

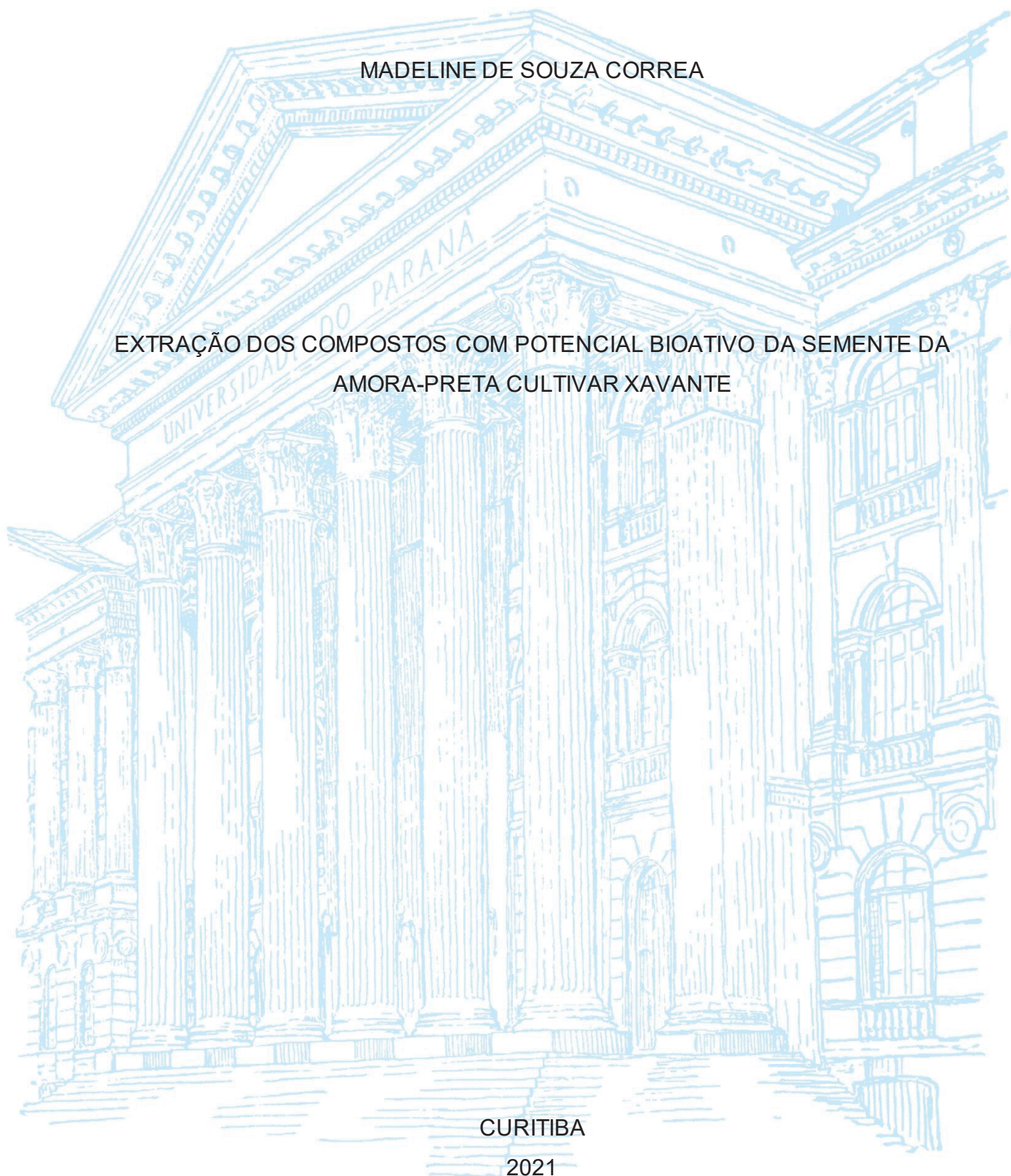
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MADELINE DE SOUZA CORREA

EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOATIVO DA SEMENTE DA
AMORA-PRETA CULTIVAR XAVANTE

CURITIBA

2021



MADELINE DE SOUZA CORREA

EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOATIVO DA SEMENTE DA
AMORA-PRETA CULTIVAR XAVANTE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani

Coorientadora: Profa. Dra. Agnes de Paula Scheer

CURITIBA

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE – SIBI/UFPR

C824e

Correa, Madeline de Souza

Extração dos compostos com potencial bioativo da semente da amora-preta cultivar xavante [recurso eletrônico]/ Madeline de Souza Correa – CURITIBA, 2021.

Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani

Coorientadora: Profa. Dra. Agnes de Paula Scheer

1. Tecnologia de alimento. 2. Amora. 3. Cobre. I. Ribani, Rosemary Hoffmann. II. Scheer, Agnes de Paula. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 664

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MADLINE DE SOUZA CORREA** intitulada: **EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOATIVO DA SEMENTE DA AMORA-PRETA CULTIVAR XAVANTE**, sob orientação da Profa. Dra. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

15/12/2021 15:09:36,0

ROSEMARY HOFFMANN RIBANI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/01/2022 12:24:51,0

ELTON FRANCESCHI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TIRADENTES)

Assinatura Eletrônica

15/12/2021 15:09:46,0

LUÍS RICARDO SHIGUEYUKI KANDA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/12/2021 14:19:42,0

ROBERTA LETICIA KRUGER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

16/12/2021 08:39:53,0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 135636

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 135636

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria
pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora e meu anjo da guarda por sempre me iluminarem nos meus momentos de aflições.

Meu irmão, Luiz Henrique por sempre tentar me acalmar, mesmo de longe, me mandando foto dos nossos 6 gatos e quando perto cozinhando boas comidas, assistindo filmes e séries comigo.

Ao Meu irmão, Wyllian, que mesmo muito distante sempre me apoiou e quando podia me visitar sempre me divertia. Além de junto com a Ângela colocarem a Lila no mundo e me fazerem uma tia babona.

Ao meu pai, por sempre me ajudar quando eu precisei.

À Profa. Rose, minha orientadora, que aceitou me orientar quando eu estava sem rumo e desacreditada. No entanto, pouco a pouco com a sua ajuda a gente foi construído esse trabalho. Agora no fim, vejo que conseguimos realizar muito daquela nossa expectativa inicial, mesmo com os contratempos de conseguir certas análises e minhas próprias dificuldades. Agradeço muito toda a sua dedicação, paciência e compreensão, principalmente quando eu mais precisei.

À Profa. Agnes, que no final da tarde daquela última sexta-feira de setembro de 2016, sem nem me conhecer, eu praticamente não dei escolha a ela a não ser aceitar me orientar, mesmo ela falando que iria se aposentar. Então, depois de um tempo ela teve que ficar como coorientadora, pensando que eu iria deixá-la em paz na aposentadoria. Que engano, eu jamais terminaria esse trabalho sem ela. Antes de conhecê-la todo mundo me falava que ela tinha muita classe, do tipo calma e educada. Mas, ela é mais, é uma pessoa com enorme empatia e coração, só com um olhar ela já sabia que algo estava errado e com gentileza ela me ajudava a encontrar uma solução, tudo entrava nos eixos e nunca desistiu de mim. Não consigo expressar em palavras o quanto sou grata.

Ao Prof. Marcos Corazza, o “*silent partner*” na orientação, agradeço toda a estrutura, apoio, paciência e confiança que foram essenciais para a realização de todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho do departamento de Agronomia da UNICENTRO, pela sua imensa generosidade em fornecer as amostras da amora-preta Xavante.

Às queridas amigas professoras do DEALI da UNICENTRO Michele Mesomo e Roberta Kruger, agradeço o apoio durante toda a minha trajetória e por disponibilizarem o suporte para armazenamento e secagem das amostras.

Ao Prof. Paulo R. P. Rodrigues do departamento de química da UNICENTRO e suas alunas Dra. Nayara L. Boschen e Débora Pelegrini pelo suporte em análises.

Ao Prof. Haroldo Ponte do DEQ da UFPR e sua aluna Dra. Renata B. Guimarães Valt, pelo suporte em análises.

Aos técnicos e pessoal dos laboratórios pela ajuda em análises e conversas: Patrícia, Andreia e Rafael da Central Analítica; a Aline do Lacta por participar da novela chamada propano; Walderson por sempre me emprestar as peneiras; Vanderlei por me emprestar o moinho de café; a Dani Zelinski pelas mil e uma ajudas, o Jorge pela ajuda em projetos de engenharia de baixo orçamento e o Thiago da Química peço desculpas por sujar a coluna.

Às minhas amigas desde o mestrado que já terminaram o doutorado há séculos, mas ainda me aguentam: Dani Olegário, já me ajudou absolutamente em tudo; Mônica Ikeda que até o pai dela me adotou, e agora eu tenho irmãos e casa na praia e a Bel a única responsável do grupo.

Aos amigos do EMULTEC, que me aguentaram com bastante paciência e sempre que precisei ficaram do meu lado: Aline, Gi, Ge, Klayton, Bruno, Sheila e o Paulo Kirnev (agregado). E em especial a Luiza, que me aguentou ainda mais me dando casa, comida e avisando sobre promoções e coisas grátis.

Aos amigos do BIOATIVOS, Dani Carpiné e Fillemon que sempre me ajudaram nas coisas mais sérias. Já o Bruno, Igor e Anely me ajudaram nas sérias, mas as bobagens superam.

Aos amigos do LACTA, Fabi Harneski, L.R.S. Kanda e Damian, pela amizade e pela paciência de me aguentarem e ajudarem.

Aos meus amigos de outros laboratórios ou fora de qualquer laboratório: Raquel Rossetto, obrigada por ser minha amiga; Thalles Andrade, com você eu nunca deixo de rir; Lay e João, os melhores vizinhos da vida e Luca Erdmann, favor pagar as cervejas que me deve por ler seus trabalhos.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado cada período da minha vida, inclusive esse, mesmo sem entender o que eu estava fazendo, meu profundo

obrigada, Danielli Pontarollo, Carolina Telles, Luciana Grande, Ewerton Mores e Claudio Lourenço.

À UFPR, ao PPGEAL e à CAPES pela oportunidade, suporte e apoio financeiro.

“All have their worth and each contributes to the worth of the others.”

(J.R.R. Tolkien, *The Silmarillion*, 1977, p.35)

RESUMO

A amora-preta (*Rubus spp.*) pertence ao grupo de frutos denominados *berries* e é reconhecida pela sua composição rica em compostos benéficos à saúde, como, principalmente seus flavonoides, como antocianinas. Quando processada, geralmente, gera subprodutos, compostos basicamente de sementes e casca. O estudo relata a extração por Soxhlet, subcrítica e supercrítica, com diferentes solventes, dos compostos bioativos da amora-preta orgânica, cultivar Xavante, presentes na semente. Solventes de diferentes polaridades foram utilizados e o trabalho foi dividido entre os óleos obtidos, utilizando os solventes fortemente apolares e os extratos obtidos com CO₂ e etanol como cossolvente. Os óleos foram obtidos utilizando hexano, éter de petróleo, CO₂ supercrítico (scCO₂) e propano comprimido. O propano apresentou taxa de extração, rendimento de extração, conteúdo de β -caroteno e estabilidade térmica maiores que as extração com scCO₂. Entretanto, o scCO₂ foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método ABTS. O conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) dos óleos extraídos foi superior a 70 %, composto essencialmente por ácido linoleico. O etanol foi escolhido como cossolvente nas extrações com CO₂ para aumentar o potencial de extração de compostos bioativos das sementes com características polares. A extração nas condições de maior pressão e temperatura estudadas apresentou os melhores resultados para rendimento de extração, conteúdo de fenólicos totais e todos os outros ensaios antioxidantes, ABTS, FRAP e DPPH. Este extrato otimizado apresentou elevado conteúdo de rutina na sua composição, alta estabilidade térmica, teor de PUFAs e ácido linoleico semelhante aos obtidos nos óleos estudados e potencial de proteção contra a oxidação do óleo de soja pelo método Rancimant superior aos antioxidantes sintéticos BHA e BHT. Diante dos resultados, tanto os óleos como os extratos obtidos das sementes da amora-preta apresentam elevado potencial de aplicação tecnológica na formulação de produtos alimentícios, fármacos e cosméticos.

Palavras-chave: *Berries*. Subproduto. CO₂. Ácido linoleico. Rutina.

ABSTRACT

The blackberry (*Rubus spp.*) belongs to the group of fruits known as berries and is recognized for being rich in compounds beneficial to health, mainly flavonoids, such as anthocyanins. This study reports the Soxhlet, subcritical and supercritical extractions, with different solvents, of bioactive compounds of organic blackberry seeds, Xavante cultivar. Solvents with different polarities were used and the work was divided between the oils obtained using the strongly apolar solvents and the extracts obtained with CO₂ and ethanol as a cosolvent. The oils were obtained using hexane, petroleum ether, supercritical CO₂ (scCO₂) and compressed propane. Propane showed higher extraction rate, extraction yield, β -carotene content and thermal stability than extractions with scCO₂. However, scCO₂ was more efficient in extracting total phenolic compounds and antioxidant activity by ABTS method. The polyunsaturated fatty acid content (PUFAs) of the extracted oils was higher than 70 %, composed mainly of linoleic acid. Ethanol was chosen as a cosolvent in the CO₂ extractions to increase the potential for extraction of bioactive compounds with polar characteristics from the seeds. The extraction at the highest pressure and temperature conditions studied showed the best results of extraction yield, total phenolic content, and all other antioxidant assays, ABTS, FRAP and DPPH. This optimized extract showed high rutin content in their composition, high thermal stability, PUFAs and linoleic acid content similar to those obtained in the oils studied, and protection factor against soybean oil oxidation, by the Rancimant method, was higher than synthetic antioxidants BHA and BHT. In view of the results, both the oils and the extracts obtained from the blackberry seeds have a high potential of technological application in the formulation of food products, pharmaceuticals and cosmetics.

Keywords: Berries. By-product. CO₂. Linoleic acid. Rutin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Cultivo de amora-preta cultivar Xavante em Guarapuava - PR.....	20
FIGURA 1.2 – Estrutura das principais antocianidinas.....	24
FIGURA 2.1. – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros dos processos no rendimento das extrações usando (a) scCO ₂ e (b) propano comprimido (b).....	40
FIGURA 2.2 – (a) Curvas experimentais de extração para óleo da semente de amora-preta obtidos com scCO ₂ (b) Curvas de solubilidade aparente para óleo da semente de amora-preta obtidos com scCO ₂ . Ensaio 3: 40 °C e 15 MPa; Ensaio 4: 40 °C e 25 MPa; Ensaio 5: 70 °C e 15 MPa, Ensaio 6: 70 °C e 25 MPa; e Ensaio 7: 55 °C e 20 MPa (Ponto central). Para o Ensaio 7, as barras representam o desvio padrão. ...	42
FIGURA 2.3 – (a) Curvas experimentais de extração para óleo da semente de amora-preta obtidos com propano comprimido (b) Curvas de solubilidade aparente para óleo da semente de amora-preta obtidos com propano comprimido. Ensaio 8: 30 °C e 10 MPa; Ensaio 9: 30 °C e 20 MPa; Ensaio 10: 70 °C e 10 MPa, Ensaio 11: 70 °C e 20 MPa; Ensaio 12: 50 °C e 15 MPa (Ponto central) e Ensaio 13: 50 °C e 5,0 MPa. Para o Ensaio 12, as barras representam o desvio padrão.	43
FIGURA 2.4 - Decomposição térmica dos óleos das sementes da amora-preta por TGA 30 a 600 °C. (a) hexano (Ensaio 1), (b) éter de petróleo (Ensaio 2), (c) scCO ₂ (Ensaio 6), e (d) propano (Ensaio 12).....	52
FIGURA 3. 1 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros dos processos no rendimento das extrações usando CO ₂ + EtOH	63
FIGURA 3.2 - Curvas experimentais de extração para os óleos da semente de amora-preta obtidos com CO ₂ + EtOH	63
FIGURA 3.3 - Curvas TG/DTG para o extrato de sementes de amora-preta obtidos com CO ₂ + EtOH ensaio 6.....	71
FIGURA 3.4 - Curva DSC para o extrato de sementes de amora-preta obtidos com CO ₂ + EtOH Ensaio 6.....	72
FIGURA 3.5 - Fator de proteção (FP) para diferentes concentrações de extrato de sementes de amora-preta (ESA) ensaio 6 e antioxidantes sintéticos BHA e BHT adicionados no óleo de soja	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Condições experimentais e rendimentos de extração obtidos para as sementes de amora-preta .	39
TABELA 2.2 - Extrações sequenciais dos resíduos das sementes de amora-preta utilizando Soxhlet após as extrações pressurizadas.	44
TABELA 2.3 - Composição dos ácidos graxos presentes nos óleos das sementes da amora-preta .	46
TABELA 2.4 - Índices de Saponificação e de lodo para os óleos.	47
TABELA 2.5 - Atividade antioxidante para os óleos obtidos da semente da amora-preta por diferentes ensaios.	49
TABELA 2.6 - Dados da decomposição térmica dos óleos de semente de amora-preta obtido a partir das curvas TG/DTG	52
TABELA 3.1 – Condições experimentais e rendimentos de extração obtidos para sementes de amora-preta .	64
TABELA 3.2 - Atividades antioxidante e antocianinas monoméricas totais para os extratos de semente de amora-preta.	67
TABELA 3.3 – Perfil de ácidos graxos e índices de qualidade nutricional lipídica dos extratos de semente de amora-preta.	68
TABELA 3.4 – Perfil de Ácidos fenólicos e flavonoides do extrato, Ensaio 6, da semente de amora-preta	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1 AMORA-PRETA.....	19
1.1 COMPOSTOS DE INTERESSE ENCONTRADOS NO SUBPROTUDO DO PROCESSAMENTO DA AMORA-PRETA.....	22
1.1.1 Óleo da semente.....	22
1.1.2 Outros bioativos.....	22
1.1.2.1 Ácidos fenólicos.....	23
1.1.2.2 Antocianinas.....	24
1.1.2.3 Rutina.....	25
1.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO E OUTROS BIOATIVOS EM SEMENTES DE <i>BERRIES</i>	25
1.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	28
CAPÍTULO II: EXTRAÇÃO DE ÓLEOS DE ALTA QUALIDADE DA SEMENTE DA AMORA-PRETA (<i>RUBUS SPP.</i>) CV XAVANTE UTILIZANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 MATERIAL.....	31
2.2 EXTRAÇÕES COM O APARATO SOXHLET.....	32
2.3 EXTRAÇÕES COM SOLVENTES PRESSURIZADOS.....	33
2.4 EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS COM OS RESÍDUOS DA EXTRAÇÃO PRESSURIZADA.....	34
2.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICES DE SAPONIFICAÇÃO E IODO DOS ÓLEOS.....	34
2.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
2.6.1 Conteúdo de β -caroteno.....	35
2.7 DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA.....	36
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

3.1 MATÉRIA-PRIMA	36
3.2 EXTRAÇÃO POR SOXHLET	37
3.3 EXTRAÇÕES PRESSURIZADAS	37
3.4 EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS COM RESÍDUOS OBTIDOS A PARTIR DAS EXTRAÇÕES PRESSURIZADAS.....	44
3.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICES DE SAPONIFICAÇÃO E IODO 45	
3.6 DIFERENTES ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	47
3.7 DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA	50
4 CONCLUSÃO	53
CAPÍTULO III : OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA SEMENTE DE AMORA-PRETA (<i>RUBUS SPP.</i>) CULTIVAR XAVANTE USANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E ETANOL COMO COSSOLVENTE.....	
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 MATERIAL.....	56
2.2 SELEÇÃO DO COSSOLVENTE.....	56
2.3 EXTRAÇÃO UTILIZANDO SCCO ₂ COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE	57
2.4 ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	57
2.5 ANTOCIANINAS MONOMÉRICA TOTAIS (AMT)	57
2.6 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS E QUALIDADE NUTRICIONAL LIPÍDICA DOS EXTRATOS DE SEMENTES AMORA-PRETA.....	58
2.7 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR UPLC NO EXTRATO OBTIDO NA CONDIÇÃO OTIMIZADA.....	59
2.8 ANÁLISE TÉRMICA DO EXTRATO OBTIDO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS	60
2.9 ANÁLISE DE RANCIMAT	60
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 SELEÇÃO DO COSSOLVENTE.....	61
3.2 EXTRAÇÃO UTILIZANDO SCCO ₂ MAIS COSSOLVENTE.....	61
3.3 ENSAIOS ANTIOXIDANTES E DO TEOR DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS (AMT).....	65

3.4 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E QUALIDADE NUTRICIONAL LIPÍDICA DOS EXTRATOS DE SEMENTES DE AMORA-PRETA.....	66
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS DETERMINADOS POR UPLC DO EXTRATO OBTIDO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS	69
3.6 ANÁLISES TÉRMICAS DO EXTRATO EM CONDIÇÕES ÓTIMAS	70
3.7 ANÁLISE RANCIMAT	72
4 CONCLUSÃO	74
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da amora-preta, no Brasil, está se expandindo desde a introdução de cultivares adaptados ao clima brasileiro pela Embrapa na década de 1970, principalmente nas regiões sul e sudeste. Ele representa uma excelente opção de cultivo, particularmente em pequenas propriedades rurais, devido à sua facilidade de plantio e alta produção.

A amora-preta faz parte de um grupo de frutas chamado *berries*, que têm recebido atenção mundial, devido aos seus nutrientes e quantidade de bioativos. Dentre estes compostos, a amora-preta contém vitaminas, minerais, proteínas, açúcares e polifenóis. Estudos revelam que essa fruta possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral, e efeitos positivos nos lipídios sanguíneos e na aterosclerose.

Os efeitos biológicos da amora-preta sugerem possíveis aplicações na área da saúde humana. Seu consumo, in natura, é dificultado pela sua estrutura frágil e elevada taxa respiratória, o que faz com sua vida pós-colheita seja relativamente curta. Por isso, comercialmente, é vendida na forma congelada, desidratada ou como produtos derivados, tais como, sucos, geleias e sorvetes.

No entanto, geralmente, quando processada a amora gera resíduos sólidos, compostos de sementes e cascas. Esses resíduos ainda possuem compostos importantes, podem ser extraídos e aplicados em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. O óleo presente na semente, pode ser fonte de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e outros componentes bioativos como o β -caroteno, que aumentam suas possíveis propriedades tecnológicas e benefícios à saúde. Além de outros compostos bioativos polares, como ácidos fenólicos e flavonoides encontrados na semente.

A escolha da tecnologia de extração de compostos bioativos é de extrema importância. Algumas técnicas, chamadas “convencionais”, possuem desvantagens, como o uso de grande quantidade de solventes tóxicos, serem demoradas e de baixa seletividade. Por isso, surge a demanda pelas chamadas extrações *green*, como é o caso da extração usando CO₂, no estado supercrítico. Esse tipo de extração já é utilizado para a extração de óleos de sementes de uvas e de outras *berries*, de forma que sua aplicação para as sementes de amora é promissora. Outro solvente estudado para a extração de óleo de sementes é o propano, mas no estado

subcrítico, pois sua temperatura crítica ser considerada alta para a extração de muitos compostos.

