranate (*Punica Referências Bibliográficas* 160 granatum L.) leaves: chemical composition, economic evaluation and chemometric approach. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 3, 2012, p. 282-294.

CAVALCANTI, R.N. Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. Campinas, SP. 2013.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effect of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**, 113, 166-172, 2009.

CHANG, C. J.; CHIU, K.; CHEN. Y.; CHANG, C. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**. Analytical, Nutrition and Clinical Methods Section. p. 109-113, 2000.



COLANTUONI, A., BERTUGLIA, S., MAGISTETTI, M. J., DONATO, L. Effects of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on arterial vasomotion. **Arzneimittelforschung**, v. 41, 1991, p. 905–909.

CORRÊA, N. C. F.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F. Mass Transfer Modeling Supercritical Extraction from Solid Material. In: Proceedings of the 2 International Meeting on High Pressure Chemical Engineering. Hamburg, Germany, CD-ROM, 2001.

CORRALES, M., BUTZ, P., & TAUSCHER, B. (2008). Anthocyanin condensation reactions under high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 110, 627–635.

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

DANH, L. T. *et al.* Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of Vetiveria zizanoides essential oil. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 155, p. 617-626, 2009.

DANIELSKI, L.; SILVA, L. M. A.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. Solubility of marigold oilresin (*Calendula officinalis*) in high pressure CO<sub>2</sub>. IV Encontro Brasileiro sobre Fluidos Supercrítico – IV EBFS 2001(a). Salvador, Bahia, de 9 à 11 de setembro de 2001(a), CD-ROM, v.1: 393-398.

DEBENEDETTI, P. G. & REID, R. C. Diffusion and mass transfer in supercritical fluids. **AIChE Journal**. v.32, n.12, p.2034-2046, 1986.

DIEHL, L. C. S.; **Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico**. 2008. 284f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; DUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, 2004, p. 23-28.

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

FERREIRA, S. R. S.; Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

FERREIRA, S. R. S.; DANIELKI, L.; MICHIELIN, E. Z. Determination of field horsetail oilresin (*Equisetum arvense*) solubility in supercritical carbon dioxide. ENPROMER, Santa Fé-Argentina, 2001.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**. v.14, p. 235-245, 1999.

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

GIACOMETTI, D.; LLERAS, E. In: J. E. H. Bermejo, J. Leon, (Org.). *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. Rome: FAO, 1994, pp 229-237.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit. F1.2.1-13.

HAGIWARA, A. *et al.* Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4, 5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, 2001, p. 17-25.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical research Communications**, 9 (1), 1-32, 1990.

HAMBURGUER, M.; BAUMANN, D.; ADLER, S. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants - effects of high pressure added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, v. 15, p. 46-54, 2004.

HARBORNE, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*, Chapman and Hall: New York, 1st ed., 1994.

HAYASHI, K. Em *The chemistry of flavonoid compounds*; Geissman, T. A., ed.; The MacMillian Company: New York, 1962, cap. 9.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolismo and struture activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. Stonelam, v. 13. n. 9. p. 573 – 584. Sept. 2002

HIERRO, M. T. G., **Temas Avanzados de Análisis Químicas**. Edinford S. A., Madrid, 1994.

IBRAF - Instituto Brasileiro de frutas. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/>>. Acesso em: 05/09/2016.

ILLÉS, V.; - DAOOD, H. G.; PERNECZKI, S.; SZOKONYA, L.; THEN, M. Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super-and subcritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**. v.17, p.177-186, 2000.

IBAÑEZ, E.; KUBÁTOVÁ, A.; SEÑORÁNS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; HAWTHOME, S. B. Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 375, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS. Disponível em: <<http://ibflorestas.org.br/loja/muda-20a30-jabuticaba-sabara.html>>Acessado em 23/11/2016.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *J. of Food Science*, Hoboken, v. 74, n. 9, p. r107-r113, 2009.

JOCHMANN, A. Extração supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*). Florianópolis, 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, UFSC, 2000.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; I WASHINA, A; NISHINO, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, v. 115, 1997, p. 173 –178.

KONG, J. M. *et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, 2003, p. 923-933.

KOPCAK, U., MOHAMED, R. S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures, *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 209-214, 2005.

KUHN, Fernanda. **Potencial antioxidante da *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel sobre parâmetros de estresse oxidativo em *Rhamdia quelen***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós – Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária da Região de Chapecó. 2014, 69 p.

LEITE-LEGATTI, A.V. *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, *Food Research International* (2012).

LIMA, A. J. B., CORRÊA, A. D., SACZK, A. A., MARTINS, M. P., & CASTILHO, R. O. (2011). Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 877–887.

LIMA, A. J. B. Caracterização e atividade antioxidante da jaboticaba, [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. Lavras: UFLA, 159 p. 2009.

LÓPEZ-SEBASTIÁN, S. *et al.* Dearomatization of Antioxidant Rosemary Extracts by Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, 1998, p. 13-19.

LOU, X., JANSSEN, H. C., CRAMERS, C. A. "Quantitative Aspects of Directly Coupled Supercritical Fluid Extraction - Capillary Gas Chromatography with a Conventional Split/Splitless Injector as Interface" **J. High Resol. Chromatogr.** vol. 16, pg. 425, 1993.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, 1998, p. 1-10.

MCHUGH, M. A., KRUKONIS, V. J. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**; Butterworths Publishers; Boston; MA, pg. 69-78, 1994.

MARRONE, C.; POLETTO, M.; REVERCHON, E.; STASSI, A. Almond oil extraction by supercritical CO<sub>2</sub>: experiments and modelling. **Chemical Engineering Science**. v.53, n.21, p.3711-3718, 1998.

