



Programa de Pós-Graduação em Engenharia
de Recursos Naturais da Amazônia

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA POLPA DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA: Isotermas de Rendimento Global, Atividade Alelopática dos Extratos, Enriquecimento de Antocianinas e Compostos Fenólicos

Camila de Cássia Rodrigues Batista

Proposta de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia, ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Recursos Naturais.

Orientador (es): Dr. Ing. Nélio Teixeira Machado
Dr. Raul Nunes de Carvalho Júnior

Belém/2016

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA POLPA DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA: Isotermas de Rendimento Global, Atividade Alelopática dos Extratos, Enriquecimento de Antocianinas e Compostos Fenólicos

OUTUBRO/2016

Camila de Cássia Rodrigues Batista

PROPOSTA DE TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA (PRODERNA/ITEC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS.

Aprovada por:

Prof^o. Nélio Teixeira Machado, Dr.Ing.
(FEQ/UFPA-Orientador)

Prof^o. Raul Nunes de Carvalho Júnior, Dr. Eng.
(FEA/ UFPA – Orientador)

Prof^o. Emanuel Negrão Macedo, Dr.
(PRODERNA/UFPA-Membro Interno)

Prof.^a. Maria Angela de Almeida Meireles., Dra.
(FEA/ UNICAMP –Membro Externo)

Prof.^a Marilena Emmi Araújo, Dra.
(FEQ/UFPA– Membro Externo)

Prof.^a Alessandra Lopes Santos, Dra.
(FEA/UFPA– Membro Externo)

BELÉM, PA - BRASIL

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Batista, Camila de Cássia Rodrigues

Obtenção de extratos da polpa de açaí (Euterpe oleracea) por extração supercrítica: isothermas de rendimento global, atividade alelopática dos extratos, enriquecimento de antocianinas e compostos fenólicos/ Camila de Cássia Rodrigues Batista.- 2016.

Orientador: Nélcio Teixeira Machado;

Coorientador: Raul Nunes de Carvalho

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia, Belém, 2016

1. Biotecnologia 2. Compostos bioativos 3. Extração com fluido supercrítico 4. Açaí I. Título

CDD 22.ed.660.6

Dedico este trabalho:

Aos meus filhos, Júlia Maria e Murilo, que são a razão do minha alegria e dos meus esforços para continuar...

Aos meus pais e irmãos, Nonato (meu pai), Dilce e Maria de Nazaré (minhas mães), Victor, Breno e Bruno (meu irmãos), por todo apoio e incentivo, que sempre me impulsionam em direção a vitória.

Ao meu marido Maurício Rodrigues por sempre estar ao meu lado com todo seu amor, companheirismo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por constantemente estar presente em minha vida, mostrando que as dificuldades do caminho só servem para nos fortalecer.

Aos meus filhos, Júlia Maria e Murilo, porque além de me fazerem uma pessoa melhor e feliz, tiveram que ficar algumas vezes sem a minha presença e atenção durante momentos dedicados a esse trabalho.

Ao meu marido, Mauricio Rodrigues, por todo seu incentivo e apoio nas minhas idas e vindas entre Abaetetuba e Belém.

Aos meus pais, irmãos, a toda minha família, pela torcida, apoio e incentivos em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Nélio Teixeira Machado, pelas valiosas orientações, atenção, e disponibilidade de sempre me ajudar desde a graduação até esse momento. Quem conhece sabe que tem um coração imenso, e só tenho a agradecer por mim e por todos por tudo o que faz pensando em nos ajudar.

Ao Prof. Raul Nunes de Carvalho Júnior, pela valiosa orientação, contribuição, incentivo, por te me acolhido em seu laboratório e me ensinando muitas coisas. Por tudo o que fez por mim e por este trabalho, sou eternamente grata.

Ao grupo LABEX, pelo ambiente agradável de trabalho e pelas trocas de aprendizado, em especial, Rafael Botelho, Mozaniel, Rafael Oliveira, Rafael Holanda e Ana Paula Martins, que realizam parte dos experimentos, transmitindo cada um o seu conhecimento.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Belém/PA pelos experimentos de atividade alelopática dos extratos.

Aos Laboratórios (LAFAMI, LAQUANAM e CVACBA) que contribuíram com análises para compor este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.

As amigas, Elinéia e Marcilene, pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

À FAPESPA, pela bolsa de doutorado concedida.

A todas demais pessoas, que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Resumo da proposta de Tese apresentada ao PRODERNA/UFPA como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Recursos Naturais (Dra.Eng.)

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA POLPA DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA: Isotermas de Rendimento Global, Atividade Alelopática dos Extratos, Enriquecimento de Antocianinas e Compostos Fenólicos

Camila de Cássia Rodrigues Batista

Outubro/2016

Orientadores: Prof. Dr. Ing. Nélio Teixeira Machado

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Júnior

Área de Concentração: Uso e Transformação de Recursos Naturais

O açaí (*Euterpe oleracea*) é um dos alimentos funcionais mais populares da Amazônia, amplamente consumido pelo Brasil e tornou-se conhecido em outros países, em especial, devido aos muitos benefícios que possui para uma vasta utilização no crescente mercado de nutracêuticos. Extratos derivados do açaí apresentam uma série de componentes com propriedades antioxidantes, vasodilatadoras, anti-inflamatórias e energéticas. Dentre as tecnologias apropriadas nos processos de extração, a tecnologia supercrítica tem se tornado vantajosa em obter extratos com maior qualidade, agregando valores aos produtos e subprodutos do processo. Diante disto, este trabalho apresenta como objetivo um estudo do processo de extração supercrítica da polpa de açaí para obtenção de extratos ricos em compostos bioativos. Uma avaliação das variáveis do processo de extração supercrítica com CO₂ (temperatura, pressão e densidade de solvente) da polpa do açaí mostrou as condições que maximizam a quantidade de extratos (fração lipídica) obtidos, assim como possibilitam a concentração de

antocianinas na polpa de açaí desengordurada para posterior extração supercrítica destes compostos. Os extratos obtidos da extração com CO₂ foram avaliados quanto a composição em ácidos graxos e atividade alelopática. As isoterms de rendimento global mostraram que a quantidade máxima de extrato obtida no processo foi na condição de 70°C/490 bar seguido da condição de 50°C/350 bar.

Palavra chave: extração supercrítica, rendimento global, atividade alelopática, *Euterpe oleracea*.

Abstract presented to PRODERNA/UFPA as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Natural Resources Engineering (D.Eng.)

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA POLPA DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA: Isotermas de Rendimento Global, Atividade Alelopática dos Extratos, Enriquecimento de Antocianinas e Compostos Fenólicos

Camila de Cássia Rodrigues Batista

Outubro/2016

Mentors: Prof. Dr. Ing. Nélio Teixeira Machado

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Júnior

Research Area: Use and Transformation of Natural Resources

ABSTRACT

Açaí is one of the most popular functional foods of the Amazon, widely consumed in Brazil and became known in other countries, especially due to the many benefits it has for a wide use in the growing market for nutraceuticals. Açaí extracts derived have a number of components with antioxidant, vasodilatory, anti-inflammatory and energy. Among the appropriate technologies in the processes, supercritical technology has become advantageous to obtain extracts with higher quality, adding value to products and by-products of the process. This work presents as objective a study of the supercritical extraction process of acai pulp to obtain extracts rich in bioactive compounds. A evaluation of the variables of the supercritical extraction process with CO₂ (temperature, pressure, and solvent density) of Açaí pulp showed the conditions that maximize the amount extracts (lipid fraction) obtained, and enable the concentration anthocyanins in açaí pulp defatted for subsequent extraction of these

compounds. The extracts obtained from extraction with CO₂ were evaluated for fatty acid composition and allelopathic activities. The overall yield isotherms showed that the maximum amount of extract obtained in the process was in the condition of 70°C/490 bar followed by the condition of 50°C/350 bar.