A molécula de CO₂ é fortemente apolar, então para que junto da extração da fração lipossolúvel da semente se consiga a extração de compostos bioativos mais polares, também presentes na semente da amora, uma alternativa é a adição de um cossolvente polar como é o caso do etanol, para a obtenção de um extrato rico em compostos com poder antioxidante como ácidos fenólicos e a rutina.

Diante destes fatos, a motivação para este trabalho é o estudo da extração dos compostos com potencial bioativo presentes na semente da amora-preta cultivar Xavante. O trabalho está dividido em capítulos. O Capítulo I correspondente a revisão da literatura sobre os principais tópicos do estudo. O Capítulo II está baseado no conteúdo apresentado no artigo "*Pressurized extraction of high-quality blackberry (*Rubus spp.* Xavante cultivar) seed oils*" publicado no *The Journal of Supercritical Fluids*". O Capítulo III está baseado no artigo sob submissão que trata da Obtenção de extratos da semente de amora-preta (*Rubus spp.*) cultivar Xavante usando dióxido de carbono supercrítico e etanol como cossolvente.

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial dos compostos bioativos dos extratos das sementes da amora-preta cultivar (cv) Xavante.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extratos da semente da amora-preta cv Xavante utilizando diferentes solventes: hexano, éter de petróleo, etanol, acetato de etila, dióxido de carbono supercrítico com e sem adição de etanol como cossolvente e propano comprimido.
- Avaliar o rendimento de extração para os diferentes solventes.
- Determinar a influência das condições de pressão e temperatura nas extrações com fluidos pressurizados sob o rendimento e atividade antioxidante.
- Quantificar a atividade antioxidante por diferentes ensaios de todos os extratos obtidos.

- Determinar o conteúdo e caracterizar os ácidos graxos nos extratos obtidos com todos os solventes estudados.
- Determinar o conteúdo de compostos bioativos como β -caroteno nos óleos e antocianinas monoméricas totais nos extratos obtidos com solventes polares.
- Avaliar a estabilidade térmica dos óleos por termogravimetria.
- Identificar e quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência os compostos fenólicos do extrato obtido com dióxido de carbono e etanol como cossolvente nas condições otimizadas de extração.
- Determinar o comportamento térmico do extrato obtido com dióxido de carbono e etanol como cossolvente na condição ótima de extração por termogravimetria e calorimetria de varredura diferencial.
- Avaliar o fator de proteção antioxidante do extrato otimizado, obtido na extração com dióxido de carbono e etanol, em diferentes concentrações em óleo de soja utilizando o método Rancimat.

CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA

1 AMORA-PRETA

A amora-preta é o fruto da amoreira que é uma espécie de planta arbustiva, de porte ereto ou rasteiro, que produz frutas agregadas com cerca de 4 a 7 gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. Apresenta espinhos nos principais cultivares comerciais, o que exige uma manipulação cuidadosa por parte do operador da colheita com sua integridade física e com a qualidade do fruto. São plantas produzidas em ramos, que após a colheita são eliminados. Enquanto alguns ramos estão produzindo, outras hastes emergem e crescem renovando o material para a próxima produção. O fruto verdadeiro da amoreira é denominado mini drupa ou drupete, onde existe uma pequena semente, sendo que sua junção forma o que se chama de fruto agregado (ANTUNES, 2002).

A amora-preta pertence à família *Rosacea* gênero, *Rubus*. *Rubus* é um grupo muito diversificado e generalizado de plantas. Estima-se que existem entre 400 e 500 espécies individuais de framboesa e amora nas Américas, Europa, norte da África e Ásia (HIDALGO; ALMAJANO, 2017; POLING, 1996)

No Brasil, existem somente cinco espécies de amora nativas: *R. urticaefolius*, *R. erythrocladors*, *R. brasiliensis*, *R. sellowii* e *R. imperialis*. As cultivares de amoreiras existentes no país são resultado de introduções e hibridações de cultivares norte-americanas. O programa para o melhoramento da amora-preta foi iniciado no Brasil na década de 70 pela Embrapa Clima Temperado (ANTUNES; RASSEIRA, 2004).

O cultivar Xavante, FIGURA 1.1, é o primeiro cultivar brasileiro de amoreira preta de porte ereto, hastes vigorosas e sem espinhos. Esse cultivar tem baixa necessidade de frio e boa produção. A floração tem início em setembro, estendendo-se até outubro. Sua maturação é precoce, com a colheita se iniciando em meados de novembro e prolonga-se até janeiro, com necessidade de colheita dos frutos de dois em dois dias. Os frutos possuem forma alongada, firmeza média, sabor doce-ácido, onde predomina a acidez, possui um teor de sólidos solúveis em torno de 8 °Brix, com massa média de cada fruto de 6 g. A sua produtividade comparada com

o cultivar Tupy, mais cultivado do mundo, é muito semelhante (ANTUNES; RASSEIRA, 2004; BOTELHO *et al.*, 2009).

FIGURA 1.1 – Cultivo de amora-preta cultivar Xavante em Guarapuava - PR



FONTE: A autora (2016)

A área plantada de amoreira preta no mundo e no Brasil tem aumentado nas últimas décadas. A produtividade da amoreira preta, no cultivo convencional pode ser superior a 10 t ha⁻¹ (ANTUNES, 2002). A produção relatada do cultivar Xavante, em Guarapuava, Paraná, foi de 3 t ha⁻¹ (BOTELHO *et al.*, 2009).

A amora-preta faz parte da designação chamada de “pequenos frutos” (*small fruits*) que é o termo na literatura internacional para referenciar diversas culturas como a do morango, framboesa, groselha, mirtilo, entre outras. O cultivo desses pequenos frutos se caracteriza pela grande necessidade de mão de obra e pela possibilidade de obtenção de alto retorno econômico. Os pequenos frutos, também são denominados de *berries*, cujo termo vem sendo utilizado para descrever qualquer fruta pequena, de cor vermelha, roxa ou negra de sabor adocicado e forma arredondada (PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 2010).

A maturação da amora-preta pode ser determinada pelos parâmetros de coloração e acidez. A coloração é o parâmetro de qualidade que determina de forma prática o ponto de colheita (PAGOT, 2006). Durante a etapa de amadurecimento, o fruto passa por diversas mudanças de coloração de verde para vermelho e,

finalmente, para preto. Os últimos estádios ocorrem, normalmente, entre um e três dias. Do ponto de vista comercial, os frutos podem ser divididos em três estádios de maturação: “mosqueado”, quando apresentam 50 % da superfície preta, “preto-brilhante”, quando apresentam 100 % da superfície preta e brilho aparente e “preto-opaco”, quando apresentam coloração preta, porém com perda de brilho decorrente do estágio avançado de maturação (PERKINS-VEAZIE; COLLINS; CLARK, 1996).

O estágio de maturação “preto-brilhante” pode ser subdividido em dois outros estádios em função da turgidez da mini drupas e da presença de mini drupas expandidas ou não. De acordo com esses estádios a colheita da amora-preta deve ser realizada quando os frutos atingirem o estágio de maturação “preto-brilhante” e com mini drupas não expandidas. Se a fruta for colhida em estádios anteriores a este, os frutos imaturos tem pouca aceitabilidade pelo mercado consumidor, pois suas características não mudam de forma significativa após a colheita, caso seja feita a colheita nos estádios de maturação mais avançados (“preto-brilhante” com mini drupas expandidas ou “preto-opaco”) resulta em uma maior fragilidade dos frutos e menor tempo de conservação pós-colheita (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009).

A amoras-pretas e framboesas são produzidas em mais de 30 países pelo mundo. Apesar disso os frutos são normalmente vendidos e consumidos frescos, e isso representa menos de 10 % da produção, devido a sua perecibilidade o que contribui na deterioração microbiológica e nutricional e diminui sua qualidade e benefícios a saúde (STRUCK *et al.*, 2016). Na indústria de alimentos as amoras são utilizadas frequentemente para a fabricação de suplementos dietéticos, sucos, sorvetes, geleias e outros doces (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). A maior parte das *berries* é utilizada na indústria de alimentos para a produção de suco, que é diretamente consumido ou utilizado como ingrediente em outra formulação. A prensagem das *berries*, gera um subproduto chamado de “bagaço”, composto principalmente por peles (exocarpo), sementes, caules (dependendo do fruto), que representa de 20-25 % de toda a massa de *berries* (ALBA; CAMPBELL; KONTOGIORGOS, 2019; STRUCK *et al.*, 2016). Dependendo do tipo de *berrie* o bagaço pode conter até 70 % dos polifenóis originais do fruto que podem ser usados como antioxidantes e corantes, por exemplo (ALBA; CAMPBELL; KONTOGIORGOS, 2019).

1.1 COMPOSTOS DE INTERESSE ENCONTRADOS NO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DA AMORA-PRETA

1.1.1 Óleo da semente

Os óleos das sementes de *berries* e de uvas são os maiores coprodutos da indústria de processamento desses frutos. Esses óleos são considerados especiais, geralmente usados em produtos alimentícios e cosméticos, por causa das altas concentrações de componentes lipídicos bioativos como ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), fitosteróis, tocoferóis, tocotrienóis, carotenoides e esqualeno que aumentam suas propriedades tecnológicas e possíveis benefícios à saúde (TEMELLI, 2009). Uma grande variação ocorre no conteúdo de sementes nas *berries*, na faixa de menos de 1 % a mais de 10 % entre espécies. No entanto a maior variação ocorre no conteúdo de óleo. Mesmo para a mesma espécie, a variação é explicada pela pureza, tamanho das sementes e eficiência do procedimento de extração (LAMPI; HEINONEN, 2009).

A estabilidade oxidativa do óleo depende principalmente da composição de ácidos graxos e da presença de compostos antioxidantes. Embora os óleos de sementes de *berries*, sejam altamente insaturados, sua estabilidade oxidativa pode ser comparada à dos óleos refinados. Os pigmentos como carotenoides e clorofilas presentes nos óleos não refinados podem diminuir a estabilidade, embora possam apresentar atributos positivos, promovendo coloração atrativa aos óleos e, no caso dos carotenoides, uma contribuição na atividade antioxidante (LAMPI; HEINONEN, 2009).

Os óleos de *berries* podem não ser uma boa fonte de compostos fenólicos antioxidante hidrossolúveis, mas eles possuem elevados conteúdos de tocoferóis e outros antioxidantes lipossolúveis (LAMPI; HEINONEN, 2009).

1.1.2 Outros bioativos

As amoras são uma fonte rica de polifenóis. O conteúdo de fenólicos totais em amoras-pretas têm estado na faixa de 114 a 1056 mg por 100 g de fruto (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Além da genética, o grau de maturação pode influenciar nos níveis de fenólicos totais. Por exemplo, a análise de três

diferentes cultivares de amora-preta “*Chester Thornless*”, “*Hull Thornless*”, e “*Triple Crown*”, demonstraram que o conteúdo de fenólicos totais, decresce significativamente com a maturação da fruta de verde até o estágio de colheita (WANG; LIN, 2000). No entanto, em outro estudo envolvendo amoras-pretas de regiões tropicais montanhosas, os níveis de fenólicos totais flutuaram com os estádios do fruto maduro para o vermelho claro, 580 mg por 100 g de fruto, para o roxo, 460 mg por 100 g de fruto e para o roxo escuro, 520 mg por 100 g de fruto (ACOSTA-MONTOYA *et al.*, 2010).

As *berries* são ricas em ácidos fenólicos e flavonoides, sendo parte destes as antocianinas responsáveis pela cor dos frutos e pela sua elevada capacidade antioxidante (UNGUREANU *et al.*, 2020).

1.1.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em duas categorias: derivados de ácido hidroxibenzóico e derivados de ácido hidroxicinâmico (HIDALGO; ALMAJANO, 2017).

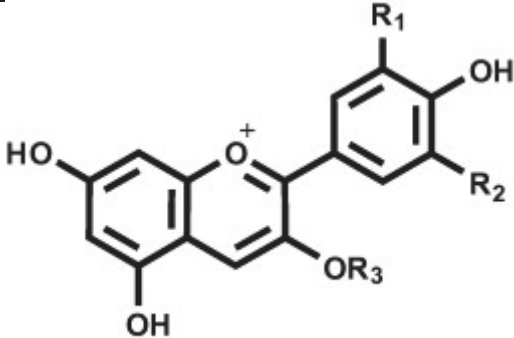
Os ácidos fenólicos em amoras-pretas são relatados na faixa de 7,00 a 64,00 mg para 100 g do fruto e são na sua maioria ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Esses ácidos ocorrem na forma conjugada com ésteres e glicosídeos, raramente como ácidos livres. Os ésteres compõem 53,1% do total de ácidos fenólicos, dos quais 43,6 e 3,3 % são glicosídeos e ácidos livres, respectivamente. Os ácidos hidroxibenzóicos da amora-preta incluem os ácidos: p-hidroxibenzóico, protocatecúico, gálico, vanílico, salicílico e gentísico. Os ácidos cafeíco, m-cumárico, p-cumárico e ferúlico são ácidos hidroxicinâmicos encontrados em amoras-pretas na forma livre, éster e glicosídicas. As formas éster dos ácidos m-cumárico, 3,4-dimetoxicinâmico e hidroxicafeíco são predominantes (ZADERNOWSKI; NACZK; NESTEROWICZ, 2005). Os ácidos derivados do hidroxibenzóico e hidroxicinâmico são classificados como: ácido clorogênico, neoclorogênico, e ésteres do ácido cafeíco, p-cumárico, ferúlico e gálico, como também ácidos protocatecuico e β -D-glicosídeos dos ácidos p-cumárico e p-hidroxibenzóico (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012).

1.1.2.2 Antocianinas

As antocianinas são os compostos fenólicos responsáveis pela cor dos pigmentos azuis, vermelhos, roxos e pretos de frutas e vegetais, e são reconhecidos pelos seus potenciais benefícios para a saúde (JENSEN *et al.*, 2008). São pertencentes ao grupo dos flavonoides, subgrupo antocianidinas predominantemente encontradas em *berries* e uvas vermelhas (CHO *et al.*, 2004).

As antocianidinas são baseadas no íon flavílio, ou 2-fenilcromenílio. A variedade de grupos químicos que podem substituir as diferentes posições (R1, R2...) criam as antocianidinas encontradas na natureza FIGURA 1.2. Existem cerca de 17 antocianidinas encontradas na natureza, enquanto apenas seis delas, a cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina, e malvidina, estão presentes na maioria dos alimentos, (WU *et al.*, 2006). Quando as antocianidinas são conjugadas com açúcares, as antocianinas são formadas.

FIGURA 1.2 – Estrutura das principais antocianidinas

		
Antocianidina	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH ₃	H
Cianidina	OH	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Petunidina	OCH ₃	OH
Delfinidina	OH	OH

FONTE: Adaptado de Fernandes et al. (2014)

As antocianinas das amoras-pretas são na maioria cianidinas com molécula de glicose, raminose, xilose e arabinose ligada ao carbono 3. As antocianinas

identificadas incluem cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-malonil-glicosídeo, cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-acetilglicosídeo (NACZK; SHAHIDI, 2004; WU; PRIOR, 2005).

Estudos mostram que o conteúdo de antocianinas da amora-preta varia devido as diferenças entre variedades, condições do meio ambiente, locais de cultivo, estádios de maturação e processamento (BEATTIE; CROZIER; DUTHIE, 2005). O estudo de Cho et al. (2004) mostrou que o conteúdo total de antocianinas, de seis genótipos de amoras-pretas, variou de 114,4 a 241,5 mg para 100 g de frutos. Em um estudo similar, o conteúdo de antocianinas monoméricas em 51 cultivares vários de 70 a 201 mg para 100 g de fruto fresco (FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2005).

1.1.2.3 Rutina

A rutina, quercetina-3-O-rutinosídeo, é uma forma glicosilada da quercetina, flavonoide pertencente a subclasse dos flavonóis (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996) é uma molécula fracamente solúvel em água (SEMWAL *et al.*, 2021). A rutina foi detectada em várias variedades de amora-preta, com conteúdo variando de 0,73 a 11,83 mg para 100 g de fruto fresco (CHO *et al.*, 2004, 2005; GÜNDOĞDU; KAN; CANAN, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020). A rutina é um potente antioxidante e amplamente utilizado como padrão para avaliação de atividade antioxidante em extratos vegetais (SEMWAL *et al.*, 2021).

1.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO E OUTROS BIOATIVOS EM SEMENTES DE *BERRIES*

Diversas técnicas, incluindo prensagem a frio em temperaturas não excedendo 45 °C, prensagem em altas temperaturas, extração com solvente, ou extração com solventes pressurizados podem ser usadas na extração de óleo de sementes de *berries*. No entanto, a escolha do solvente é limitada a aprovação para uso em alimentos (LAMPI; HEINONEN, 2009).

Alguns estudos utilizaram a técnica de prensagem a frio para a extração de óleo de semente de amora-preta, relatando a composição de ácidos graxos, 6,0 a 8,6 % saturados, 16,1 a 18,3 % de monoinsaturados e 73-78,8 % de poli-insaturados e conteúdo de fenólicos totais, 50,3 a 54,4 mg equivalente de ácido gálico (EAG) g⁻¹ de semente (BUSHMAN *et al.*, 2004; VAN HOED *et al.*, 2009, 2011).

Os estudos encontrados utilizando extração com solventes orgânicos como éter de petróleo e hexano, avaliaram a composição de ácidos graxos, 5,92 a 10,97 % saturados, 12,5 a 26,67 % de monoinsaturados e 61,86 a 80,95 % de poli-insaturados e conteúdo de carotenoides, 32,30 a 33,92 mg de β -caroteno kg⁻¹ (DIMIĆ *et al.*, 2012; FAZIO *et al.*, 2013; MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIC; KRSTIĆ; *et al.*, 2015).

Extração com fluido supercrítico (EFS), é um método considerado “verde” para a extração de compostos valiosos de sementes de *berries* (GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ANDLID; *et al.*, 2018). Uma substância no estado supercrítico está em condições acima de sua temperatura e pressão críticas, nessa região o fluido possui ambas as propriedades, de gás, difusão, viscosidade e tensão superficial e do líquido, densidade e poder de solvatação. Essas propriedades são favoráveis a extração de compostos pois aumentam a taxa de transferência de massa e o rendimento de extração (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014). As vantagens de se utilizar EFS é redução de uso de solventes, tempo de extração menor, não gera resíduos, reutilização do solvente e uso de baixas temperaturas quando comparado com extração com solventes orgânicos convencionais e prensagem a frio. Outra vantagem da extração com SFE, é o ajuste dos parâmetros pressão e temperatura baseado na solubilidade dos componentes alvo (GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ANDLID; *et al.*, 2018).

Os óleos de *berries* comercialmente disponíveis produzidos por extração com fluido supercrítico incluem *blackcurrant*, *wild blueberry (bilberry)*, *cloudberry*, *lingoberry* e *sea buckthorn* (LAMPI; HEINONEN, 2009).

Os óleos de sementes podem ser usados após filtragem, mas em muitos casos algum tipo de refino é necessário para obtenção de óleos com boa qualidade. Quando a extração é feita com solventes orgânicos, a remoção do solvente é necessária. Óleos obtidos por extração com hexano ou prensagem precisam ser degomados para a redução de fosfatídeos e gomas, em um processo similar ao

utilizado na indústria de óleo vegetal. Na extração supercrítica, a maior vantagem é a eliminação dessas etapas (KAPOOR; NAIR, 2005).

O uso do dióxido de carbono supercrítico vem se mostrando uma alternativa favorável ao uso de solventes orgânicos no processamento de óleos. O CO₂ não é inflamável, pode ser considerado barato e possui temperatura e pressão críticas moderadas, 31 °C e 7,4 MPa respectivamente (TEMELLI, 2009). Outros fluidos supercríticos ou pressurizados, como o etano e o propano também têm sido considerados como potenciais solventes de extração para óleos e gorduras devido à alta solubilidade dos lipídios nesses solventes comparados com o CO₂ supercrítico. No entanto, a maior dificuldade no uso desses fluidos é a inflamabilidade.

O propano comprimido tem apresentado resultados promissores na extração de compostos bioativos. Mesmo não possuindo todas as vantagens do CO₂ supercrítico, em alguns estudos apresentaram melhor desempenho que este, na extração de compostos bioativos, com relação ao rendimento, tempo de extração e atividade anti-inflamatória (CORREA *et al.*, 2017, 2016; FREITAS *et al.*, 2008; HAMDAN *et al.*, 2008). O propano apresenta moderados parâmetros críticos, (97 °C e 4,2 MPa), é relativamente barato, facilmente se separa do extrato, possui elevado poder de solvatação, não produz resíduos tóxicos, e pode ser operado em pressões mais brandas do que as utilizadas nos processos com CO₂ (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SPARKS *et al.*, 2006). No entanto, é utilizado no estado subcrítico devido à sua alta temperatura crítica, o que pode degradar os compostos termo sensíveis de interesse.

No entanto, todos os solventes citados anteriormente, hexano, éter de petróleo, CO₂ e propano, possuem moléculas fortemente apolares, o que impede a extração de substâncias bioativas polares da amora-preta, antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos) que são solúveis em solventes polares na forma aquosa ou não, como metanol, acetato de etila e etanol (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Como no caso de substâncias apolares, pode ser usado sistemas de extração convencionais com aquecimento, ebulição e refluxo para a extração com os solventes, no entanto possui as mesmas desvantagens de perda de compostos por termosensibilidade e tempos de extração muito longos (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Assim, dessa forma surge como alternativa, a extração com fluido supercrítico, mas como já citado a molécula de CO₂ é fortemente apolar, mas esse obstáculo pode ser contornado com a adição de um cossolvente (modificador de polaridade), que é a

adição de um solvente polar, sendo o etanol o mais estudado (MANZOOR *et al.*, 2021).

Na literatura foi encontrado um estudo utilizando scCO₂ com e sem adição de mistura hidroetanólica como cossolvente na obtenção de extratos do bagaço da amora-preta cultivar caingangue. Nesse estudo, foram avaliadas as atividades antioxidantes dos extratos: antocianinas monoméricas totais, 0,13 – 17,54 mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo g⁻¹; conteúdo de fenólicos totais 3,31-49,36 mg EAG g⁻¹; DPPH, 12,25-76,03 µmol equivalente de Trolox (TE) g⁻¹ e ABTS: 21,26-68,28 µmol TE g⁻¹ (PASQUEL REÁTEGUI *et al.*, 2014).

1.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os principais aspectos da amora-preta, em especial o cultivar Xavante, utilizado nesse estudo foi abordado nesse capítulo. Cabe salientar que esse cultivar apresenta características promissoras para a ampliação do seu cultivo e foi pouco estudado. O fato de não possuir espinhos em suas hastes, facilita a colheita que precisa ser realizada manualmente e a baixa necessidade de frio, aumentaria a extensão das possíveis regiões em que podem ser cultivadas.