MAUL, A. A., *Fluidos Supercríticos – Situação Atual e Futuro da Extração Supercrítica*, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Ano II, no. 11. Pp. 42-46, 1999.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American plants. In: Jose Martinez. (Org.). **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds**. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, p.243-274, 2011.

MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S.; HENSE, L. Avaliação das variáveis de processo no extrato supercrítico de cavalinha (*Equisetum arvense*), SLACA-IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, São Paulo, 12 à 15 de novembro de 2001, CD-ROM, Livro de Resumos, v.1, p.128.

MORAZZONI, P.; MAGISTRETTI, M. J. Activity of Myrtoctyan, an anthocyanoside complex from *V. myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. **Fitoterapia**, v. 61, 1990, p. 13–21.

MORTON, J. **Fruits of Warm Climates**; Julia Morton: Winterville, NC, 1987, p 386-388.

MOYLER, D. Extraction of Essential Oil with Carbon Dioxide. *Flav. and Fragr. J.*, U.S.A., 8 :235-247, 1993.

PENEDO, P. L. M.; COELHO, G. L. V. PURIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS POR EXTRAÇÃO COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 17 n. 4 Campinas Dec. 1997.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 340-372, 2010.

PEREIRA, M. **Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jabuticabeiras (*Myrciaria spp*)**. Tese (Doutor em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003, 206 p.

PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications: Industrial Development and economic Issues. In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Meeting on High Pressure Chemical Engineering. Hamburg, Germany, CD-ROM, 2001.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**, 95, 215-226, 2009.

RAWSON A., TIWARI B. K. , BRUNTON N., BRENNAN C., CULLEN P. J., O'DONNELL P. Application of Supercritical Carbon Dioxide to Fruit and Vegetables: Extraction, Processing, and Preservation. *Food Reviews International*, v.28, p.253–276, 2012.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D.

Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 1-5. 2008.

REYNERTSON, K. A. *et al.* Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, 2006, p. 1228-1230.

REYNERTSON, K.A., YaNg, H., JIANG, B., BASILE, M.J., KENNELLY, E.J., 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* 109 (4), 883–890.

RIZVI, S. S. H.; DANIELS, J. A.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**. p.57-64. Jul. 1986.

RUFINO *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 127**, Fortaleza, CE, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F. D.; Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*, Barking, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SACCHET, C., MOCELIN, R., SACHETT, A., BEVILAQUA, F., CHITOLINA, R., KUHN, F., BOLIGON, A.A., ATHAYDE, M.L., ROMAN JUNIOR, W.A., ROSEMBERG, D.B., DAL MAGRO, J, CONTERATO, G.M., PIATO, A.L., Antidepressant-like and antioxidant effects of *Plinia trunciflora* in Mice. *Evid Based Complement Alternat. Med.* 2015, 1-9.

SACCHETTITI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621-632, 2005.

SADILOVA, E., CARLE, R., STINTZING, F.C., 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro

antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1461–1471.

SANDLER, I.S. **Chemical and Engineering Thermodynamics**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 622 p.

SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A.A. Optimization of bioactive compounds extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO<sub>2</sub>. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. V. 12, Jul 2011, Pag. 398–406.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of antioxidant compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, 2010, p. 23-31.

SARMENTO, C. M. P., HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. Extraction and fractionation of rice bran oil using supercritical extraction. IV Encontro Brasileiro sobre Fluidos Supercrítico – IV EBFS 2001, Salvador, Bahia, v.1, p.468-474, 2001.

SHAHID, F. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications**. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1995, 321 p.

SILVA, F. P. T.; LIBERAL, E. M.; PESSOA, F. L. P. Uso do fluido supercrítico na extração de produtos naturais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos- SBCTA**. v.31, p.48-61, jan/jun, 1997.

SINGLETON, V. L, ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144, 1999.

SINKO, P. J. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 5. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.;



BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30, 351-355, 2007.

SOVOVÁ, H., Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modelling of extraction curves. *Chem. Eng. Science* 49, 409, 1994.

STRINGHETA, P. C.; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1991.

TAYLOR, L. T., *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons, Inc., USA, 1996.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V.; *Quim. Nova* 2002, 25, 685.

YAMINI, Y.; ASGHARI-KHIAVI, M.; BAHRAMIFAR, N. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets, *Talanta*, n°58, p.1003-1010, 2002.

YODA, S. K. Estudo da Cinética de Extração dos Glicosídeos da Stévia rebaudian Bertoni Com Mistura CO<sub>2</sub>+Água. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2001.

YOUDIM, K. A., MCDONALD, J., KALT, W., JOSEPH, J. A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, 2002, p. 282–288.

WANG, C. J. *et al.* Protective effect of Hibiscus Anthocyanins Against tert-butyl Hydroperoxide-induced Hepatic Toxicity in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, 2000, p. 411-416.

WANG, H.; CHEN, C.; CHANG, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. **Food Chemistry**. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section.72, 505-509, 2001.

WHALEN, P. J. *et al.* Measurements of extrusion effects by viscosity profile using the rapid viscoanalyser. **Cereal Foods World**, v. 42, n. 6, 1997, p. 469-475.

ZANATTA, C. F. *et al.* Determination of anthocyanins from camucamu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, 2005, p. 9531-9535.

ZETZEL, C., MEIRELES, M. A. A., BRUNNER, G. Standardized Lowcost batch SFE-Units for University Education and Comparative Research. Versailles, France, *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, 2003.