



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Extratos de Sementes de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L) Obtidos Via CO₂ Supercrítico: Isotermas de Rendimento Global, Dados Cinéticos e Ajustes, Ácidos Graxos Totais, Fitosteróis e Efeitos Neuroprotetores

José Rafael Santos Botelho
Engenheiro Químico (UFPA, 2011)

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Orientador PPGEQ/FEQ/ITEC/UFPA

Prof^a. Dr^a. Marilena Emmi Araújo
Co-Orientadora PPGEQ/FEQ/ITEC/UFPA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Belém – PA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Botelho, José Rafael Santos, 1987-
Extratos de Sementes de Gergelim Preto
(Sesamum indi-cum l) Obtidos via CO2
supercrítico: Isotermas de Rendimento Global,
Dados Cinéticos e Ajustes, Ácidos Graxos
Totais, Fitosteróis e Efeitos Neuroprotetores /
José Rafael Santos Botelho. - 2013.

Orientador: Raul Nunes de Carvalho Junior;
Coorientadora: Marilena Emmi Araújo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química, Belém,
2013.

1. Processos químicos. 2. Extração com fluído
super crítico. 3. Extração (Química). 4.
Gergelim. I. Título.

CDD 23. ed. 660.281

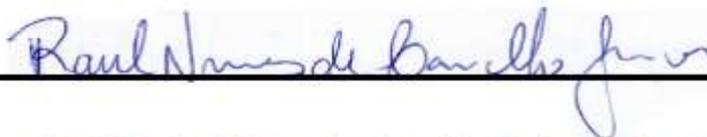
Extratos de Sementes de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L) Obtidos Via CO₂ Supercrítico: Isotermas de Rendimento Global, Dados Cinéticos e Ajustes, Ácidos Graxos Totais, Fitosteróis e Efeitos Neuroprotetores

José Rafael Santos Botelho

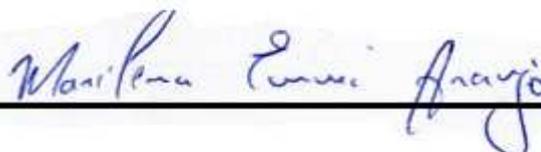
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Data da Avaliação: 17/12/2013

Banca Examinadora



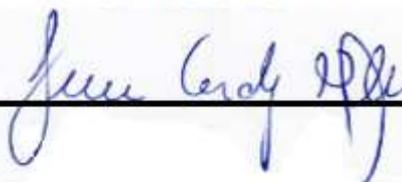
Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior (Orientador)
PPGEQ/FEQ/ITEC/UFPA



Prof^a. Dr^a. Marilena Emmi Araújo (Co-Orientadora)
PPGEQ/FEQ/ITEC/UFPA



Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (Membro Titular)
PPGNBC/ICB/UFPA



Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho (Membro Titular)
PEQ/DEQ/UEM

Prof. Dr. Ing. Nelio Teixeira Machado (Membro Suplente)

À todas as pessoas que trabalham por um mundo melhor.

Agradecimentos

A Deus.

À minha família que motiva minhas ações. A minha vitória é nossa vitória. Palavras não descrevem a magnitude do meu agradecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior pelas oportunidades, paciência, atenção e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Wallace Gomes Leal pelas oportunidades, atenção, paciência, ensinamentos e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Marilena Emmi Araújo pela co-orientação e fornecimento de aplicativos computacionais desenvolvidos no laboratório TERM@.

Ao Prof. Dr. Ing. Nélio Teixeira Machado pelas oportunidades, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. M. Sc. Adriano Guimarães Santos e Prof. M. Sc. Ijair Rogério Santos pelo apoio e ensinamentos de neurociências.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Antonio Manoel C. Rodrigues pela análise de determinação do teor de ácidos graxos.

Ao Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho por aceitar participar da banca deste trabalho.

A todos responsáveis pelos valerosos conhecimentos gerados a cerca da cura natural.

A todos os pesquisadores que fundamentaram este trabalho.

A todos que colaboram ou intencionam colaborar com o progresso científico para a paz.

“Por que havemos de odiar e desprezar uns aos outros?! Neste mundo há espaço para todos. A terra, que é boa e rica, pode prover a todas as nossas necessidades.” (Charles Chaplin)

RESUMO

Na medicina popular brasileira, sementes de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) é um dos mais importantes ingrediente presentes em um chá usado para tratar vítimas de acidente vascular encefálico (AVE). Porém, o isolamento de extratos de gergelim preto para fins medicinais usando a tecnologia do fluido supercrítico não foi realizado. O objetivo deste trabalho foi investigar algumas variáveis de processo da extração com fluido supercrítico em sementes de gergelim preto para gerar extratos aplicáveis a pesquisa do AVE isquêmico focal. Duas isotermas (40 e 60 °C) foram exploradas, combinadas com pressões de 200-400 bar, em vazão mássica de CO₂ constante de 5,9 x 10⁻⁵ kg/s. Os rendimentos globais foram de 37-53% em base seca. O maior rendimento foi obtido em 60 °C e 400 bar. A composição de ácidos graxos mostrou uma elevada razão de insaturados/saturados. A análise de conteúdo de fitosteróis no extrato de maior rendimento revelou maiores quantidades de β-sitosterol + sitostanol, colesterol, campesterol + campestanol + 24-metileno colesterol, Δ-5 avenasterol and estigmasterol, enquanto que menores níveis de Δ-5,24 estigmastadienol, brassicasterol, clerosterol + Δ-5-23 estigmas-tadienol, Δ-7 avenasterol, eritrodiol and Δ-7 estigmastenol foram observados. As curvas de extração das extrações com fluido supercrítico no menor e maior rendimento mássico (200 e 400 bar a 60 °C) foram ajustadas pelos modelos de Tan e Liou (1989), Martinez et al. (2003), Esquível et al. (1999), Goto et al. (1993) e Sovová (1994 e 2012). Os modelos de Tan e Liou (1989), Goto et al. (1993) e Sovová (1994 e 2012) apresentaram as melhores valores nominais de somas residuais dos quadrados. Experimentos pilotos sugerem que o extrato obtido via fluido supercrítico de gergelim preto é neuroprotetor em relação a isquemia focal por endotelina-1 no córtex motor de ratos machos adultos, observada a redução da área de infarto isquêmico.

Palavras-chave: Sementes de Gergelim Preto; Extração com CO₂ Fluido Supercrítico; Ácidos Graxos; Fitosteróis, Modelagem Cinética; Neuroproteção.

ABSTRACT

In Brazilian folk medicine, black sesame (*Sesamum indicum* L) seeds is one of the most important ingredients present in the tea used to treat encephalic stroke victims. Nevertheless, isolation of black sesame extracts to medicinal finality using supercritical fluid technology has not been performed. The objective of this work was to investigate some process variables of supercritical fluid extraction in black sesame to generate extracts applicable in stroke research. Two isothermal (40 and 60 °C) were explored, combined with pressures that ranged from 200-400 bar, at a constant CO₂ mass flow rate of $5,9 \times 10^{-5}$ kg/s. The global yields ranged from 37-53% in dry basis. The highest mass yield was obtained at 60 °C and 400 bar. The fatty acid composition comprised a high unsaturated/saturated ratio. Chromatographic analysis of phytosterol content in the high global yield extract revealed higher amounts of β -sitosterol + sitostanol, cholesterol, campesterol + campestanol + 24-methylene cholesterol, Δ -5 avenasterol and stigmasterol, while lower levels of Δ -5,24 stigmastadienol, brassicasterol, clerosterol + Δ -5-23 stigmastadienol, Δ -7 avenasterol, eritrodiol and Δ -7 stigmastenol were present in the black sesame extract. Overall extraction curves from the supercritical fluid extraction in lower and higher global yields (200 e 400 bar at 60 °C) fitted the Tan and Liou (1989), Martinez et al. (2003), Esquível et al. (1999), Goto et al. (1993) e Sovová models (1994 and 2012). The models of Tan and Liou (1989), Goto et al. (1993) and Sovová (1994 and 2012) presented the best residual sum of squares values. Pilot experiments suggest that black sesame extract is neuroprotective following endothelin-1 induced focal ischemia into the motor cortex of male adult rat, observing indications that a prejudicial cell form for the stroke's status was inhibited by the treatment.

Keywords: Black Sesame Seeds; CO₂ Supercritical Fluid Extraction; Fatty Acids; Phytosterols; Kinetics Modeling; Neuroprotection.

NOMENCLATURA

b_i	Parâmetro ajustável no modelo de Martinez et al. (T^{-1})
β	Porosidade das partículas do modelo de Goto et al. (adimensional)
d_c	Diâmetro do leito (L)
F	Massa de alimentação (M)
h	Coordenada axial (L)
H	Altura do leito (L)
K	Constante de equilíbrio de dessorção do modelo de Goto et al.
k_d	Coefficiente de dessorção (T^{-1})
K_m	Coefficiente de partição que relaciona as massas de solvente e matriz vegetal (kg de planta)/(kg de solvente)
k_{YA}	Coefficiente de transferência de massa na fase fluida (T^{-1})
k_{XA}	Coefficiente de transferência de massa na fase sólida (T^{-1})
M_{CER}	Taxa de transferência de massa no período CER (M/T)
Q_{CO_2}	Vazão mássica de CO_2 (M/T)
q'	Taxa de fluxo específico kg (kg de planta) s^{-1}
S	Área transversal de transferência de massa (L^2)
t	Tempo (T)
t_{CER}	Período de taxa constante de extração (T)
$t_{comb,f}$	Tempo característico combinado de transferência de massa
t_{FER}	Período de taxa decrescente de extração (T)
t_m	Parâmetro ajustável no modelo de Martinez et al. (T)
t_r	Tempo de residência
τ	Tortuosidade (adimensional)
u	Velocidade superficial (LT^{-1})
φ	Parâmetro adimensional do modelo de Goto et al. (adimensional)
X	Razão mássica de soluto / massa de sólido livre de soluto (M/M)
X_u	Concentração do extrato na planta antes da extração kg/kg
Y	Razão mássica de soluto / massa de solvente (M/M)
Y_{CER}	Razão mássica de soluto na fase fluida na saída do extrator (M/M)

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Nomenclatura.....	v
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo Geral.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos.....	4
Capítulo 2. Revisão da Literatura.....	5
2.1 – Gergelim-preto (<i>Sesamum indicum</i> L).....	5
2.3 – Extração supercrítica.....	6
2.3.1 – Fluido supercrítico.....	6
2.3.2 – Extração com fluidos supercríticos e parâmetros de processo.....	8
2.3.2.1 – Densidade.....	8
2.3.2.2 – Pressão.....	9
2.3.2.3 – Solubilidade.....	9
2.3.2.4 – Processo de extração supercrítica.....	10
2.3.2.5 – SFE em leito fixo.....	11
2.3.2.6 – Modelos matemáticos para as curvas globais de extração.....	12
2.3.2.6.1 – Modelo de Tan e Liou (1989).....	12
2.3.2.6.2 – Modelo de Goto (1993).....	13
2.3.2.6.3 – Modelo de Sovová (1994).....	15
2.3.2.6.4 – Modelo de Esquivel et al. (1999).....	16
2.3.2.6.5 – Modelo de Martínez et al. (2003).....	16
2.3.2.6.6 – Modelo de Sovová (2012).....	17
Capítulo 3. Materiais e Métodos.....	18
3.1 – Seleção dos métodos de extrações.....	18
3.2 – Aquisição, pré-tratamento e caracterização de parâmetros das amostras.....	18
3.2.1 – Aquisição da amostra.....	18

3.2.2 – Pré-tratamento (cominuição e secagem).....	19
3.2.3 – Determinação da umidade.....	20
3.2.4 – Determinação do diâmetro médio das partículas.....	20
3.2.5 – Determinação de densidade aparente, densidade real e porosidade do leito.....	20
3.3 – Extração supercrítica.....	20
3.3.1 – Seleção dos parâmetros de processo das extrações supercríticas.....	20
3.3.2 – Procedimentos técnicos para as SFEs.....	21
3.3.2.1 – SFE para determinação das isotermas de rendimento global.....	21
3.3.2.2 – Extração supercrítica em modo de cinética de extração.....	23
3.3.2 – Medida da massa de extrato.....	23
3.3.3 – Cálculos de rendimento em termos de massa.....	23
3.4 – Obtenção de óleo volátil a partir de hidrodestilação.....	24
3.5 – Caracterizações dos extratos.....	24
3.5.1 – Determinação do teor relativo de ácidos graxos por cromatografia à gás.....	24
3.5.2 – Determinação do teor relativo de fitoesteróis por cromatografia à gás.....	25
3.5.3 – Modelo experimental de isquemia focal e tratamento por extratos de sementes de gergelim-preto (<i>Sesamun indicum L.</i>).....	25
3.6 – Modelagem.....	25
3.6.1 – Cálculo de densidade.....	25
3.6.2 – Vazão mássica de CO ₂	25
3.6.3 – Cálculos da taxa de transferência de massa e parâmetros cinéticos.....	26
3.6.4 – Ajustes em curvas dos dados dos experimentos em modo de cinética de extração.....	26
Capítulo 4. Resultados e Discussão.....	27
4.1 – Caracterização das matérias-primas.....	27
4.1.1 – Sementes de gergelim-preto (<i>Sesamun indicum L.</i>).....	27
4.2 – Processos Extrativos.....	27
4.2.1 – Hidrodestilação.....	27
4.2.2 – SFE.....	27
4.2.2.1 – Isotermas de rendimento global.....	27
4.2.2.1.1 - Determinação da vazão mássica e densidades do CO ₂ na saída do sistema SFE.....	27
4.2.2.1.2 – SFE em sementes de gergelim-preto (<i>Sesamun indicum L.</i>).....	28

4.2.2.2 – Cinética da SFE.....	30
4.2.2.2.1 – Modelagem.....	30
4.3 – Composição dos extratos via SFE de sementes de gergelim-preto (Sesamun indicum L.).....	33
4.3.1 – Determinação de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	33
4.3.2 – Determinação de fitoesteróis por cromatografia gasosa.....	34
4.4 – Verificação do poder anti-inflamatório dos extratos via SFE de sementes de gergelim-preto (Sesamun indicum L.) após isquemia cerebral focal induzida em ratos wistar adultos.....	35
Capítulo 5. Conclusões.....	37
Capítulo 6. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	38
Capítulo 7. Lista de Produção Científica.....	39
Capítulo 8. Referências Bibliográficas.....	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

Questões sociais, econômicas, ambientais e biológicas favorecem o desenvolvimento de processos para obtenção de extratos livres de componentes químicos tóxicos. E uma relevante alternativa é a operação de extração com fluido supercrítico (SFE, Supercritical Fluid Extraction), observando que o solvente deve apresentar propriedades físico-químicas que facilitem a separação do soluto após a operação de extração. A tecnologia a cerca da SFE também se mostra vantajosa em situações em que os extratos contêm substâncias termossensíveis, com predisposição para reagir quimicamente com os solventes convencionais e/ou quando aplicado como alguma forma possível de absorção por seres humanos nas formas de alimento, cosmético, fármacos e etc.