O óleo da semente é um coproduto de grande valor gerado do resíduo processamento da amora-preta. Os métodos clássicos de extração de óleos utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, são processos longos e o óleo obtido não é de alta qualidade, sendo necessários outros processos de purificação. Em relação a composição do óleo os estudos encontrados com extração por prensagem a frio e solventes orgânicos, mostram um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ômega 3 e 6, o que é interessantíssimo do ponto de vista tanto nutricional quanto econômico. Já existe aplicação industrial em cosméticos de óleos de outras sementes com perfil de ácidos graxos inferior ao da semente em estudo. A extração com fluido supercrítico, CO₂, já é usado industrialmente para a produção de óleo sementes de outras *berries* e de uvas. Portanto, há demanda para o estudo de condições do processo específicas para esta matriz. Para a extração com propano comprimido não foram encontrados estudos até o momento para a obtenção óleo da amora-preta.

A maioria dos estudos sobre subprodutos do processamento da amora-preta é focado na recuperação de antocianinas do bagaço (semente e casca). Apenas um

estudo foi encontrado sobre o uso de CO₂ supercrítico com e sem adição de mistura hidroetanólica como cossolvente para o bagaço de amora-preta do cultivar caingangue. Não há relatos na literatura recente sobre a extração de bioativos da semente da amora-preta cultivar Xavante utilizando CO₂ com adição de cossolventes, para a extração de compostos de natureza polar.

CAPÍTULO II: EXTRAÇÃO DE ÓLEOS DE ALTA QUALIDADE DA SEMENTE DA AMORA-PRETA (*RUBUS SPP.*) CV XAVANTE UTILIZANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS

Resumo

Este estudo relata a extração do óleo da semente da amora-preta orgânica (*Rubus spp.*) cv Xavante utilizando CO₂ supercrítico (scCO₂), propano comprimido, hexano e éter de petróleo. As extrações com propano comprimido obtiveram maior rendimento e taxa de extração, em comparação as realizadas com scCO₂. Os óleos obtidos representam uma rica fonte de ácidos graxos insaturados, em torno de 93 %, principalmente composto por ácido linoleico. Além disso, a extração com scCO₂ resultou em um óleo com o maior conteúdo de compostos fenólicos totais, 113,49 mg EAG 100 g⁻¹, e atividade antioxidante pelo método ABTS, 2701,74 µET 100 g⁻¹). No entanto, o propano comprimido mostrou maior eficiência na extração de β-caroteno e o óleo obtido apresentou maior estabilidade térmica, 224,70 °C, em relação ao obtido com scCO₂, 198,83 °C. Estes resultados indicam um elevado potencial do óleo da semente de amora para aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica, nutracêutica e cosmética.

Palavras-chave: *berries*, subproduto, CO₂ supercrítico, propano comprimido, ácido linoleico.

1 INTRODUÇÃO

A indústria agroalimentar gera uma enorme quantidade de resíduos ou subprodutos, estimulando a pesquisa de novos processos para sua valorização e promovendo ganhos tanto econômicos como ambientais (BHARAT HELKAR; SAHOO, 2016). Nas indústrias de processamento de *berries*, como a amora, as sementes são normalmente removidas e, portanto, podem ser consideradas como

um subproduto. Portanto, o desenvolvimento de coprodutos de alto valor agregado a partir das sementes de amoras poderia aumentar seu cultivo, beneficiando tanto produtores quanto consumidores (MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015).

Um possível coproduto a ser obtido de sementes de *berries* é o seu óleo, cujas propriedades têm sido relatadas em estudos recentes. Além de ser um óleo comestível, seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, tocoferóis, tocotrienóis, fitoesteróis e carotenoides podem trazer benefícios à saúde (BUSHMAN *et al.*, 2004; DIMIĆ *et al.*, 2012; FAZIO *et al.*, 2013; GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ANDLID; *et al.*, 2018; HELBIG *et al.*, 2008; LAMPI; HEINONEN, 2009; MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; KRSTIĆ; *et al.*, 2015; MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015; PARRY; YU, 2004; VAN HOED *et al.*, 2011, 2009; YANG *et al.*, 2011). Como o uso do óleo de sementes de *berries* nas indústrias de alimentos e fármacos pode envolver operações térmicas, dados sobre o comportamento térmico dos óleos também é essencial para estabelecer parâmetros de processo (DIMIĆ *et al.*, 2012).

Diversas técnicas de extração são utilizadas para a extração de óleo de sementes de *berries*, incluindo tanto a prensagem a frio (a temperaturas inferiores a 45 °C) como a quente (a temperaturas mais elevadas), bem como a extração com solventes (LAMPI; HEINONEN, 2009). Os métodos que utilizam solventes podem ser considerados demorados e requerem processos posteriores para a separação do óleo do solvente, o que pode gerar um óleo com resíduos de solventes orgânicos. Neste sentido, a extração com fluido pressurizado é uma opção para substituir estes métodos, principalmente pela possibilidade de produzir extratos de alta qualidade, devido ao uso de baixas temperaturas e a possibilidade de o processo ocorrer na ausência de luz e oxigênio, o que pode preservar os compostos almejados. Este tipo de processo também oferece outras vantagens como, alta seletividade e evitar o uso de solventes orgânicos perigosos (CUCO *et al.*, 2019; GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ANDLID; *et al.*, 2018; NIMET *et al.*, 2011). O dióxido de carbono supercrítico tem sido amplamente proposto como solvente em diversas matrizes vegetais e o propano subcrítico também tem apresentado resultados promissores para extração de óleos vegetais (AHANGARI; SARGOLZAEI, 2012; CUCO *et al.*, 2019; CUCO; CARDOZO-FILHO; SILVA, 2019; FETZER *et al.*, 2018; FREITAS *et*

al., 2008; NIMET *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2018; TUROLA BARBI *et al.*, 2019).

Alguns estudos comparando a extração com fluidos supercríticos (SFE) e a extração convencional usando solventes orgânicos frequentemente relatam maiores rendimentos de extração para o método de extração convencional (GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ANDLID; *et al.*, 2018; SALGIN; DINC; ULUDA, 2016; XU *et al.*, 2008). Entretanto, solventes orgânicos, como hexano, são perigosos para os trabalhadores e para o meio ambiente, e procedimentos alternativos de extração e solventes são requeridos. Além disso, um maior rendimento de extração não significa a obtenção de, por exemplo, um óleo de alta qualidade. Os óleos obtidos na extração com hexano são submetidos a processos de purificação, como dessolvenização, degomagem, devido à maior extração de fosfatídeos, e, às vezes, branqueamento, para a obtenção de um óleo mais translúcido. Por outro lado, os extratos obtidos com SFE não necessitam destes processos posteriores (LAMPI; HEINONEN, 2009). Entretanto, existe falta de informação na literatura sobre a comparação entre técnicas de extração de óleos de sementes de *berries*, utilizando diferentes técnicas de extração como dióxido de carbono supercrítico, propano comprimido e extração convencional com solventes orgânicos como hexano e éter de petróleo.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar aplicações tanto do scCO₂ quanto do propano pressurizado como solventes para extrair o óleo presente nas sementes da amora-preta orgânica cultivar Xavante. Foi determinada a influência de duas condições principais de operação, pressão e temperatura de extração, sobre o rendimento do óleo. Além disso, foram determinadas: a composição de ácidos graxos, conteúdo de fenólicos total e outras atividades pelos ensaios antioxidantes ABTS, FRAP e DPPH. Também foi determinado o teor de β -caroteno e comportamento térmico dos óleos obtidos. Todos esses resultados foram comparados com os óleos obtidos a partir das sementes do mesmo lote utilizando a extração em aparato Soxhlet com os solventes orgânicos hexano e éter de petróleo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os frutos no estágio maduro, preto brilhante, de amora-preta orgânica CV Xavante foram coletados na área da fazenda experimental na Universidade Estadual do Centro-Oeste (Guarapuava, Paraná, Brasil) de novembro de 2016 a janeiro de 2017. Os frutos inteiros foram caracterizados quanto a sua massa média ($5,10 \pm 0,56$ g), umidade ($87,14 \pm 0,38$ %), teor de sementes ($3,27 \pm 0,38$ %) e teor de bagaço e casca ($9,59 \pm 0,38$ %). Em seguida, os frutos foram secos em estufa com circulação de ar a 40 °C por aproximadamente 48 h, como descrito na literatura (GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ALMINGER; *et al.*, 2018). Em seguida, as sementes de amora foram separadas mecanicamente e secas novamente seguindo o mesmo procedimento de secagem da fruta inteira, o que resultou em um teor de umidade de $7,07 \pm 0,73$ %. As sementes secas foram trituradas em moedor de café e classificadas de acordo com a distribuição granulométrica utilizando um agitador vibratório (Produtest, São Paulo, Brasil) com diferentes peneiras da série Tyler, entre 28 e 35 mesh. Portanto, foi estimado o tamanho das partículas pelo método descrito por Gomide (GOMIDE, 1980). A densidade real das sementes moídas foi medida na Central Analítica do Instituto de Química - Unicamp (Campinas, São Paulo, Brasil), utilizando o método do picnômetro com gás hélio (Quantachrome Utrapyc 1200e) e a densidade aparente do leito foi calculada pela razão da massa de alimentação pelo volume do vaso de extração. Em seguida, a porosidade do leito de partículas (ε) foi calculado pela Equação 1:

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

Onde ρ_a é a densidade aparente e ρ_r é a densidade real.

2.2 EXTRAÇÕES COM O APARATO SOXHLET

As extrações utilizando o aparato de Soxhlet foram realizadas em triplicatas, foram utilizados os solventes hexano e éter de petróleo. As extrações foram realizadas de acordo com o método da AOAC (AOAC, 2000) utilizando 5 g da amostra, 150 mL de solvente foi refluxado por 6 h em seu ponto de ebulição. Após o período de extração, o solvente foi removido utilizando rotaevaporador (Fisatom, Modelo 803 – São Paulo, São Paulo, Brasil) e posteriormente colocado em estufa

com circulação de ar a 60 °C para a remoção do solvente residual. O rendimento foi expresso em % m/m (100*g de extrato/g de amostra seca).

2.3 EXTRAÇÕES COM SOLVENTES PRESSURIZADOS

As extrações foram realizadas utilizando tanto o aparato experimental quanto o procedimento previamente apresentado (CORREA, *et al.*, 2016; FETZER *et al.*, 2018). O equipamento é composto por um vaso extrator resistente a pressão (80 cm³ de volume interno, L=0,16 m e ϕ_{interno} 2,52.10⁻²) acoplado a um banho termostático com circulação, uma válvula micrométrica do tipo agulha para controle do fluxo dentro do extrator, uma bomba tipo seringa (ISCO, modelo 500D, Lincoln, NE, EUA) refrigerada por um banho termostático com circulação e sensores de temperatura e transdutores de pressão. Para a extração, foram utilizados CO₂ e propano como solventes. Um design experimental randomizado 2² com triplicata no ponto central foi aplicado para cada solvente, com o objetivo de estudar a combinação dos dois fatores independentes que afetam o processo de extração: a pressão (P), variando de 15,0 a 25,0 MPa para as extrações com scCO₂ e 10,0 a 20,0 MPa para as extrações com propano comprimido e a temperatura (T) de 40,0 a 70,0 °C para o scCO₂ e de 30,0 a 70,0 °C para o propano. Um experimento adicional foi realizado para o propano comprimido a 5,0 MPa e 50, 0 °C como tentativa de verificar os efeitos destas condições no rendimento da extração.

Para todas as corridas de extração, a câmara de extração foi carregada com aproximada 30 g das sementes de amora-preta moídas. Após alcançar as condições desejadas de temperatura e pressão, à extração estática foi realizada. Testes preliminares (resultados não mostrados) foram realizados e o tempo de extração estática (TEE) foi fixado em 60 min para o scCO₂ e 30 min para o propano comprimido. Em seguida à extração estática, foi iniciada à extração dinâmica utilizando um fluxo constante de solvente em torno de 2,0 mL min⁻¹, usado como padrão para todas as extrações. O fluxo de massa do solvente $\dot{q}$ (g min⁻¹), mostrado na TABELA 2.1 foi determinado utilizando a densidade do solvente temperatura de 10 °C e pressão da bomba seringa na condição de extração) (LEMMON; MCLINDEN; FRIEND, 2020) e o fluxo do solvente de 2 mL min⁻¹. As amostras de óleo extraídas das sementes de amora foram coletadas, à pressão atmosférica e 18 °C) em tubos de ensaio de 10 mL e pesadas a intervalos de tempo de 10 min

para a extração com scCO₂ até o tempo final de 150 min. Para o propano massa extraída foi determinada em intervalos de 5 min até os 40 min, após em intervalos de 10 min até o tempo final de 60 min. O rendimento foi expresso em % m/m (100*g de extrato/g de amostra seca). E a solubilidade aparente do extrato foi calculada a partir da parte linear das curvas de extração e expressa em g de extrato por g de solvente.

2.4 EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS COM OS RESÍDUOS DA EXTRAÇÃO PRESSURIZADA

A fim de verificar quanto de óleo restou no resíduo das amostras após a extração pressurizada, os resíduos das extrações com maior rendimento tanto para o scCO₂ quanto para o propano comprimido foram submetidos a uma extração convencional sequencial, utilizando o procedimento das extrações convencionais descritos no item 2.2.

2.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICES DE SAPONIFICAÇÃO E IODO DOS ÓLEOS

O perfil de ácidos graxos do óleo da semente da amora-preta foi analisado utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu (GC 2010 Plus – Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar SH-Rtx (Shimadzu, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm – Kyoto, Japão), acoplado a um detector de ionização de chama e modo de *injeção split* 1:10. A temperatura do injetor e do detector foi de 140 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 100 °C mantida por 5 min, em seguida aumentada até 240 °C a uma taxa de 4 °C min⁻¹ e mantida por 5 min. O gás de transporte utilizado foi o hélio a 32,5 cm³ min⁻¹. Todas as amostras foram preparadas de acordo com o método oficial, Ce 2-66 da Sociedade Americana dos Químicos de Óleo (AOCS, 1997) para converter tanto os triacilgliceróis como os ácidos graxos livres das amostras em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). Cada FAME foi identificado por comparação com os tempos de retenção observados para os FAMES que compunham a mistura padrão. A quantificação dos ácidos graxos foi feita através do procedimento de normalização

da área. Os resultados foram expressos como a porcentagem de cada ácido graxo presente na amostra.

Os índices de saponificação e iodo das amostras de óleo foram determinados segundo os métodos Cd 3a-94 e Cd 1c-85, respectivamente (AOCS, 1997).

2.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicata. Foram pesados aproximadamente 50 mg de cada amostra dos óleos da semente de amora-preta, e então foi adicionado 1 mL da solução metanol: água (9:1 v/v). Esta mistura foi agitada vigorosamente durante 5 min e centrifugada por 10 min a 3500 xg. A fase de metanol foi removida e analisada por métodos espectrométricos para determinar a atividade antioxidante. Todos os ensaios de atividade antioxidante foram conduzidos em espectrofotômetro UV-Vis (Global Analyzer – Monte Alto, Estado de São Paulo, Brasil).

A análise do conteúdo de fenólicos totais (CFT) pelo ensaio do reagente de Folin-Ciocalteu foi realizado pela metodologia de Singleton et al. (1999). Os resultados quantitativos foram calculados através da curva analítica para o padrão de ácido gálico e foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg EAG 100 g⁻¹).

O método do sequestro do radical ABTS^{•+} foi realizado com base no procedimento descrito por Re et al. (1999). A atividade do sequestro do radical DPPH[•] foi realizada com base no método proposto por (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O ensaio de poder antioxidante pela redução do ferro, FRAP, foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996). Para a quantificação desses ensaios, foi utilizada curva analítica utilizando como padrão Trolox e os resultados foram expressos em μmol equivalente de Trolox por 100 g de óleo (μmolTE 100 g⁻¹).

2.6.1 Conteúdo de β -caroteno

O conteúdo de β -caroteno foi determinado de acordo com Cuco et al. (2019). As amostras de óleo foram diluídas em hexano e a absorbância foi medida a 450 nm

em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, 1800 – Kyoto, Japão). Os valores obtidos foram inseridos na Equação 2 e os resultados foram expressos em mg de β -caroteno por 100 g de óleo ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

$$\beta\text{-caroteno} = \frac{(Abs \cdot Vol \cdot 10^3)}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \cdot W} \quad (2)$$

Onde, *Abs* é a absorbância do máximo λ (450 nm), *Vol* é o volume da diluição (mL), $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção do β -caroteno em hexano (2592) e *W* é a massa da amostra de óleo (g).

2.7 DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA

A decomposição térmica dos óleos de semente de amora-preta foi avaliada por termogravimétrica (TGA). As análises térmicas foram realizadas em equipamento TGA/DSC 1 STAR Mettler Toledo® e foram baseadas no método descrito por Micic et al. (2015). As amostras de óleo foram inseridas em uma panela de alumina aberta, colocadas no equipamento e submetidas a uma taxa de aquecimento de $10,0 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$, à pressão atmosférica e em contato com um fluxo constante de N_2 de 50 mL min^{-1} . Como referência foi usada uma panela de alumina aberta e vazia.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software Statistica 12.0 (TIBCO Software, Palo Alto, EUA), e cada resposta foi avaliada de forma independente. O teste de Duncan foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias considerando um valor de *p* inferior a 0,05 ($p < 0,05$) como estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima deste estudo consistiu em sementes de amora-preta cultivar Xavante moídas, obtidas conforme descrito anteriormente, com tamanho médio de partícula de 0,56 mm, densidade real de $1370 \pm 10 \text{ kg m}^{-3}$, densidade aparente de $577,59 \text{ kg m}^{-3}$ e, conseqüentemente, porosidade do leito de partículas, calculada pela Equação 1, de 0,58.

3.2 EXTRAÇÃO POR SOXHLET

A TABELA 2.1 apresenta os resultados da extração com Soxhlet usando hexano e éter de petróleo como solventes. A extração com hexano, Ensaio 1, mostrou o maior rendimento ($10,51 \pm 0,60 \%$) em comparação com o éter de petróleo, Ensaio 2 ($2,85 \pm 0,24 \%$). A notável diferença observada para os rendimentos se deve provavelmente à capacidade de cada solvente em acessar e solubilizar o óleo dentro da matriz sólida, embora ambos os solventes sejam apolares e tenham constantes dielétricas próximas, 1,89 e 2,00 para hexano e éter de petróleo, respectivamente (MOHD-SETAPAR; NIAN-YIAN; MOHD-SHARIF, 2014). O rendimento do óleo extraído das sementes de amora-preta pelo método laboratorial padrão, usando hexano durante 8 h, está de acordo com Dimić et al (DIMIĆ *et al.*, 2012), cujos resultados variaram de 13,97 % a 14,34 % e também com o estudo de Wajs-Bonikowska et al (WAJS-BONIKOWSKA *et al.*, 2017), que obteve rendimento de 11,80 % para o bagaço de amora-preta. Quanto as extrações com éter de petróleo, não foram encontrados dados pertinentes disponíveis na literatura.

3.3 EXTRAÇÕES PRESSURIZADAS

Os resultados da extração com scCO₂ e propano comprimido estão apresentados na TABELA 2.1. Os rendimentos de extração dos óleos da semente obtidos com scCO₂ variaram entre 0,25 e 1,89 %. O maior rendimento, 1,89 %, foi obtido a 70 °C e 25 MPa, maiores pontos de pressão e temperatura. Quando se mantêm a temperatura em 70 °C e se reduz a pressão para 15 MPa, o rendimento da extração cai drasticamente para 0,25 %. Estes resultados podem ser explicados pela densidade do CO₂, que nas condições de 70 °C e 15 MPa, apresenta a menor densidade, $505,88 \text{ kg m}^{-3}$ entre os ensaios realizados, conseqüentemente resultando na menor solubilidade aparente, conforme apresentado na TABELA 2.1. Na

condição de maior pressão, 25 MPa, um aumento na temperatura de 40 °C para 70 °C resultou em um ligeiro aumento do rendimento, de 1,81 % para 1,89 %. Entretanto, para a pressão mais baixa, 15 MPa, o mesmo aumento na temperatura de 40 °C para 70 °C, foi prejudicial para o rendimento, que caiu de 1,15 % para 0,25 % (ensaios 3 e 5).

TABELA 2.1 - Condições experimentais e rendimentos de extração obtidos para as sementes de amora-preta.

Ensaio	Solvente	T (°C)	P (MPa)	Densidade (kg m ⁻³) ^a	Solubilidade aparente ^b	$\dot{q}$ (g min ⁻¹)	TEE (min)	Tempo de Extração (min)	Rendimento extração ^c (%)	de
<i>Extração Soxhlet</i>										
1 ^d	Hexano	68	0,10	-	-	-	-	360	10,51 ± 0,60	
2 ^d	Éter de petróleo	62	0,10	-	-	-	-	360	2,85 ± 0,24	
<i>Extração Pressurizada</i>										
3	CO ₂	40	15,0	780,23	0,0014	1,91	60	150	1,15	
4	CO ₂	40	25,0	879,49	0,0044	2,00	60	150	1,81	
5	CO ₂	70	15,0	505,88	0,0004	1,91	60	150	0,25	
6	CO ₂	70	25,0	736,92	0,0029	2,00	60	150	1,89	
7 ^d	CO ₂	55	20,0	754,61	0,0018 ± 0,0001	1,96	60	150	1,51 ± 0,04	
8	Propano	30	10,0	508,67	0,0371	1,07	30	60	2,20	
9	Propano	30	20,0	527,33	0,0359	1,10	30	60	2,30	
10	Propano	70	10,0	451,72	0,0428	1,07	30	60	2,30	
11	Propano	70	20,0	482,47	0,0392	1,10	30	60	2,32	
12 ^d	Propano	50	15,0	494,70	0,0386 ± 0,0016	1,08	30	60	2,30 ± 0,07	
13	Propano	50	5,0	464,65	0,0398	1,05	30	60	2,20	

^a Densidade do solvente nas condições do ensaio de extração. Valores obtidos do NIST banco de dados (LEMMON; MCLINDEN; FRIEND, 2020).

^b Solubilidade aparente (g extrato g solvente⁻¹) foi calculada utilizando a parte linear das curvas de extração e o valor corresponde ao coeficiente angular da equação FIGURA 2.2 b e FIGURA 2.3b.

^d Médias de rendimento de extração ± desvio padrão da triplicata para os ensaios 1, 3, 7 e 12.