Keyword: supercritical extraction, global yield, allelopathic activities, *Euterpe oleracea*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos do açaí. Foto: Adrielson Furtado, 2009..	23
Figura 2. Estrutura química das antocianinas.	29
Figura 3. Diagrama de fases de fases de um componente puro.	32
Figura 4. Isotermas de rendimento global de extratos do alecrim com CO ₂ supercrítico	38
Figura 5. Curva típica de extração.	39
Figura 6. Fluxograma de atividades realizadas	45
Figura 7. Amolecimento da polpa e despoldadeira de açaí utilizada	47
Figura 8. Liofilizador utilizado e polpa liofilizada obtida.	48
Figura 9. Fluxograma esquemático da obtenção de extratos da polpa de açaí.	54
Figura 10. Fluxograma esquemático da unidade de extração <i>Spe-ed</i> .	57
Figura 11. Fluxograma esquemático da unidade de <i>Spde-ed</i> equipada com bomba de cossolvente.	58
Figura 12. Distribuição de tamanho de partículas da polpa de açaí liofilizada	67
Figura 13. Isotermas de rendimento global.	68
Figura 14. Pressão versus rendimento para isotermas.	69
Figura 15. Variação na porcentagem de ácido oleico, ácido palmítico e ácido palmítoleico com aumento da densidade de CO ₂ para temperatura de 50°C	73
Figura 16. Variação na porcentagem de ácido oleico, ácido palmítico e ácido palmítoleico com aumento da densidade de CO ₂ para temperatura de 60°C.	73
Figura 17. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre a germinação de sementes de <i>Mimosa pudica</i> (malícia).	75
Figura 18. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre a germinação de sementes de <i>Senna obtusifolia</i> (mata-pasto).	76
Figura 19. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre o alongamento da radícula de <i>S. obtusifolia</i> (■) e <i>M. pudica</i> (■).	77
Figura 20. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre o alongamento do hipocótilo de <i>S. obtusifolia</i> (■) e <i>M. pudica</i> (■).	78
Figura 21. Concentração de compostos fenólicos na polpa de açaí liofilizada e nas polpas após extração com CO ₂ supercrítico.	79

Figura 22. Teor de antocianinas na polpa de açaí liofilizada (PAL) e nas polpas após extração com CO ₂ .	80
Figura 23. Análise de MEV que mostra a morfologia da polpa de açaí desengordurada. (B): Ampliação de (A)	82
Figura 24. Análise de MEV que mostra a morfologia da polpa de açaí desengordurada. (C): Ampliação de (B), (D): Ampliação de (C)	83
Figura 25. Análise de MEV que mostra a morfologia da polpa de açaí desengordurada. (E): Ampliação de (D), (F): Ampliação de (E)	84
Figura 26. Imagem projetada pelo MEV e a análise gráfica realizada pelo EDS da polpa de açaí desengordurada	85
Figura 27. Curva global de extração obtida para cinética à 220 bar e 50°C em função do tempo.	88
Figura 28. Curva global de extração obtida para cinética à 350 bar e 50°C em função do tempo.	88
Figura 29. Modelagem da cinética de extração da fração lipídica do açaí a 220 bar. ...	91
Figura 30. Modelagem da cinética de extração da fração lipídica do açaí a 350 bar. ...	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da polpa de açaí liofilizada e polpa de açaí comercial	25
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica publicados na literatura.....	26
Tabela 3. Condições críticas para vários solventes	33
Tabela 4. Valores característicos do gás, líquido e fluido supercrítico..	34
Tabela 5. Parâmetros operacionais usados no ICP OES.....	53
Tabela 6. Caracterização física dos frutos de açaí.....	64
Tabela 7. Composição, teor de umidade, compostos fenólicos e antocianinas totais na polpa de açaí liofilizada.....	65
Tabela 8. Determinação de metais na polpa de açaí liofilizada.....	66
Tabela 9. Parâmetros característicos do processo de extração com fluido supercrítico da polpa de açaí liofilizada.....	67
Tabela 10. Composição em ácidos graxos.....	71
Tabela 11. Parâmetros cinéticos dos extratos obtidos ao spline de três retas.....	89
Tabela 12. Parâmetros dos modelos de transferência de massa	90
Tabela 13. Parâmetros estatísticos para o modelo Tan e Liou (1989).....	90
Tabela 14. Parâmetros estatísticos para o modelo Goto et al. (1993).....	90
Tabela 15. Parâmetros estatísticos para o modelo Martínez et al. (2003).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico

CCC- Cromatografia contracorrente

CER – Constant Extraction Rate (Taxa Constante de Extração)

DC - *Diffusion Controlled* (Taxa de difusão controlada)

DHA – Ácido docosahexaenóico

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

EFSC - Extração com Fluidos Supercríticos

EPA – Ácido eicosapentaenoico

FER - *Falling Extraction Rate* (Taxa decrescente de extração)

GRAS - *Generally Recognized As Safe* (geralmente reconhecido como seguro)

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

LLE- Extração líquido-líquido

MPLC- Cromatografia de média pressão

OEC - *Overall Extraction Curves* (Curva Global de Extração)

SPE – Extração na fase sólida

X_o – Rendimento Global de Extração

LISTA DE SÍMBOLOS

- A - Parâmetro pertencente ao modelo de Goto *et al.* (1993);
- a1 - Parâmetro pertencente ao modelo de Goto *et al.* (1993)
- a2 - Parâmetro pertencente ao modelo de Goto *et al.* (1993)
- b_i - Parâmetro ajustável ao modelo de Martínez *et al.* (2002);
- C - Parâmetro pertencente ao modelo de Goto *et al.* (1993)
- C_i - Razão mássica de soluto nos poros da folha (-)
- C_s - Razão mássica de soluto na folha (-)
- H - Altura do leito de extração (L)
- h - Coordenada axial (L)
- K_d - Coeficiente de dessorção (T-1), parâmetro ajustável ao modelo de Tan e Liou (1989)
- K_f - Coeficiente volumétrico de transferência de massa (L-3);
- t - Tempo (T);
- t_{mi} - Parâmetro ajustável do modelo de Martínez *et al.* (2003)
- ε - Porosidade do leito de partículas
- ρ - densidade (Kg/m³)
- ρ_a - Densidade aparente (Kg/m³)
- ρ_r - Densidade real (Kg/m³)
- Pc - Pressão crítica
- Tc- Temperatura crítica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
MOTIVAÇÃO E OBJETIVO	19
SÍNTESE DO TRABALHO.....	21
CAPÍTULO 1- REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1.1 O AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i>)	22
1.1.2 Aspectos gerais.....	22
1.1.2 Composição química.....	24
1.2 ESTUDOS NA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DO AÇAÍ	27
1.3 ANTOCIANINAS	28
1.4 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRTICOS.....	31
1.4.1 Fluidos supercríticos.....	31
1.4.2 O processo e parâmetros da extração.....	35
1.5 ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL.....	37
1.6 CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO	38
1.7 MODELAGEM MATEMÁTICA	39
1.7.1 Modelo Tan e Liou (1989)	40
1.7.2 Modelo Goto et al. (1993).....	41
1.7.3 Modelo Martínez et al. (2003).....	43
CAPÍTULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1 MATÉRIA PRIMA.....	46
2.2 CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA PRIMA.....	46

2.2.1	Biometria dos frutos	46
2.2.2	Despolpamento	46
2.2.3	Liofilização	47
2.3	CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE AÇAÍ LIOFILIZADA	48
2.3.1	Determinação da granulometria	48
2.3.2	Determinação da umidade, densidade real das partículas, densidade aparente do leito e porosidade do leito	49
2.3.3	Análise da composição centesimal	50
2.3.4	Determinação da concentração de compostos fenólicos totais	51
2.3.5	Determinação de teor antocianinas totais	52
2.3.6	Determinação de metais	52
2.4	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	54
2.4.1	Extração supercrítica com CO₂	55
2.4.2	Extração supercrítica com CO₂ e cossolvente	57
2.5	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO	58
2.6	COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM CO₂	59
2.7	ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO COM CO₂	59
2.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E TEOR DE ANTOCIANINAS NA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA	60
2.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA	60
2.10	DETERMINAÇÃO DAS CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO	61

2.10.1 Cálculo de parâmetros cinéticos.....	61
2.11 MODELAGEM MATEMÁTICA	62
CAPÍTULO 3 –RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
3.1.1 Biometria dos frutos	64
3.4.2 Composição centesimal, o teor de umidade, compostos fenólicos e antocianinas totais.....	64
3.4.3 Determinação de metais.....	65
3.4.4 Diâmetro médio das partículas, Densidade real, Densidade aparente e Porosidade do leito.....	66
3.5 ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL.....	68
3.6 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO COM CO ₂	70
3.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS	74
3.9 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS TOTAIS NA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA	79
3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA.....	81
3.11 AVALIAÇÃO DE ETANOL, ÁGUA E ETANOL/ÁGUA COMO COSSOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRTICA COM CO ₂ PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA.....	85
3.12 CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO E PARAMÊTROS CINÉTICOS	87
3.13 MODELAGEM MATEMÁTICA	89
CAPITULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	93
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	103
APÊNDICE	104
ANEXOS	111

INTRODUÇÃO

MOTIVAÇÃO E OBJETIVO

O desenvolvimento de tecnologias de separação com potencial aplicação no processamento para obtenção de produtos naturais, e com propriedades funcionais e nutracêuticos têm crescido consideravelmente em razão da necessidade e procura do consumo de produtos benéficos á saúde humana, bem como a crescente restrição a utilização de substâncias sintéticas na indústria de alimentos e farmacêutica.

Os extratos naturais desempenham um importante papel para diversos fins industriais, devido às suas aplicações múltiplas, facilidade de aplicação, e características aos produtos finais. A maioria dos extratos naturais possuem mais do que uma ou duas funções podendo ser utilizados como corantes naturais, nutracêuticos, alimentos funcionais, agentes conservantes, aromatizadores e fragrâncias, medicamentos, suplementos vitamínicos, padrões químicos, perfumes, entre outros (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Entre os diversos métodos de obtenção de produtos naturais, o processo de extração com fluido supercrítico vem se tornando uma tecnologia apropriada e de grande interesse, pois proporciona a obtenção de produtos isentos de solventes residuais, possuindo os produtos obtidos qualidade superiores, quando comparadas aos produtos obtidos por técnicas convencionais. Além disso, o processo oferece várias vantagens adicionais tais como: possibilidade de processamento a temperaturas baixas e ou moderadas, temperatura e pressão crítica moderadas, alta seletividade quanto aos compostos indesejados, além de preservar as propriedades organolépticas do material.