Entre as moléculas em fase supercrítica, o CO₂ destaca-se pela sua inatividade em termos de reação química, sendo uma grande vantagem para processamento de alimentos, medicamentos e demais produtos que devem ter o mínimo de substâncias estranhas. Além disso, o CO₂ detém relativos baixos valores nominais de temperatura crítica e pressão crítica, o que se associa a menor gasto de energia para reproduzir as condições críticas operacionais. O CO₂ apresenta também vantagens por ter seu preço economicamente viável e a sua separação do extrato no final do processo é realizada de acordo que solvente e soluto migram para a parte despressurizada do sistema em sistemas semicontínuos e contínuos ou pela liberação da pressão em um reator ao término de uma operação em batelada (**KAISER, 1996**).

O processo de SFE é caracterizado principalmente pelas propriedades físicas e químicas do fluido supercrítico, sendo um agente com propriedades características de uma fase intermediária das fases gasosa e líquida. E por meio do controle das variáveis termodinâmicas é possível administrar a condição de fase supercrítica.

O fluido supercrítico é aplicado em processos como obtenção de extratos naturais, fase móvel em cromatografia, polimerização (**BRUNNER, 2004**), impregnação de medicamentos em lentes de contato (**COSTA et al., 2010**), recuperação de metais pesados de matrizes sólidas e líquidas (**HERRERO et al., 2010**), separação enantiomérica (**Toribio et al., 2006**), entre outras.

A aplicação da SFE em relação à extração de produtos naturais em conjunto com o conhecimento popular de tratamento baseado em plantas medicinais apresenta expectativas positivas quanto a validação deste conhecimento popular e principalmente gerar novas alternativas de medicamentos para problemas extremamente graves como a isquemia.

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma condição devastadora causada pela ruptura dos vasos sanguíneos (hemorrágico) ou pela obstrução por trombólise ou embolia (isquêmico). Este distúrbio neuronal agudo atinge a cada 40 s e provoca uma morte a cada 4 minutos nos Estados Unidos da América (EUA). A taxa de mortalidade é de cerca de 40% em todo o mundo (**LLOYD-JONES et al., 2009**). Sobreviventes do AVE podem sofrer sérias deficiências funcionais, incluindo disfunções sensoriais e motoras, bem como enormes problemas sociais (**LLOYD-JONES et al., 2009**). A maioria das vítimas tem comprometimento da capacidade de trabalho e cerca de 30% dos pacientes com AVE precisar de ajuda com o auto-cuidado (**LLOYD-JONES et al., 2009**). Nos EUA, os AVEs custaram cerca de 73,7 bilhões de dólares em 2010, com projeção a 1,52 trilhão de dólares em 2050 (**LLOYD-JONES et al., 2009**). Não há nenhuma terapia aprovada eficaz para o AVE além do ativador do plasminogênio tecidual recombinado (rt-PA), porém beneficia apenas alguns pacientes (**MOSKOWITZ et al., 2010**). Portanto estes fatos são a motivação para a busca da comunidade científica de novas drogas neuroprotetoras obtidos a partir de produtos naturais.

Substâncias antioxidantes como o sesamol, sesamolina sesaminol e podem ser encontrados em *Sesamum indicum* L (**WICHITSRANOI et al., 2011**). **Kiran e Asad (2008)** mostraram que as sementes e óleo de *Sesamum indicum* L têm atividade cicatrizante considerável quando administrada por via oral ou tópico. O pigmento preto gergelim obtido por remoção de matéria, utilizando diclorometano e protocolo hidrolítico apresentou considerável efeito antioxidante e antinitrosante (**PANZELLA et al., 2012**). Demonstrou-se que as sementes de gergelim preto apresenta maior potencial antioxidante em relação as sementes de gergelim creme (**SILVA et al., 2011**). Somente a casca das sementes de gergelim também exibem notável capacidade antioxidante (**SHAHIDI et al., 2006**).

Shyu e Hwuang (2002) estudaram frações de extrato de semente de gergelim preto obtido usando hexano seguido de solução de metanol. Estes autores observaram que essas frações apresentaram atividades antioxidante consideráveis pelo método com 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Bem como, **HU et al. (2004)** observaram que os

extratos de sementes de gergelim preto via SFE apresentaram maiores concentrações de vitamina E do que extratos obtidos via extração com hexano.

Além disso, tem sido sugerido que a farinha desengordurada de sementes de gergelim pode controlar a taxa de glicemia e de peso em pacientes de diabetes mellitus (**FIGUEIREDO et al., 2008**). Compostos fenólicos presentes no extrato de semente de gergelim preto pode ter importantes ações na limpeza de radicais livres, que devem estar relacionadas a indução à morte de células cancerígenas HT-29 do cólon humano (**KIM et al., 2009**).

Os ácidos graxos insaturados são muito importantes para a manutenção do fluxo na membrana celular. A presença de ácidos graxos insaturados e saturados na dieta tem implicações sobre a saúde (**MICHA et al., 2010**). Foi demonstrado que o consumo excessivo de ácidos graxos saturados na dieta aumenta o risco de doença vascular, enquanto que acredita-se que o consumo de ácidos graxos insaturados é positivo na diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (**MICHA et al., 2010**).

Ácidos graxos eicosanóicos são ácidos graxos poli-insaturados, que geram prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos proinflamatórios. Estes ácidos graxos estão envolvidos em reações inflamatórias, alergia, dor e pode ser prejudicial para a parede dos vasos sanguíneos (**MICHA et al., 2010**). **Yoshida et al. (2007)**, descobriram que os na semente de gergelim estão presentes os ácidos graxos: linoleico, oleico, palmítico, esteárico e linolênico.

Os fitoesteróis são compostos esteróides diferentes pela sua composição química do carbono e a presença ou ausência de ligação dupla. Fitoesteróis pode diminuir os níveis de colesterol LDL, que podem está relacionados com a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (**WEINGÄRTNER et al., 2009**).

Medicina popular brasileira sugere que gergelim preto (*Sesamum indicum* L) é um ingrediente importante em um chá terapêutico para vítimas potencialmente acometidas de AVE. Algumas evidências científicas suportam esta noção (**CHOI et al., 2002 e Jamarkattel-Pandit et al., 2010**). Sugere-se que o β -sitosterol isolado de Aloe vera tem efeitos angiogênicos terapêuticos em vasos sanguíneos danificados em esquilo-damongólia submetido a lesão de reperfusão isquêmica (**CHOI et al., 2002**). Além disso, tem sido sugerido que o extrato obtido a partir de sementes de gergelim desengordurada com extração por hexano e metanol, diminui a área do enfarte após oclusão da artéria cerebral em ratos (**JAMARKATTEL-PANDIT et al., 2010**). No entanto, o uso dos processos de extração comuns, como remoção do teor de lípidos com hexano, podem

comprometer negativamente a obtenção de componentes químicos importantes do extrato, incluindo ácidos graxos insaturados e fitosteróis.

Os produtos naturais estão milenarmente associados à cura de inúmeros problemas de saúde humana (MUKHOPADHYAY, 2000), por isso é necessário que os estudos sobre obtenções desses produtos naturais obtidos por extrações sejam direcionados de forma multidisciplinar, visando a aplicação dos extratos em estudos para desenvolvimento de tratamentos graves como o AVE. Além disso, o isolamento de extratos de gergelim preto para fins medicinais usando a tecnologia do fluido supercrítico não foi realizado. Diante deste contexto multidisciplinar de cambiar os produtos naturais e a cura do AVE, neste estudo, utilizou-se a tecnologia SFE para se obter extratos de sementes de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) e suas composições de ácidos graxos e fitosteróis, assim como foi realizado estudos para estabelecer parâmetros cinéticos de obtenção dos extratos e aplicação em roedores adultos submetidos a isquemia focal.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Obtenção de extratos de sementes de gergelim preto via SFE para avaliando rendimentos mássicos, estudo cinético de extração, caracterização em termos de composição de ácidos graxos e fitosteróis, bem como, potencial neuroprotetor em roedores machos adultos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Obter as isotermas de rendimento mássico global;
- ❖ Determinar os parâmetros cinéticos de SFE;
- ❖ Obter as composições dos extratos em termos de ácidos graxos e fitosteróis;
- ❖ Avaliar potencial neuroprotetor em roedores adultos acometidos de isquemia focal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Gergelim-preto (*Sesamum indicum* L.)

Sésamo, também chamado Benne, planta vertical e anual (*Sesamum indicum*) de vários tipos e variedades que pertencem à família Pedaliaceae, cultivadas desde a antiguidade pelas suas sementes, que são utilizadas como alimentos e aromatizantes e a partir do qual um óleo valorizado é extraído (**Encyclopædia Britannica, 2012**).

Sabe-se que do conhecimento popular que a semente de gergelim-preto (*Sesamum indicum* L.) é um ingrediente fundamental nas receitas/medicamentos naturais que são indicadas na administração por um paciente com suspeita de ter sido acometido acidente vascular encefálico (AVE), por isso este fato fornece um indicativo de rota para pesquisas. Além disso, o respaldo metodológico para pesquisas desse nível de abrangência se deve também as substâncias antioxidantes identificadas nas sementes de *Sesamum indicum* L. como o sesamol, sesamin e o sesamol (**Wichitsranoi et al., 2011**), fitosteróis e ácidos graxos (**ÜNAL et al., 2008**), assim como pesquisas mostram que as sementes e o óleo do *Sesamum indicum* L. apresentam considerável atividade cicatrizante quando administrados tópicamente ou oralmente (**Kiran e Asad, 2008**). O pigmento preto obtido por remoção de gordura por diclorometano e protocolo hidrolítico otimizado com 6 M de HCl a 100 °C apresentou potentes propriedades antinitrosantes, bem como bons resultados para eficiência antioxidante por arranjo radical de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e redução de íons férricos (**Panzella et al., 2012**). Em relação ao gergelim creme, o gergelim-preto apresenta maior potencial antioxidante (**Silva et al., 2011**), destacando as cascas da semente do gergelim-preto com a maior atividade antioxidante relativa (**Shahidi et al., 2006**). **SHYU e HWUANG (2002)** estudaram frações do extrato de gergelim-preto obtido via hexano seguida por solução de metanol e observaram que duas das frações também apresentaram consideráveis atividades antioxidantes por arranjo antioxidativo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A farinha desengordurada do *Sesamum indicum* L. contribui positivamente para o controle da taxa glicêmica e peso de pacientes com diabetes mellitus (**Figueiredo e Modesto Filho, 2008**). Foi mostrado que o sesamol e os seus metabolitos podem ter uma contribuição importante como antioxidantes em sementes e óleo de gergelim (**Kang et al, 1998**). Pesquisas mostraram que os extratos de gergelim

preto possuem compostos fenólicos com a capacidade de limpeza radical que podem estar relacionados com efeito apoptótico em células cancerígenas de cólon humanas HT-29 (Kim et al, 2009).

2.3 – Extração supercrítica

2.3.1 – Fluido supercrítico

O fluido supercrítico é, como o próprio nome indica, o principal agente da extração supercrítica. Sendo o termo “fluido supercrítico” utilizado para designar a condição de fase supercrítica da matéria.

Para que qualquer substância atinja a fase supercrítica é necessário que seja obtido um conjunto de valores nominais de determinadas propriedades. A partir da regra das fases de Gibbs para uma substância e apenas na fase supercrítica $F = 2 - \pi + n$, sendo π o número de fases e n o número de substância. Observamos que podemos caracterizar o estado de fluido supercrítico por duas variáveis intensivas como a temperatura e pressão. Contudo valores nominais mínimos dessas variáveis intensivas são definidos para que a partir deles cada substância esteja na fase supercrítica. Estes valores são denominados pelo ponto crítico de cada substância, onde observamos a temperatura crítica (T_C), pressão crítica (P_C) e volume crítico (V_C).