$\dot{q}$ = vazão mássica do solvente

TEE = Tempo de extração estática

Considerando o delineamento experimental, apenas a pressão apresentou um efeito significativo e positivo ($p < 0,05$), ilustrado no gráfico de Pareto, FIGURA. 2.1a, que pode ser explicado pelo aumento na densidade do CO₂. Efeitos semelhantes foram relatados por outros autores utilizando scCO₂ para extração de óleo de semente de outras frutos tais como mirtilo (GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ALMINGER; *et al.*, 2018), espinheiro marinho (XU *et al.*, 2008) e mirtilo colombiano (LÓPEZ-PADILLA *et al.*, 2016).

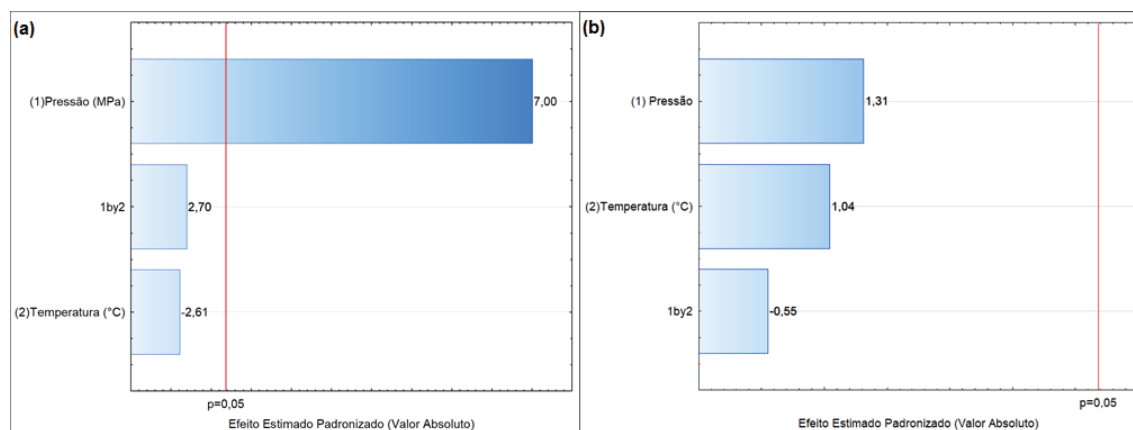
A Equação 3 representa o modelo para o rendimento de óleo de semente de amora-preta obtido usando scCO₂:

$$Y = 1,38 + 0,58P \quad (3)$$

Onde, P é a pressão em MPa.

A ANOVA para o modelo do rendimento de extração do óleo semente de amora-preta obtido com scCO₂ mostrou que os resultados obtidos conduziram a um modelo preditivo significativo ($r^2 = 0,94$). O $F_{\text{calculado}}$ de 17,42, foi maior que o F_{tabulado} de 9,28 da tabela de distribuição de Fischer, com $\alpha = 0,05$, grau de liberdade para regressão de 3 e grau de liberdade o resíduo de 3.

FIGURA 2.1. – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros dos processos no rendimento das extrações usando (a) scCO₂ e (b) propano comprimido (b)



FONTE: A autora (2020).

A FIGURA 2.2a mostra a curva global de extração experimental para o scCO₂, na qual é possível observar que as etapas típicas de curvas de

extração não estão bem definidas. Quanto à solubilidade aparente, FIGURA 2.2b e TABELA 2.1, quando a temperatura foi mantida constante e se aumentou a pressão, a solubilidade aparente aumentou cerca de dez vezes. Isto pode ser atribuído às alterações no momento dipolo do CO₂, já que esta propriedade pode ser manipulada de acordo com as condições, pressão e temperatura, aplicadas para as extrações. Ao aumentar a pressão de extração a temperatura constante, o momento dipolo do CO₂ aumenta, resultando em um aumento da solubilidade dos compostos mais polares no CO₂.

Considerando o delineamento experimental para o propano comprimido, tanto a pressão quanto a temperatura não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$), como ilustrado no gráfico de Pareto, FIGURA 2.1b, como também observado por outros autores que avaliaram a extração de oleaginosas (FORNASARI *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2016; ZANQUI *et al.*, 2015). Consequentemente, o modelo de comportamento do rendimento do óleo de semente de amora-preta obtido com propano comprimido não pode ser representado. Esses resultados indicam que a extração com propano comprimido pode ser operada em condições de baixa temperatura e pressão. Portanto, foi realizado um ensaio adicional, ensaio 13 (50 °C e 5,0 MPa) e o rendimento obtido 2,20 %, foi mais um indício de que realmente a pressão e a temperatura não possuem uma influência significativa no rendimento da extração.

Além disso, as curvas globais de extração experimental, FIGURA 2.3a para a extração do óleo da semente de amora-preta com propano como solvente em diferentes condições de temperatura e pressão também mostraram comportamentos similares e consequentemente solubilidades similares, conforme a FIGURA 2.3b. Para todas as condições, FIGURA 2.3a, a maior parte do óleo foi extraído nos primeiros 15 min, 76 %, onde ocorreu uma taxa de extração constante a etapa convectiva (CER), seguido de uma diminuição da taxa de extração (FER), até 25 min e atingido assim a etapa de difusão controlada (DC).

FIGURA 2.2 – (a) Curvas experimentais de extração para óleo da semente de amora-preta obtidos com scCO₂ (b) Curvas de solubilidade aparente para óleo da semente de amora-preta obtidos com scCO₂. Ensaio 3: 40 °C e 15 MPa; Ensaio 4: 40 °C e 25 MPa; Ensaio 5: 70 °C e 15 MPa, Ensaio 6: 70 °C e 25 MPa; e Ensaio 7: 55 °C e 20 MPa (Ponto central). Para o Ensaio 7, as barras representam o desvio padrão.

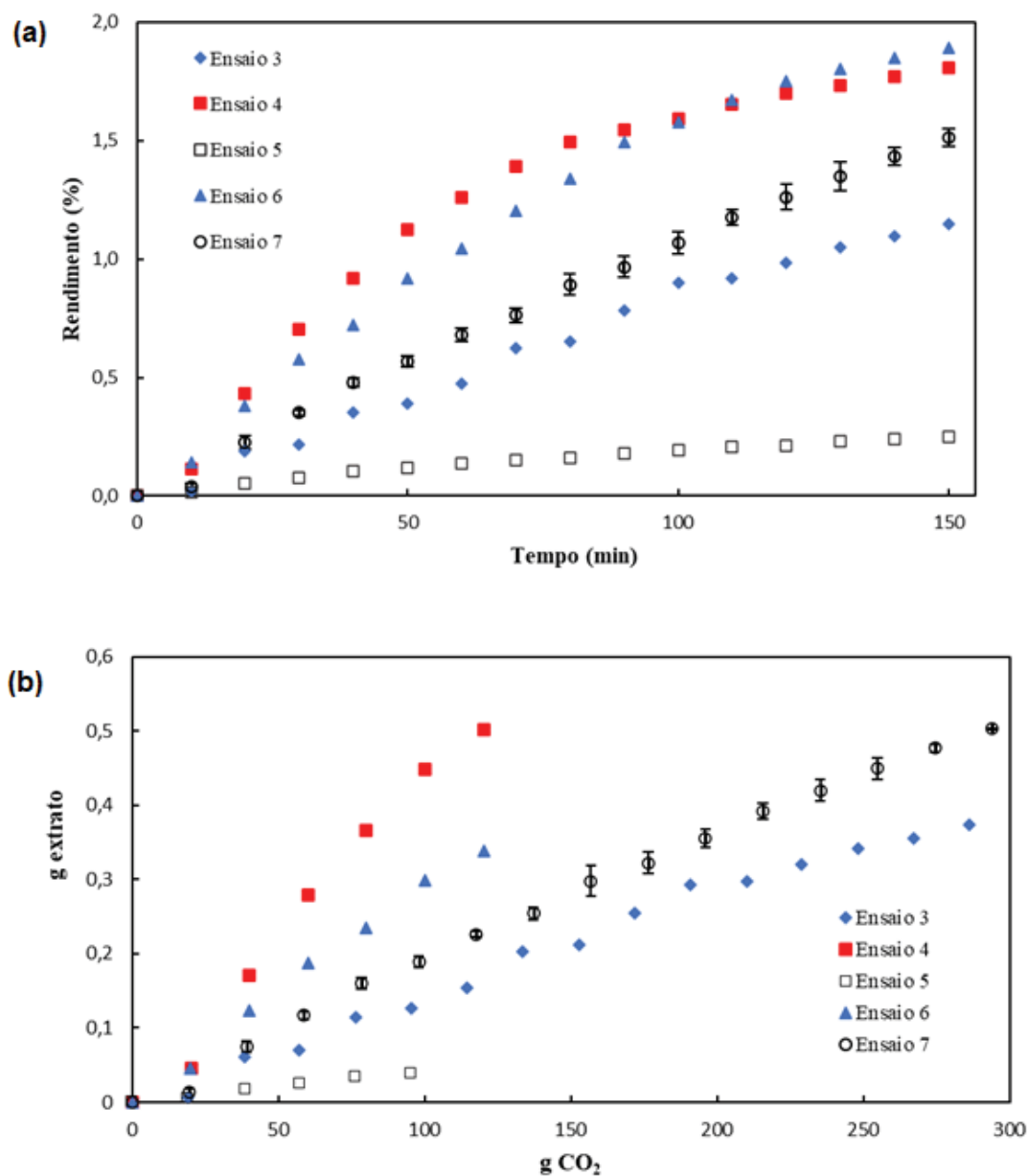
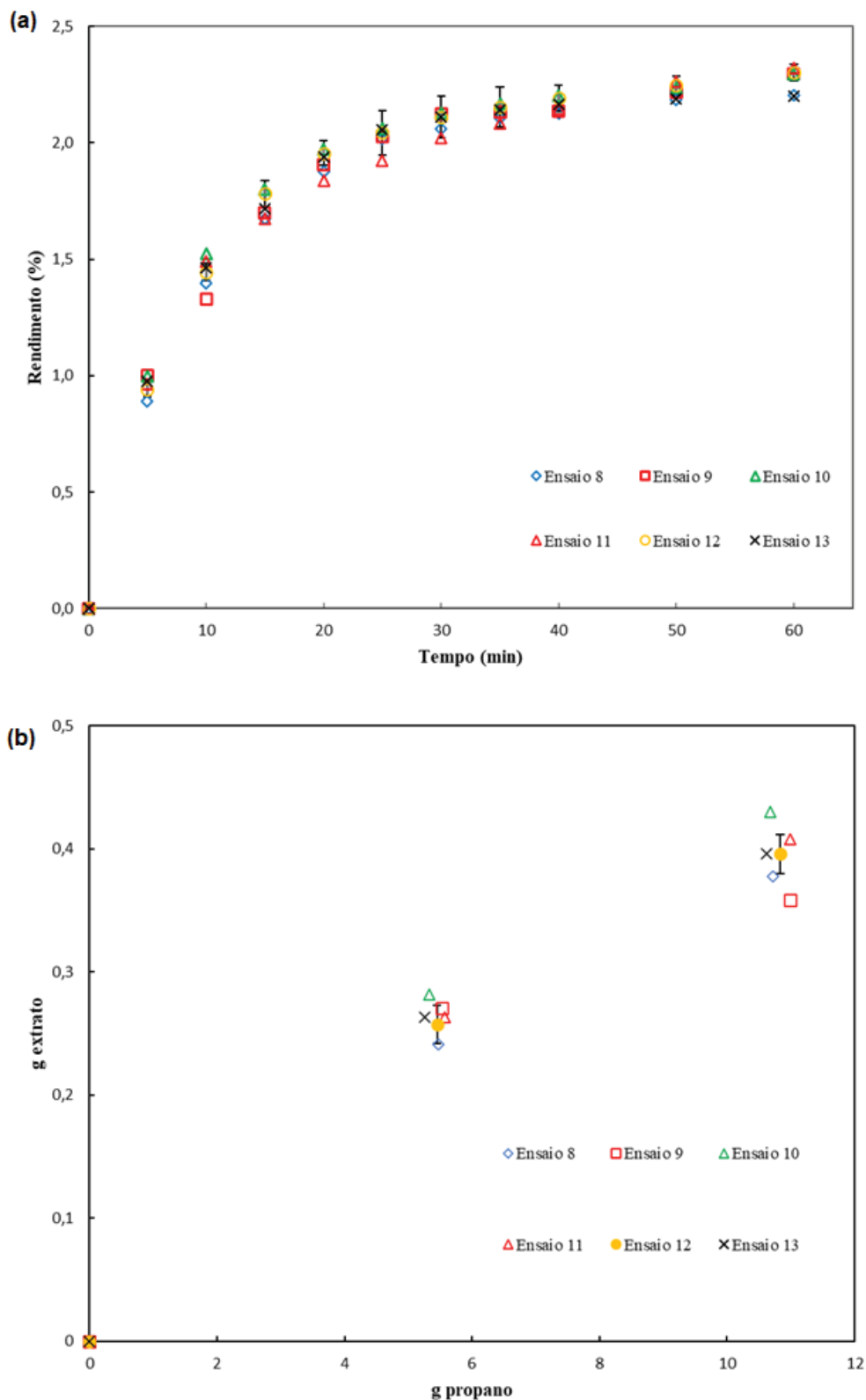


FIGURA 2.3 – (a) Curvas experimentais de extração para óleo da semente de amora-preta obtidos com propano comprimido (b) Curvas de solubilidade aparente para óleo da semente de amora-preta obtidos com propano comprimido. Ensaio 8: 30 °C e 10 MPa; Ensaio 9: 30 °C e 20 MPa; Ensaio 10: 70 °C e 10 MPa, Ensaio 11: 70 °C e 20 MPa; Ensaio 12: 50 °C e 15 MPa (Ponto central) e Ensaio 13: 50 °C e 5,0 Para o Ensaio 12, as barras representam o desvio padrão.



Em conclusão, os resultados mostraram que as extrações com propano são mais rápidas do que as com scCO₂ como solvente. Este aspecto pode estar relacionado ao fato de que a solubilidade dos triacilgliceróis é maior no propano do que no CO₂ (AHANGARI; SARGOLZAEI, 2012; FREITAS *et al.*, 2008; HAMDAN *et al.*, 2008).

3.4 EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS COM RESÍDUOS OBTIDOS A PARTIR DAS EXTRAÇÕES PRESSURIZADAS

A TABELA 2.2 mostra os resultados dos experimentos adicionais que foram realizados usando a extração com Soxhlet para avaliar o conteúdo lipídico residual após as extrações pressurizadas.

TABELA 2.2 - Extrações sequenciais dos resíduos das sementes de amora-preta utilizando Soxhlet após as extrações pressurizadas.

Ensaio	Amostra	Solvente	Rendimento extração sequencial (%)	$\sum$ a (pressurizado + extração sequencial)	Rendimento
14	scCO ₂ Resíduo ensaio 6 (Rendimento = 1,89 %)	Hexano	10,58 ± 0,01	12,47	
15	scCO ₂ Resíduo ensaio 6 (Rendimento = 1,89 %)	Éter de petróleo	1,34 ± 0,18	3,23	
16	Propano Resíduo ensaio 12 (Rendimento = 2,30 %)	Hexano	7,72 ± 0,24	10,02	
17	Propano Resíduo ensaio 12 (Rendimento = 2,30 %)	Éter de petróleo	0,32 ± 0,13	2,62	

^a Média e desvio padrão da triplicata.

Considerando a extração convencional com hexano, Ensaio 1, como referência para o maior rendimento de extração era esperado que a soma dos rendimentos (10,51 %) obtidos após a extração sequencial, apresentados na TABELA 2.2, atingissem valores próximos desse rendimento. Entretanto, a

soma dos rendimentos para a extração sequencial realizada utilizando os resíduos da extração com scCO₂, no Ensaio 6 e Soxhlet utilizando hexano no Ensaio 14, resultou em um rendimento total de 12,47 % maior quando comparado ao Ensaio 1. Isto pode ser explicado por possíveis fissuras na estrutura da casca da semente e ruptura de ligações químicas, seja como resultado do uso de altas pressões, nesse caso 25 MPa na extração com scCO₂ e/ou devido à etapa de despressurização realizada, o que poderia facilitar a extração sequencial com hexano.

Este efeito foi observado em menor escala para a extração sequencial realizada com propano comprimido, Ensaio 12, seguido da extração com Soxhlet com hexano, Ensaio 16, que proporcionou um rendimento total de 10,02 %, próximo ao do Ensaio 1. Por outro lado, as extrações sequenciais com éter de petróleo resultaram em rendimentos muito baixos. Assim, como já citado para os resultados apresentados na TABELA 2.1, apesar de próximas as constantes dielétricas dos solventes utilizados nas extrações convencionais, uma grande diferença de rendimento foi observada mais uma vez nas extrações sequenciais.

3.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICES DE SAPONIFICAÇÃO E IODO

O perfil de ácidos graxos apresentado na TABELA 2.3, indica que os óleos obtidos das sementes da amora-preta são muito interessantes do ponto de vista nutricional. De acordo com os resultados, o principal ácido graxo observado em todas as amostras de óleo foi o ácido linoleico, 65,70 a 67,35 %, independente do solvente utilizado. O teor de ácidos graxos insaturados, 92,77 a 93,26 %, é semelhante aos relatados na literatura de 88,52 a 93,55 % para a extração convencional do óleo de sementes de amora-preta (FAZIO *et al.*, 2013; MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015; VAN HOED *et al.*, 2009).

Os ácidos linoleico e γ-linolênico constituem os principais ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) dos óleos de semente de amora-preta, entre 75,87 e 77,31 %. Os PUFAs são precursores de mediadores inflamatórios semelhantes a hormônios, conhecidos como eicosanoides, que servem como moduladores

de uma ampla gama de fatores de transcrição. Isto pode ser parte da explicação para a ligação metabólica entre a ingestão de PUFA e benefícios à saúde, o que leva a uma redução do progresso de doenças crônicas (WILLIAMS; BUTTRISS, 2006), tais como doenças cardiovasculares e diabetes (MARANGONI *et al.*, 2020). Além disso, como o ácido γ -linolênico é um constituinte do leite materno, sua presença no óleo de semente de amora-preta, teria potencial para ser utilizado como ingrediente em fórmulas infantis (JURGOŃSKI *et al.*, 2018).

TABELA 2.3 - Composição dos ácidos graxos presentes nos óleos das sementes da amora-preta.

Ácido graxo	% ácido graxo			
	scCO ₂ Ensaio 7	Propano Ensaio 12	Hexano Ensaio 1	Éter de petróleo Ensaio 2
Palmítico (C16:0)	4,92	4,69	4,97	4,99
Estearico (C18:0)	2,02	2,06	2,26	2,14
Oleico (C18:1)	14,73	15,02	15,70	14,59
Linoleico (C18:2)	66,81	66,55	65,70	67,35
γ -Linolênico (C18:3 n-6)	10,08	10,05	9,78	9,47
Gadoleico (C20:1)	1,02	1,14	1,20	1,07
Linolênico (C18:3)	0,42	0,50	0,39	0,39
Σ SFA ^a	6,94	6,75	7,23	7,13
Σ MUFA ^b	15,75	16,16	16,90	15,66
Σ PUFA ^c	77,31	77,10	75,87	77,21
Σ MUFA+PUFA	93,06	93,26	92,77	92,87

O desvio padrão para todos os ácidos graxos é menor que 0,006.

^aÁcidos graxos saturados.

^bÁcidos graxos monoinsaturados.

^cÁcidos graxos poli-insaturados.

A TABELA 2.4 apresenta o Índice de Saponificação (IS) e de Iodo (II) para o óleo de semente de amora obtido com diferentes solventes. O IS compreende todos os ácidos graxos presentes no óleo, sejam livres ou em sua

forma esterificada (BART; PALMERI; CAVALLARO, 2010). Todos os óleos apresentaram IS em torno de 215 mg KOH g⁻¹, valor superior ao relatado na literatura para o óleo de semente de amora-preta cultivar Čačak extraído com hexano de 192,30 mg KOH g⁻¹ (MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIC; PEZO; *et al.*, 2015). O alto IS obtido indica que é possível aplicar este óleo em formulações de produtos como sabonete líquido, xampus e cremes de barbear. O II determina o grau de insaturação dos ácidos graxos que compõem as moléculas de triacilglicerol. Para este estudo, a faixa de II foi de 152,88 a 154,75 mg I₂ g⁻¹, valor inferior ao relatado para o óleo de semente de amora-preta cultivar Čačak extraído com hexano de 188,39 mg I₂ g⁻¹, obtido através do método de titulação (MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIC; PEZO; *et al.*, 2015). As diferenças entre IS e II relatadas neste estudo frente aos relatados no trabalho realizado por Micic *et al.* (2015) podem ser devidas tanto as diferenças de cultivares, condições ambientais de cultivo, quanto à diferença entre os métodos utilizados para a determinação do Índice de Iodo.

TABELA 2.4 - Índices de Saponificação e de Iodo para os óleos.

Extração	Índice de Saponificação (mg KOH g ⁻¹)	Índice de Iodo (mg I ₂ g ⁻¹)
scCO ₂ Ensaio 7	215,30	154,75
Propano Ensaio 12	215,38	154,47
Hexano Ensaio 1	215,16	152,88
Éter de petróleo Ensaio 2	215,22	153,97

3.6 DIFERENTES ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados do CFT para os óleos de semente de amora-preta obtidos após extrações realizadas sob diferentes condições são mostrados na TABELA 2.5. A faixa de CFT foi de 27,76 a 113,49 mg GAE 100 g⁻¹, inferior ao valor reportado por Wajs-Bonikowska *et al.* (2017) de 189,39 mg GAE 100 g⁻¹ para o extrato com CO₂ de bagaço de amora, mas que é superior aos valores

reportados para o óleo de framboesa preta prensado a frio, 4 a 9 mg GAE 100 g⁻¹ (PARRY; YU, 2004). Os maiores valores de CFT foram obtidos para a extração de scCO₂ e os menores para a extração com propano comprimido. Para o planejamento experimental da extração com scCO₂ ambos os parâmetros, pressão e temperatura não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) para o CFT. Entretanto, para o planejamento experimental da extração com propano, tanto a pressão quanto a temperatura apresentaram efeitos significativos e positivos ($p < 0,05$) no teor de CFT.

A maioria dos compostos fenólicos tem natureza hidrofílica e provavelmente não são encontrados em grandes quantidades nos óleos de sementes de *berries*, já que são ricos em constituintes lipofílicos (LAMPI; HEINONEN, 2009). Por esta razão, a maioria dos trabalhos publicados apresenta resultados apenas para compostos fenólicos extraídos com solventes polares.

A partir da TABELA 2.5, também é possível inferir que as atividades antioxidantes obtidas pelos métodos, ABTS, DPPH e FRAP, apresentaram os maiores resultados para os óleos obtidos com scCO₂ como solvente, indicando que este solvente tem uma alta seletividade para compostos com potencial antioxidante. Em particular, para o método ABTS, os valores obtidos para o scCO₂ ficaram na faixa de 1236,12 a 2701,74 µmol TE 100 g⁻¹, valores maiores que o relatado por Wajs-Bonikowska et al (2017) de 1219 µmol TE 100 g⁻¹ para o extrato de bagaço de amora-preta obtido com CO₂. Em relação aos delineamentos experimentais, tanto para o scCO₂ quanto para o propano comprimido, a pressão e a temperatura não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Além disso, na faixa de temperatura estudada neste trabalho, aparentemente os compostos com capacidade antioxidante não sofreram degradação térmica.