A extração com fluido supercrítico é um processo baseado na solubilidade dos componentes no fluido supercrítico. A capacidade de separação soluto-solvente através da variação do poder de solvatação com as condições de estado (temperatura e pressão) tornam a tecnologia de fluidos supercrítica voltada para a aplicação nas duas últimas décadas (BRUNNER, 2005).

A disponibilidade de quantidades expressivas de matérias-primas em regiões próximas ao fabrico local contribui para o desenvolvimento de processos de fluido supercrítico e melhora a viabilidade econômica para aplicações industriais. Este ponto

fundamental está satisfeito em várias regiões do Brasil. O país possui um dos maiores biodiversidades do mundo, o que permite a produção de baixo custo de matérias-primas (ZABOT, 2013).

Dentre as várias espécies brasileiras, o açaí (*Euterpe oleracea*), fruto típico da região amazônica, é encontrado espontaneamente nos estados do Pará, Amapá, Amazonas e Maranhão, e possui diversas propriedades que conferem vários benefícios potenciais a saúde, principalmente devido à sua alta concentração de polifenóis e altas concentrações de antocianinas, além da presença de quantidades expressivas de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados no óleo de sua polpa. (NOGUEIRA et al., 1995; BICHARA & ROGEZ, 2011; NASCIMENTO et al., 2008). Estudos recentes mostraram as inúmeras vantagens das substâncias presentes no açaí para a saúde humana, principalmente como agente antioxidante que age na inibição dos radicais livres (MERTENS-TALCOTT et al., 2008), efeito anti-inflamatório (XIE et al., 2012; KANG et al., 2012; FAVANCHO, 2010), efeitos antileucêmicos (POZO-INSFRAN et al., 2006) e efeitos de neuroproteção (WONG et al., 2013).

Poucos trabalhos retratam sobre a obtenção de extratos derivados dos frutos de açaí. Apesar de algumas tecnologias se mostrarem um processo tecnicamente viável para obtenção de extratos de alta qualidade, os métodos ainda se restringem ao meio acadêmico. A prensagem dos frutos com condições adaptadas a partir de outras matérias-primas de sementes oleaginosas é o método mais utilizado, com rendimentos inferiores a 50% dos estudos de investigação em escala de laboratório (YAMAGUCHI, 2015).

Diante deste contexto, o trabalho apresenta como objetivo geral:

A obtenção de extratos ricos em compostos bioativos da polpa de açaí, empregando o processo de extração supercrítica com CO₂ para obtenção de frações ricas em ácidos graxos e, conseqüentemente, uma polpa enriquecida de compostos fenólicos e antocianinas.

Os objetivos específicos, que compõem a estrutura da tese são:

- Caracterização físico-química e preparação da matéria-prima;
- Determinação de isotermas de rendimento globais da extração supercrítica com CO₂;
- Determinação da composição em ácidos graxos dos extratos obtidos;

- Determinação da concentração de compostos fenólicos totais e teor de antocianinas totais da polpa após a extração;
- Avaliação da atividade alelopática dos extratos obtidos da extração com CO₂;
- Determinação das curvas cinéticas de extração com CO₂;
- Modelagem matemática das curvas cinéticas obtidas utilizando modelos da literatura
- Avaliação de cossolvente adequado para extração supercrítica combinada com CO₂ das antocianinas da polpa desengordurada.

SÍNTESE DO TRABALHO

O Capítulo 1 apresenta uma revisão da literatura, onde são abordados aspectos gerais da matéria prima e do processo utilizado neste trabalho.

O Capítulo 2 apresenta a metodologia de preparação e processamento dos frutos de açaí para obtenção da polpa e caracterização físico- química, a metodologia de extração supercrítica com CO₂ da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) para obtenção de frações de óleo, e polpa desengordurada enriquecida em compostos fenólicos e antocianinas, a metodologia de análises e atividade alelopática realizadas nas frações e metodologia de análise na polpa de açaí antes e após o processo de extração em termos de determinação de compostos fenólicos e antocianinas totais, a metodologia para obtenção de curvas globais de extração e modelagem matemática, e por fim, a metodologia empregada na avaliação do uso de cossolvente adequado na obtenção de extrato rico em antocianinas.

O Capítulo 3 apresenta os resultados e discussões inerentes ao Capítulo 2.

O Capítulo 4 apresenta as conclusões gerais e sugestões.

Por fim, no Capítulo 5 são apresentadas as referências utilizadas neste trabalho.

CAPÍTULO 1- REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo é abordado a revisão da literatura sobre o açaí e sua composição, uma breve definição sobre ácidos graxos, antocianinas e seus métodos de extração, fluidos supercríticos, o processo de extração supercrítica, isothermas de rendimento global, curvas globais de extração e modelagem matemática.

1.1 O AÇAÍ (*Euterpe oleracea*)

1.1.2 Aspectos gerais

O gênero *Euterpe* possui 49 espécies distribuídas na América do Sul, sendo que 10 dessas espécies ocorrem no Brasil. Das espécies que são encontradas no país, três espécies ocorrem com mais frequência, a *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatória*, a principal diferença entre elas é a forma como as palmeiras crescem e a região onde são encontradas (VILLACHICA, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2002; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

A *Euterpe oleracea* é uma espécie encontrada no estuário do Rio Amazonas, nos estados do Pará, Amapá, Tocantins e Maranhão, e também pode ser encontrada em países próximos da região amazônica como Guina, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela. Maiores áreas ocupadas da espécie encontram-se na Amazônia Oriental brasileira, considerada como seu centro de origem e onde se encontram densas e diversificadas populações (OLIVEIRA *et al.*, 2000). A espécie encontra condições satisfatórias de cultivo nas faixas climáticas com regular distribuição de chuvas e em áreas que, mesmo com período seco definido, disponham de umidade satisfatória no solo, como nas várzeas (MULLER, 2006). As palmeiras atingem mais de 25 metros de comprimento, com troncos de 9 a 16 centímetros de diâmetro. As flores e frutos ocorrem durante todo o ano, mas a maior abundância dos frutos na estação de seca ocorre entre julho e dezembro (SHANLEY, 2005).

A produção anual de cachos frutíferos na palmeira depende da fertilidade e umidade do solo, e da luminosidade. Cada cacho, frequentemente, contém algumas centenas de frutos. O fruto, popularmente conhecido como açaí, é arredondado e pesa cerca de 2 gramas, quando maduros têm coloração roxo-escura, sendo exceção o açaí

do tipo branco, com coloração verde (VASCONCELOS & ALVES, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2000). Os frutos das palmeiras do gênero *Euterpe* raramente são *consumidos in natura*, pois eles têm apenas uma pequena proporção de polpa (ROGEZ, 2000), representa 15% e é aproveitada de forma tradicional, no consumo alimentar, sorvetes e outros produtos derivados. O caroço corresponde a 85% do peso total, do qual a borra é utilizada na produção de cosméticos; as fibras em móveis, placas acústicas, xaxim, compensados, indústria automobilística, entre outros (TINOCO, 2005). A Figura 1 ilustra os frutos do açaí.



Figura 1. Frutos do açaí. Foto: Adrielson Furtado, 2009. Fonte: <http://adrielsonfurtado.blogspot.com.br/2011/05/acai-euterpe-oleracea-mart.html> (Acesso: 19/10/2016).

A partir da maceração dos frutos com adição de água, de forma manual ou mecânica, resultam na polpa de açaí ou suco de açaí, um produto de consistência variável e tom violáceo que abastece o mercado consumidor. O suco de açaí é produto mais consumido e de maior aceitação na região amazônica, apresenta vários benefícios potenciais para a saúde dos consumidores, principalmente devido à sua alta concentração de polifenóis e altas concentrações de antocianinas, principalmente

cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, que são responsáveis pela cor preta-roxa e do elevado poder antioxidante do fruto (BICHARA & ROGEZ, 2011; TEIXEIRA & PESSOA, 2012).

O estado do Pará é o principal produtor de açaí, seguido da Amapá. Nesses locais, o grande volume de frutos que abastece os mercados ainda provém das maiores extensões de açazais localizadas no estuário amazônico. Os plantios racionais ainda são raros, mas nos últimos anos, vêm despertando interesse de agricultores e grupos empresariais, pelas perspectivas altamente promissoras dos mercados internos e externos, tendo em vista o crescimento das exportações para vários estados das Regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, assim como para os Estados Unidos, União Européia e Japão, esse fator vêm impulsionando a melhoria gradual no funcionamento da cadeia produtiva do açaí, a qual inicialmente comercializava produtos *in natura* como polpas, para produtos beneficiados e processados. O surgimento de novas agroindústrias propicia o aumento gradativo do elenco de produtos derivados do açaí (FARIAS NETO *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 1995).