Na Figura 2.1, observa-se algumas substâncias e seus respectivos T_C , P_C e V_C . Sendo que é possível consultar um vasto conteúdo de substâncias em handbooks.

Na Tabela 2.1, observam-se alguns exemplos de substâncias com seus respectivos valores nominais de T_C , P_C e V_C .

Tabela 2.1 - Valores nominais de T_C , P_C e V_C de algumas substâncias

	T_C (K)	P_C (MPa)	V_C (m ³ /kmol)
H ₂ O	647,096	22,064	0,0559472
NH ₃	405,65	11,28	0,07247
CO	132,92	3,499	0,0944
CO ₂	304,21	7,383	0,094

A diferença de T_C 's observada na Tabela 2.1 entre dióxido de carbono e água está diretamente ligada às forças intermoleculares. A água, por apresentar ligações de ponte de hidrogênio (energia de dissociação de uma ligação desse tipo: 4-38 kJ mol⁻¹)

necessita de mais energia térmica para chegar na fase supercrítica, enquanto que o dióxido de carbono apresenta ligações dipolo-dipolo, que são consideravelmente menos intensas.

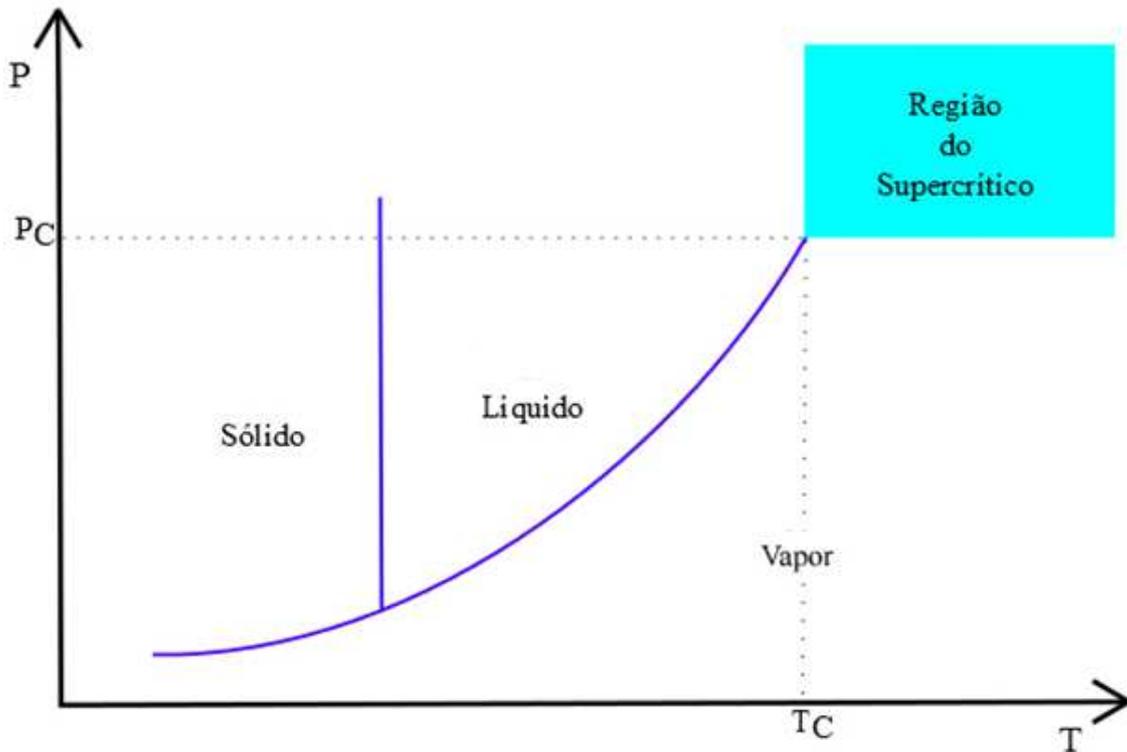


Figura 2.1. Diagrama PT genérico ilustrando o plano supercrítico.

De acordo que o ponto crítico de um substancia é alcançado, a compressibilidade isotérmica tende ao infinito, por isso o volume molar ou a densidade apresentam alterações abruptas (McHUGH, 1994). E analisando pela forma gráfica da função potencial de Lennard-Jones (Figura 2.2), observa-se que à medida que a pressão do sistema aumenta dentro do plano supercrítico, infere-se que as moléculas estão sendo sujeitas a diminuição da distância intermolecular, conseqüentemente a energia potencial intermolecular aumenta drasticamente em função de situações com a repulsão entre núcleos e entre eletrosferas, por isso propriedades intensivas como densidade e volume molar têm seus valores nominais altamente sensíveis a variações de propriedades intensivas controláveis como a pressão no plano supercrítico de fase.

Outro ponto relevante nessa aproximação molecular é a alteração do caminho livre médio molecular de tal forma que as propriedades de transporte como difusividade e viscosidade, assim como a densidade apresentam valores intermediários das fases líquida e gasosa. Próximo ao ponto crítico, o fluido tem densidade e difusividade similar

à do líquido, assim como a viscosidade semelhante a dos gases, conferindo apreciável poder de solvatação e elevada difusividade (CARVALHO Jr, 2004).

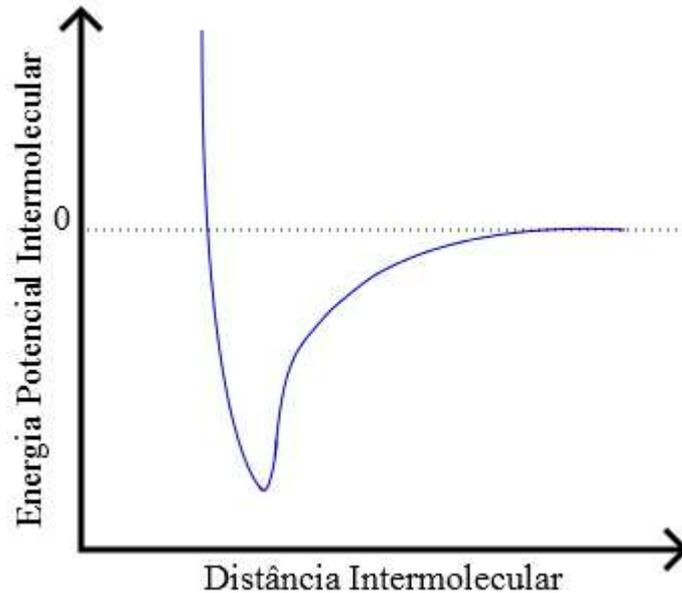


Figura 2.2. Gráfico de energia potencial intermolecular de Lennard-Jones.

O valor nominal de T_C do dióxido de carbono torna esta substância relevante para extração de substâncias termossensíveis, bem como propriedades como a inércia química também favorece a exploração no campo alimentício e farmacêutico. Bem como, é uma substância barata, não inflamável, abundante e adquirido em alto grau de pureza (MUKHOPADHYAY, 2000).

2.3.2 – Extração com fluidos supercríticos e parâmetros de processo

2.3.2.1 - Densidade

A densidade (ρ) é uma propriedade intensiva que seu valor nominal representa o quanto de massa (m) ocupa o valor nominal unitário de volume (V) de uma determinada substância. Representando, também, a noção dos caminhos livres médios dos átomos ou moléculas desta substâncias.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2.1)$$

O poder de solvatação de um fluido supercrítico é diretamente relacionado com a densidade, que por sua vez é, geralmente, controlada por alterações nos valores nominais de temperatura e, principalmente, pressão do sistema. Então, por meio do controle da densidade é possível simular e/ou substituir as propriedades de inúmeros solventes orgânicos como hexano, metanol, cloreto de metileno e clorofórmio (GOODSHIP et al., 2004).

Para relacionar as variáveis intensivas temperatura, pressão e densidade, se sugere que seja utilizadas equações de estados a fim de determinar os valores de densidade do solvente e/ou da mistura solvente-soluto (BRUNNER, 1994).

2.3.2.2 - Pressão

A pressão (P) exercida por um fluido é definida como a força normal (F_{normal}) exercida sobre uma unidade de área (A) da superfície na qual o fluido se distribui (SMITH et al., 2007). Já para um ponto específico de área A' , a pressão é definida como (MORAN et al., 2006):

$$P = \lim_{A \rightarrow A'} \left(\frac{F_{\text{normal}}}{A} \right) \quad (2.2)$$

Essa força normal é devido à transferência de quantidade de movimento ocorrido em função das colisões contra a superfície. Assim como as propriedades de transporte como a difusão, condutividade térmica e viscosidade, a pressão também depende dessas colisões (MAHAN et al., 1995). Portanto é necessário atenção aos sistemas envolvendo fluidos supercríticos, pois elevadas pressões implicam em elevadas forças o que conseqüentemente gera cuidados peculiares na administração e projetos operacionais dos processos que envolvem este fluido.

2.3.2.3 – Solubilidade

Tal como a diferença de temperatura para a transferência de calor e a diferença de pressão para a transferência de quantidade de movimento, a força motriz do fenômeno de transporte de massa é a diferença de concentração da espécie química. Contudo, esta transferência de massa é limitada pelas condições de equilíbrio. E a solubilidade

consiste na quantidade de uma espécie química, proveniente de uma amostra vegetal, dissolvida no solvente supercrítico que passa por esse meio vegetal, por exemplo.

Para estudar o equilíbrio de fases e diante da complexidade em termos de substâncias presentes numa amostra vegetal, geralmente uma modelagem empírica é adotada. Contudo, esta abordagem compromete negativamente o aproveitamento de informações experimentais de um sistema para outro (MEIRELES, 1999).

2.3.2.4 – Processo de extração supercrítica

Tratando-se de SFE em matriz sólida vegetal, o fluido supercrítico atravessa no sentido ascendente ou descendente a matriz vegetal carregada numa coluna e o processo é operada em modo semi-contínuo ou semi-batelada, já que a matéria-prima vegetal permanece fixa na coluna enquanto esta é atravessada pela corrente material de CO₂. Além disso, temperatura e pressão, também, são mantidos constantes e selecionados de acordo que o fluido supercrítico tenha capacidade de extrair os solutos (MUKHOPADHYAY, 2000). CARVALHO JR et al. (2005) mostrou que a relação entre parâmetros geométricos e de processo como massa de amostra vegetal, vazão mássica do fluido supercrítico, altura do leito e diâmetro da coluna devem ser observados pois relacionam-se matematicamente para a mudança de escala da SFE.

Observando que na SFE a transferência de massa de soluto da matriz vegetal para o meio no qual está o fluido supercrítico ocorre por meio dos fenômenos de convecção e difusão, que podem ocorrer simultaneamente. Para o fenômeno convectivo predominar é necessário que a amostra vegetal esteja preparada adequadamente em termos de distribuição granulométrica e umidade. Contudo, após um tempo que o processo foi desempenhado, os efeitos difusionais são fundamentais para obtenção de solutos provenientes de células intactas da amostra (CARVALHO JR, 2004).

BRUNNER (1994) observou que quando o fluido supercrítico entra em contato com a matriz sólida, a estrutura celular dilata-se e diminui a resistência a transferência de massa, com isso ocorre a solvatação, podendo ser precedida por reações. Por fim, com destaque para a difusão, o soluto é transportado para a superfície da matriz e então são arrastados na fase fluida pelo solvente supercrítico em modo contínuo.

Outro ponto de relevância é a interface meio pressurizado com meio ambiente determinado por uma válvula, onde ocorre a súbita queda de pressão (P) da solução, sendo esta uma expansão isentálpica ($H = \text{constante}$). E por isso haverá a possibilidade

de congelamento na região da válvula pela queda brusca de temperatura ou aquecimento. E o coeficiente de Joule-Thomson (μ_{JT}) é que descreve o comportamento da temperatura (T) da solução na região de estrangulamento da válvula e é definido como (ÇENGEL et al., 2006):

$$\mu_{JT} = \left(\frac{\partial T}{\partial P} \right)_H \quad (2.3)$$

Onde: a temperatura diminui em $\mu_{JT} > 0$, aumenta em $\mu_{JT} < 0$ e se mantém constante para $\mu_{JT} = 0$. Na Figura 2.3 ilustra a curva de inversão ($\mu_{JT} = 0$) para coordenadas reduzidas.

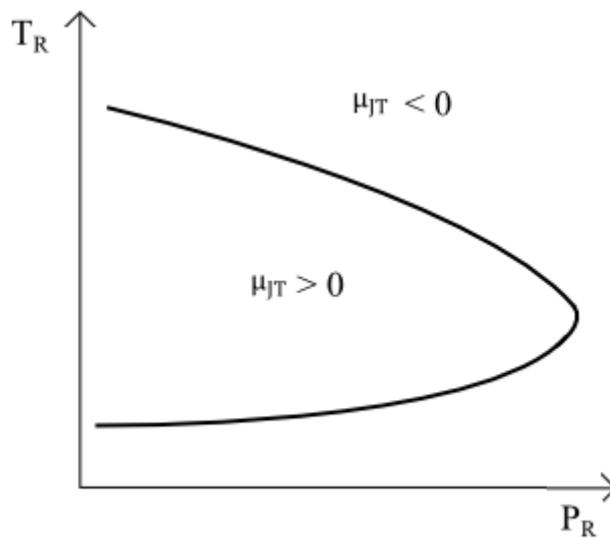


Figura 2.3. Curva de inversão, onde $\mu_{JT} = 0$, para coordenadas reduzidas. Adaptado a partir de SMITH et al. (2007).