TABELA 2.5 - Atividade antioxidante para os óleos obtidos da semente da amora-preta por diferentes ensaios.

Ensaio	Solvente	T (°C)	P (MPa)	CFT (mg EAG 100 g ⁻¹)	ABTS (μmol TE 100 g ⁻¹)	DPPH (μmol TE 100 g ⁻¹)	FRAP (μmol TE 100 g ⁻¹)	β-caroteno (mg 100 g ⁻¹)
1	Hexano	68	0,10	75,26 ± 1,75 ^e	51,67 ± 0,75 ^e	87,24 ± 0,49 ^{ef}	164,23 ± 2,29 ^c	11,63 ± 1,90 ^{ef}
2	Éter de petróleo	62	0,10	77,71 ± 1,08 ^{de}	47,81 ± 1,63 ^e	157,15 ± 0,95 ^b	227,65 ± 15,16 ^a	26,26 ± 1,15 ^c
3	CO ₂	40	15,0	84,98 ± 1,35 ^{cd}	1534,92 ± 137,46 ^c	138,60 ± 13,75 ^{bc}	207,47 ± 4,50 ^{ab}	11,39 ± 3,22 ^{ef}
4	CO ₂	40	25,0	73,92 ± 2,33 ^e	1236,13 ± 19,85 ^d	126,21 ± 1,56 ^{cd}	189,42 ± 12,16 ^b	19,87 ± 0,09 ^d
5	CO ₂	70	15,0	102,99 ± 8,04 ^b	2530,97 ± 42,68 ^b	85,70 ± 0,35 ^f	113,01 ± 9,99 ^d	8,50 ± 1,67 ^f
6	CO ₂	70	25,0	87,16 ± 10,27 ^c	2701,74 ± 19,87 ^a	196,88 ± 9,34 ^a	210,00 ± 3,65 ^{ab}	18,79 ± 0,28 ^d
7*	CO ₂	55	20,0	113,49 ± 1,34 ^a	2384,82 ± 244,23 ^b	201,95 ± 2,36 ^a	197,65 ± 23,90 ^b	14,66 ± 1,32 ^e
8	Propano	30	10,0	27,76 ± 0,86 ⁱ	25,52 ± 2,61 ^e	95,40 ± 4,60 ^{ef}	69,84 ± 0,88 ^e	44,77 ± 0,01 ^a
9	Propano	30	20,0	37,36 ± 0,27 ^h	25,31 ± 6,35 ^e	94,74 ± 7,07 ^{ef}	54,67 ± 6,09 ^e	36,63 ± 2,25 ^b
10	Propano	70	10,0	47,16 ± 3,07 ^g	41,14 ± 6,55 ^e	91,71 ± 3,32 ^{ef}	58,21 ± 1,63 ^e	30,16 ± 1,20 ^c
11	Propano	70	20,0	59,78 ± 1,96 ^f	76,42 ± 4,53 ^e	107,71 ± 2,96 ^{de}	96,66 ± 0,14 ^d	39,38 ± 3,85 ^b
12*	Propano	50	15,0	40,88 ± 0,49 ^{gh}	38,40 ± 10,31 ^e	95,74 ± 23,24 ^{ef}	56,01 ± 15,63 ^e	28,85 ± 0,31 ^c
13	Propano	50	5,0	41,84 ± 1,03 ^{gh}	45,39 ± 7,88 ^e	76,17 ± 2,97 ^f	104,25 ± 8,04 ^d	30,21 ± 1,66 ^c

* Média e desvio padrão das duplicatas. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna significam diferenças significativas entre amostras, como indicado pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

A TABELA 2.5 também apresenta o conteúdo de β -caroteno, composto muito desejado na indústria de alimentos e fármacos por seus potenciais benefícios a saúde (CATCHPOLE *et al.*, 2018), e cujos valores variaram de 8,50 a 44,77 mg β -caroteno 100 g⁻¹ nas condições estudadas. Os valores encontrados são superiores aos relatados por Dimic *et al.* (2012) para o óleo de amora-preta, 0,34 mg β -caroteno 100 g⁻¹. Além disso, a solubilidade do β -caroteno no propano tem sido relatada como sendo duas ordens de magnitude maior que no scCO₂ (CHUANG; JOHANNSEN, 2011), explicando os maiores valores apresentados pelos óleos obtidos com propano comprimido, 29,07 a 44,77 mg β -caroteno 100 g⁻¹. As amostras de óleo obtidas com scCO₂ apresentaram 8,34 a 19,87 mg β -caroteno 100 g⁻¹ e a pressão teve efeito significativo e positivo ($p < 0,05$) na extração do β -caroteno nas condições estudadas.

3.7 DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA

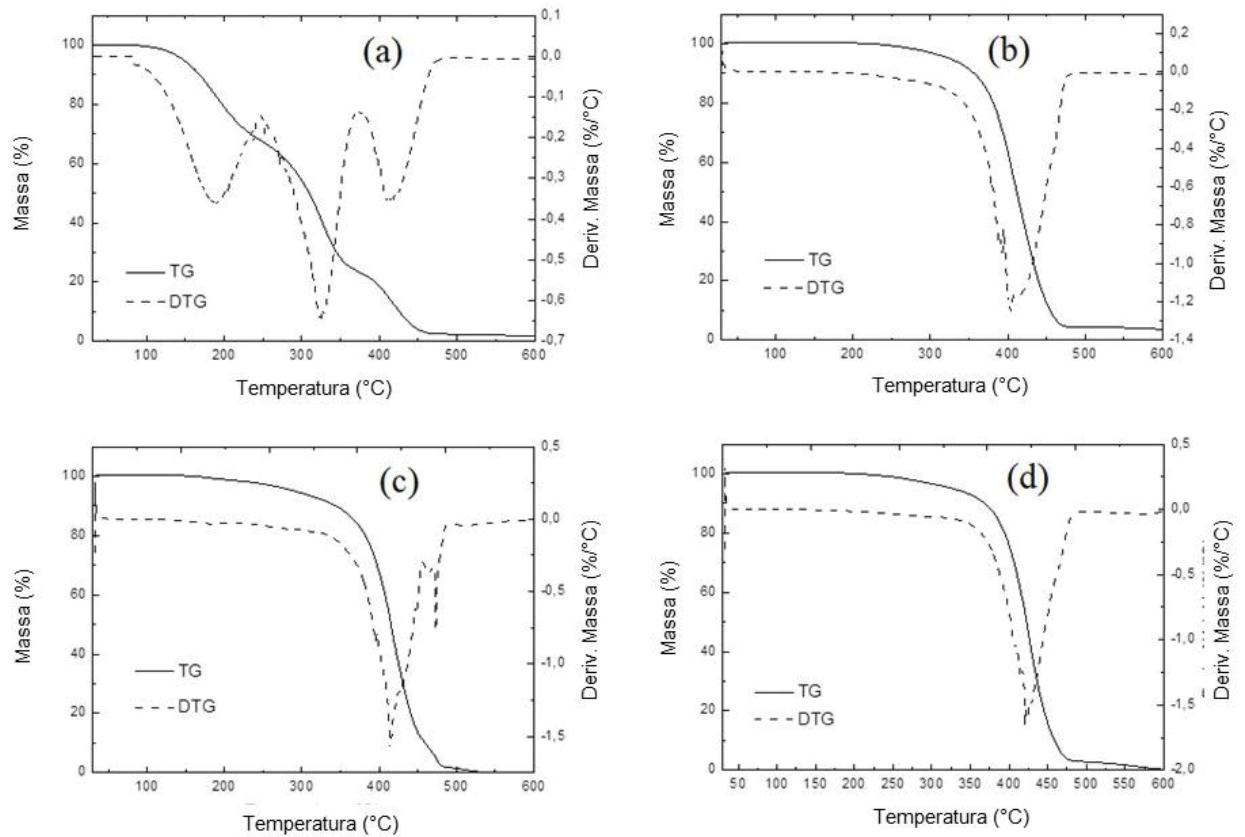
As FIGURAS 2.4a-d mostram as etapas da decomposição térmica dos óleos de semente de amora-preta. A curva termogravimétrica (TG) mostra a perda de massa e a curva termogravimétrica derivada (DTG) mostra a taxa de perda de massa durante a decomposição térmica, para uma faixa de temperatura de 30 a 600 °C. A faixa de temperatura de cada etapa da decomposição térmica, os valores de perda de massa e temperatura de pico são apresentados na TABELA 6.

As curvas termogravimétricas TG/DTG, FIGURAS 2.4b-d, mostram que o comportamento térmico das amostras de óleo obtidas com éter de petróleo, scCO₂ e propano comprimido são semelhantes, como corroborado pelas temperaturas dos picos (TABELA 2.6). A decomposição térmica ocorre em uma única etapa e provavelmente corresponde à decomposição dos ácidos graxos (DIMÍĆ *et al.*, 2012; GAO; BIRCH, 2016; GOUVEIA DE SOUZA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2002). Para as amostras de óleo obtidas com scCO₂ e propano 100% das amostras foram decompostas antes de 600 °C e, portanto, não restaram resíduos de cinza nas panelas de alumina. Embora os óleos apresentem composição semelhantes de ácidos graxos (TABELA 2.3), as diferenças entre as faixas de temperatura apresentadas na TABELA 2.6 podem ser atribuídas ao conteúdo de compostos antioxidantes naturais (TABELA 2.5), co-extraídos com os óleos, por exemplo,

polifenóis, carotenoides e tocoferóis (DWECK; SAMPAIO, 2004; GAO; BIRCH, 2016).

As curvas termogravimétricas TG/DTG para a amostra de óleo obtida com hexano (FIGURA 2.4a) não apresentaram comportamento térmico semelhante aos outros solventes. Para essa amostra, a decomposição térmica ocorreu em três etapas (TABELA 2.6). A primeira etapa tem início em 101,87 °C, muito abaixo das temperaturas das outras amostras de óleo, provavelmente devido à presença de produtos de oxidação lipídica e moléculas de hidrólise de triacilglicerol, por exemplo, mono e diacilgliceróis, e ácidos graxos livres. Como essas moléculas são mais suscetíveis à degradação térmica, elas podem ter deslocado a temperatura inicial da decomposição térmica para uma temperatura mais baixa (MISTRY; MIN, 1988; VECCHIO *et al.*, 2009). A segunda e terceira etapas, provavelmente correspondem à decomposição dos ácidos graxos, primeiro os poli-insaturados de 249,11 a 370,97 °C e depois os ácidos graxos monoinsaturados e saturados de 370,97 a 480,61 °C (SANTOS *et al.*, 2002). Além disso, as amostras de óleo obtidas com éter de petróleo e com hexano apresentaram teores de cinzas de 2,98 e 1,78 %, respectivamente.

FIGURA 2.4 - Decomposição térmica dos óleos das sementes da amora-preta por TGA 30 a 600 °C. (a) hexano (Ensaio 1), (b) éter de petróleo (Ensaio 2), (c) scCO₂ (Ensaio 6), e (d) propano (Ensaio 12).



FONTE: (CORREA *et al.*, 2020)

TABELA 2.6 - Dados da decomposição térmica dos óleos de semente de amora-preta obtido a partir das curvas TG/DTG

Extração	Etapa da decomposição térmica	Faixa de temperatura (°C)	Δm (%)	T* (°C)
Hexano	1 ^a	101,87 - 249,11	32,48	181,93
Ensaio 1	2 ^a	249,11 - 370,97	43,75	322,48
	3 ^a	370,97 - 480,61	21,27	407,11
Éter de petróleo	1 ^a	238,59 - 480,50	95,48	413,87
Ensaio 2				
scCO ₂	1 ^a	198,83 - 536,78	100,00	409,19
Ensaio 6				
Propano	1 ^a	224,70 - 586,64	100,00	409,96
Ensaio 12				

Δm , variação da perda de massa.

*T, temperatura de pico.

4 CONCLUSÃO

Este estudo visou avaliar o potencial do dióxido de carbono supercrítico e do propano subcrítico para extração do óleo das sementes da amora-preta orgânica cultivar Xavante. A extração com propano comprimido foi a mais eficiente quando comparada ao scCO₂, tanto em termos de rendimento de extração quanto de tempo extração, apresentando maiores taxas de extração inicial. As condições de operação avaliadas, pressão e temperatura, para o propano comprimido não foram significativas em relação ao rendimento de extração. Por outro lado, para as extrações com scCO₂, a pressão apresentou um efeito significativo e positivo.

A composição de ácidos graxos dos óleos foi semelhante e extremamente interessante do ponto de vista nutricional devido a elevada proporção de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoleico. O scCO₂ mostrou maior eficiência na extração de compostos com atividade antioxidante em comparação aos outros solventes. Entretanto, o propano comprimido apresentou melhor solubilidade para o β -caroteno. Apesar de todos os óleos apresentarem perfil semelhante de ácidos graxos, eles apresentaram diferentes atividades térmicas, provavelmente devido à presença de antioxidantes naturais extraídos. Portanto, as características dos óleos como boa estabilidade térmica e presença de altas quantidades, tanto de ácidos graxos insaturados quanto de compostos com atividade antioxidante, indicam um forte potencial de aplicação do óleo de semente da amora-preta cultivar Xavante como ingrediente para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

CAPÍTULO III : OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA SEMENTE DE AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) CULTIVAR XAVANTE USANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E ETANOL COMO COSSOLVENTE

RESUMO

A adição de um cossolvente polar para extração conjunta com dióxido de carbono supercrítico pode viabilizar a extração da fração lipossolúvel e de compostos bioativos mais polares de uma matriz. Assim, este estudo relata a obtenção de extratos de sementes da amora-preta utilizando CO₂ supercrítico e etanol como cossolvente. Para isso utilizou-se um delineamento experimental 2², variando a pressão (P) de 15,0 a 25,0 MPa e a temperatura (T), de 40,0 a 70,0 °C. A extração a 70 °C e 25 MPa apresentou os maiores resultados: 24,05 % de rendimento, conteúdo de fenólicos totais de 388,62 mg GAE 100 g⁻¹, ABTS de 12948,31 µmol TE 100 g⁻¹, DPPH de 12995,83 µmol TE 100 g⁻¹ e FRAP de 14242,68 µmol TE 100 g⁻¹. O perfil de ácidos graxos apresentou 92 % de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido linoleico (63 %). Os índices nutricionais lipídicos foram PUFA/SFA de 9,60, Hipercolesterolêmicos/Hipocolesterolêmicos de 16,23, Aterogenecidade de 0,06 e Trombogenecidade de 0,17. Vários ácidos fenólicos foram identificados no óleo, sendo o flavonol rutina o principal compostos fenólico determinado. A decomposição térmica do extrato iniciou a 196,25 °C e seu comportamento térmico indicou que para o óleo sofrer a menor ação de enzimas é recomendado seu armazenamento a -29,52 °C, temperatura em que as moléculas de triacilglicerol estão imobilizadas. O extrato na concentração de 4000 mg por kg de óleo apresentou fator de proteção contra a oxidação do óleo de soja maior que o BHA e BHT na análise Rancimat. Estes resultados indicam um grande potencial de aplicação deste extrato como antioxidante.

Palavras-chave: cossolvente, *Berries*, ácido linoleico, rutina, Rancimat.

1 INTRODUÇÃO

A amora-preta é uma fonte de compostos fenólicos que contribuem para sua elevada capacidade antioxidantes. Os frutos são normalmente consumidos frescos ou congelados, mas podem ser usados como ingrediente na fabricação de geleias, vinho, chá, sorvetes, sobremesas e outros produtos de panificação (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012; SCHULZ *et al.*, 2019). Entretanto, quando processados os frutos da amora geram uma enorme quantidade de resíduos, coprodutos, em sua maioria compostos de pele e sementes que são subutilizados

(GUSTINELLI; ELIASSON; SVELANDER; ANDLID; *et al.*, 2018; PAP *et al.*, 2004). Em especial, o processo de fabricação de suco de *berries* gera grandes quantidades de resíduos, cerca de 20 a 25 % do fruto inteiro (ALBA; CAMPBELL; KONTOGIORGOS, 2019). Estes coprodutos de processamento de frutas e vegetais, potencialmente contêm compostos fenólicos que podem ser extraídos e utilizados como subproduto para aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

As extrações de compostos de alto valor dos coprodutos da amora-preta são mais focados no bagaço e na recuperação das antocianinas (DA FONSECA MACHADO *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2018, 2015, 2017; PASQUEL REÁTEGUI *et al.*, 2014; SOZZI *et al.*, 2021). Os estudos sobre a semente são voltados para obtenção do óleo, seu teor de ácidos graxos e outros compostos bioativos (BUSHMAN *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2020; DIMIĆ *et al.*, 2012; FAZIO *et al.*, 2013; MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; KRSTIĆ; *et al.*, 2015; MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015; VAN HOED *et al.*, 2009, 2011; YANG *et al.*, 2011).

Um ponto crucial para a obtenção de extratos de alto valor, é a escolha do método de extração. Os métodos usuais para a extração utilizando solventes como Soxhlet e maceração, são trabalhosos, demorados e requerem uma quantidade substancial de solventes tóxicos como o metanol e o diclorometano. Além disso, podem não fornecer um extrato de alta qualidade, devido à baixa seletividade (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). Como alternativa, a extração com CO₂ supercrítico surge como uma técnica de extração que opera a temperaturas moderadas e pressões muito altas. Isto permite altas taxas de transferência de massa, que são difíceis de alcançar com solventes líquidos. Portanto, o tempo de extração necessário é menor. Como o CO₂ é uma molécula extremamente apolar e a maioria dos compostos bioativos é formado por moléculas polares, esta questão pode ser resolvida com a adição de cossolventes polares, também conhecidos como modificadores, como o etanol, para aumentar a solubilidade das substâncias polares (MANZOOR *et al.*, 2021).

Estudos sobre o uso de CO₂ com cossolventes polares para a extração de compostos bioativos das sementes da amora-preta não estão publicados na literatura recente. Portanto, os objetivos deste estudo foram: (i) encontrar o melhor cossolvente polar entre etanol e acetato de etila, considerando como resposta o rendimento da extração utilizando Soxhlet, atividade antioxidante e antocianinas

monoméricas totais (AMT); (ii) especificar a influência de duas condições principais de operação, pressão e temperatura, nas extrações com CO₂ e o cossolvente selecionado em relação ao rendimento de extrato; (iii) determinar as condições otimizadas de extração, melhores resultado de rendimento de extração e atividade antioxidante; (iv) determinar a composição de ácidos graxos e a qualidade lipídica dos principais extratos de sementes de amora; (v) identificar compostos bioativos por UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência e o comportamento térmico do extrato obtido nas condições ótimas e (vi) avaliar o potencial de proteção do extrato de semente de amora-preta no óleo de soja contra a oxidação pela análise de Rancimat.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os procedimentos de separação, secagem e moagem das sementes da amora-preta e caracterização da matéria-prima foram descritos no item 2.1 do Capítulo II. A amostra apresentava teor de umidade de $7,07 \pm 0,73$ %, tamanho médio das partículas de 0,56 mm, densidade real de 1370 ± 10 kg m⁻³, densidade aparente de 577,59 kg m⁻³ e porosidade do leito das partículas de 0,58.

2.2 SELEÇÃO DO COSSOLVENTE

O etanol e o acetato de etila foram avaliados, inicialmente, como solventes para a extração de compostos polares bioativos das sementes de amora-preta. As extrações usando o aparato de Soxhlet foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no item 2.2 do Capítulo II. O rendimento foi expresso em g de extrato por g de amostra seca. Para a seleção do melhor solvente para uso como cossolvente na extração com scCO₂, foram avaliadas as respostas: rendimento de extração, atividade antioxidante (ensaios CFT, ABTS, DPPH e FRAP) e AMT dos extratos.

2.3 EXTRAÇÃO UTILIZANDO SCCO₂ COM ADIÇÃO DE COSSOLVENTE

Os componentes básicos da unidade experimental de extração com fluidos pressurizados foram descritos no item 2.3 do Capítulo II. A unidade e seu procedimento de operação foram apresentados em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (FETZER *et al.*, 2018; JUCHEN *et al.*, 2019). As extrações foram realizadas empregando um delineamento experimental randomizado 2² com triplicata no ponto central, com pressão (P) variando de 15,0 a 25,0 MPa e temperatura (T) de 40,0 a 70,0 °C.

Em primeiro lugar, o extrator foi carregado com aproximadamente 20 g de sementes de amora-preta moídas e 20 g de etanol, 1:1 (m/m). Depois, o extrator foi preenchido com CO₂ nas condições de pressão e temperatura desejadas, iniciando-se a extração estática por 60 min (definido por testes preliminares, onde para esta matéria-prima o sistema está em equilíbrio após este tempo). Então, após a extração estática, a extração dinâmica foi iniciada com fluxo constante de CO₂ de 2,0 mL min⁻¹. As amostras de extratos das sementes de amora-preta foram coletadas, a pressão atmosférica e 18 °C, em tubos de ensaio de 10 mL em intervalos de tempo de 2,5 min (até 15 min do tempo de extração) e 5 min (de 20 a 30 min do tempo de extração). Após o procedimento de extração para a completa remoção do etanol, os extratos foram colocados em estufa com circulação de ar (Nova Ética, modelo 400) na temperatura de extração.

2.4 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

O preparo das amostras e as metodologias empregadas na quantificação do conteúdo de fenólicos totais (CFT) e outros métodos de determinação de atividade antioxidante, ABTS, DPPH e FRAP, foram as mesmas descritas anteriormente no item 2.6 do Capítulo II.

2.5 ANTOCIANINAS MONOMÉRICA TOTAIS (AMT)

Para a determinação do teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) foi utilizado o método diferencial de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Os extratos obtidos foram diluídos em duas soluções tampão de cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 mol L⁻¹) e de acetato de sódio pH 4,5 (0,40 M), em que o ajuste do pH foi feito pela adição de HCl concentrado. As absorbâncias foram medidas a 510 e 700 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, 1800), utilizando as soluções tampão como branco. A concentração de pigmentos no extrato foi calculada considerando a absorvidade molar (ϵ) de 26900 L cm⁻¹ mol⁻¹, massa molar de 449,2 g mol⁻¹, que correspondem à cianidina-3-glicosídeo, principal antocianina presente na amora-preta (SIRIWOHARN; WROLSTAD, 2004). Os resultados foram expressos como mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo (EC3G) por 100 g⁻¹ de extrato utilizando a Equação 4.

$$AMT = \frac{A.MW.DF.1000.V}{\epsilon.L.M} \quad (4)$$

Onde:

AMT = Conteúdo de antocianinas monoméricas totais (mg EC3G 100 g⁻¹ de extrato);

$$A = (Abs_{510\text{ nm}} - Abs_{700\text{ nm}})_{pH1.0} - (Abs_{510\text{ nm}} - Abs_{700\text{ nm}})_{pH4.5};$$

MW = 449,2– Massa molar da cianidina-3-glicosídeo (g mol⁻¹);

DF = fator de diluição;

V = volume (L);

ϵ = 26900 L cm⁻¹ mol⁻¹ absorvidade molar da cianidina-3-glicosídeo;

L = fator de correção do caminho óptico de 1 cm;

M = massa de extrato (g).