1.1.2 Composição química

Quimicamente, os frutos das espécies *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatória* são caracterizados pela presença de substâncias bioativas. Cerca de 90 substâncias foram descritas, das quais cerca de 31% é composto de flavonóides, em seguida os compostos fenólicos (23%), lignóides (11%) e as antocianinas (9%). Outras classes incluem ácidos graxos, quinonas, terpenos e norisoprenóides (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

Na literatura são apresentados diversos dados da composição centesimal, maior parte destes referem-se ao açaí obtido da espécie *Euterpe oleracea*. Segundo Yuyama *et al.* (2011) as variações nas concentrações de lipídeos, fibra e outros constituintes nutricionais no suco de açaí podem ser decorrentes de vários fatores como, por exemplo, o desenvolvimento de mecanismos de adaptação morfológica e anatômica destas espécies, em função das características ambientais de cada ecossistema.

A composição tanto da porção comestível quanto da polpa comercializada possuem resultados diferenciados, este fato pode ser explicado pelo teor de água utilizada para a extração da polpa, pois o que se denomina polpa de açaí é a água adicionada durante o processamento (CAROLINE, 1999, OLIVEIRA *et al.*, 2000). A Tabela 1 apresenta a composição centesimal da polpa de açaí liofilizada e polpa de açaí

comercial. Reconhecidamente, a polpa do açaí apresenta elevado valor energético por conter alto teor de lipídios, e é rico em carboidratos, fibras, proteínas.

Tabela 1. Composição centesimal da polpa de açaí liofilizada e polpa de açaí comercial

Componentes	Polpa de açaí comercial¹	Polpa de açaí liofilizada²
Umidade	89,18	4,92
Proteínas	0,17	8,13
Lipídios	4,61	40,75
Carboidratos	5,63	42,23
Cinzas	0,41	3,68

¹ Menezes *et al.* (2008) ² Nascimento *et al.* (2008)

Em dados reportados por Muller (2006), em relação as proteínas, o teor encontrado no açaí pode ser até 15% em base a matéria seca, possuindo teor superior ao do leite (3,5%) e do ovo (12, 49%), enquanto o perfil de aminoácidos é semelhante ao do ovo .

No que se refere ao teor de ferro, a polpa do açaí apresenta baixos teores com concentrações variando de 289,8 a 1093.5 $\mu\text{g} \%$, demonstrando que o açaí como fonte de ferro é pouco expressivo (YUYAMA *et al.*, 2002). O açaí também contém quantidades importantes de fitosteróis e fibras alimentares. Dentre os fitosteróis presentes na sua composição química, destacam-se o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (SCHAUSS *et al.*, 2006). Além disso, o açaí possui quantidades elevadas (45 mg/100 g em relação a matéria seca) de vitamina E, na forma de α -tocoferol (ROGEZ, 2000).

Segundo Rogez (2000), o açaí é um alimento com alto percentual de lipídeos, os quais representam em média 52,64% em relação a matéria seca. O perfil de ácidos graxos dos lipídeos do açaí é composto por 59,8% de ácidos graxos monoinsaturados, 27,5% de saturados e 12,6% de poli-insaturados, sendo este um perfil interessante do ponto de vista nutricional.

A tabela 2 apresenta o perfil de ácidos graxos da fração lipídica da polpa de açaí encontrados em diferentes trabalhos publicados na literatura.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica publicados na literatura.

Ácidos Graxos	Nascimento et al. (2008)		Monteiro (2011)
	Extração enzimática	Extração com n-hexano	Extração com CO ₂ supercrítico (50°C/330 bar)
C12:0	0,04	0,07	*
C14:0	0,11	0,13	*
C16:0	25,93	26,18	22,14
C16:1	4,88	4,88	3,64
C18:0	1,86	1,81	1,71
C18:1(trans)	*	*	*
C18:1(cis 9)	52,54	52	58,20
C18:1 (cis 11)	3,39	3,45	*
C18:2	9,72	7,28	10,74
C18:3	0,64	0,55	0,91
C20:0	0,12	0,11	0,66
Total			
Ácidos saturados	28,06	28,3	24,51
Ácidos insaturados	71	68,16	73,49

O consumo da polpa de açaí, rica em lipídeos essenciais e de boa qualidade nutricional, e em certos minerais como cálcio e o potássio podem contribuir para garantir o crescimento do corpo humano em geral, uma vez que esses nutrientes participam de várias reações metabólicas importantes para o organismo (MENEZES *et al.*, 2008).

O fruto do açaí contém quantidades significativas de antocianinas, o que atribui propriedades antioxidantes a esse fruto (BERNAUD *et al.*, 2011). Na literatura, as quantidades de antocianinas encontradas no açaí são muito variáveis, em função da variância intrínseca entre as amostras, dos métodos de extração das análises empregadas, e da espécie em questão.

Amostras de açaí frescas e despulpadas momentos antes da análise apresentam teores de 192,7 mg/ 100g (ROGEZ, 2000). Na polpa de açaí liofilizada de diferentes progênes existem variações significativas no teor de antocianinas totais de 75mg/100g a 228 mg/ 100g (COHEN *et al.* 2006). Em duas espécies de açaí *in natura*, a *Euterpe edulis* e a *Euterpe oleracea*, o açaí da primeira espécie apresenta maiores teores de antocianinas do que a segunda espécie, em termos de mg/g de matéria seca, resultando em 353% a mais (SHLTZS, 2008), tais trabalhos comprovam o alto valor desses pigmentos no fruto ou polpa de açaí.

A quantidade de antocianinas na polpa de açaí é tão elevada que amostras liofilizadas foram usadas para obter padrões isolados de cianidina-3-O-glicósido e cyanidin-3-O-rutinosídeo (GOUVÊA *et al.*, 2012), as duas são encontradas com predominância na polpa. Além dessas majoritárias, também podem ser encontradas as antocianinas perlaconidina-3-glucosídeo, ciandina-3-sambiosídeo, peonidina-3-glucosídeo, peonidina-3-rutinosídeo. Além disso, grandes quantidades de compostos fenólicos como ácidos fenólicos flavanóis e flavonóis estão presentes. Esses componentes agem como cofatores no incremento da ação biológica das antocianinas (PORTINHO *et al.*.2012).

1.2 ESTUDOS NA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DO AÇAÍ

Na literatura estão publicados diversos estudos relacionados com a obtenção de óleo e de antocianinas do fruto ou polpa de açaí por diferentes métodos de extração.

Em trabalho publicado por Nascimento *et al.*(2008) foi quantificado a composição de ácidos graxos do óleo de açaí obtido por extração enzimática e extração tradicional utilizando hexano como solvente. Ambos os métodos apresentaram elevado teor de ácidos graxos insaturados, 68 a 71% no óleo de açaí, mostrando que a extração enzimática não difere de forma significativa dos resultados obtidos para o óleo extraído com solvente.

CONSTANT (2003) realizou extrações da antocianina do fruto fresco efetuados com etanol acidificado a pH 2 em diferentes teores alcoólicos. A extração com etanol 70% apresentou-se ligeiramente superior, mas não estatisticamente diferente para extração com etanol a 90%, assim como tendo a necessidade de ser concentrar os extratos em evaporador a vácuo, a utilização do etanol 90% é recomendado devido a

facilidade de concentração. Além disso, observou-se que solventes com maiores teores de água apresentaram menor poder extrator e dependendo do solvente empregado na extração, é possível alterar tanto o perfil de antocianinas, quanto a estabilidade do extrato antociânico final.

NOVELO (2011) quantificou o teor de antocianinas dos frutos de açaí obtidas pela extração com diferentes solventes extratores, como álcool etílico 95%, álcool etílico 80%, álcool etílico 70%, álcool etílico 60% e água destilada, com a utilização de ácido cítrico 0,3% como agente acidulante. Estudos comprovaram que o emprego do etanol 80% e etanol 95% como solvente resultaram em maiores concentrações do composto. Embora, os resultados tenham sido semelhantes a extração utilizando etanol 80% foi considerado o solvente de preferência em seu estudo devido a solução ser mais aquosa, portanto mais econômica, além de ter apresentado desvio padrão menor que os resultados utilizando o etanol 95%..

No Brasil, poucos trabalhos retratam sobre a extração envolvendo fluidos supercríticos para obtenção de extratos do açaí. Apesar da tecnologia se mostrar um processo tecnicamente viável para obtenção de extratos de alta qualidade, o método ainda se restringe ao meio acadêmico.

1.3 ANTOCIANINAS

As antocianinas são pigmentos pertencentes ao grupo dos flavonóides, que é o grupo mais importante de compostos hidrossolúveis, responsáveis pelas cores que vão desde o espectro com tonalidades claras, rosa, vermelho, incluindo tonalidades escuras, roxa, azul e preta. Estes compostos são abundantes na natureza, se encontram em vegetais (flores, frutos, sementes, folhas, etc), apresentam uma importante alternativa para a substituição gradativa de corantes sintéticos, constituem uma fração não energética da dieta do ser humano e estão relacionados com importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos com relação a nutrição e a saúde estão relacionados às suas propriedades antioxidantes (GISTUI et al., 1998; LOPES et al., 2007; VOLP et al., 2007).

A estrutura química das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, mostrada na figura 2 (LOPES et al., 2000), em função de sua estrutura, podem estar associadas com compostos flavonóides não antociânicos. Apesar de

possuir a mesma origem biossintética de outros flavonóides naturais, as antocianinas diferem destes por absorver fortemente na região visível do espectro.