2.3.2.5 – SFE em leito fixo

Para um extrator com geometria cilíndrica, a transferência de massa unidimensional axial, na ausência de reações químicas, o balanço de massa sob perspectiva descritiva euleriana é dado por (Rodrigues et al., 2000):

Fase fluida:

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u \frac{\partial Y}{\partial Z} = \frac{\partial}{\partial Z} \left(D_{aY} \frac{\partial Y}{\partial Z} \right) + \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad (2.4)$$

Fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial Z} \left(D_{aX} \frac{\partial X}{\partial Z} \right) - \frac{J(X, Y)}{K_p(1 - \varepsilon)} \quad (2.5)$$

Onde:

Y e X = razões mássicas de soluto na fase sólida e fase fluida respectivamente;

U = velocidade intersticial da fase fluida;

t = tempo;

Z = direção axial;

ε = porosidade do leito;

K_p = coeficiente de partição;

J(X,Y) = taxa de transferência de massa na interface substrato sólido/solvente;

D_{aY} = coeficiente de dispersão axial;

D_{aX} = coeficiente de difusão efetivo.

Resolvendo as equações 2.4 e 2.5, encontram-se as equações que descrevem as curvas globais de extração, que são ferramentas fundamentais para o projeto de equipamentos para a SFE.

Segundo **CABRAL (1993)**, estas curvas podem ser divididas em três etapas:

I - Etapa CER (taxa constante de extração), em que a superfície exterior do sólido está recoberta por uma camada de soluto;

II - Etapa de taxa decrescente de extração, onde o decorrer da SFE, porções da camada de soluto foram removidas; e

III - Etapa difusional, em que a mistura soluto+solvente supercrítico se difunde na matriz sólida.

2.3.2.6 – Modelos matemáticos para as curvas globais de extração

2.3.2.6.1 – Modelo de Tan e Liou (1989)

Neste modelo, a difusão não é considerada no processo de extração, além disso, adota-se a hipótese de que o processo é predominado pela dessorção de analitos da matriz vegetal e então a transferência de massa ocorre na interface com uma cinética de primeira ordem.

Balanco de massa na fase fluida:

$$\varepsilon\rho\frac{\partial Y}{\partial t} + u\rho\frac{\partial Y}{\partial h} = -(1 - \varepsilon)\rho_s\frac{\partial X}{\partial t} \quad (2.6)$$

Balanco de massa na fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -k_d X \quad (2.7)$$

Para solucionar as equações 2.6 e 2.7, foram adotadas as seguintes condições iniciais e de contorno:

$$Y(h, t = 0) = 0 \quad (2.8)$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (2.9)$$

$$Y(h, t = 0) = X_0 \quad (2.10)$$

Aplicando 2.8, 2.9 e 2.10 em 2.6 e 2.7, obtém-se a equação 2.11, que é a razão mássica do extrato no solvente na saída do extrator em função do tempo da extração.

$$Y(h = H, t) = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_S}{\rho} \left[\exp\left(\frac{k_d \varepsilon H}{u}\right) - 1 \right] \exp(-k_d t) \quad (2.11)$$

Observa-se que a inconsistência entre as equações 2.8 e 2.11, pois para $t = 0$, na equação 2.8 tem-se $Y = 0$, já na equação 2.9 obtém-se $Y = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_S}{\rho} \left[\exp\left(\frac{k_d \varepsilon H}{u}\right) - 1 \right]$, o que indica um possível erro na resolução das equações de balanços materiais.

Para determinar a massa de extrato em função do tempo, resolve-se a seguinte integral:

$$m(h = H, t) = \int_0^t Y(h = H, t) Q_{CO_2} dt \quad (2.12)$$

$$m(h = H, t) = \frac{Q_{CO_2}}{k_d} \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_S}{\rho} \left[1 - \exp\left(k_d \frac{\varepsilon H S \rho}{Q_{CO_2}}\right) \right] [\exp(-k_d t) - 1] \quad (2.13)$$

Sendo:

S = Superfície de transferência (m^2)

2.3.2.6.2 – Modelo de Goto (1993)

Este modelo considera que as partículas da matriz vegetal são porosas e possuem geometria planar com espessura desprezível. Com isso, a dessorção é o mecanismo predominante no processo de transferência de massa do soluto da partícula para os poros e então difusão deste soluto nos poros. A partir destas considerações, a equação de transferência de massa é dada por:

$$\beta \frac{\partial X_{\text{poros}}}{\partial t} + (1 - \beta) \frac{\partial X_{\text{partícula}}}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 X_{\text{poros}}}{\partial h^2} \quad (2.14)$$

$$\frac{\partial X_{\text{partícula}}}{\partial t} = k_d \left(X_{\text{poros}} - \left(\frac{X_{\text{partícula}}}{K} \right) \right) \quad (2.15)$$

Sendo:

β = porosidade da partícula;

h = coordenada da partícula.

Resolvendo as equações 2.14 e 2.15 obtém-se a equação 2.16, que é a equação da massa de extrato em função do tempo do modelo de **Goto et al. (1993)**.

$$m(h = H, t) = \frac{A \left[\frac{\beta}{K} + (1 - \beta) \right] X_0 \rho_s Q_{CO_2}}{\rho} \left\{ \frac{\tau}{a_1} \left[\exp \left(a_1 \frac{t}{\tau} \right) - 1 \right] + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - \exp \left(a_2 \frac{t}{\tau} \right) \right] \right\} \quad (2.16)$$

Sendo:

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

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

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

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

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

$$\phi = k_p a_p \tau$$

2.3.2.6.3 – Modelo de Sovová (1994)

Sovová (1994) desenvolveu este modelo para descrever o fluxo axial do fluido supercrítico através de amostra vegetal moída em um extrator cilíndrico. O soluto encontra-se no interior das células vegetais e parte fica exposto devido rompimentos em paredes celulares ocorridos na cominuição. Com isso, o extrato é dividido em soluto de fácil (X_p) e difícil acesso (X_k). Após a extração de X_p , o processo se torna predominado pelo fenômeno difusivo ao longo que X_k é extraído. Observa-se, também, que este modelo emprega os coeficientes de transferência de massa na fase fluida relacionado ao período CER (taxa de extração constante) e de transferência de massa na fase sólida relacionado a etapa de extração de X_k dominada por processo difusivo.

As equações dos balanços materiais para um elemento da matriz sólida são:

Fase sólida:

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (2.17)$$

Fase líquida:

$$\rho U \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (2.18)$$

Sendo:

$$J(X, Y) = k_{YA}(Y^* - Y) \text{ para } X > X_k \quad (2.19)$$

$$J(X, Y) = k_{XA}X \left(1 - \frac{Y}{Y^*}\right) \text{ para } X \leq X_k \quad (2.20)$$

A partir das soluções analíticas das equações 2.19 e 2.20, obtém-se a curva de extração dada pela seguintes equações:

$$m(h = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-Z)] \text{ para } t \leq t_{CER} \quad (2.21)$$

$$m(h = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - t_{CER} \exp(Z_w - Z)] \text{ para } t_{CER} < t \leq t_{CER} \quad (2.22)$$

$$m(h = H, t) = m_{SI} \left\{ X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left[1 + \exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{m_{SI}} (t_{CER} - t) \right] \left(\frac{X_p}{X_0} \right) \right\} \text{ para } t > t_{FER} \quad (2.23)$$

Sendo:

$$Z = \frac{m_{SI}k_{YA}\rho}{Q_{CO_2}(1 - \varepsilon)\rho_S}$$

$$W = \frac{m_{SI}k_{XA}}{Q_{CO_2}(1 - \varepsilon)}$$

$$Z_w = \frac{ZY^*}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{m_{SI}} (t_{CER} - t) \right] - X_k}{X_0 - X_k} \right\}$$

$$t_{CER} = \frac{m_{SI}X_p}{Y^*ZQ_{CO_2}}$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_{SI}}{WQ_{CO_2}} \ln \left[\frac{X_k + X_p \exp \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right)}{X_0} \right]$$

2.3.2.6.4 – Modelo de Esquivel et al. (1999)

Este é um modelo empírico no qual foi aplicado primeiramente na obtenção de extrato de casca de azeitona. Este modelo tem a curva de extração descrita pela equação 2.24.

$$e = e_{lim} \left(\frac{t}{k + t} \right) \quad (2.24)$$

Sendo:

e: razão entre massa de extrato e massa de solvente;

e_{lim} : razão entre massa de extrato e massa de solvente no tempo infinito de extração;

k: parâmetro ajustável.

2.3.2.6.5 – Modelo de Martínez et al. (2003)

Este modelo considera o sistema de extração como um sistema multicomponente. A curva de extração é dada conforme a equação 2.25.

$$m_i(h = H, t) = \frac{Q_{CO_2} HA_i}{u\varepsilon} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[b_i(t_{\min} - t)]} - \frac{1}{1 + \exp[b_i t_{mi}]} \right\} \quad (2.25)$$

Sendo:

ε = porosidade do leito de partículas;

h = coordenada axial do extrator (m);

H = Altura total do extrator (m);

Q_{CO_2} = Vazão mássica da fase fluida (kg/s).

Martinez et al. (2003) utilizou este modelo para modelar a curva de SFE do óleo-resina de gengibre.

2.3.2.6.6 – Modelo de Sovová (2012)

Este modelo é resultado de modificação feita por **SOVOVÁ (1994)** na equação publicada por **PAPAMICHAIL et al. (2000)** para extração de óleo essencial. Esta equação considera que há interação entre o soluto e a matriz sólida. A curva de extração é dada por:

$$\eta = X_u \left[1 - \exp \left(- \frac{q' K_m t}{1 + \frac{t_{comb,f}}{t_r}} \right) \right] \quad (2.26)$$

Onde:

η : Rendimento da extração kg/kg;

X_u : Concentração do extrato na planta antes da extração kg/kg;

q' : Taxa de fluxo específico kg (kg de planta) s^{-1} ;

K_m : Coeficiente de partição que relaciona as massas de solvente e matriz vegetal (kg de planta)/(kg de solvente);

$t_{comb,f}$: tempo característico combinado de transferência de massa;

t_r : tempo de residência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Seleção das operações de extrações

As extrações via SFE foram realizadas no *Spe-edTM SFE* (Allentown, PA, EUA) modelo 7071 da Applied Separations (Figura 3.1), acoplado com compressor Schulz modelo CSA 7,8 volume interno de 19,7 l da Schulz S/A (Joinville, SC, Brasil), cilindro com CO₂ com 99.9% de pureza da Linde Gases (Belém, PA, Brasil), recirculador Polyscience F08400796 (Niles, Illinois, EUA) e medidor de vazão de CO₂ na saída do sistema Alicat Scientific M 5SLPM (Tucson, AZ, EUA). Sendo que as extrações foram realizadas em duplicata.



Figura 3.1 - *Spe-edTM SFE* modelo 7071 da Applied Separations, Inc.

Já as obtenções de óleo volátil a partir de hidrodestilação foram realizadas em aparato convencional clewenger composto por manta de aquecimento, balão de vidro, condensador, tubo coletor graduado e frasco coletor.

3.2 – Aquisição, pré-tratamento e caracterização de parâmetros das amostras

3.2.1 – Aquisição da amostra

As amostras consistem de sementes de gergelim-preto que foram adquiridas como produto comercial Novalimento (São Paulo, SP, Brasil) provenientes de cultivos reali-

zados no estado de São Paulo no Brasil, sendo, que foram cultivadas sementes (Figura 3.2) para registro do testemunho de uma amostra no Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, PA, Brasil) sob o registro de MG: 204755.



Figura 3.2 - Sementes e planta de gergelim-preto (*Sesamun indicum* L.) utilizadas neste trabalho.

3.2.2 – Pré-tratamento (cominuição e secagem)

A amostra foi pré-tratada cominuída em moinho (Tecnal, modelo TE-631/3, Brasil) e submetida à secagem a 45 °C por 6 horas.

3.2.3 – Determinação da umidade

A determinação da umidade foi realizada utilizando uma balança de umidade com precisão de $\pm 0,01\%$ (Shimadzu, modelo SHI-MOC-120H, Brasil).

3.2.4 – Determinação do diâmetro médio das partículas

O peneiramento convencional é inadequado para a determinação da granulometria das partículas desta matéria-prima devido sua elevada oleosidade. Por isso a análise granulométrica para determinação do diâmetro médio das partículas foi realizada pela medida visual por microscópio eletrônico (Kalinu Technology, model KLN-J500, China) e software Micro-Measure de diâmetros de 240 partículas. Sendo que essas partículas foram peneiradas previamente e ficaram retidas entre as malhas de 16 e 28 mesh.

3.2.5 – Determinação de densidade aparente, densidade real e porosidade do leito

A densidade aparente (ρ_a) foi determinada pela razão entre massa de amostra pelo volume do leito. Assim como a densidade real (ρ_r) foi determinada por picnometria em gás hélio (Quantachrome, modelo Ultrapyc 1200e, USA). Já a porosidade do leito (ε) foi determinada pela equação (3.1).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3.1)$$

3.3 – Extração supercrítica

3.3.1 – Seleção dos parâmetros de processo das extrações supercríticas

Para a obtenção do extrato de gergelim-preto (*Sesamun indicum L.*), a seleção das variáveis temperatura e pressão foi realizada a fim de realizar uma varredura em duplicata nas isothermas de 40 °C e 60 °C combinadas com os valores de pressão de 200, 250, 300, 350 e 400 bar.