2.6 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS E QUALIDADE NUTRICIONAL LIPÍDICA DOS EXTRATOS DE SEMENTES AMORA-PRETA

A determinação do perfil dos ácidos graxos dos extratos de sementes de amora-preta, está descrito conforme o item 2.5 do Capítulo II.

Utilizando o perfil de ácidos graxos dos extratos das sementes de amora-preta, foi possível calcular quatro índices de qualidade nutricional lipídica: a razão entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados (PUFA/SFA); a razão entre os

ácidos graxos hipercolesterolêmicos/hipocolesterolêmicos (H/H) utilizando a Equação 5 (CHEN; LIU, 2020; SANTOS-SILVA; BESSA; SANTOS-SILVA, 2002), o índice de Aterogenecidade (IA) e o índice Trombogenecidade (IT) utilizando as Equações 6 e 7, respectivamente (CHEN; LIU, 2020; CUNHA *et al.*, 2019; ULBRICHT; SOUTHGATE, 1992).

$$H/H = \frac{C18:1\omega9 + C18:2\omega6 + C18:3\omega3 + C18:3\omega6}{C16:0} \quad (5)$$

$$IA = \frac{C16:0}{\sum MUFA + PUFA} \quad (6)$$

$$IT = \frac{C16:0 + C18:0}{0.5(\sum MUFA) + 0.5(\sum \omega6) + 3(\sum \omega3) + (\sum \omega3/\omega6)} \quad (7)$$

2.7 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR UPLC NO EXTRATO OBTIDO NA CONDIÇÃO OTIMIZADA

A análise dos compostos fenólicos presentes no extrato otimizado, foi realizado em Acquity UPLC H-Class (Waters, Miliford, MA, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e coluna Acquity BEH C18 (Waters, Miliford, MA, EUA) de 2,1 mm × 50,0 mm, x 17,0 µm, a 30 °C. O extrato foi filtrado em filtro seringa de nylon 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil). As fases móveis foram constituídas de A (0,1 % de ácido fórmico em água ultrapura) e B (0,1 ácido fórmico em metanol). A vazão foi de 0,35 mL min⁻¹ e as condições de gradiente de eluição foram 0 min – 0 % B; 8 min – 20 % B; 15 min – 100 % B; 18 min – 0 % B e eluição isocrática com 0 % de B até 20 min. As corridas foram monitoradas em 260, 270, 280 e 370 nm. A quantificação foi realizada utilizando as curvas de calibração para os padrões ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido m-cumárico, ácido ferúlico, ácido o-cúmarico, ácido sinápico, ácido elágico, rutina, hesperidina e genisteína.

2.8 ANÁLISE TÉRMICA DO EXTRATO OBTIDO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS

A decomposição térmica do extrato de sementes de amora-preta obtidos nas condições otimizadas (Ensaio 6, TABELA 3.1) foi avaliada por termogravimetria (TGA). A análise térmica foi realizada em equipamento TGA (TGA 4000, Thermogravimetric Analyzer, Perkin-Elmer – Pyris, - Shelton, EUA) e procedimento baseado no método proposto por Micic et al (2015). O extrato $5,20 \pm 0,50$ mg, foi colocado em uma panelinha de alumina aberta, inserido no equipamento e submetido a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 30 a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, à pressão atmosférica sob atmosfera de N_2 a 20 mL min^{-1} . Foi utilizada como referência uma panelinha de alumina vazia.

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) foi realizada em equipamento DSC (DSC 850 Perkin Elmer Inc. - Waltham, EUA) usando N_2 como gás de purga. Cerca de 8 mg do extrato foram colocados em uma panelinha de alumínio e hermeticamente selados. Um teste de resfriamento e aquecimento foi realizado seguindo o método proposto por Micic et al (2015). Primeiro a amostra foi mantida a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, depois aquecida a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantida durante 5 min, depois resfriada a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantida nesta temperatura durante 5 min e então aquecida de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A curva DSC foi registrada e as temperaturas de pico e início foram calculadas utilizando o software PyrisTM (Shelton, EUA).

2.9 ANÁLISE DE RANCIMAT

O extrato obtido nas condições otimizadas foi adicionado em óleo de soja refinado (sem adição de antioxidantes) fornecido pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial, em concentrações de 500, 1000, 2000 e 4000 mg de extrato por kg de óleo. Os resultados foram comparados com óleo de soja adicionado com os antioxidantes sintéticos BHT e BHA, na concentração de 100 mg kg^{-1} . Uma amostra controle (óleo de soja sem antioxidante) também foi oxidada sob as mesmas condições. A estabilidade oxidativa e o comportamento das amostras foram avaliados com base no método proposto por Abbedou et al (2013). Os ensaios foram realizados no equipamento Rancimat (Metrohm Model 873 – Herisau, Suíça),

na Biotec (Universidade Estadual do Centro-Oeste), sob as condições: 3,0 g de óleo, fluxo de ar de 10 L h⁻¹ e temperatura de 110 °C e água ultrapura (cuja condutividade é inferior a 5 uS cm⁻¹). A condutividade desta água é medida de forma contínua. A condutividade da água aumenta quando os produtos de oxidação emergem.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Descrito no item 2.8 Capítulo II.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DO COSSOLVENTE

A molécula de dióxido de carbono é fortemente apolar, enquanto os compostos fenólicos em sua maioria possuem mais moléculas polares. Assim, para a extração destas moléculas é indicado o uso de cossolventes polares (HIDALGO; ALMAJANO, 2017; IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Neste estudo, devido ao perfil de compostos fenólicos encontrados em amora-pretas, a literatura sugere o uso de cossolventes (HIDALGO; ALMAJANO, 2017; IGNAT; VOLF; POPA, 2011) o etanol é mais utilizado, pois é considerado seguro para o ser humano e o meio ambiente (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014), e acetato de etila é utilizado nas industriais farmacêuticas, de aromas e alimentícia (FALCO; KIRAN, 2012).

Os rendimentos de extração, TABELA 3.1, a atividade antioxidante e AMT dos extratos, TABELA 3.2, foram avaliados para a determinação do cossolvente. Para o rendimento de extração, o etanol foi quase seis vezes mais eficiente que o acetato de etila 36,07 % e 6,60 %, respectivamente (TABELA 3.1). Em relação a atividade antioxidante, para todos os diferentes ensaios e AMT também, TABELA 3.2, os resultados obtidos com etanol foram todos superiores aos dos obtidos com acetato de etila ($p < 0,05$). Portanto, o etanol foi selecionado como cossolvente na extração com CO₂.

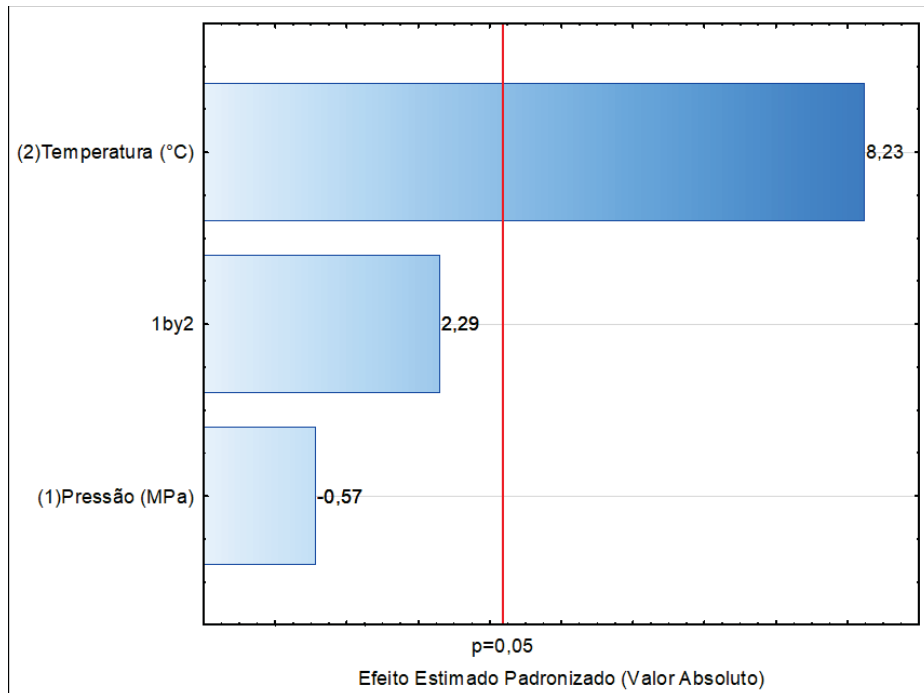
3.2 EXTRAÇÃO UTILIZANDO SCCO₂ MAIS COSSOLVENTE

Os resultados da extração das sementes de amora-preta com CO₂ e etanol (CO₂ + EtOH) são apresentados na TABELA 3.1. Os rendimentos de extração variaram entre 6,74 e 24,05 %. O maior rendimento de 24,05 %, foi obtido no ensaio 6 que corresponde as condições de temperatura e pressão mais altas estudadas, 70 °C e 25 MPa. Quando se mantem a pressão a 25 MPa e reduz a temperatura para 40 °C, o rendimento da extração cai drasticamente para 6,74 %.

A performance da extração usando scCO₂ e etanol a pressão constante é afetada principalmente pela temperatura através de dois mecanismos. O aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor dos materiais solúveis e a solubilidade do etanol (cossolvente), ambos aumentam a taxa de extração. Por outro lado, um aumento da temperatura reduz a densidade e solubilidade do scCO₂, o que leva a uma diminuição da taxa de extração (GOYENECHE *et al.*, 2020). A 25 MPa (TABELA 3.1) quando a temperatura aumenta de 40 °C para 70 °C o rendimento da extração aumenta em quase seis vezes. Um aumento também é verificado para as condições a pressão de 15 MPa onde o aumento da temperatura de 40 °C para 70 °C quase duplicou o rendimento da extração. O efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) da variável temperatura nas condições estudadas é corroborado pelo gráfico de Pareto apresentado na FIGURA 3.1. A pressão não apresentou efeito significativo nas condições estudadas. Esses resultados indicam que o etanol teve sua solubilidade aumentada com o aumento da temperatura, já que os experimentos utilizando somente o CO₂ puro mostrados no CAPÍTULO III a influência da pressão foi predominante e significativa ($p < 0,05$).

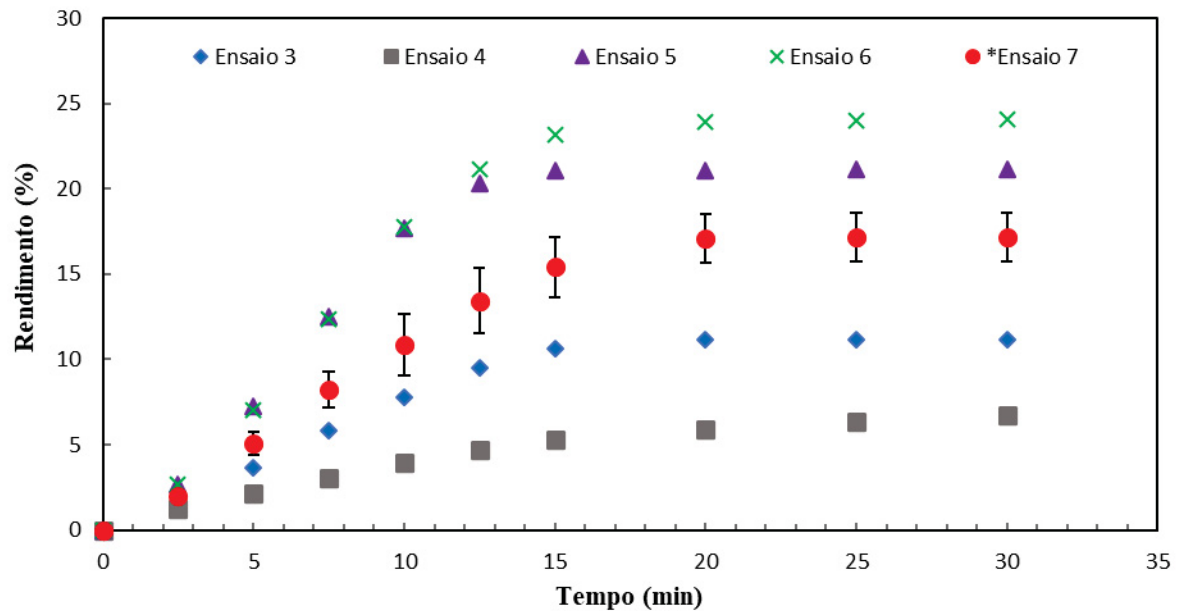
As curvas globais de extração FIGURA 3.2 para as extrações de sementes de amora em diferentes condições de temperatura e pressão. Para as condições de maior temperatura de extração ensaios 5 e 6 e 7 a primeira etapa de extração, onde a transferência de massa por convecção é alta nos primeiros 15 min, após segue para a etapa de transferência de massa por difusão com o esgotamento do etanol na câmara de extração e a predominância do scCO₂ como solvente. Isto pode indicar que, nestas condições, como observado por Juchen (2019) o scCO₂ atuou mais a como transportador de extrato, ou seja, o CO₂ auxiliou no transporte da mistura de extrato e cossolvente, enquanto o etanol cossolvente atuou extraindo os compostos. Para os ensaios em condições de menor temperatura 3 e 4, a taxa de extração é bastante lenta com a transferência de massa por convecção baixa, sendo predominante a etapa de difusão.

FIGURA 3. 1 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros dos processos no rendimento das extrações usando CO₂ + EtOH



FONTE: A autora (2021)

FIGURA 3.2 - Curvas experimentais de extração para os óleos da semente de amora-preta obtidos com CO₂ + EtOH



Ensaio 3, 40 °C e 15 MPa; Ensaio 4, 40 °C e 25 MPa; Ensaio 5, 70 °C e 15 MPa, Ensaio 6, 70 °C e 25 MPa; e Ensaio 7, 55 °C e 20 MPa (Ponto central). Para o Ensaio 7, as barras representam o desvio padrão.

TABELA 3.1 – Condições experimentais e rendimentos de extração obtidos para sementes de amora-preta.

Ensaio	Solvente	T (°C)	P (MPa)	Densidade CO ₂ (kg m ⁻³) ^a	$\dot{q}$ (g min ⁻¹)	TEE (min)	Tempo de Extração (min)	Rendimento de Extração ^b (%)
1 ^c	Etanol	78	0,10	-	-	-	360	36,07 ± 0,04
2 ^c	Acetato de Etila	77	0,10	-	-	-	360	6,60 ± 0,75
3	CO ₂ + EtOH	40	15,0	780,23	1,91	60	30	11,19
4	CO ₂ + EtOH	40	25,0	879,49	2,00	60	30	6,74
5	CO ₂ + EtOH	70	15,0	505,88	1,91	60	30	21,13
6	CO ₂ + EtOH	70	25,0	736,92	2,00	60	30	24,05
7 ^d	CO ₂ + EtOH	55	20,0	754,61	1,96	60	30	17,17 ± 1,51

^a Densidade CO₂ nas condições de pressão do planejamento experimental e temperatura da bomba seringa que é de 10 °C. Valores obtidos no do NIST banco de dados (LEMMON; MCLINDEN; FRIEND, 2020).

^b Massa de extrato pela massa de amostra.

^d Médias de rendimento de extração ± desvio padrão da triplicata para os ensaios 1, 2 e 7.

TEE = Tempo de extração estática

Comparando os rendimentos de extração, com o maior rendimento relatado por Reátegui et al (2014) para o bagaço de amora-preta, que foi de 18,25 %, (condições de CO₂ + EtOH 90 %, 60 °C, 15 MPa e assistido por ultrassom, 200 W) o rendimento obtido foi menor que os ensaios 5 e 6 e próximo do ensaio 7.

3.3 ENSAIOS ANTIOXIDANTES E DO TEOR DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS (AMT)

Os resultados do CFT para os extratos de sementes de amora-preta extraídos em diferentes condições são mostrados na TABELA 3.2. A faixa de CFT variou de 133,54 a 3855,62 mg EAG 100 g⁻¹. O ensaio 6 foi o mais eficiente para a extração de antioxidante utilizando o ensaio CFT de 3855,62 mg EAG 100 g⁻¹. Considerando o delineamento experimental, para as extrações com CO₂ + EtOH, a temperatura apresentou efeito significativo e positivo ($p < 0,05$) para o CFT. Além disso, os resultados de CFT em todas as condições de extração para o CO₂ + EtOH foram superiores ao relatado para o bagaço de amora-preta (condições de CO₂ + EtOH 90 %, 60 °C, 15 MPa e assistido por ultrassom, 200 W) (PASQUEL REÁTEGUI *et al.*, 2014).

A TABELA 3.2 também apresenta as atividades antioxidantes obtidas por outros três ensaios diferentes. Para todos esses métodos, assim como o TPC, o ensaio 6 apresentou os melhores resultados ($p < 0,05$) ABTS de 12948,31 µmol TE 100 g⁻¹, DPPH de 12995,83 µmol TE 100 g⁻¹ e FRAP de 14242,68 µmol TE 100 g⁻¹. Considerando o delineamento experimental para o CO₂ + EtOH, a pressão e a temperatura não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) nos resultados dos métodos ABTS, DPPH e FRAP.

As extrações com CO₂ + EtOH, TABELA 3.2, não se mostraram eficientes para recuperação de antocianinas, a faixa de AMT foi de 33,10 a 79 mg EC3G 100 g⁻¹, valor bem inferior ao obtido para o extrato de etanol 317,89 mg EC3G 100 g⁻¹. A expectativa de uma recuperação eficiente de antocianinas era baixa devido a semente não possuir este composto, apenas resíduos de pele impregnados na parede da semente.

Portanto, as condições do ensaio 6, 70 °C e 25 MPa foram as que resultaram nos melhores resultados em relação ao rendimento de extrato e atividade

antioxidante, podendo ser considerada a condição ótima para este estudo tendo sido escolhida para ser utilizada nas próximas análises.

3.4 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E QUALIDADE NUTRICIONAL LIPÍDICA DOS EXTRATOS DE SEMENTES DE AMORA-PRETA.

A TABELA 3.3 mostra o perfil de ácidos graxos para os extratos das sementes de amora-preta. O teor de ácidos graxos insaturados, variou de 91,46 a 92,92 %, independente do solvente utilizado, muito semelhante ao encontrado nos óleos obtidos no CAPÍTULO II (TABELA 2.3) utilizando solventes apolares, que variou de 92,77 a 93,77 %. Os resultados dos índices da qualidade nutricional lipídica dos ácidos graxos do extrato de amora-preta também estão apresentados na TABELA 3.3. O índice de PUFA/SFA é atualmente utilizado para medir o seu efeito em relação a saúde cardiovascular. Uma dieta baseada no consumo de PUFA's pode diminuir o colesterol lipoproteico de baixa densidade (LDL) e diminuir os níveis de colesterol sérico e os SFAs aumentam os níveis de colesterol sérico (CHEN; LIU, 2020). Consequentemente, quanto maior essa proporção, melhor o efeito, para os extratos de amora-preta os índices de PUFA/SFA variariam de 8,88 a 10,70, essa faixa é melhor que a encontrada para o óleo de girassol que variou de 4,75 a 4,94 (FARAJZADEH ALAN *et al.*, 2019; FILIP; HRIBAR; VIDRIH, 2011). Para a relação H/H, valores altos significam benefícios para o metabolismo do colesterol, com o aumento da formação de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (CUNHA *et al.*, 2019). Os extratos de amora-preta tiveram o H/H variando entre 15,54 e 18,43, valores superiores aos relatados pela literatura para o óleo de semente de groselha-negra (13,87), o óleo de abacate (2,06) e o óleo de semente de macadâmia (4,91) (YING *et al.*, 2018). Em relação ao IA e IT, valores mais baixos significam maior teor de ácidos graxos antiaterogênicos, aumentando consequentemente o potencial de prevenção de doenças coronarianas (CUNHA *et al.*, 2019), neste estudo os valores de IA e IT variaram de 0,05 e 0,06 e 0,15 a 0,18, respectivamente, valores inferiores aos encontrados na literatura para o azeite de oliva, 0,14 e 0,32, óleo de girassol 0,07 e 0,28 (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1992) e óleo de semente de groselha negra, 0,10 e 0,23 (YING *et al.*, 2018).

TABELA 3.2 - Atividades antioxidante e antocianinas monoméricas totais para os extratos de semente de amora-preta.

Ensaio	Solvente	T (°C)	P (MPa)	CFT (mg EAG 100 g ⁻¹)	ABTS (μmol TE 100 g ⁻¹)	DPPH (μmol TE 100 g ⁻¹)	FRAP (μmol TE 100 g ⁻¹)	AMT (mg EC3G 100 g ⁻¹)
1	Etanol	78	0,10	3641,81 ± 21,76 ^b	9892,53 ± 306,25 ^c	1192,97 ± 15,70 ^e	12088,30 ± 30,19 ^b	317,89 ± 20,58 ^a
2	Acetato de Etila	77	0,10	133,54 ± 2,57 ^f	435,68 ± 5,61 ^f	452,38 ± 11,35 ^e	889,00 ± 10,10 ^e	60,03 ± 3,14 ^{bc}
3	CO ₂ + EtOH	40	15,0	2472,09 ± 55,07 ^d	8806,72 ± 390,01 ^d	8132,41 ± 976,39 ^c	9719,80 ± 546,56 ^c	57,30 ± 8,53 ^{bc}
4	CO ₂ + EtOH	40	25,0	1467,74 ± 25,85 ^e	4507,51 ± 352,80 ^e	4747,69 ± 446,92 ^d	5907,76 ± 6,23 ^d	79,33 ± 2,76 ^b
5	CO ₂ + EtOH	70	15,0	3226,50 ± 48,14 ^c	10937,27 ± 41,69 ^b	10836,71 ± 105,61 ^b	11638,56 ± 137,31 ^b	49,44 ± 1,57 ^c
6	CO ₂ + EtOH	70	25,0	3855,62 ± 36,36 ^a	12948,31 ± 737,56 ^a	12995,83 ± 646,66 ^a	14242,68 ± 643,66 ^a	33,10 ± 5,98 ^c
7*	CO ₂ + EtOH	55	20,0	3407,69 ± 188,63 ^c	11677,42 ± 742,63 ^b	11465,68 ± 643,94 ^b	12382,72 ± 147,55 ^b	55,56 ± 3,58 ^{bc}

* Média e desvio padrão das duplicatas. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna significam diferenças significativas entre amostras, como indicado pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

TABELA 3.3 – Perfil de ácidos graxos e índices de qualidade nutricional lipídica dos extratos de semente de amora-preta.