Quimicamente, as antocianinas são glicosídeos de derivados polihidroxi e polimetoxi de 2-fenil benzopirlico ou íon flavílico polimetoxi de 2-fenil benzopirlico ou íon flavílico. Diferem entre si pelo número de grupos hidroxila, número e natureza de açúcares unidos à molécula, posição desse açúcar e pelo número e natureza dos ácidos alifáticos ou aromáticos unidos aos açúcares da molécula. Suas moléculas são polares, em função dos grupos substituintes polares (hidroxilas, hidrogênio e metoxilas) e glicosilas ligadas aos anéis aromáticos, portanto, são solúveis em água. Na natureza, encontram associadas a moléculas de açúcares e quando livres destes açúcares são denominadas de antocianidinas ou agliconas, sendo estas encontradas em matéria fresca de plantas (WU et al., 2006; KONG et al., 2003). Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (FRANCIS, 2000). A diferença na estrutura química entre elas se verifica nas posições 3' e 5' do anel B, e as principais fontes são uvas, morango, repolho-roxo, etc (ARAÚJO, 2011).

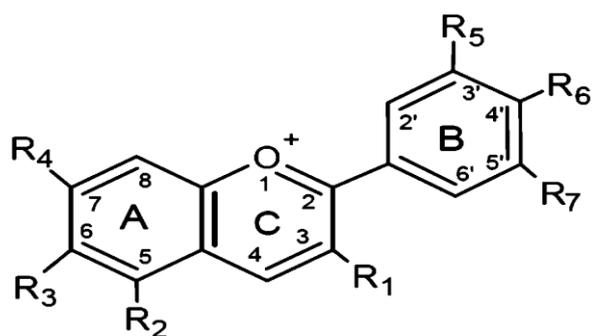


Figura 2. Estrutura química das antocianinas (adaptado de LOPES *et al.*, 2000).

Esses pigmentos quando isolados são altamente instáveis e muito suscetíveis a degradação. A sua estabilidade é afetada por diversos fatores, tais como PH, temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, ente outros. A estabilização de antocianinas é foco principal de recentes estudos devido as mais diversas aplicações, efeitos benéficos a saúde e sua utilização como alternativa de substituição aos corantes artificiais (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009).

As antocianinas foram utilizadas pela primeira vez na indústria de alimentos como corantes naturais. Nos últimos anos, as pesquisas começaram a se concentrar em possíveis aplicações na saúde humana como suplementos nutricionais, funcionais, formulações de alimentos, medicamentos e cosméticos (GRIGORAS et al., 2012). Pesquisas recentes mostraram as inúmeras vantagens destes pigmentos para a saúde humana, principalmente como agente antioxidante que age na inibição dos radicais livres (TSUDA et al., 1994; WANG et al., 1999; NAM et al., 2006; PHILPOTT et al., 2006); prevenindo doenças degenerativas como o câncer (KAMEI et al., 1995; HYUN et al., 2004; ZHAO et al., 2004); melhorando a adaptação à visão noturna e prevenindo a fadiga visual (JAYAPRAKAS et al., 2005); como anti-inflamatório (WANG et al., 1999); também foram aplicados no tratamento contra a obesidade e hiperglicemia (TSUDA et al., 2003).

As antocianinas são muito solúveis em água, sendo extraídas com facilidade a partir do uso de água, metanol e etanol. Com o intuito de prevenir a oxidação destes pigmentos, a extração é realizada em meio ácido (LEE & HONG, 1992). Convencionalmente, os métodos de extração desses pigmentos empregam a extração sólido-líquido, que são realizados considerando parâmetros como temperatura, PH e solventes contendo pequenas quantidades de um ácido. Esses processos mostram-se efetivos, porém são demorados e utilizam grande quantidade de solventes. Além disso, esses métodos são poucos seletivos e produzem soluções de pigmentos com grandes quantidades de subprodutos, como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas. Algumas dessas impurezas podem acelerar o processo de degradação das antocianinas. Consequentemente, os pesquisadores que trabalham com alimentos preferem outras formas de extração (CÍSSE et al., 2012; CHANDRASEKHAR et al., 2012; TROUNG et al., 2012; LOPES et al., 2000).

Estudos mais recentes aplicam alternativas tecnológicas na obtenção de antocianinas, com o objetivo de alcançar processos com melhores características econômicas e ambientais garantindo maior sustentabilidade, segurança e qualidade aos produtos obtidos (CORRALES et al., 2008), como extração assistida por micro-ondas (LIAZID et al., 2011), extração assistida por ultrassom (CARRERA et al., 2012), a extração com líquido pressurizado (TROUNG et al., 2012) e a extração com fluido supercrítico (CALVACANTI, 2013; PAULA et al., 2014).

Os extratos de antocianinas obtidos a partir de frutas e flores são quase sempre encontrados como uma mistura de antocianinas, e também podem conter clorofilas e

pigmentos pertencentes ao grupo dos carotenóides. Desta forma, muitas vezes é necessário purificar, isolar e identificar os pigmentos que contem o extrato bruto (HARBONE, 1975). Nesse sentido, muitas pesquisas propõem uma variedade de técnica de extração na fase sólida (SPE), líquido-líquido (LLE) seguida da utilização de técnicas cromatográficas sofisticadas, como a cromatografia contracorrente (CCC), cromatografia de média pressão (MPLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Geralmente, utilizam-se o SPE com cartuchos C18 ou Sephadex, onde as antocianinas são separadas dos outros compostos, através da aplicação do extrato antociânico bruto no cartucho contendo material adsorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. As antocianinas ficam fortemente ligadas aos adsorventes por seus grupos hidroxil não-substituídos. Desta forma, primeiramente são eluídas as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como açúcares, ácidos e substâncias solúveis, e posteriormente são eluídos os pigmentos antociânicos (MARÇO et al. 2008). O CCC e a MPLC são utilizados como métodos de purificação com posterior análise por HPLC para elucidação estrutural, com a vantagem de minimizar o tempo de separação e solventes da fase móvel. O mais comum método utilizado para separar as antocianinas é por HPLC com UV-Vis ou arranjo de diodos (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009).

1.4 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

1.4.1 Fluidos supercríticos

Os fluidos supercríticos foram estudados extensivamente nas tentativas de adquirir conhecimento preciso e detalhado sobre suas propriedades fundamentais. Este conhecimento é necessário para a utilização e otimização da tecnologia dos fluidos supercríticos na obtenção de diversos materiais (SUN, 2002).

Os fluidos supercríticos são substâncias a pressões e temperaturas acima de seus valores críticos, P_C e T_C , podem ser removidos facilmente do soluto através da expansão à pressão ambiente (BRUNNER, 2005). Quando uma substância no estado gasoso é comprimida até sua pressão de saturação, esta se torna líquido ou sólido. No entanto, se este composto é aquecido além de uma temperatura específica, qualquer que seja a

compressão, ele não se torna líquido. Esta temperatura é chamada de temperatura crítica (T_c) e a pressão de vapor correspondente a ela é conhecida como pressão crítica (P_c) (MUKHOPADHYAY, 2000). A Figura 3 apresenta o diagrama de fases de um componente puro. A região crítica tem sua origem no ponto crítico, e acima desta temperatura e pressão críticas, a substância é considerada fluido supercrítico.

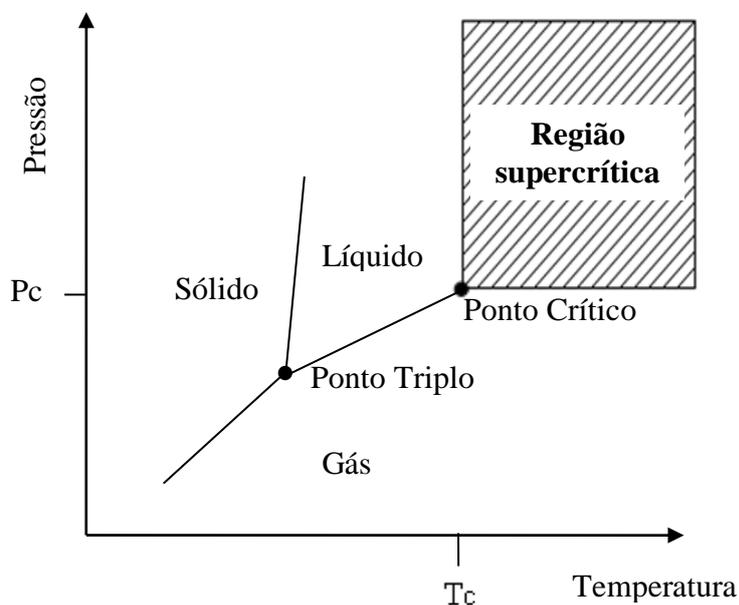


Figura 3. Diagrama de fases de fases de um componente puro. Adaptado de Brunner (2005).