3.3.2 – Procedimentos técnicos para as SFEs

3.3.2.1 – SFE para determinação das isotermas de rendimento global

A extração exaustiva é realizada de acordo com a sequência a seguir:

I - A partir do momento em que o conjunto instrumental está conectado ao fornecimento elétrico e as válvulas inlet's, outlet's e vent estão fechadas e as válvulas micro-métricas parcialmente fechadas, acopla-se a coluna de extração (Figura 3.3) devidamente preparada com a amostra na base de 5 gramas para uma coluna com dimensões altura 32,5 cm e diâmetro 1,4 cm, utilizando-se algodão para evitar a migração de partículas da amostra para os capilares do equipamento, assim como utilizou-se esferas de vidro para preencher o volume restante da coluna.



Figura 3.3 – Ilustração do leito da coluna preparada para a extração.

II - Em seguida, verificam-se possíveis vazamentos nos pontos de conexões entre coluna e dutos do equipamento por meio da liberação de CO₂ para o sistema e então, com a temperatura do banho termostático sinalizando está no valor desejado, inicia-se a compressão do sistema pela rotação manual da válvula de pressão do ar até atingir o valor da pressão de operação observada no monitor do sistema de pressão. Enquanto isso, a temperatura da válvula micrométrica está programada no valor de 90 °C estimado verificando-se que no valor de 85 °C, ainda ocorre obstrução no duto de saída da corrente material por congelamento previsto pelo efeito de Joule-Thomson;

III – Logo, inicia-se a extração por meio da contagem do tempo dividido em duas etapas: a) etapa estática ou batelada desempenhada em 30 minutos em que a válvula outlet está fechada; b) com o frasco coletor devidamente identificado acoplado na saída do duto com uma saída específica para o CO₂ seguir exclusivamente para o medidor de vazão, inicia-se a etapa semi-contínua desempenhada em 3 horas marcadas a partir do fim da etapa estática, e então se abre a válvula outlet, até o início da despressurização do sistema. Ressaltando que o frasco coletor deve estar inserido em um banho térmico para captura das substâncias voláteis, assim como adequado a incidência luminosa devido substâncias fotossensíveis;

IV – Completando o tempo de extração, segue-se para a despressurização em que a válvula de fornecimento de CO₂ para o equipamento é fechada de forma manual, a válvula de pressão do ar é rotacionada gradativamente no sentido anti-horário até o limite. Em paralelo, manuseiam-se as válvulas outlet e micrométrica para manter a vazão do CO₂ em 2 l/min até que o valor de 0 seja observado no visor do monitor do sistema de pressão;

V – Com o sistema completamente despressurizado, retira-se o frasco coletor para verificar a massa de extrato. Então, armazena-se o extrato em temperatura de aproximadamente -15°C e protegido de incidência luminosa;

VI – Realiza-se a limpeza do equipamento utilizando os materiais adequados como álcool etílico, a seringa que acompanha o *Spe-edTM SFE* e CO₂ gasoso para limpar os capilares na linha de extração, assim como detergente neutro e escova para limpar a coluna de extração, observando os cuidados de preservação do equipamento.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.2.2 – Extração supercrítica em modo de cinética de extração

Para o estudo da cinética de extração supercrítica, replicou-se o experimento relativo a temperatura de 60°C/400 bar e 60°C/200 bar, pois nestes experimentos observaram-se o maior e menor rendimento, consecutivamente, em termo de massa de extrato, sendo que, também, amostras do extrato obtido nas condições 60°C/400 bar foram destinadas aos experimentos para verificar o potencial anti-inflamatório do extrato após isquemia cerebral focal induzida em ratos adultos, pesquisa esta realizada sob coordenação do Professor Doutor Wallace Gomes Leal, coordenador do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

As curvas globais de extração (OECs) foram obtidas a partir de 6,02 g de amostra por experimento, correspondendo a um leito de 3,5 cm de altura (H) e 1,4 cm de diâmetro (d_c). Sendo mantido o tempo de extração estático e dinâmico, coletando-se amostras em seis intervalos de 10 min, dois intervalos de 20 min e três intervalos de 30 min no período semi-contínuo da SFE. E vazão mássica de CO₂ igual a $5,9 \times 10^{-5}$ kg/s. Sendo que os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.2 – Medida da massa de extrato

A massa do extrato é medida por meio de método analítico gravimétrico indireto, em que utilizando uma balança analítica (Astral Científica, Edutec, modelo FA 2204C série 1004030, PR, Brasil) com precisão de 0,0001 g, verifica-se a massa do frasco coletor antes e após a extração, considerando a diferença de massas registradas como a massa do extrato obtido.

3.3.3 – Cálculos de rendimento em termos de massa

Para determinar os rendimentos, foram aplicados conhecimentos de porcentagem considerando as umidades das amostras, calculando rendimento mássico em base seca.

$$\text{Rendimento Mássico em Base Seca} = \frac{m_E}{m_{\text{amostra}} \times \left(\frac{100 - U}{100}\right)} \quad (3.2)$$

Onde:

m_E é a massa do extrato em gramas;

$m_{amostra}$ é a massa da amostra em gramas antes da extração;

U é a umidade percentual da amostra.

3.4 – Obtenção de óleo volátil a partir de hidrodestilação

A extração por hidrodestilação foi realizada com base no método 962.17 da **AOAC (1997)**, onde a partir de 100 g de amostra de semente de gergelim-preto com as condições de umidade e granulometria das amostras utilizadas nas SFE's com 220,1 ml de água destilada num balão de vidro de 500 ml. A manta de aquecimento fornece calor suficiente para que a água entre em ebulição e então o vapor da mistura é direcionado ao condensador e assim o extrato mais água condensados são capturados no tubo coletor graduado. Por fim, verificou-se a partir das polaridades e densidades a separação do óleo volátil da fração remanescente no tubo coletor graduado. Sendo que este experimento foi desempenhado em 2 horas e foi realizado em duplicata.

3.5 – Caracterizações dos extratos

3.5.1 – Determinação do teor relativo de ácidos graxos por cromatografia à gás

A composição porcentual relativa de ácidos graxos foi determinada pela conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) de acordo com o método de **Rodrigues et al (2010)**, utilizando cromatógrafo a gás Varian modelo CP 3380 acoplado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar CPSil 88 de 60 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μm da Varian Inc.

Foi injetado 1 μl , sendo que gás hélio foi utilizado como fase móvel com vazão de 0,9 ml/min e o DIC e o injetor (split ratio 1:100) a 250 °C. A programação de temperatura da coluna foi desempenhada de 80 °C por 4 min e então elevada para 205 °C com 4 °C/min.

A identificação dos picos individuais de ácidos graxos foi realizada com base em padrões (Nu-check-prep Inc, EUA). Assim como, utilizou-se o software Varian Star 3.4.1 para calcular os tempos de retenção e áreas dos picos. Os resultados foram expressos com percentuais relativos de ácidos graxos totais. Determinação do teor relativo de áci-

dos graxos por cromatografia à gás em todos os extratos obtidos para elaboração das isotermas de rendimento global de 40 °C e 60 °C.

3.5.2 – Determinação do teor relativo de fitoesteróis por cromatografia à gás

A análise quantitativa de fitoesteróis foi realizada de acordo com o método Ch 6-91 da **AOCS (2004)** em uma amostra de extrato obtida nas condições operacionais de 60°C/400bar. Os resultados foram expressos em percentuais relativos de fitoesteróis totais.

3.5.3 – Modelo experimental de isquemia focal e tratamento por extratos de sementes de gergelim-preto (*Sesamun indicum L.*)

Para testar os efeitos neuroprotetores do extrato obtido nas condições operacionais de 60°C/400 bar, foram tratados ratos machos Wistar adultos. O peptídeo endotelina-1 (ET-1) foi microinjetada no córtex motor do rato de acordo com o protocolo descrito por **Santos et al. (2012)** e **Agnati et al. (1991)**. A microinjeção de ET-1 trata-se de um modelo de isquemia focal bem estabelecido. Foram utilizados grupos controle para comparação.

Para a análise histopatológica, os cérebros foram dissecados, crioprotetidos e então cortados no criostato em seções transversais com 20 µm de espessura. Sendo que violeta de cresila foi utilizada para verificar o perfil histológico.

3.6 – Modelagem

3.6.1 – Cálculo de densidade

As densidades do CO₂ foram calculadas pelo programa TermoDi (**CARVALHO Jr. et al, 2004**), com manual disponível na tese de doutorado de **CARVALHO Jr. (2004)**.

3.6.2 – Vazão mássica de CO₂

Para determinar a vazão mássica de CO₂ na saída do sistema o fluxo foi controlado para que a vazão volumétrica fosse mantida em aproximadamente 2 l/min e então apli-

cou-se na equação 3.4 os dados de vazões volumétricas e densidades calculadas pelo programa TermoDi (CARVALHO Jr. et al, 2004) a partir de temperaturas e pressões de CO₂ na saída do sistema SFE, fornecida pelo medidor de vazão da Alicat Scientific acoplado no sistema de exaustão do solvente do *Spe-edTM SFE*, com as densidades determinadas de acordo com o tópico 3.6.1.

$$\dot{m}_{\text{CO}_2} = \rho_{\text{CO}_2} \times Q_{\text{CO}_2} \quad (3.4)$$

3.6.3 – Cálculos da taxa de transferência de massa e parâmetros cinéticos

As curvas globais de extração (OECs) foram usadas para ajustar um spline de duas retas de acordo com o protocolo descrito por **Rodrigues et. Al. (2003)**. Este método foi utilizado para calcular os parâmetros do período de taxa de extração constante (CER): taxa de transferência de massa do período CER (M_{CER}) e a duração do período CER (t_{CER}). O aplicativo desenvolvido por **Santos (2007)** foi empregado para estimar estes parâmetros. A taxa de transferência de massa do soluto na fase supercrítica na saída do extrator ($Y_{\text{CER,sp}}$) foi obtida pela razão entre $M_{\text{CER,sp}}$ e vazão mássica média (Q_{CO_2}) para o período CER.

3.6.4 – Ajustes em curvas dos dados dos experimentos em modo de cinética de extração

Para a modelagem das OECs, foram usadas as curvas cinéticas obtidas no menor e maior rendimento global (200 e 400 bar, a 60 ° C). As curvas foram ajustadas pelos modelos de **Tan e Liou (1989)**, **Martinez et al. (2003)**, **Esquível et al. (1999)**, **Goto et al. (1993)**, **Sovová (1994)** e **Papamichail et al. (2000)** modificado por **Sovová (2012)**. Os parâmetros ajustados foram os seguintes: o coeficiente de dessorção (k_d) para o modelo de **Tan e Liou (1989)**, os parâmetros empíricos b_i e t_{mi} do modelo lógico de **Martinez et al. (2003)**, o K para o modelo de **Esquível et al. (1999)**, da constante de equilíbrio de dessorção (k) e o parâmetro adimensional ϕ para o modelo de **Goto et al. (1993)**, o período de taxa constante de extração (t_{CER}) e o coeficiente de transferência de massa da fase fluida (K_y) para o modelo **Sovová (1994)** e K_m é o coeficiente de partição entre massa de planta e solvente ($\text{kg planta} / (\text{kg solvente})^{-1}$), $t_{\text{comb,f}}$ é tempo

combinado característico de transferência de massa e t_r é o tempo de residência no modelo **Sovová (2012)**.

Para cada ajuste foi verificado os valores nominais das somas residuais dos quadrados (RSS) para avaliar qual modelo apresenta melhor ajuste.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização das matérias-primas

4.1.1 – Sementes de gergelim-preto (*Sesamun indicum* L.)

A amostra de sementes de gergelim-preto seca e cominuída apresentou $3.95 \pm 0.23\%$ de umidade, densidade real (ρ_r) de $1160 \pm 10 \text{ kg/m}^3$, densidade aparente (ρ_a) de 1117 kg/m^3 e porosidade do leito (ϵ) de 0,037.

Já o diâmetro médio das partículas foi de $2.9 \times 10^{-4} \pm 0.00015 \text{ m}$.

4.2 – Processos Extrativos

4.2.1 – Hidrodestilação

Não foram obtidos extratos mensuráveis nos ensaios de hidrodestilação.

4.2.2 – SFE

4.2.2.1 – Isotermas de rendimento global

4.2.2.1.1 - Determinação da vazão mássica e densidades do CO₂ na saída do sistema

SFE

A vazão mássica média determinada foi de $5,9 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$. Já as densidades calculadas podem ser observadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Densidades calculadas por meio do software TermoDi.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade (kg/m ³)
40	200	830,062
40	250	885,720
40	300	928,359
40	350	963,071
40	400	992,394
60	200	694,410
60	250	774,141
60	300	831,426
60	350	876,280
60	400	913,183
27,66	1,02	1,80434

4.2.2.1.2 – SFE em sementes de gergelim-preto (*Sesamun indicum* L.)