Ácido graxo	ácido graxo (%)		
	CO ₂ + EtOH	Etanol	Acetato de Etila
	Ensaio 6	Ensaio 1	Ensaio 2
Palmítico (C16:0)	5,60	5,82	4,97
Esteárico (C18:0)	2,31	2,72	2,21
Oleico (C18:1 ω 9)	14,98	14,52	14,78
Linoleico (C18:2 ω 6)	65,03	65,07	66,32
γ -Linolênico (C18:3 ω 6)	10,41	10,35	9,95
Gadoleico (C20:1)	1,20	1,09	1,22
Linolênico (C18:3 ω 3)	0,46	0,43	0,55
Σ SFA ^a	7,91	8,54	7,18
Σ MUFA ^b	16,18	15,61	16,00
Σ PUFA ^c	75,90	75,85	76,82
Σ MUFA+PUFA	92,08	91,46	92,82
ω 3/ ω 6	0,01	0,01	0,01
PUFA/SFA ^d	9,60	8,88	10,70
H/H ^e	16,23	15,54	18,43
IA ^f	0,06	0,06	0,05
IT ^g	0,17	0,18	0,15

O desvio padrão para todos os ácidos graxos foi menor que 0,01.

^aÁcidos graxos saturados.

^bÁcidos graxos monoinsaturados.

^cÁcidos graxos poli-insaturados.

^dRazão entre poli-insaturados/saturados ácidos graxos.

^eRazão entre hipercolesterolêmicos/hipocolesterolêmicos.

^fÍndice de Aterogenecidade.

^gÍndice de Trombogenicidade.

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS DETERMINADOS POR UPLC DO EXTRATO OBTIDO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS

O conteúdo dos ácidos fenólicos e flavonoides no extrato otimizado, Ensaio 6, das sementes da amora-preta foram determinados por UPLC. A TABELA 3.4 mostra que, para o extrato otimizado, dez ácidos fenólicos foram identificados: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido m-cumárico, ácido ferúlico, ácido o-cúmarico, ácido sinápico e ácido elágico. Estes ácidos correspondem a um conteúdo total em torno de 45,13 mg de ácidos fenólicos por 100 de extrato. Este é um valor bastante interessante, quando comparado com o extrato de semente de uva, conhecido como ingrediente em formulações cosméticas. O extrato obtido com 75 % de etanol apresentou um teor de 58 mg de ácidos fenólicos por 100 de extrato (ALRUGAIBAH *et al.*, 2021).

O ácido fenólico predominante do extrato de amora-preta foi o ácido protocatecuico, 19,34 mg 100 g⁻¹, valor superior aos obtidos para os cultivares de amora-preta da Anatólia Oriental que variaram de 0,394 a 1,179 mg 100 g⁻¹ (GÜNDOĞDU; KAN; CANAN, 2016) e para o óleo cru de semente de amora que foi de 7,03 mg 100 g⁻¹ (VAN HOED *et al.*, 2011). Estudos apontam diversas propriedades farmacológicas para este ácido como antioxidante, antibacteriano, anticancerígeno, antihiperlipidêmico, antidiabético e anti-inflamatório (KAKKAR; BAIS, 2014). Alguns ácidos, como o ácido sinápico está presente na polpa do fruto de amora-preta (ZIA-UL-HAQ *et al.*, 2014). Assim não é esperado que este composto seja encontrado no óleo da semente, mas não foi detectado no óleo de amora-preta prensado a frio, provavelmente pela natureza polar do composto (VAN HOED *et al.*, 2011). Neste trabalho o uso do etanol como cossolvente pode ser uma possível explicação para a presença de 1,33 mg 100 g⁻¹ deste composto no extrato da semente.

A TABELA 3.4 também mostra os flavonoides identificados, rutina, hesperidina e genisteína, assim como seu conteúdo. O principal composto identificado no extrato da semente foi a rutina, 411,13 mg 100 g⁻¹, apontada em vários estudos como um dos principais flavonóis no fruto da amora-preta (GÜNDOĞDU; KAN; CANAN, 2016; HUANG *et al.*, 2012; JAKOBEK *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2020; SCHULZ *et al.*, 2019). A hesperidina não foi detectada no

amadurecimento do fruto da amora-preta no estágio de plena maturidade e a genisteína (SCHULZ *et al.*, 2019) não foi encontrada em estudos com amora-preta.

TABELA 3.4 – Perfil de Ácidos fenólicos e flavonoides do extrato, Ensaio 6, da semente de amora-preta

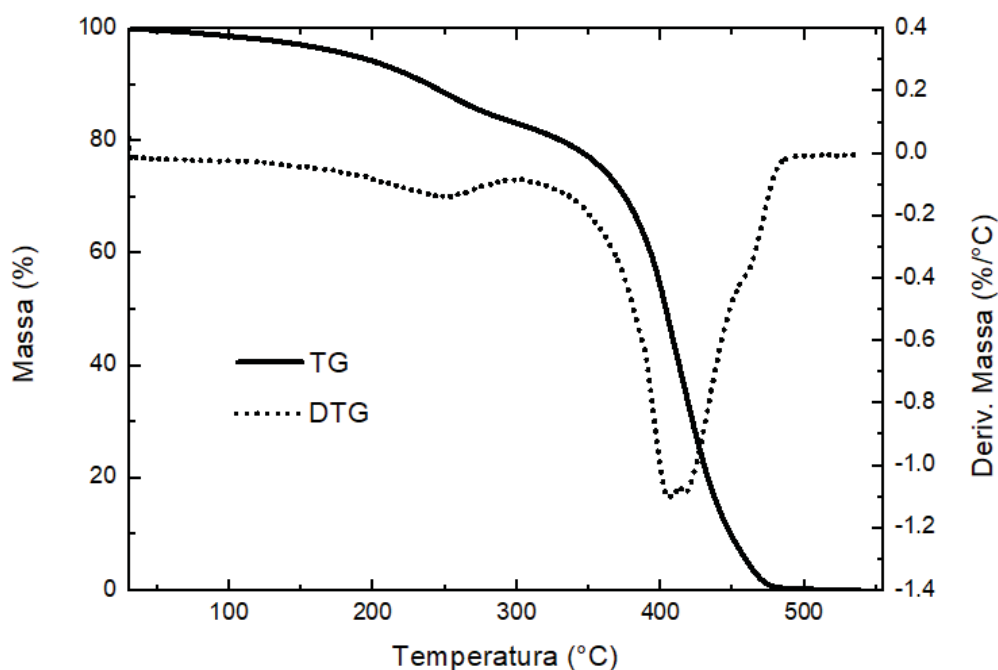
Composto	Concentração mg 100 g ⁻¹
Ácido gálico	3,97 ± 0,03
Ácido protocatecuico	10,34 ± 0,05
Ácido gentísico	4,90 ± 0,04
Ácido clorogênico	3,27 ± 0,01
Ácido p-cumárico	4,41 ± 0,43
Ácido m-cumárico	4,42 ± 0,10
Ácido ferúlico	2,20 ± 0,02
Ácido o-cúmarico	1,78 ± 0,01
Ácido-sinápico	1,33 ± 0,08
Ácido elágico	8,51 ± 0,55
Rutina	411,13 ± 1,67
Hesperidina	8,53 ± 0,12
Genisteína	2,43 ± 0,04

FONTE: A autora (2021)

3.6 ANÁLISES TÉRMICAS DO EXTRATO EM CONDIÇÕES ÓTIMAS

As curvas termogravimétricas TG/DTG, FIGURA 3.3, mostram o comportamento térmico do extrato obtido em condições ótimas (ensaio 6). A decomposição térmica ocorreu em uma única etapa, na faixa de temperatura de 196,25 a 502,82 °C, corresponde à decomposição dos ácidos graxos e polissacarídeos (MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015) e finalmente a 502,82 °C toda a amostra do extrato foi decomposta.

FIGURA 3.3 - Curvas TG/DTG para o extrato de sementes de amora-preta obtidos com CO₂ + EtOH ensaio 6

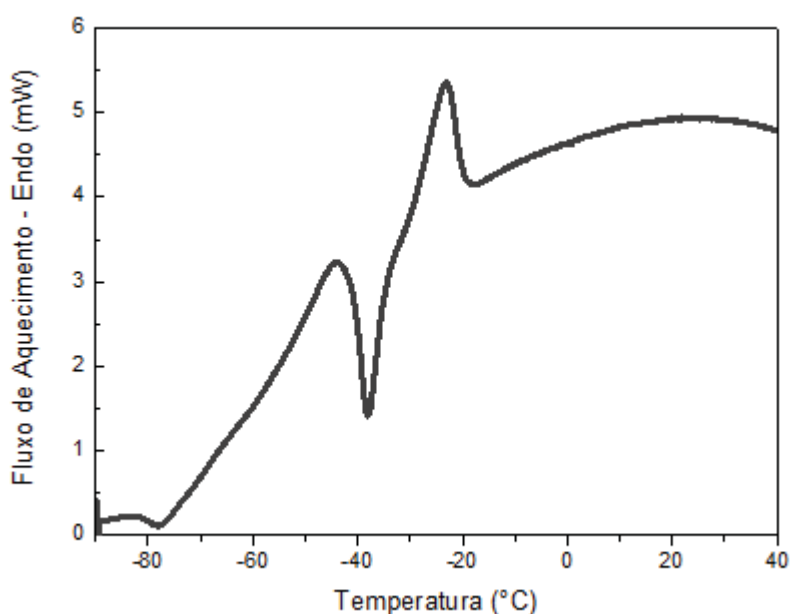


FONTE: A autora (2021)

A curva DSC, FIGURA 3.4, mostra as transições térmicas do extrato obtido em condições ótimas, ensaio 6. Estas transições foram identificadas na etapa de aquecimento de -90 a 40 °C, especificamente na faixa de temperatura de -50 a -10 °C, dois picos endotérmicos em -44,75 e -23,50 °C, e um pico exotérmico a -38,18 °C. Uma curva DSC similar foi relatada por (MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015) para a farinha de semente de amora-preta, dois picos endotérmicos a -41,36 e -19,94 °C, e um pico exotérmico a -38,55 °C. O primeiro pico endotérmico a -44,75 °C e o pico exotérmico a -38,18 °C correspondem ao fenômeno conhecido como poliformismo dos óleos vegetais, onde os cristais de triacilgliceróis têm mais do que uma forma. O segundo pico endotérmico corresponde à fusão das formas cristalinas dos óleos. Os lipídeos presentes no extrato de semente de amora-preta começam a fundir a -29,52 °C e se transformam totalmente para o estado líquido a -20,06 °C. Quando os óleos estão na forma cristalina a propagação da reação oxidativa e a hidrólise do triacilglicerol pela enzima lipase pode ser limitada, pois as moléculas de triacilglicerol estão imobilizadas (MICIĆ; OSTOJIĆ; SIMONOVIĆ; PEZO; *et al.*, 2015). Com base nestes dados, o extrato de amora-preta deve ser

armazenado a uma temperatura inferior a $-29,52\text{ }^{\circ}\text{C}$, para melhor preservar o óleo presente.

FIGURA 3.4 - Curva DSC para o extrato de sementes de amora-preta obtidos com $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ Ensaio 6



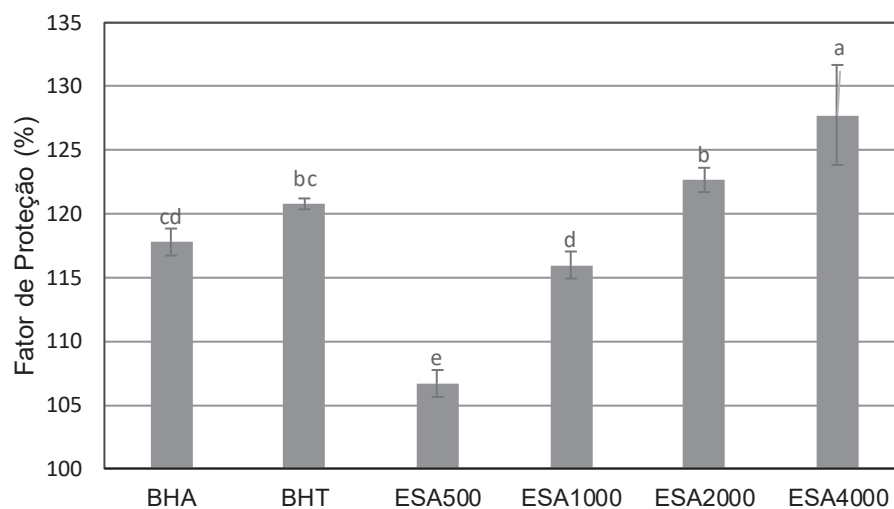
FONTE: A autora (2021)

3.7 ANÁLISE RANCIMAT

O objetivo da análise de Rancimat é determinar o período de indução através da detecção de ácidos voláteis formados durante a oxidação do óleo (MATTHÄUS, 1996). O fator de proteção (FP) para óleo de soja contendo extrato de semente de amora-preta (ESA) obtido em condições ótimas (ensaio 6) em diferentes concentrações 500 (ESA500); 1000 (ESA1000); 2000 (ESA2000); e 4000 (ESA4000) mg kg^{-1} , e os antioxidantes sintéticos BHA e BHT na concentração de 100 mg kg^{-1} , são apresentados na FIGURA 3.5. Na concentração de 4000 mg kg^{-1} (ESA4000) o FP encontrado foi o maior em relação a todas as outras concentrações de extrato testadas e também aos obtidos para o BHA e BHT ($p < 0,05$). Os valores de FP obtidos utilizando ESA, podem ser atribuídos a estabilidade térmica, $196,25\text{ }^{\circ}\text{C}$, e pelo seu perfil e conteúdo de compostos fenólicos, TABELA 3.4 do extrato. De

acordo com a literatura, o flavonol rutina, apresentou a mais forte capacidade antioxidante e desoxidação dos radicais livres entre cerca de uma centena de compostos fenólicos (CAI *et al.*, 2004; CHUN; KIM; LEE, 2003; HUANG *et al.*, 2012; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Para os ácidos fenólicos, a ordem da capacidade antioxidante diminui a partir do ácido protocatecúico > ácido clorogênico > ácido gentístico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico (HUANG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2009; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Alguns estudos que utilizaram extratos vegetais como antioxidantes obtiveram resultados similares a este trabalho, extratos de casca de batata com alto teor de ácido clorogênico, apresentaram alta estabilidade oxidativa em óleo de soja (FRANCO *et al.*, 2016), extrato de *goji berry*, rico em rutina, mostrou maior estabilidade oxidativa em óleo de soja do que o BHA e BHT (PEDRO *et al.*, 2017).

FIGURA 3.5 - Fator de proteção (FP) para diferentes concentrações de extrato de sementes de amora-preta (ESA) ensaio 6 e antioxidantes sintéticos BHA e BHT adicionados no óleo de soja



Concentrações no óleo de soja: 500 (ESA500), 1000 (ESA1000), 2000 (ESA2000), e 4000 (ESA4000) mg kg⁻¹ e, BHA e BHT na concentração de 100 mg kg⁻¹.

FONTE: A autora (2021).

4 CONCLUSÃO

O etanol apresentou maior rendimento de extração e atividade antioxidante em todos os ensaios sendo, por este motivo, escolhido como cossolvente para o planejamento experimental de extração com CO₂. Nas condições de operação avaliadas, a temperatura apresentou um efeito positivo e significativo no rendimento da extração. O extrato obtido a 70 °C e 25 MPa foi o extrato considerado otimizado nas condições estudadas, pois apresentou o maior rendimento de extração e atividade antioxidante em todos os ensaios avaliados. O perfil de ácidos graxos apresentou um teor de PUFA's acima de 70 %, composto principalmente por ácido linoleico. Consequentemente todos os índices de qualidade nutricional lipídica calculados apresentaram excelentes resultados em comparação a outras fontes vegetais. Os principais compostos fenólicos identificados por UPLC foram a rutina e o ácido protocatecuico. As análises térmicas dos extratos mostraram que o extrato inicia a sua decomposição termo oxidativa a partir de 196 °C e que, para preservar os lipídeos presentes no extrato da ação enzimática oxidativa a temperatura ideal de armazenamento deve ser abaixo de -29,52 °C. A análise Rancimat revelou que o fator de proteção contra oxidação do óleo de soja utilizando o extrato da semente na concentração de 4000 mg por kg de óleo de soja é maior que do BHA e BHT. Portanto, estas características indicam um alto potencial de uso dos extratos das sementes de amora-preta cultivar Xavante na formulação de produtos nas indústrias de alimentos e fármacos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permite considerar que as sementes de amora-preta do cultivar Xavante possuem uma gama de compostos com possíveis potenciais bioativos e com alta aplicabilidade industrial. Os solventes considerados tradicionais na extração como é o caso do hexano continuam obtendo altos rendimentos de extração de óleos. No entanto, altos rendimentos não significam extratos de alta qualidade, como se pode observar para a maioria dos resultados dos ensaios de atividade antioxidante, conteúdo de β -caroteno e estabilidade térmica do extrato obtido com o hexano. As extrações com fluidos pressurizados mostram resultados promissores, tanto para o scCO₂ como para o propano, tudo depende dos compostos alvo de extração. O perfil de ácidos graxos do óleo das sementes é realmente excelente tanto do ponto de vista nutricional como tecnológico, pois o teor de PUFA's pode ser considerado maior entre a maioria dos óleos de semente de *berries*, uvas e outras oleaginosas aplicadas em cosméticos, por exemplo. Também foi observada alta estabilidade térmica nos óleos extraídos seja com scCO₂ ou propano, importantes quanto à utilização em processos industriais.

No entanto, para se extrair ao máximo os compostos com potencial bioativo das sementes da amora, foi necessário tornar a extração supercrítica com CO₂ mais solúvel aos compostos polares. Assim houve a necessidade da escolha de um cossolvente polar e o etanol se mostrou eficiente. Amostras de sementes de amora-preta e etanol (1:1 m/m) foram carregadas em sistema extrator supercrítico iniciando-se com extração estática seguida de extração dinâmica com CO₂ (2,0 mL min⁻¹) em condições de pressão e temperatura controladas. Utilizando-se um delineamento experimental 2², variando a pressão (P) de 15,0 a 25,0 MPa e a temperatura (T), de 40,0 a 70,0 °C foi possível definir um extrato otimizado nas condições estudadas. Este extrato foi avaliado, e apresentou um alto potencial antioxidante nos ensaios colorimétricos e com a cromatografia líquida foi possível identificar vários ácidos fenólicos com capacidade antioxidante, mas a alta quantidade de rutina pode ser a principal responsável por essa capacidade. O perfil de ácidos graxos da fração lipossolúvel do extrato foi semelhante aos obtidos com os outros solventes apolares, porém calculados alguns índices de qualidade nutricional lipídica, os resultados foram melhores que os encontrados para óleos considerados boas fontes de ácidos graxos insaturados, como o de girassol. A

estabilidade térmica do extrato foi alta, então o extrato foi testado como antioxidante natural em óleo de soja pelo método Rancimat e apresentou potencial de proteção contra a oxidação semelhante aos antioxidantes sintéticos BHA e BHT.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a obtenção de extratos com scCO₂ em pressões mais altas;
- Determinar os demais compostos dos óleos e extratos com bioatividade como os tocoferóis;
- Avaliar de atividade antioxidante “*in vivo*” dos extratos e óleos.
- Definir a citotoxicidade dos óleos e extratos;

REFERÊNCIAS

- ABBEDDOU, S.; PETRAKIS, C.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; KEFALAS, P.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Effect of simulated thermo-degradation on the carotenoids, tocopherols and antioxidant properties of tomato and paprika oleoresins. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 90, no. 11, p. 1697–1703, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2317-x>.
- ACOSTA-MONTOYA, Ó.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C.; PÉREZ, A. M.; CASTRO, M. V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl .) during three edible maturity stages. **Food Chemistry**, vol. 119, no. 4, p. 1497–1501, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>.
- AHANGARI, B.; SARGOLZAEI, J. Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, vol. 46, no. 3, p. 258–265, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0040579512030013>.
- ALBA, K.; CAMPBELL, G. M.; KONTOGIORGOS, V. Dietary fibre from berry-processing waste and its impact on bread structure: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 99, no. 9, p. 4189–4199, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9633>.
- ALRUGAIBAH, M.; WASHINGTON, T. L.; YAGIZ, Y.; GU, L. Ultrasound-assisted extraction of phenolic acids, flavonols, and flavan-3-ols from muscadine grape skins and seeds using natural deep eutectic solvents and predictive modelling by artificial neural networking. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 79, p. 105773, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105773>.
- ANTUNES, L. E. C. Amora-Preta: Nova Opção De Cultivo No Brasil. **Ciência Rural**, vol. 32, no. 1, p. 151–158, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100026>.
- ANTUNES, L. E. C.; RASSEIRA, M. do C. B. Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta. **Embrapa clima temperado Documento 122**, , p. 1–51, 2004. .
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
- AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign: AOCS Press, 1997.
- BART, J. C. J.; PALMERI, N.; CAVALLARO, S. Emerging new energy crops for biodiesel production. **Biodiesel Science and Technology**, , p. 226–284, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845697761.226>.
- BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G. G. Potential Health Benefits of Berries.

Current Nutrition and Food Science, vol. 1, no. June, p. 71–86, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1573401052953294>.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. vol. 76, p. 70–76, 1996. .

BHARAT HELKAR, P.; SAHOO, A. Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. **International Journal of Waste Resources**, vol. 6, no. 3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000248>.

BOTELHO, R. V.; PAVANELLO, A. P.; BROETTO, D.; DE FÁTIMA SCISLOSKI, S.; BALDISSERA, T. C. Fenologia e produção da amoreira-preta sem espinhos cv. Xavante na região de Guarapuava-PR. **Scientia Agraria**, vol. 10, no. 3, p. 209–214, 2009. .

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm-Wiss Technol**, vol. 28, p. 25–30, 1995. .

BUSHMAN, B. Shaun; PHILLIPS, B.; ISBELL, T.; OU, B.; CRANE, J. M.; KNAPP, S. J. Chemical composition of caneberry (Rubus spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, no. 26, p. 7982–7987, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf049149a>.

BUSHMAN, B S; PHILLIPS, B.; ISBELL, T.; OU, B.; CRANE, J. M.; KNAPP, S. J. Chemical Composition of Caneberry (Rubus spp .) Seeds and Oils and Their Antioxidant Potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 7982–7987, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf049149a>.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, vol. 74, no. 17, p. 2157–2184, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>.

CATCHPOLE, O.; MORENO, T.; MONTAÑES, F.; TALLON, S. Perspectives on processing of high value lipids using supercritical fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 134, no. December 2017, p. 260–268, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.001>.

CHEN, J.; LIU, H. Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini-review. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 16, p. 1–24, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21165695>.