À medida que o ponto crítico de uma substância é alcançado, sua compressibilidade térmica tende ao infinito, assim seu volume molar e densidade muda drasticamente. Na região supercrítica uma substância que é um gás em condições normais apresenta uma densidade semelhante ao líquido e uma muito maior capacidade de solvente que é dependente da pressão. A capacidade de solvente variável de um fluido supercrítico é a base sobre a qual processo de separação pode ser realizado (McHUGH & KRUKONIS, 1994). A Tabela 3 lista as temperaturas e pressões críticas para uma variedade de solventes.

Tabela 3. Condições críticas para vários solventes (McHUGH & KRUKONIS, 1994)

Solvente	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (bar)
Dióxido de carbono	31.1	73.8
Etano	32.2	48.8
Etileno	9.3	50.4
Propano	96.7	42.5
Propileno	91.9	46.0
Ciclohexano	280.3	40.7
Isoproponol	235.2	47.6
Benzeno	289.0	48.9
Tolueno	318.6	41.1
p-xileno	343.1	35.2
Clorotrifluometano	28.9	39.2
Triclorofluometano	198.1	44.1
Amônia	132.5	112.8
Água	374.2	220.5

Entre as propriedades, os fluidos supercríticos apresentam viscosidade baixa como a de um gás, alta densidade como os líquidos e difusão intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade (SILVA et al., 1997). Estas propriedades tornam os fluidos supercríticos interessantes para processos de extração já que a alta densidade proporciona a eles um poder de solvatação semelhante ao apresentado pelos líquidos, enquanto a alta difusividade e a baixa viscosidade permitem alto poder de penetração em diferentes matrizes, o que favorece a transferência de massa no processo de extração (RIZVI et al., 1986). Contudo, são prontamente adaptáveis a muitas separações difíceis, não somente por permitir a separação de materiais instáveis termicamente, a baixas temperaturas, mas também devido a alta compressibilidade e solubilidade exponencial, e ainda efetuar separações com pequenas variações de pressão (SILVA et al., 1997).

A capacidade de difusão dos fluidos supercríticos chega a ser de uma a duas ordens de magnitude maior que aquela dos líquidos, o que proporciona uma rápida e eficiente transferência de massa. Outra característica remete às de um gás, a baixa viscosidade e a ausência de tensão superficial, facilita a penetração dos fluidos supercríticos na matriz sólida (TAYLOR, 1996; LUQUE DE CASTRO et al., 2004). A Tabela 4 apresenta valores característicos de densidade, difusividade e viscosidade para os estados gasoso, líquido e supercrítico.

Tabela 4. Valores característicos do gás, líquido e fluido supercrítico. Adaptado de BRUNNER (1994).

Estado do fluido	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g/cm.s)
<i>Gás</i> P= 1 atm, T= 15-30°C	(0.6-2.0)x10 ⁻³	0.1-0.4	0.6-2.0x10 ⁻⁴
<i>Líquido</i> P= 1 atm, T= 15-30°C	0.6-1.6	(0.2-2.0)x10 ⁻⁵	(0.2-3.0)x10 ⁻²
<i>Fluido supercrítico</i> P _c , T _c	0.7x10 ⁻³	0.7x10 ⁻³	(1.3)x10 ⁻⁴
4P _c , T _c	0.2x10 ⁻³	0.2x10 ⁻³	(3.9)x10 ⁻⁴

Entre os solventes empregados no processo de extração com fluidos supercríticos (EFSC), o dióxido de carbono (CO₂) é o mais comumente utilizado. Muitas características lhe conferem grandes vantagens como solvente no processo de extração, entre elas: a sua baixa temperatura crítica, permitindo que extrações sejam realizadas a uma temperatura que não prejudique as propriedades organolépticas e químicas do extrato; sua pressão crítica, de fácil obtenção para o CO₂ em um processo de produção industrial; o CO₂ é inerte, não oferece riscos de reações secundárias, como oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas; é seguro, não explosivo, não poluente e não tóxico; possui polaridade máxima a do hexano, solvente apolar usualmente utilizado nas extrações tradicionais (REVERCHON *et al.*, 2006; MAUL, 1999).

A polaridade do CO₂ como fluido extrator limita a extração a obtenção de compostos orgânicos apolares e de baixo peso molecular, compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos, estes são facilmente extraídos com CO₂. Portanto, compostos altamente polares e de maior peso molecular, como açúcares, taninos, proteínas, fosfatídios, glicosídeos e sais orgânicos, são dificilmente solúveis no solvente (BRUNNER, 2005; MAUL, 1999). Desta maneira, uma extração utilizando solventes orgânicos junto à extração supercrítica com CO₂, é necessário para aumentar a polaridade, o poder de solvatação do solvente, e conseqüentemente, o número de compostos extraídos, estes solventes são denominados de cossolventes ou modificadores.

A utilização de cossolventes ou modificadores é uma prática bastante comum em ESFC quando se deseja extrair compostos de alta polaridade normalmente não solúveis

em CO₂ devido à sua baixa polaridade (CALVACANTI, 2012). Os cossolventes são empregados em baixas concentrações, se comparado às extrações convencionais com solventes orgânicos. Na extração com fluidos supercríticos o volume de cossolvente utilizado é aproximadamente 15 vezes inferior ao volume de solvente orgânico utilizado na extração convencional (CAMPOS, 2005).

Os cossolventes podem ser selecionados de acordo com a força de interação do soluto - solvente, quanto maior esta interação, maior a facilidade de extração (FREITAS, 2007). Os solventes empregados como modificadores são o etanol, metanol, água, diclorometano e n-hexano, os quais são capazes de realizar a interação do tipo dipolo-dipolo e ponte de hidrogênio nas moléculas do soluto contendo grupos funcionais polares (MELO et al., 2014;). No entanto, para a maioria das aplicações industriais, a seleção de solventes é geralmente limitada a solventes considerados como seguros (GRAS), e, na prática, o etanol, ou misturas de etanol com água são o mais utilizados (BRUNNER, 1994).

1.4.2 O processo e parâmetros da extração

Especificamente, a seleção dos parâmetros de extração depende do composto a ser extraído, considera-se peso molecular e polaridade, e algumas regras gerais podem ser aplicadas. A primeira é a escolha da temperatura, esta deve ser fixada entre 35 a 60°C quando se deseja extrair compostos termosensíveis para evitar possíveis degradações. Outro parâmetro relevante é a pressão que pode ser utilizada para ajustar a seletividade do processo (REVERCHON & MARCO, 2006). A temperatura e pressão influenciam diretamente na densidade do solvente, e consequentemente, na sua capacidade de separação através do poder de solubilização.

A densidade é uma propriedade responsável pela capacidade solvente dos fluidos supercríticos, sendo alterada por mudanças na pressão e temperatura do sistema, especialmente na região próxima ao ponto crítico (ROSA et al., 2009). Em geral, a solubilidade do substrato no fluido supercrítico é função da densidade do solvente e da pressão de vapor de soluto. Ao se percorrer uma isoterma com o aumento de pressão, a densidade do solvente aumenta enquanto a pressão de vapor diminui. Por outro lado, se a temperatura aumenta isobaricamente ocorre diminuição da densidade do solvente e

aumento da pressão de vapor do soluto. Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação ou condesação retrógrada (McHUNG & KRUKONIS, 1986).

Quanto à vazão do solvente, geralmente, um aumento na vazão do solvente supercrítico causa um aumento na capacidade de extração. Alguns casos foram observados que, para valores maiores de vazão do solvente, o tempo de contato entre o soluto e o solvente, necessário para que houvesse a saturação do solvente com o soluto, foi insuficiente (PEREIRA & MEIRELES, 2010).

A eficácia do processo de extração supercrítica, também depende da característica da matriz sólida, tal como tamanho da partícula e umidade (REVERCHON & MARCO, 2006; POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007).

O tamanho da partícula é um parâmetro que influencia nos processos de EFSC, de acordo com alguns autores (CASSEL et al., 2008; PEREIRA & MEIRELES, 2010), a diminuição do tamanho de partícula da matriz sólida aumenta a taxa de extração, uma vez que ocorre um aumento da área disponível para de transferência de massa.

A umidade é uma propriedade física do material que interfere de forma negativa na capacidade do fluxo da extração se difundir pelas estruturas da matriz sólida em alcançar e solubilizar o material a ser extraído, o excesso prejudica o rendimento da extração de componentes que tem maior afinidade com CO₂, que são os compostos apolares e de baixa polaridade. Em alguns casos, a presença de água é necessária para permitir a interação do solvente com o soluto, quando a intenção é extrair compostos de maior polaridade (POORMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007; PEREIRA & MEIRELES, 2010).

O processo de EFSC ocorre em duas etapas: extração dos componentes solúveis da matriz sólida para o solvente supercrítico e separação do extrato do solvente. Na extração de matrizes sólidas com fluido supercrítico, é utilizado um extrator de leito fixo, onde o leito é formado pelo próprio material vegetal. Durante o processo extrativo, o solvente é alimentado no extrator inicialmente puro e distribuído uniformemente no interior do leito fixo de partículas sólidas, solubilizando os componentes presentes no material vegetal. Conforme o solvente escoar através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase líquida, e em qualquer ponto dentro do extrator a concentração de óleo na fase sólida e fluída varia continuamente até

que o equilíbrio seja alcançado. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e passa pelo separador (BRUNNER, 1994.). Na etapa de separação, a pressão de separação é reduzida, acarretando na vaporização do solvente e na precipitação do soluto (SOVOVÁ, 2005).