Os fenômenos de vaporização e solubilização presentes na extração supercrítica caracterizam o desempenho desta operação. Onde a vaporização consiste na migração de moléculas da amostra da matéria-prima numa fase condensada para a fase expandida do solvente supercrítico, assim como a solubilização de moléculas da matéria-prima devido interações soluto e solvente em função de propriedades do sistema que as moléculas estão envolvidas. A ocorrência da associação entre vaporização e solubilização caracteriza a natureza intermediária do estado fluido supercrítico (**LUQUE de CASTRO et al., 1994**). A compressibilidade isotérmica tende ao infinito de acordo que as condições se aproximam do ponto crítico, portanto a densidade muda drasticamente e a solubilidade das substâncias em CO₂ supercrítico (S-CO₂) depende de diferenças de volume livre entre o soluto e o S-CO₂ e das forças intermoleculares entre S-CO₂/S-CO₂, S-CO₂/soluto e pares soluto-soluto na solução (**MCHUGH e KRUKONIS, 1994**). A densidade do S-CO₂ é estimada a partir das duas variáveis intensivas como pressão e temperatura, contudo é necessário também que sejam verificadas as interações extrato de semente de gergelim-preto/S-CO₂. Sendo essas interações observadas por medições de solubilidade de extrato de semente de gergelim-preto/S-CO₂ e/ou por meio das isotermas de rendimentos globais obtidas nos experimentos de SFE. As isotermas de rendimento global de 40 °C e 60 °C são mostradas na Figura 4.1. Observa-se que o maior e menor valores nominais de rendimento mássico foram nos experimentos desempenhados em 60°C com 400 bar e 60°C com 200 bar consecutivamente.

Outra observação a partir da Figura 4.1 é que para pressões entre os valores nominais de 200 à 332,5 bar, o efeito da densidade do CO₂ prevalece e a isoterma 40 °C tem o maior rendimento global mássico. Entretanto a partir de 332,5 bar à 400 bar o efeito da pressão de vapor predomina em termos de rendimento global mássico.

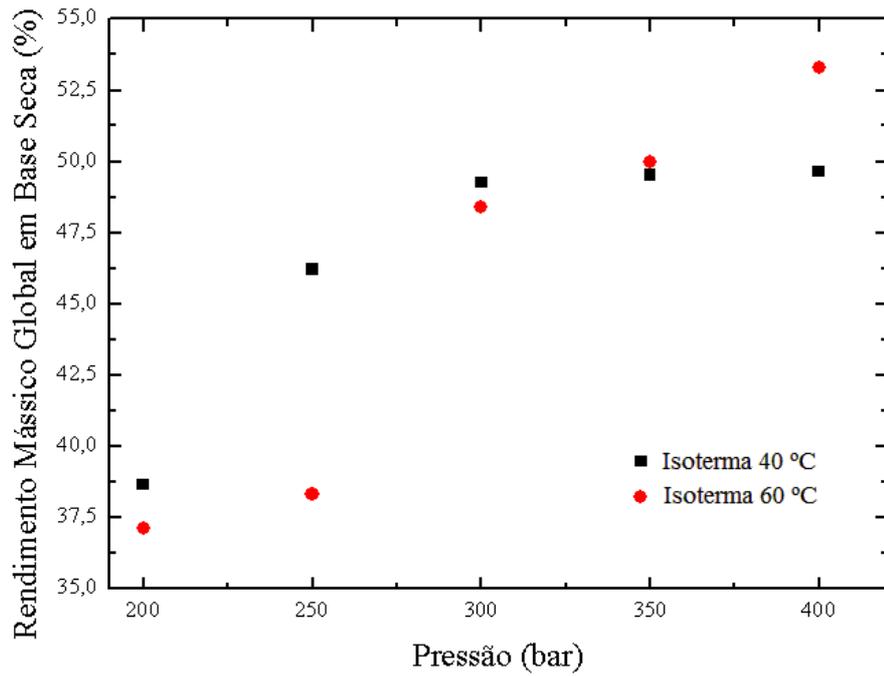


Figura 4.1 – Isotermas de rendimento mássico global versus pressão das SFE's.

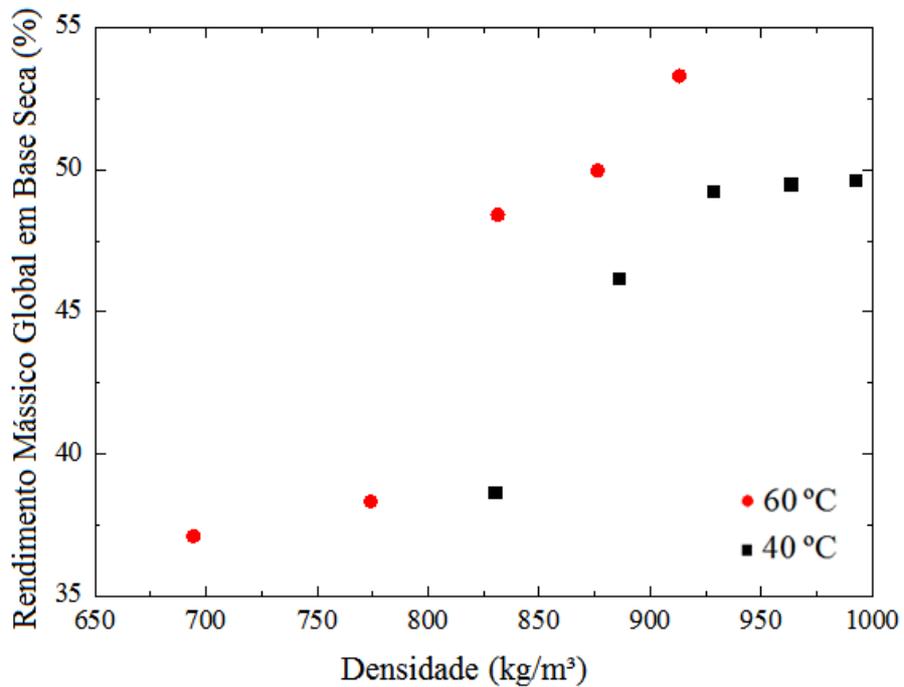


Figura 4.2 – Isotermas de rendimento mássico global versus densidade das SFE's.

Já na Figura 4.2, observa-se a limitação da SFE pela densidade para os três primeiros pontos em ordem crescente de cada isoterma, ressaltando o ponto relativo ao experi-

mento 60 °C e 200 bar sendo o de menor rendimento devido o menor valor nominal de densidade. Assim como, não foi notado avanço efetivo no rendimento do extrato a partir da pressão de inversão para a isoterma de 40 °C, observando que a prevalência do efeito da pressão de vapor não resulta em ganhos positivos no quesito massa de extrato, já que há um rendimento percentual global em base seca médio desses três experimentos de 49,51% com desvio padrão de $\pm 0,2\%$.

4.2.2.2 – Cinética da SFE

Os parâmetros operacionais selecionados para a realização da SFE em modo de cinética foram conforme a descrição apresentada na seção 3.3.2.2.

4.2.2.2.1 – Modelagem

Os resultados dos parâmetros de transferência de massa foram: $M_{CER} = 3,74 \times 10^{-7} \text{ kg s}^{-1}$, $t_{CER} = 2820 \text{ s}$ e $Y_{CER} = 0,00497$ (200 bar e 60 ° C) e $M_{CER} = 1,11 \times 10^{-6} \text{ kg s}^{-1}$, $t_{CER} = 2160 \text{ s}$ e $Y_{CER} = 0,01474$ (400 bar e 60 ° C). Em ambos os casos, o spline de duas retas forneceram os ajustes mais adequados em relação ao spline de três retas. Houve um aumento de 2,9 vezes em M_{CER} quando a pressão foi aumentada de 200 para 400 bar. Para a modelagem das OECs, o modelo de **Goto et al. (1993)** apresentou o melhor ajuste com menor soma residual dos quadrados (RSS), como pode ser observado na Tabela 4.2. Já o modelo de **Sovová (2012)** apresentou um melhor ajuste das OECs em relação ao ajuste implementado pelo modelo de **Sovová (1994)**. O modelo de **Tan e Liou (1989)**. O modelo de **Esquivel et al. (1999)**, não apresentou um bom ajuste para os dados experimentais. Os parâmetros ajustados nestes modelos são aplicáveis apenas para as nossas condições experimentais. O modelo de **Martínez et al. (2003)** não apresentou RSS significativo. Os melhores ajustes estão podem ser observados na Figuras 4.5 e 4.6.

Tabela 4.2 - Parâmetros dos modelos cinéticos.

Modelo	Parâmetros - 60 °C – 200 bar	Parâmetros - 60 °C – 400 bar
Sovová 2012	$K_m = 2,1684 \pm 0,08354$ $t_{\text{comb},f}/t_r = 0,95$ RSS = 0,00207	$K_m = 4,86862 \pm 0,21232$ $t_{\text{comb},f}/t_r = 0,95$ RSS = 0,00422
Sovová 1994	$t_{\text{CER}} = 47 \text{ min}$ $k_{Y_A} = 0,0049 \text{ s}^{-1}$ RSS = 0,0698	$t_{\text{CER}} = 36 \text{ min}$ $K_{Y_A} = 0,0171 \text{ s}^{-1}$ RSS = 0,3071
Tan and Liou	$k_d = 0,01051 \pm 0,0008 \text{ min}^{-1}$ RSS = 0,02915	$K_d = 0,03332 \text{ min}^{-1}$ RSS = 0,08374
Martinez et al.	$b_i = 0,01098 \pm 0,00023 \text{ min}$ $t_{\text{mi}} = -2863,49 \pm 70,47 \text{ min}$ RSS = 0,18681	$b = 0,02622 \pm 0,00034 \text{ min}$ $t_{\text{mi}} = -1206,83 \pm 9,90 \text{ min}$ RSS = 0,25585
Esquível et al.	$K = 46,33349 \pm 5,93 \text{ min}$ RSS = 0,42185	$K = 17,40 \pm 2,01157$ RSS = 0,48662
Goto et al.	$\phi = 0,01$ $k = 0,87768 \pm 0,01036$ RSS = $3,02009 \times 10^{-8}$	$\phi = 0,00017$ $k = 0,00503 \pm 0,00006$ RSS = $9,3923 \times 10^{-8}$

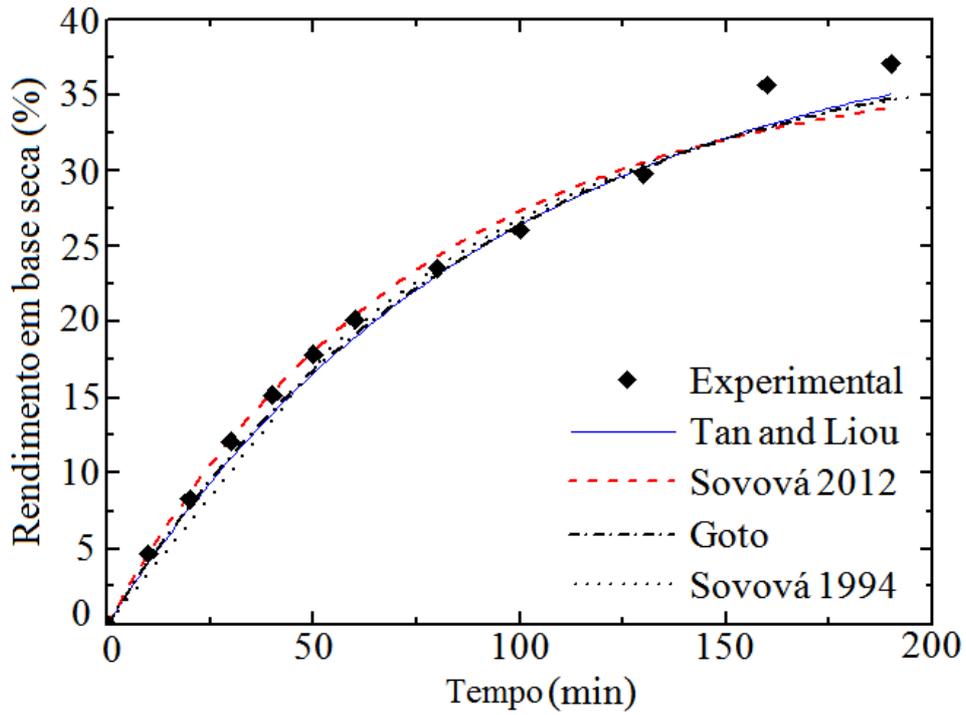


Figura 4.5 – Dados experimentais e ajustes obtidos nas condições operacionais de 60°C/200 bar.

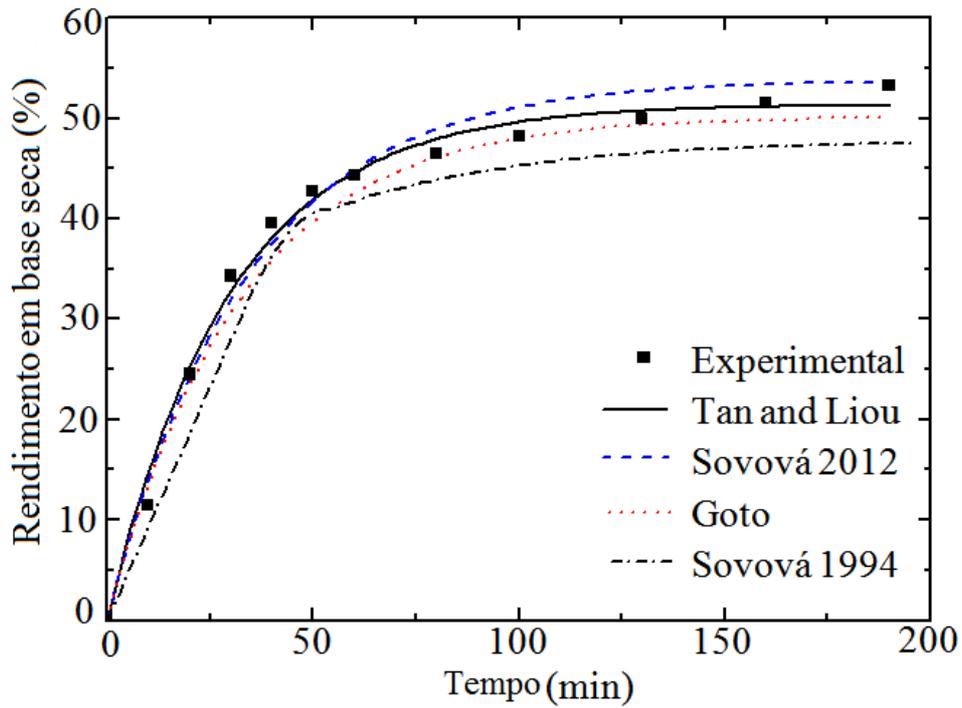


Figura 4.6 – Dados experimentais e ajustes obtidos nas condições operacionais de 60°C/400 bar.