CHO, M. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; CLARK, J. R. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry , blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography / mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 84, p. 1771–1782, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1885>.

CHO, M. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; CLARK, J. R. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography / mass spectrometry. **Journal of the**

Science of Food and Agriculture, vol. 85, p. 2149–2158, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2209>.

CHUANG, M. H.; JOHANNSEN, M. Solubilities and adsorption equilibria of β -carotene in supercritical and near-critical fluids. **Journal of Chemical and Engineering Data**, vol. 56, no. 5, p. 1770–1777, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jc100229f>.

CHUN, O. K.; KIM, D. O.; LEE, C. Y. Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, no. 27, p. 8067–8072, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf034740d>.

CORREA, M.; BOMBARDELLI, M. C. M.; DIAS, P. F.; BOVO, F.; MESSIAS-REASON, I. J.; MAURER, J. B. B.; CORAZZA, M. L. Bioactivity of extracts of *Musa paradisiaca* L. obtained with compressed propane and supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, vol. 122, p. 63–69, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.004>.

CORREA, M.; MESOMO, M. C.; PIANOSKI, K. E.; TORRES, Y. R.; CORAZZA, M. L. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 113, p. 128–135, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.016>.

CORREA, M. S.; FETZER, D. L.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L.; SCHEER, A. P.; RIBANI, R. H. Pressurized extraction of high-quality blackberry (*Rubus* spp. Xavante cultivar) seed oils. **Journal of Supercritical Fluids**, no. xxxx, p. 105101, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105101>.

CUCO, R. P.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, C. da. Simultaneous extraction of seed oil and active compounds from peel of pumpkin (*Cucurbita maxima*) using pressurized carbon dioxide as solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 143, no. June 2018, p. 8–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.002>.

CUCO, R. P.; MASSA, T. B.; POSTAUE, N.; CARDOZO-FILHO, L.; DA SILVA, C. Oil extraction from structured bed of pumpkin seeds and peel using compressed propane as solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 152, p. 104568, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104568>.

CUNHA, V. M. B.; SILVA, M. P. da; SOUSA, S. H. B. de; BEZERRA, P. do N.; MENEZES, E. G. O.; SILVA, N. J. N. da; BANNA, D. A. D. da S.; ARAÚJO, M. E.; CARVALHO JUNIOR, R. N. de. Bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) oil extraction using supercritical CO₂ and bioactive compounds determination in the residual pulp. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 144, p. 81–90, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.010>.

DA FONSECA MACHADO, A. P.; ALVES REZENDE, C.; ALEXANDRE RODRIGUES, R.; FERNÁNDEZ BARBERO, G.; DE TARSO VIEIRA E ROSA, P.; MARTÍNEZ, J. Encapsulation of anthocyanin-rich extract from blackberry residues by spray-drying, freeze-drying and supercritical antisolvent. **Powder Technology**, vol.

340, p. 553–562, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.063>.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, vol. 76, p. 40–51, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 92, p. 115–176, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>.

DIMIĆ, E. B.; VUJASINOVIĆ, V. B.; RADOČAJ, O. F.; PASTOR, O. P. Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. **Acta Periodica Technologica**, vol. 43, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2298/APT1243001D>.

DWECK, J.; SAMPAIO, C. M. S. Analysis of the thermal decomposition of commercial vegetable oils in air by simultaneous TG/DTA. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, vol. 75, no. 2, p. 385–391, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000027124.96546.0f>.

FALCO, N.; KIRAN, E. Volumetric properties of ethyl acetate + carbon dioxide binary fluid mixtures at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 61, p. 9–24, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.09.016>.

FAN-CHIANG, H.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. **Food Chemistry and Toxicology**, vol. 70, no. 3, p. 198–202, 2005. .

FAN, L.; WANG, Y.; XIE, P.; ZHANG, L.; LI, Y.; ZHOU, J. Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. **Food Chemistry**, vol. 275, p. 299–308, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103>.

FARAJZADEH ALAN, D.; NAELI, M. H.; NADERI, M.; JAFARI, S. M.; TAVAKOLI, H. R. Production of Trans-free fats by chemical interesterified blends of palm stearin and sunflower oil. **Food Science and Nutrition**, vol. 7, no. 11, p. 3722–3730, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1231>.

FAZIO, A.; PLASTINA, P.; MEIJERINK, J.; WITKAMP, R. F.; GABRIELE, B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of Rubus and Sambucus species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. **Food Chemistry**, vol. 140, no. 4, p. 817–824, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.010>.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; CALHAU, C.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, vol. 7, no. 1, p. 54–66, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.010>.

FETZER, D. L.; CRUZ, P. N.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L. Extraction of baru (*Dipteryx alata* vogel) seed oil using compressed solvents technology. **Journal of**

Supercritical Fluids, vol. 137, no. January, p. 23–33, 2018. DOI 10.1016/j.supflu.2018.03.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.004>.

FILIP, S.; HRIBAR, J.; VIDRIH, R. Influence of natural antioxidants on the formation of trans-fatty-acid isomers during heat treatment of sunflower oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 113, no. 2, p. 224–230, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900231>.

FORNASARI, C. H.; SECCO, D.; SANTOS, R. F.; DA SILVA, T. R. B.; GALANT LENZ, N. B.; TOKURA, L. K.; LENZ, M. L.; DE SOUZA, S. N. M.; ZANÃO JUNIOR, L. A.; GURGACZ, F. Efficiency of the use of solvents in vegetable oil extraction at oleaginous crops. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 80, no. May, p. 121–124, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.123>.

FRANCO, D.; PATEIRO, M.; RODRÍGUEZ AMADO, I.; LÓPEZ PEDROUSO, M.; ZAPATA, C.; VÁZQUEZ, J. A.; LORENZO, J. M. Antioxidant ability of potato (*Solanum tuberosum*) peel extracts to inhibit soybean oil oxidation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 118, no. 12, p. 1891–1902, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500419>.

FREITAS, L. D. S.; DE OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: Extraction yields and characterization of free glycerol compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, no. 8, p. 2558–2564, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0732096>.

GAO, F.; BIRCH, J. Oxidative stability, thermal decomposition, and oxidation onset prediction of carrot, flax, hemp, and canola seed oils in relation to oil composition and positional distribution of fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 118, no. 7, p. 1042–1052, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500208>.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, no. August 2001, p. 0–13, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>.

GOMIDE, R. Operações Unitárias. , p. 298, 1980. .

GOUVEIA DE SOUZA, A.; OLIVEIRA SANTOS, J. C.; CONCEIÇÃO, M. M.; DANTAS SILVA, M. C.; PRASAD, S. A thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 21, no. 2, p. 265–273, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0104-66322004000200017>.

GOYENECHE, R.; DI SCALA, K.; RAMIREZ, C. L.; FANOVICH, M. A. Recovery of bioactive compounds from beetroot leaves by supercritical CO₂ extraction as a promising bioresource. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 155, p. 1–5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104658>.

GÜNDOĞDU, M.; KAN, T.; CANAN, İ. Bioactive and antioxidant characteristics of

blackberry cultivars from East Anatolia. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, vol. 40, no. 3, p. 344–351, 2016. <https://doi.org/10.3906/tar-1511-78>.

GUSTINELLI, G.; ELIASSON, L.; SVELANDER, C.; ALMINGER, M.; AHRNÉ, L. Supercritical CO₂ extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seed oil: Fatty acid composition and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 135, no. December 2017, p. 91–97, 2018. DOI 10.1016/j.supflu.2018.01.002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.002>.

GUSTINELLI, G.; ELIASSON, L.; SVELANDER, C.; ANDLID, T.; LUNDIN, L.; AHRNÉ, L.; ALMINGER, M. Supercritical Fluid Extraction of Berry Seeds: Chemical Composition and Antioxidant Activity. **Journal of Food Quality**, vol. 2018, no. September, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6046074>.

HAMDAN, S.; DAOOD, H. G.; TOTH-MARKUS, M.; ILLÉS, V. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 44, no. 1, p. 25–30, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.08.009>.

HELBIG, D.; BÖHM, V.; WAGNER, A.; SCHUBERT, R.; JAHREIS, G. Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues. **Food Chemistry**, vol. 111, no. 4, p. 1043–1049, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.017>.

HIDALGO, G. I.; ALMAJANO, M. P. Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. **Antioxidants**, vol. 6, no. 1, 2017. <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>.

HUANG, W. Y.; ZHANG, H. C.; LIU, W. X.; LI, C. Y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University: Science B**, vol. 13, no. 2, p. 94–102, 2012. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100137>.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, vol. 126, p. 1821–1835, 2011. .

JAKOBEK, L.; ŠERUGA, M.; ŠERUGA, B.; NOVAK, I.; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, M. Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 44, no. 4, p. 860–868, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01920.x>.

JENSEN, G. S.; XIANLI, X. W.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J. B.; CARTER, S. G.; SCHERWITZ, L. S.; BEAMAN, R. B.; ENDRES, J. R.; SCHAUSS, A. G. In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend . Results of a Pilot and Crossover Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, p. 8326–8333, 2008. .

JUCHEN, P. T.; ARAUJO, M. N.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L.; AUGUSTO, F.; VOLL, P. Industrial Crops & Products Extraction of parboiled rice bran oil with supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent: Kinetics and characterization.

Industrial Crops & Products, vol. 139, no. February, p. 111506, 2019. DOI 10.1016/j.indcrop.2019.111506. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111506>.

JURGOŃSKI, A.; KOZA, J.; CHU, D.-T.; OPYD, P. M. Berry seed oils as potential cardioprotective food supplements. **Nutrire**, vol. 43, no. 1, p. 1–6, 2018. Disponible em: <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0086-x>.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacology**, vol. 2014, p. 1–9, 2014. Disponible em: <https://doi.org/10.1155/2014/952943>.

KAPOOR, R.; NAIR, H. Gamma linolenic acid oils. In: SHAHIDI, F. (ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The Blackberry Fruit : A Review on Its Composition and Chemistry , Metabolism and Bioavailability , and Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, p. 5716–5727, 2012. .

LAMPI, A. M.; HEINONEN, M. **Berry Seed and Grapeseed Oils**. [S. l.]: AOCS Press, 2009. DOI 10.1016/B978-1-893997-97-4.50012-7. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-893997-97-4.50012-7>.

LEMMON, E. W.; MCLINDEN, M. O.; FRIEND, D. G. Thermophysical Properties of Fluid Systems. In: LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. (eds.). **NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69**. Gaithersburg MD, 20899: National Institute of Standards and Technology, 2020. Disponible em: <https://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>.

LI, W.; HYDAMAKA, A. W.; LOWRY, L.; BETA, T. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. **Central European Journal of Biology**, vol. 4, no. 4, p. 499–506, 2009. Disponible em: <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0041-1>.

LÓPEZ-PADILLA, A.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; FLÓREZ, C. E. R.; BARRIOS, D. M. R.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Vaccinium meridionale Swartz supercritical CO2 extraction: Effect of process conditions and scaling up. **Materials**, vol. 9, no. 7, 2016. Disponible em: <https://doi.org/10.3390/ma9070519>.

MACHADO, A. P. D. F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J. L.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**, vol. 77, p. 675–683, 2015. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>.

MACHADO, A. P. D. F.; PEREIRA, A. L. D.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. **Food Chemistry**, vol. 231, p. 1–10, 2017. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.060>.

MACHADO, A. P. D. F.; RUEDA, M.; BARBERO, G. F.; MARTÍN, Á.; COCERO, M.

J.; MARTÍNEZ, J. Co-precipitation of anthocyanins of the extract obtained from blackberry residues by pressurized antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 137, no. January, p. 81–92, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.013>.

MANZOOR, M.; SINGH, J.; GANI, A.; NOOR, N. Valorization of natural colors as health-promoting bioactive compounds: Phytochemical profile, extraction techniques, and pharmacological perspectives. **Food Chemistry**, vol. 362, p. 130141, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130141>.

MARANGONI, F.; AGOSTONI, C.; BORGHI, C.; CATAPANO, A. L.; CENA, H.; GHISELLI, A.; LA VECCHIA, C.; LERCKER, G.; MANZATO, E.; PIRILLO, A.; RICCARDI, G.; RISÉ, P.; VISIOLI, F.; POLI, A. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects. **Atherosclerosis**, vol. 292, p. 90–98, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.018>.

MATTHÄUS, B. W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by rancimat and conductivity and chemiluminescence measurements. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 73, no. 8, p. 1039–1043, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02523413>.

MICIĆ, D. M.; OSTOJIĆ, S. B.; SIMONOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, G.; PEZO, L. L.; SIMONOVIĆ, B. R. Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC. **Thermochimica Acta**, vol. 601, no. June 2018, p. 39–44, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.12.018>.

MICIĆ, D. M.; OSTOJIĆ, S. B.; SIMONOVIĆ, M. B.; PEZO, L. L.; SIMONOVIĆ, B. R. Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flours and oils. **Thermochimica Acta**, vol. 617, p. 21–27, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.08.017>.

MISTRY, B. S.; MIN, D. Prooxidant Effects of Monoglycerides and Diglycerides in Soybean Oil. **Journal of Food Science**, vol. 53, no. 6, p. 1896–1897, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07869.x>.

MOHD-SETAPAR, S. H.; NIAN-YIAN, L.; MOHD-SHARIF, N. S. Extraction of rubber (hevea brasiliensis) seed oil using soxhlet method. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, vol. 10, no. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.11113/mjfas.v10n1.61>.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, vol. 1054, no. 1–2, p. 95–111, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>.

NIMET, G.; DA SILVA, E. A.; PALÚ, F.; DARIVA, C.; FREITAS, L. dos S.; NETO, A. M.; FILHO, L. C. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus* L.) oil with supercritical CO₂ and subcritical propane: Experimental and modeling. **Chemical Engineering Journal**, vol. 168, no. 1, p. 262–268, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.088>.

OLIVEIRA, D. A.; AUGUSTA, A.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; MARASCHIN, M.;

FERREIRA, S. R. S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, vol. 164, no. 3, p. 423–432, 2013. DOI 10.1016/j.jbiotec.2012.09.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.09.014>.

PAGOT, E. Cultivo de pequenas frutas: amora-preta, framboesa mirtilo. Porto Alegre, , p. 41, 2006. .

PAP, N.; PONGRÁCZ, E.; MYLLYKOSKI, L.; KEISKI, R. Waste minimization and utilization in the food industry: Processing of arctic berries, and extraction of valuable compounds from juice- processing by-products. **Proceedings of the waste minimization and resources use optimization conference**, no. April 2014, p. 159–168, 2004. Disponível em: <http://www.oulu.fi/resopt/wasmin/pap.pdf>.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries : Improving Human Health and Healthy Aging , and Promoting Quality Life — A Review. **Plant Foods Human Nutrition**, vol. 65, p. 299–308, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0177-1>.

PARRY, J.; YU, L. Fatty Acid Content and Antioxidant Properties of Cold-pressed Black Raspberry Seed Oil and Meal. **Food Chemistry**, vol. 69, no. 3, p. 189–193, 2004. .

PASQUEL REÁTEGUI, J. L.; MACHADO, A. P. D. F.; BARBERO, G. F.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 94, p. 223–233, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.019>.

PEDRO, A. C.; MAURER, J.; BELLO, J.; MAURER, B.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; ÁVILA, S.; MARIA, G.; WINDSON, C.; HAMINIUK, I. Bioactive compounds of organic goji berry (*Lycium barbarum* L .) prevents oxidative deterioration of soybean oil Industrial Crops & Products Bioactive compounds of organic goji berry (*Lycium barbarum* L .) prevents oxidative deterioration of soybean oil. **Industrial Crops & Products**, vol. 112, no. November, p. 90–97, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.052>.

PEREIRA, M. G.; HAMERSKI, F.; ANDRADE, E. F.; SCHEER, A. de P.; CORAZZA, M. L. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 128, no. March, p. 338–348, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.021>.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K.; CLARK, J. R. Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries. **HortScience**, vol. 31, no. 2, p. 258–261, 1996. .

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit and Viticulture**, vol. 14, no. 1–2, p. 38–69, 1996. .

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-

EVANS, C. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 26, no. 98, p. 1231–1237, 1999. .

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 20, no. 7, p. 933–956, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).

RODRIGUES, C. A.; NICÁCIO, A. E.; BOEING, J. S.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V.; VISENTAINER, J. V.; MALDANER, L. Rapid extraction method followed by a d-SPE clean-up step for determination of phenolic composition and antioxidant and antiproliferative activities from berry fruits. **Food Chemistry**, vol. 309, p. 125694, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125694>.

SALGIN, S.; DINC, D.; ULUDA, G. Oil recovery in rosehip seeds from food plant waste products using supercritical CO₂ extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, vol. 118, p. 194–202, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.011>.

SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R. J. B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. **Livestock Production Science**, vol. 77, no. 2–3, p. 187–194, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00059-3).

SANTOS, J. C. O.; DOS SANTOS, I. M. G.; DE SOUZA, A. G.; PRASAD, S.; DOS SANTOS, A. V. Thermal stability and kinetic study on thermal decomposition of commercial edible oils by thermogravimetry. **Journal of Food Science**, vol. 67, no. 4, p. 1393–1398, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10296.x>.

SCHAKER, P. D. C.; ANTONIOLLI, L. R. Aspectos econômicos e tecnológicos em pós-colheita de amoras-pretas (*Rubus* spp). **Revista Brasileira Agrociência**, vol. 15, no. 1–4, p. 11–15, 2009.

SCHULZ, M.; SERAGLIO, S. K. T.; DELLA BETTA, F.; NEHRING, P.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. **Food Research International**, vol. 122, no. January, p. 627–634, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.034>.

SEMWAL, R.; JOSHI, S. K.; SEMWAL, R. B.; SEMWAL, D. K. Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry Letters**, vol. 46, no. June, p. 119–128, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.006>.

SILVA, C. M. Da; ZANQUI, A. B.; SOUZA, A. H. P.; GOHARA, A. K.; GOMES, S. T. M.; SILVA, E. A. Da; FILHO, L. C.; MATSUSHITA, M. Extraction of oil and bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze using subcritical n-propane and organic solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 112, p. 14–21, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.003>.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total

phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, vol. 299, no. 1974, p. 152–178, 1999. .

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E. Polyphenolic Composition of Marion and Evergreen Blackberries. **Food Chemistry and Toxicology**, vol. 69, no. 4, p. 233–240, 2004. .

SOZZI, A.; ZAMBON, M.; MAZZA, G.; SALVATORI, D. Fluidized bed drying of blackberry wastes: Drying kinetics, particle characterization and nutritional value of the obtained granular solids. **Powder Technology**, vol. 385, p. 37–49, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.02.058>.

SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D.; FLEMING, T. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 83, no. 10, p. 885–891, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11746-006-5042-x>.

STRUCK, S.; PLAZA, M.; TURNER, C.; ROHM, H. Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 51, no. 6, p. 1305–1318, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13112>.

TEIXEIRA, G. L.; GHAZANI, S. M.; CORAZZA, M. L.; MARANGONI, A. G.; RIBANI, R. H. Assessment of subcritical propane, supercritical CO₂ and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 133, no. October 2017, p. 122–132, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.003>.

TEMELLI, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 47, no. 3, p. 583–590, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.014>.

TUROLA BARBI, R. C.; DE SOUZA, A. R. C.; HAMERSKI, F.; LOPES TEIXEIRA, G.; CORAZZA, M. L.; HOFFMANN RIBANI, R. Subcritical propane extraction of high-quality inajá (*Maximiliana maripa*) pulp oil. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 153, p. 104576, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104576>.

ULBRICHT, T. L. V.; SOUTHGATE, D. A. t. Coronary heart disease and dietary factors. **The Lancet**, vol. 339, no. 8799, p. 987–988, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91558-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91558-P).

UNGUREANU, C. R. M.; LUPITU, A. I.; MOISA, C.; RIVIS, A.; COPOLOVICI, L. O.; POIANA, M. A. Investigation on high-value bioactive compounds and antioxidant properties of blackberries and their fractions obtained by home-scale juice processing. **Sustainability (Switzerland)**, vol. 12, no. 14, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su12145681>.

VAN HOED, V.; BARBOUCHE, I.; DE CLERCQ, N.; DEWETTINCK, K.; SLAH, M.; LEBER, E.; VERHÉ, R. Influence of filtering of cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics. **Food Chemistry**, vol. 127, no. 4, p. 1848–1855, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.134>.

VAN HOED, V.; DE CLERCQ, N.; ECHIM, C.; ANDJELKOVIC, M.; LEBER, E.; DEWETTINCK, K.; VERHÉ, R. Berry seeds: A source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. **Journal of Food Lipids**, vol. 16, no. 1, p. 33–49, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01130.x>.

VECCHIO, S.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; CHIAVARO, E. Thermal decomposition study of monovarietal extra virgin olive oil by simultaneous thermogravimetry/differential scanning calorimetry: Relation with chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, no. 11, p. 4793–4800, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf900120v>.

WAJS-BONIKOWSKA, A.; STOBIECKA, A.; BONIKOWSKI, R.; KRAJEWSKA, A.; SIKORA, M.; KULA, J. A comparative study on composition and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide, hexane and ethanol extracts from blackberry (*Rubus fruticosus*) growing in Poland. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 97, no. 11, p. 3576–3583, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8216>.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 48, no. 2, p. 140–146, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf9908345>.

WILLIAMS, C.; BUTTRISS, J. **Improving the fat content of foods**. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845691073>.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, no. 11, p. 4069–4075, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf060300l>.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, no. 7, p. 2589–2599, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf048068b>.

XU, X.; GAO, Y.; LIU, G.; WANG, Q.; ZHAO, J. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) oil using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 41, no. 7, p. 1223–1231, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.002>.

YANG, B.; AHOTUPA, M.; MÄÄTTÄ, P.; KALLIO, H. Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. **Food Research International**, vol. 44, no. 7, p. 2009–2017, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.025>.

YING, Q.; WOJCIECHOWSKA, P.; SIGER, A.; KACZMAREK, A.; RUDZIŃSKA, M. Phytochemical Content, Oxidative Stability, and Nutritional Properties of Unconventional Cold-pressed Edible Oils. **Journal of Food and Nutrition Research**, vol. 6, no. 7, p. 476–485, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-7-9>.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, no. 6, p. 2118–2124, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf040411p>.

ZANQUI, A. B.; DE MORAIS, D. R.; DA SILVA, C. M.; SANTOS, J. M.; GOMES, S. T. M.; VISENTAINER, J. V.; EBERLIN, M. N.; CARDOZO-FILHO, L.; MATSUSHITA, M. Subcritical extraction of flaxseed oil with n-propane: Composition and purity. **Food Chemistry**, vol. 188, p. 452–458, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.033>.

ZIA-UL-HAQ, M.; RIAZ, M.; DE FEO, V.; JAAFAR, H. Z. E.; MOGA, M. Rubus fruticosus L.: Constituents, biological activities and health related uses. **Molecules**, vol. 19, no. 8, p. 10998–11029, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules190810998>.