1.5 ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL

A determinação de isotermas de rendimento global permite visualizar o comportamento do sistema indicando a condição de temperatura e pressão a qual ocorre maiores rendimentos de extratos e composição dos compostos desejados, proporcionando informações necessárias para selecionar a condição que maximize o processo.

O rendimento global (X_0) do processo pode ser calculado pela relação entre massa total do extrato ($M_{extrato}$) e massa inicial da amostra em base seca ($M_{amostra}$), como expressa a equação 1.0 .

$$X_0(\%) = \frac{M_{extrato}}{M_{amostra}} \times 100 \quad (1.0)$$

Vários comportamentos podem ser verificados no estudo do desempenho do rendimento global com a temperatura e pressão, em alguns casos, devido a complexidade da composição química dos extratos, pode ser observado o fenômeno da inversão (QUISPE-CONDORI, 2005), como representado na figura 4, para as isotermas de rendimento global para o sistema alecrim + CO₂, onde na pressão de 177 bar as isotermas convergem e os dois efeitos (pressão de vapor e densidade de solvente) possuem a mesma importância sobre a solubilidade. Nesse caso, o fenômeno de inversão é verificado quando o aumento da temperatura em uma mesma pressão, para pressões maiores que 177 bar, pressões relativamente baixas, o efeito da densidade do solvente prevalece sobre o efeito da pressão do vapor, pois ocorre a diminuição da solubilidade do soluto. E em pressões relativamente altas, pressões maiores que 177 bar, causa o aumento da solubilidade do soluto, prevalecendo o efeito da pressão de vapor (CARVALHO JR., 2004).

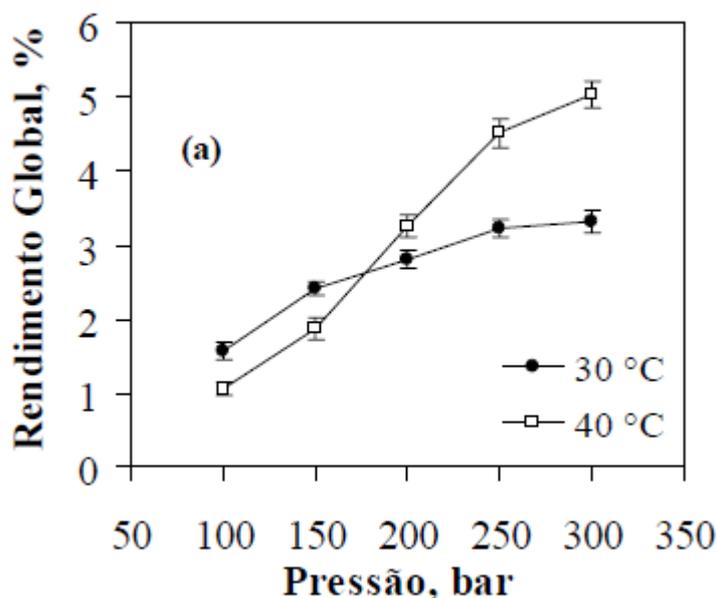


Figura 4. Isotermas de rendimento global de extratos do alecrim com CO₂ supercrítico (CARVALHO JR., 2004)

1.6 CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO

As curvas globais de extração (Overall Extraction Curves) expressam o comportamento cinético de um determinado processo de extração, onde a quantidade de extrato coletada durante o processo é plotada em função do tempo ou da quantidade de solvente utilizada (MOURA, 2004; QUISPE-CONDORI et al, 2005). O estudo da curva de extração pode ajudar a definir o volume do extrator, a vazão requerida dos solventes para a taxa de extração desejada (CABRAL, 1993), além determinar parâmetros como: tempo mínimo de extração, caracterização das etapas de extração, determinação da solubilidade e modelagem da transferência de massa do sistema (ALBUQUERQUE & MEIRELES, 2012), que fornecem informações importantes relativas ao dimensionamento industrial de uma unidade de extração com fluido supercrítico.

Uma curva típica de extração como representado na figura 5, pode ser dividida em três partes:

I. Período de taxa constante de extração (CER - Constant Extraction Rate Period), onde a superfície externa do sólido está completamente coberta pelo soluto, representa a extração de substratos que são de fácil acesso ao solvente. O solvente retira

esta camada superficial num processo de transferência de massa majoritariamente influenciada pelo efeito convectivo.

II. Período de taxa decrescente de extração (FER - Falling Extraction Rate Period), onde aparecem falhas nas camadas superficiais de soluto que recobrem o sólido;

III. Período de taxa de extração controlada pela difusão (DC - Diffusion Controlled), onde ocorre difusão da mistura soluto / solvente no sólido, ou retirada do soluto que está na parte interna da partícula.

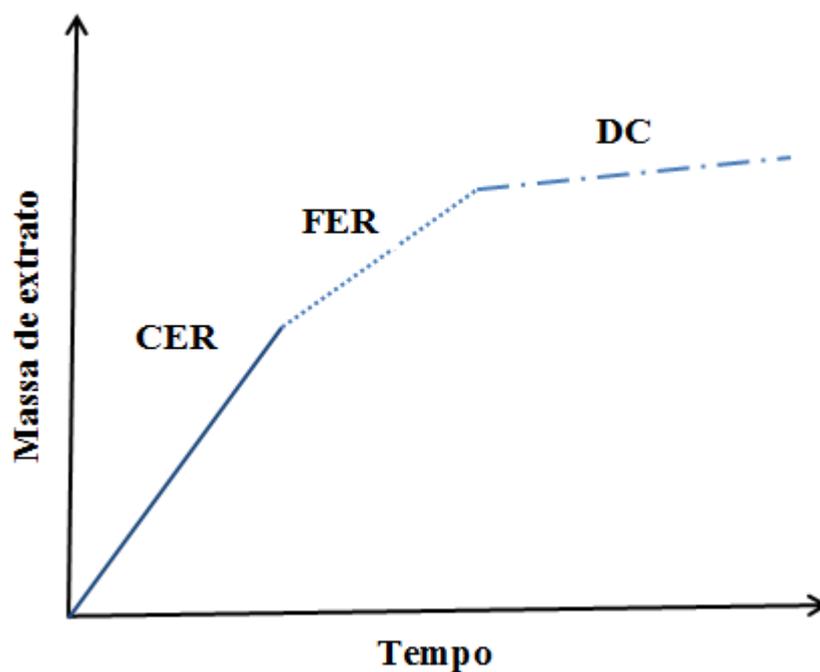


Figura 5. Curva típica de extração

1.7 MODELAGEM MATEMÁTICA

A habilidade para prever as curvas globais de extração, conhecendo os parâmetros do processo é fundamental importância tanto no projeto como na otimização de uma planta industrial. A modelagem matemática é provavelmente a principal ferramenta de predição, que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo (QUISPE-CONDORI, 2005).

Os modelos matemáticos usados para descrever as curvas globais de extração podem ser divididos em três principais categorias: os empíricos, os que usam analogias com transferência de calor e os obtidos por balanço de massa diferencial (ROSA et al., 2009). De forma geral, estes modelos consideram que na extração de um soluto a partir da matriz sólida, o extrato é formado principalmente por uma substância, independente de sua composição química. Alguns modelos consideram a resistência à transferência de massa na fase fluída ou sólida, como um controlador de processo e outros consideram as duas resistências simultaneamente. Os modelos matemáticos permitem generalizar os resultados experimentais, descrevendo os principais fenômenos de interesse através de uma equação ou um sistema de equações, que posteriormente poderão ser aplicados a condições de trabalho, possibilitando assim obter informações necessárias para um dimensionamento de uma unidade supercrítica (MOURA, 2004).