4.3 – Composição dos extratos via SFE de sementes de gergelim-preto (*Sesamun indicum* L.)

4.3.1 – Determinação de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Na Tabela 4.3, observa-se os perfis de ácidos graxos nos extratos obtidos nas SFE's em modo exaustivo. O conteúdo total de óleo de extrato de gergelim-preto variou entre 0,007 a 50,02%. Ácido caprílico (C8:0) foi observado em todas as condições operacionais e na condição de 300 bar com 60 °C foi obtida a mais alta concentração de C8:0, enquanto a concentração mais baixa foi encontrado na SFE de 400 bar com 60 °C. Traços de ácido cáprico (C10:0) foram obtidos nas condições da 200 bar com 40 °C, 400 bar com 40 °C e 400 bar com 60 °C, o mesmo foi observado para ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido margárico (C17:0), ácido linolênico (C18:3), ácido arachidico (C20:0); ácido behênico (C22:0) em todas as condições operacionais de extração. Os ácidos graxos mono-insaturados (MUFAs) que apresentaram maiores concentrações em todas as condições de extrações foram, em ordem decrescente, o ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). Já em relação a ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), o ácido linoleico (C18:2) teve a maior concentração, seguido pelo ácido linolênico (C18:3). Análise do perfil de ácidos graxos do extrato de gergelim preto indicou uma relação elevada de insaturados/saturados. Quantidades significativas em ordem decrescente de PUFAs e MUFAs foram observadas. As quantidade de ácidos graxos presentes nos extratos obtidos em 40°C/250bar e 60°C/250bar são similares aos resultados obtidos por **Corso et al. (2010)**, exceto pela presença de ácido caprílico e ausência de ácidos linolênico nos extratos obtidos neste trabalho, bem como a ausência de ácido behênico em extrato obtido neste trabalho nas condições de 40°C/250bar.

De acordo com os resultados observados por **Kelley et al (2007)** certos isômeros do ácido linoleico conjugado estão relacionados com os efeitos anticarcinogênicos. **Kritchevsky et al. (2004)** demonstraram que a aplicação de certos isômeros do ácido linoleico conjugado foram também aplicados de modo satisfatório para a inibição e tratamento da aterosclerose em coelhos. **Mei et al. (2011)** verificaram que o ácido oleico está ligado a indução a autofagia e um pequeno efeito na apoptose em hepatócitos, enquanto que o ácido palmítico suprimiu a autofagia e tem um papel fundamental em induzir a apoptose nos hepatócitos.

Tabela 4.3. Análise de ácidos graxos dos extratos via SFE.

Ácidos Graxos	Concentração de Ácidos Graxos em % g/100g									
	200bar 40 °C	250bar 40 °C	300bar 40 °C	350bar 40 °C	400bar 40 °C	200bar 60 °C	250bar 60 °C	300bar 60 °C	350bar 60 °C	400bar 60 °C
C8:0	0,3931	0,4805	0,6480	0,5206	0,3004	0,2846	0,4456	0,8974	0,7824	0,2622
C10:0	0,0090	-----	-----	-----	0,0082	-----	-----	-----	-----	0,0032
C12:0	0,0076	0,0248	-----	0,0725	0,2020	0,0194	0,0499	0,0319	0,0408	0,0827
C14:0	0,0318	0,0573	0,0466	0,0514	0,1379	0,0506	0,0375	0,0930	0,0505	0,0672
C16:0	9,6051	9,6593	9,6540	9,6103	9,4848	10,5061	9,6768	9,6312	9,7620	9,7776
C16:1	0,1651	0,1568	0,1675	0,1763	0,1381	0,1976	0,1809	0,1802	0,1742	0,1374
C17:0	0,0301	0,0430	-----	0,0327	0,0333	0,0288	0,0390	0,0324	0,0280	0,0352
C18:0	4,9233	5,1010	4,8052	4,8820	5,6956	3,8635	4,8399	4,2787	4,6192	5,9507
C18:1	36,7273	37,2234	36,5840	36,5989	38,5455	34,9946	36,4733	35,5084	35,9182	38,7779
C18:2	47,1778	46,8822	48,0947	47,6715	44,4754	50,0238	47,8554	49,3123	48,6249	44,9059
C18:3	0,5505	-----	-----	-----	0,6690	-----	-----	-----	-----	-----
C20:0	0,3793	0,3718	-----	0,3837	0,3098	-----	0,3804	0,0344	-----	-----
C22:0	-----	-----	-----	-----	-----	0,0311	0,0213	-----	-----	-----
SFA	15,3793	15,7377	15,1538	15,5532	16,172	14,7841	15,4904	14,999	15,2829	16,1788
MUFA	36,8924	37,3802	36,7515	36,7752	38,6836	35,1922	36,6542	35,6886	36,0924	38,9153
PUFA	47,7283	46,8822	48,0947	47,6715	45,1444	50,0238	47,8554	49,3123	48,6249	44,9059
S/U	0,1817	0,1868	0,1786	0,1842	0,1929	0,1735	0,1833	0,1765	0,1804	0,1930

C8:0 (ácido caprílico); C10:0 (ácido cáprico); C12:0 (ácido láurico); C14:0 (ácido mirístico); C16:0 (ácido palmítico); C16:1 (ácido palmitoleico); C17:0 (ácido margárico); C18:0 (ácido esteárico); C18:1 (ácido oleico); C18:2 (ácido linoleico); C18:3 (ácido linolênico); C20:0 (ácido arachidico); C22:0 (ácido behênico); SFA (Ácidos Graxos Saturados); MUFA (Ácidos Graxos Monoinsaturados); PUFA (Ácidos Graxos Poliinsaturados); S/U (Razão entre Ácidos Graxos Saturado/Insaturado % / %).

4.3.2 – Determinação de fitosteróis por cromatografia gasosa

Os resultados da análise de fitosteróis realizada em amostra de extrato obtida nas condições operacionais de 60°C/400bar são apresentados na Tabela 4.4. A quantificação de fitosteróis por cromatografia à gás foi caracterizada pela quantidade considerável de colesterol, bem como a presença de brassicasterol, eritrodiol, sitosterol, campesterol e estigmasterol, que são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica (BBB) e acumulam-se no cérebro (Lobo et al. 2011). , a quantificação de fitosteróis em extratos obtidos via SFE neste trabalho podem ser comparados com a quantificação de fitosteróis em extratos via extração com hexano por ÜNAL et al. (2008), observando as diferentes regiões de cultivo, elevada quantidade de colesterol, presença de brassicasterol e eritrodiol em extratos obtidos via SFE apresentados neste trabalho. Tem

sido sugerido que o brassicasterol pode ser utilizado como um biomarcador para a doença de Alzheimer, devido aos seus baixos níveis no fluido cerebrospinal de pacientes com esta doença (Vanmierlo et al. 2011). Foram observados resultados semelhantes em pacientes com síndrome de Down (Tansley et al. 2012).

Tabela 4.4 Análise quantitativa de fitosteróis em extrato obtido a 60°C/400 bar.

Fitosterol	Quantidade realtiva a fitosteróis totais (%)
Colesterol	18,70
Brassicasterol	0,86
Estigmasterol	5,17
Δ -5, 24 Estigmastadienol	0,90
Δ -7 Estigmastenol	0,23
Δ -7 avenasterol	0,53
Eritrodiol	0,29
Campesterol + campestanol + 24 metileno colesterol	15,82
Clerosterol + Δ -5, 23 estigmastadienol	0,57
Δ -5 avenasterol	12,44
β -sitosterol + sitostanol	43,91
Outros	0,55

4.4 – Verificação do poder anti-inflamatório dos extratos via SFE de sementes de gergelim-preto (*Sesamun indicum* L.) após isquemia cerebral focal induzida em ratos wistar adultos

Os resultados preliminares obtidos neste estudo sugerem que o extrato de gergelim-preto via SFE é neuroprotetor, pois foi observado uma diminuição considerável de leucócitos nos animais tratados (Ver Figura 4.7 C e D) com o extrato em comparação com o grupo controle (Ver Figura 4.7 A e B). Estudos futuros deverão investigar os efeitos do extrato de gergelim-preto via SFE e de seus componentes em desordens neurais agudas, incluindo acidente vascular encefálico e lesão da medula espinhal. Os mecanismos antioxidantes das sementes de gergelim preto podem estar envolvidos nos efeitos neuroprotetores.

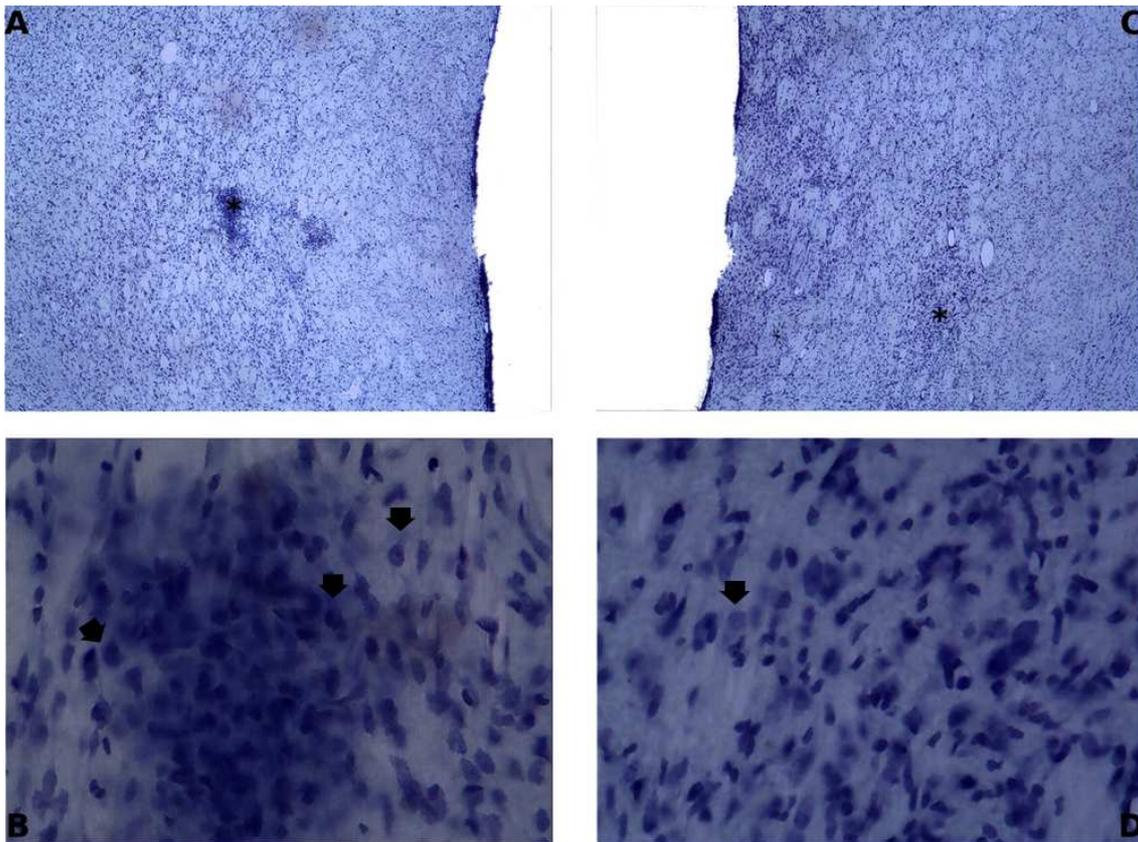


Figura 4.7 – Os asteriscos indicam o epicentro da lesão, enquanto que as setas sinalizam leucócitos. Observa-se que no grupo controle (A e B) há maior infiltração de leucócitos do que no grupo tratado (C e D).

5 CONCLUSÕES

O processo de extração utilizando dióxido de carbono supercrítico foi eficaz na produção de extrato de gergelim preto principalmente, em termos de rendimento mássico, na condição operacional de 60°C/400bar. O modelo de **Goto et al. (1993)** apresentou o melhor ajuste nas duas SFEs avaliadas. A presença de ácidos graxos poli-insaturados representados por ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) foi significativa em todos os extratos. A quantidade elevada de ácido linoleico nas sementes de gergelim preto sugere um potencial para aplicação dos extratos obtidos via SFE em estudos utilizando modelos experimentais de autofagia e apoptose, de câncer e aterosclerose, bem como em pacientes humanos. Análises qualitativas e quantitativas dos isômeros do ácido linoleico presente nos extratos devem ser feitas em estudos futuros. Por fim, a presença de fitosteróis no extrato via SFE capazes de atravessar a BBB sugere um potencial considerável do *Sesamum indicum* L. para ser usado como neuroprotector em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, conforme observado nos estudos preliminares realizados neste trabalho, utilizando um modelo de acidente vascular encefálico.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos, sugere-se:

- ❖ O desenvolvimento de um estudo teórico e experimental de equilíbrio de fases entre CO₂ supercrítico e extrato de sementes de gergelim-preto;
- ❖ Análises qualitativas e quantitativas de fitosteróis nos demais extratos;
- ❖ Análises qualitativas e quantitativas de outros compostos lipossolúveis presentes nos extratos;
- ❖ Realizar SFE com co-solvente, analisar os extratos obtidos e utiliza-los nos estudos de neuroproteção;
- ❖ Estudo nutracêutico da matriz vegetal utilizada após a SFE;
- ❖ Realizar estudo mais detalhado em termos de estruturas moleculares a fim de identificar e isolar determinada substância ou grupos de substâncias e verificar o potencial anti-inflamatório;
- ❖ Utilizar técnica de identificação molecular para verificar as substâncias obtidas nos extratos capazes de ultrapassar a barreira hemato-encefálica;
- ❖ Aplicar a metodologia deste trabalho em outras espécies vegetais;

7 LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

7.1 Artigo completo submetido para publicação em periódico:

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; SANTOS, A. G.; LEAL, G. W.; CARVALHO JR, R. N. Black sesame (*Sesamum indicum* L) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. Submetido em 07/08/2013 ao Journal of Supercritical Fluids.

7.2 Trabalho completo publicado em anais de evento:

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; CARVALHO JR, R. N. PRODUCTION OF BLACK SESAME (*Sesamum indicum* L) SEEDS EXTRACT BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION: ISOTHERMS OF GLOBAL YIELD AND DETERMINATION OF TOTAL FATTY ACIDS. **III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids – PROSCI-BA**. 2013.

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; LEAL, G. W.; CARVALHO JR, R. N. Extrato de Sementes de Gergelim-Preto (*Sesamum indicum* L) via extração supercrítica: Isotermas de Rendimento Global e Composição de Ácidos Graxos. **13º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia – 13º EPQA**. 2013. (Premiado com o Primeiro Lugar em apresentação em forma de painel).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNATI, L. F.; ZOLI, M.; KUROSAWA, M.; BENFENATI, F.; BIAGINI, G.; ZINI, I.; HALLSTROM, A.; UNGERSTEDT, U.; TOFFANO, G.; FUXE, K. A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. **Ital J Neurol Sci.** Vol 12. 1991. p 49-53.

ASABE STANDARDS. Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. ANSI/ASAE S319.3 FEB03. 2006. Pág 602-605.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). in: P. Cunniff (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th ed. Third revision, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 1997.

American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists's Society. 5 th ed., AOCS, Champaign, USA, 2004.

BRUNNER, G. **Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes.** 1 st ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994.

BRUNNER, G. **Supercritical Fluids as Solvents and Reaction Media.** Elsevier, 2004.

CABRAL, F. A. **Uso de equações de estado cúbicas para estimativas de solubilidade de óleos essenciais e de seus componentes em dióxido de carbono.** Campinas, 1993. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Alimentos.

CARVALHO Jr., R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo.** Campinas, 2004, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 166 p.

CARVALHO Jr, R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T.V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**. 35. 2005. p 197-204.

CARVALHO Jr. R. N., MOURA, L. S., LEAL, M. C. F., MEIRELES, M. A. A., **TermoDI**, 2004.

ÇENGEL, Y. A.; BOLES, M. A. **Thermodynamics: an engineering approach**. McGraw-Hill Higher Education. 2006.

CHOI, S.; KIM, K. W.; CHOI, J. S.; HAN, S. T.; PARK, Y. I.; LEE, S. K.; KIM, J. S.; CHUNG, M. H. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. **Planta Med**. 68. 2002. p. 330-335.

CORSO, M. P.; KLEN, M. R. F.; SILVA, E. A.; CARDOSO FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**. Vol 52. 2010. p. 56–61.

COSTA, V. P.; BRAGA, M. E. M.; GUERRA, J. P.; DUARTE, A. R. C.; DUARTE, C. M. M.; LEITE, E. O. B.; GIL, M. H.; SOUSA, H. C. de. Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. **Journal of Supercritical fluids**. Vol. 52, 2010. p. 306 – 316.

Encyclopædia Britannica, 2012. Disponível em:

<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/536043/sesame>.

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical Models for Supercritical Extraction of Olive Husk Oil. **Journal of Supercritical Fluids**. Vol 16, N 1. 1999. p. 43-58.

FIGUEIREDO, A. S.; MODESTO FILHO, J. Efeito do uso da farinha desengordurada do *Sesamum indicum* L nos níveis glicêmicos em diabéticas tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol 18. p. 77-83.

FRANCO, E. C.; CARDOSO, M. M.; GOUVEIA, A.; PEREIRA, A.; GOMES-LEAL, W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neurosci Res**. 73. 2012. P. 122-132.

GOODSHIP, V.; OGUR, E. O. Polymer processing with supercritical fluids. **Rapra Review Reports**. Vol. 15, Num 8. 2004.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**. N 26. 1993. p. 401 – 407.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑES, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**. 1217. 2010. p. 2495-2511.

HU, Q.; XU, J.; CHEN, S.; YANG, F. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol 52. 2004. p. 943-947.

JAMARKATTEL-PANDIT, N.; PANDIT, N. R.; KIM, M.; PARK, S. H.; KIM, K. S.; CHOI, H.; KIM, H.; BU, Y. Neuroprotective Effect of Defatted Sesame Seeds Extract against in vitro and in vivo Ischemic Neuronal Damage. **Planta Med**. 76. 2010. p. 20-26.

KAISER, Jocelyn. Supercritical solvent comes into its own. **Science**. Vol 274. 1996.

KANG, M.; NAITO, M.; TSUJIHARA, N.; OSAWA, T.; Sesamol Inhibits Lipid Peroxidation in Rat Liver and Kidney. **Journal of Nutrition**. 1998. p. 1017-1022.

KELLEY, N.; HUBBARD, N; ERICKSON, K. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. **Journal of Nutritional**. 137, 2007. p. 2599–2607.

KIRAN, Kotade.; ASAD, Mohammed. Wound healing activity of Sesamum indicum L seed and oil in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. Vol 46, 2008. p. 777-782.

KIM, M.; JEONG, M. K.; CHANG, P.; LEE, J. Radical scavenging activity and apoptotic effects in HT-29 human colon cancer cells of black sesame seed extract. **International Journal of Food Science and Technology**. Vol 44, 2009. p. 2106-2112.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; CZARNECKI, S. K.; WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J. Conjugated Linoleic Acid Isomer Effects in Atherosclerosis: Growth and Regression of Lesions. **Lipids**. 39, 2004. p. 611-616.

LEE, S. Y.; HA, T. Y.; SON, D. J.; KIM, S. R.; HONG, J. T. Effect of sesaminol glucosides on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. **Neuroscience Research**. 52. 2005. p. 330–341.

LLOYD-JONES, D., ADAMS, R., CARNETHON, M., DE SIMONE, G., FERGUSON, T.B., FLEGAL, K., FORD, E., FURIE, K., GO, A., GREENLUND, K., et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2009). Heart disease and stroke statistics—2009 update: **a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee**. *Circulation* 119, 480–486.

LOBO, A.; QUINTANILLA, M. A. The search of new biomarkers to identify Alzheimer's disease. **Acta Psychiatrica Scandinavica**. 124. 2011. p. 163-164.

LUQUE DE CASTRO, M. D. et al. **Analytical Supercritical Fluid Extraction**. Heidelberg: Springer, 1994. 321 p.

MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. **Química: um curso universitário**. São Paulo: Blucher, 1995.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent Model to Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial and Engineering Chemical Research**. N 42. 2003. p. 1057-1063.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: Desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. Campinas, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2005

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

MEI, S.; NI, H.; MANLEY, S.; BOCKUS, A.; KASSEL, K. M.; LUYENDYK, J. P.; COPPLE, B. L.; DING, W. Ding. Differential Roles of Unsaturated and Saturated Fatty Acids on Autophagy and Apoptosis in Hepatocytes. **The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol 339. 2011. p. 487-498.

MEIRELES, M. A. A. **Tecnologia supercrítica aplicada ao processamento de produtos naturais em leito fixo**. Campinas. Monografia – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 1999.

MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. **Lipids**. 45. 2010. p. 893-905.

MORAN, M. J.; SHAPIRO, H. N. **Fundamentals of Engineering Thermodynamics**. 5 th ed. John Wiley & Sons: Inglaterra. 2006.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. Neuron, 2010 Jul 29;67(2):181-98. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.002. Review. **Erratum in: Neuron**. 2010 Oct 6;68(1):161.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. CRC Press LLC: EUA. 2000.

PANZELLA, L.; EIDENBERGER, T.; NAPOLITANO, A.; d'ISCHIA, M.; Black Sesame Pigment: DPPH Assay-Ghided Purification, Antioxidant/Antinitrosant Properties, and Identification of a Degradative Structural Marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60. 2012. p. 8895-8901.

PERRY, R. H. e GREEN D.W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 8^a ed. McGraw-Hill, 2008.

RODRIGUES, V. M.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O. M. Determination of the Solubility of Clove Essential Oil in ScCO₂: an standardization of the dynamic method. **Proceedings of the 5th International Symposium on Supercritical Fluids**. 2000.

RODRIGUES, A.M.C; DARNET, S.H; SILVA, L.H. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**. Vol 21, 2010. p. 2000-2004.

RODRIGUES, V. M., ROSA, P. T. V., MARQUES, M. O. M., PETENATE, A. J., MEIRELES, M. A. M. Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisium* L) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data. **J. Agric. Food Chem.** Vol 51. 2003.

SANTOS, A. G.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I. R.; LIMA, R. R.; PEREIRA, A.; MOURA, L. S.; CARVALHO, R. N.; LAMEIRA, O.; LEAL, W. G. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012.

SANTOS, J. L. **Projeto de uma unidade de extração supercrítica empregando simulador de processos**. Dissertação. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal do Pará. 2007.

SHAHIDI, F.; LIYANA-PATHIRANA, C. M.; WALL, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. **Food Chemistry**. Vol 99, 2006. p. 478-483.

SHYU, Y. e Hwang, L. S. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma Black sesame meal. **Food Research International**. 35, 2002. p. 357-365.

SILVA, E. R. da; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; ARRIEL, N. H. C.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, S. M. R.; Capacidade antioxidante e composição química de grãos integrais de gergelim creme e preto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Vol 46 N 7, 2011. p. 736-742.

SMITH, J. M., VAN NESS, H. C., ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOLOMONS, T, W, G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. Vol 1. 8ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SOVOVÁ, H. Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO₂: I. Modeling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**. Vol 3, N 49. 1994. p. 409 - 414.

SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. **Journal of Supercritical Fluids**. 66. 2012. p. 73 – 79.

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of Desorption at Supercritical Conditions. **American Institute of Chemical Engineers Journal**. Vol 6, N 35. 1989. p. 1029 – 1031.

TANSLEY, G.; HOLMES, D. T.; LÜTJOHANN, D.; HEAD, E.; WELLINGTON, C. L. Sterol lipid metabolism in Down Syndrome Revisited: Down Syndrome Is Associated

with a Selective Reduction in serum brassicasterol Levels. **Current Gerontology and Geriatrics Research**. 2012.

TORIBIO, L.; ALONSO, C.; NOZAL, M. J. del; BERNAL, J. L.; JIMÉNEZ, J. L. Enantiomeric separation of chiral sulfoxides by supercritical fluid chromatography. **Journal of Separation Science**. Vol 29. 2006. p. 1363-1372.

ÜNAL, M. K.; YALÇIN, H. Proximate composition of Turkish sesame seeds and characterization of their oils. **Grasas y Aceites**. Vol 59. 2008. p. 23-26.

VANMIERLO, T.; POPP, J.; KÖLSCH, H.; FRIEDRICH, S.; JESSEN, F.; STOFFEL-WAGNER, B.; BERTSCH, T.; HARTMANN, T.; MAIER, W.; VON BERGMANN, K.; STEINBUSCH, H.; MULDER, M.; LÜTJOHANN, D. The plant sterol brassicasterol as additional CSF biomarker in Alzheimer's disease. **Acta Psychiatrica Scandinavica**. 124. 2011. p. 184-192.

WEINGÄRTNER, O.; BÖHM, M.; LAUSFS, U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. **European Heart Journal**. 30. 2009. p. 404–409.

WICHITSRANOI, J.; WEERAPREEYAKUL, N.; BOONSIRI, P.; SETTASATIAN, C.; SETTASATIAN, N.; KOMANASIN, N.; SIRIJAICHINGKUL, S.; TEERAJETGUL, Y.; RANGKADILOK, N.; LEELAYUWAT, N. Antihypertensive and antioxidant effects of dietary black sesame meal in pre-hypertensive humans. **Nutrition Journal**. 2011.

YOSHIDA, H.; TANAKA, M.; TOMIYAMA, Y.; MIZUSHINA, Y. Antioxidant Distributions and Triacylglycerol Molecular Species of Sesame Seeds (*Sesamum indicum*), **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 84. 2007. p. 165–172.