1.7.1 Modelo Tan e Liou (1989)

O modelo Tan e Liou (1989) é um modelo cinético de primeira ordem que considera a unidade de extração como leito cilindro tendo o coeficiente de dessorção como único parâmetro ajustável. Os termos referentes a dispersão axial e a difusão são desprezadas, pois segundo os autores, estes fenômenos não influenciam significativamente no processo. O balanço de massa para o modelo de Tan e Liou (1989) pode ser expresso pelas Equações 1.1 e 1.2 para a fase fluída e para a fase sólida, respectivamente:

$$\varepsilon\rho \frac{\partial Y}{\partial t} + \mu\rho \frac{\partial Y}{\partial h} = -(1 - \varepsilon)\rho_s \frac{\partial X}{\partial t} \quad (1.1)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = K_d X \quad (1.2)$$

Utilizando-se as seguintes condições de contorno pra resoluções das equações 1.1 e 1.2:

$$Y(h, t=0) = 0 \quad (1.3)$$

$$Y(h=0, t) = 0 \quad (1.4)$$

$$X(h, t=0) = X_0 \quad (1.5)$$

Aplicando as condições de contorno 1.3, 1.4 e 1.5, obtém-se a equação 1.6 a qual expressa a razão mássica o soluto no solvente em função de tempo e o processo na saída do extrator.

$$Y(h = H, T) = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \left[\exp\left(\frac{K_d \varepsilon H}{u}\right) - 1 \right] \exp(-K_d t) \quad (1.6)$$

Como a massa de óleo na saída do extrator é dada pela equação 1.7:

$$m(h = H, t) = \int_0^t Y(h = H, t) Q_{CO_2} dt \quad (1.7)$$

Substitui-se a equação 4 na equação 3 e integrando-se, obtém-se a equação 1.8:

$$m(h = H, t) = \frac{A}{K_d} [1 - \exp K_d][\exp(-K_d t) - 1] \quad (1.8)$$

Onde:

$$A = Q_{CO_2} \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \cdot X_0 \frac{\rho_{CO_2}}{\rho_s} \quad (1.9)$$

$$B = \frac{\varepsilon \cdot H}{u} = X_0 \frac{\varepsilon \cdot H \cdot S \cdot \rho_s}{Q_{CO_2}} \quad (1.10)$$

1.7.2 Modelo Goto et al. (1993)

No modelo apresentado por Goto et al. (1993), considera-se que a que o leito de extração é formado por partículas com geometria de uma placa plana. A partícula sólida é tratada como um meio poroso, que tem espessura desprezível em relação às demais dimensões, de forma que a transferência de massa ocorre apenas entre as duas maiores superfícies da placa. O processo de transferência de massa é controlado pelo mecanismo de dessorção (da partícula para os poros, seguido de difusão do soluto nos poros da partícula) com dois parâmetros a serem determinados: o coeficiente global de transferência de massa (ϕ) e a constante de equilíbrio de dessorção (k).

A equação diferencial de massa na fase sólida é expressa pelas equações 1.11 e 1.12:

$$\beta \frac{\partial C_i}{\partial t} + (1 - \beta) \frac{\partial C_s}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 C_i}{\partial h^2} \quad (1.11)$$

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = K_d \left(C_i - \frac{C_s}{K} \right) \quad (1.12)$$

Onde:

β é a porosidade da folha;

C_i é a razão mássica de soluto nos poros da folha;

C_s é a razão mássica de soluto na folha;

h é a coordenada da partícula

D_e é a difusividade efetiva entra as partículas;

K_d é o Coeficiente de dessorção;

K é a constante de equilíbrio de dessorção.

Para a fase fluida do sistema, o balanço de massa é representado pela equação

1.13:

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + \frac{C}{\tau} = -(1 - \varepsilon) K_f a_p (C - C_i|_{h=e}) \quad (1.13)$$

Onde:

τ é o tempo de residência do solvente no leito;

K_f é o coeficiente volumétrico de transferência de massa;

a_p é a área específica de transferência de massa;

e é a meia espessura da folha.

As condições iniciais e de contorno para resolução das equações de balanço de massa são representadas pelas seguintes equações 1.14, 1.15 e 1.16:

$$C(h, t = 0) = C_{s0} \quad (1.14)$$

$$C_s(h, t = 0) = C_i(h, t = 0) = 0 \quad (1.15)$$

$$D_e \left(\frac{\partial C_i}{\partial h} \right) \Big|_{h=e} = K_f a_p (C - C_i|_{h=e}) \quad (1.16)$$

A resolução das equações de balanço de massa consiste na seguinte equação 1.17, onde se despreza o efeito da dispersão axial:

$$m = \frac{A [\beta / K + (1 - \beta)] X_0 \rho_s Q_{CO_2}}{\rho} \left\{ \frac{\tau}{a_1} \left[\exp \left(a_1 \frac{t}{\tau} \right) - 1 \right] + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - \exp \left(a_2 \frac{t}{\tau} \right) \right] \right\} \quad (1.17)$$

Onde:

$$a_1 = \frac{1}{2} \left(+b \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (1.18)$$

$$a_2 = \frac{1}{2} \left(-b \sqrt{b^2 - 4c} \right) \quad (1.19)$$

$$A = \frac{(1 - \varepsilon) \phi}{[\beta + (1 - \beta)K] \varepsilon (a_1 - a_2)} \quad (1.20)$$

$$b = \frac{\emptyset}{[\beta + (1 - \beta)K]} + \frac{1}{\varepsilon} + \frac{\emptyset(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (1.21)$$

$$c = \frac{\emptyset}{[\beta + (1 - \beta)K]\varepsilon} \quad (1.22)$$

$$K_p = \frac{3K_f}{3 + B_i} \quad (1.23)$$

1.7.3 Modelo Martínez et al. (2003)

Os modelos anteriores tratam o extrato como sendo um pseudocomposto ou uma substância pura, no entanto, o extrato obtido da extração supercrítica apresenta vários compostos, classificados de acordo com suas características químicas, tais como terpenos, flavonóides, fenóis, entre outros. Portanto, a modelagem de processos de extração, em alguns casos, deve levar em conta a variação da composição do extrato ao longo da extração, de forma que se possa otimizar o processo para a obtenção dos compostos de interesse.

Em modelo proposto de França e Meireles (2000) considerou-se que o fluxo de transferência de massa, $J(X, Y)$, é função da solubilidade dos componentes no solvente (S_i), expressa pela equação 1.24, para um extrato com n componentes.

$$J(X, Y) = \sum_{i=1}^n S_i \quad (1.24)$$

O modelo Martínez (2003) é um modelo adaptado a partir do modelo proposto por França e Meireles (2000), o qual implanta uma nova função para substituir o termo S_i na equação, utilizando a equação logística de Verhust que descreve o comportamento do crescimento das populações, expressa na equação 1.25:

$$S_i(t) = \frac{A_i b_i \exp [b_i(t_{mi} - t)]}{\{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]\}^2} \quad (1.25)$$

Onde:

t é o tempo de extração;

A_i , b_i , t_{mi} são parâmetros ajustáveis do modelo.

O balanço de massa para fase fluida é expresso pela equação 1.26, onde o termo $J(X, Y)$ é dado pela equação 1.24.

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad (1.26)$$

Com a condição inicial $Y(h = 0) = 0$, e integrando, obtém-se a equação 1.27 na saída do extrator:

$$Y(h = H) = \frac{H_B}{4\varepsilon} \sum_{i=1}^n S_i \quad (1.27)$$

CAPÍTULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo da obtenção de extratos ricos em compostos bioativos via extração com fluido supercrítico a partir da polpa de açaí foi realizado conforme diagrama de fluxo de atividades realizadas descrito na Figura 6.

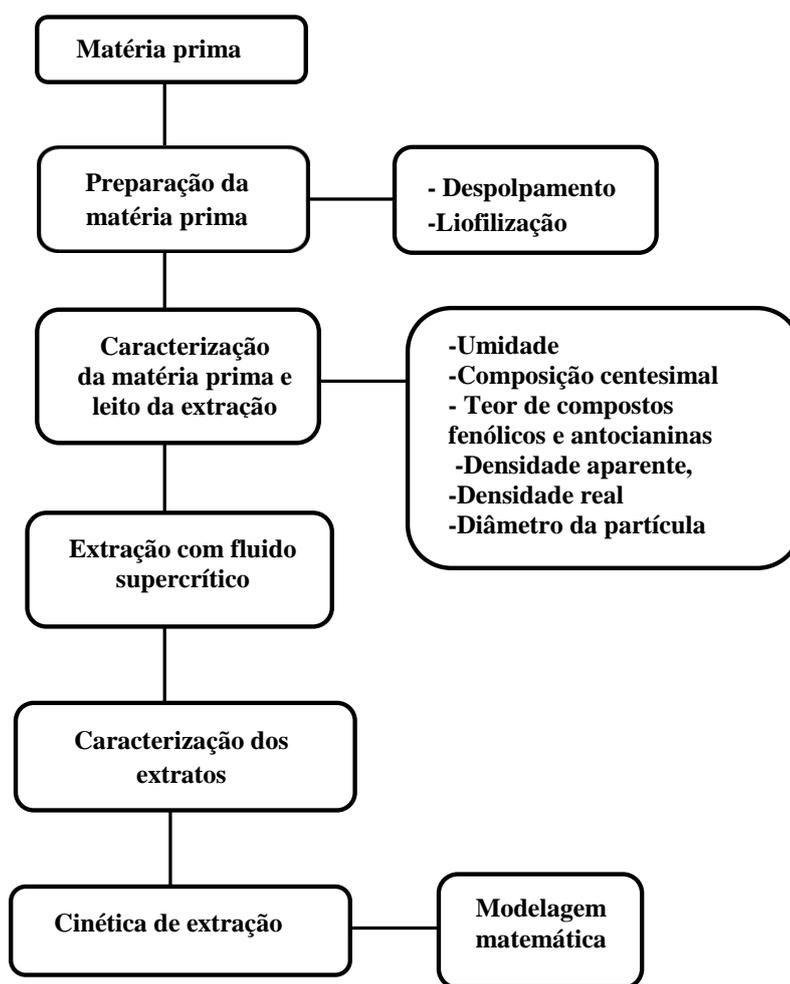


Figura 6. Fluxograma de atividades realizadas

2.1 MATÉRIA PRIMA

A matéria prima empregada neste trabalho consiste nos frutos do açaí *in natura* coletados no município de Abaetetuba (Pará, Brasil), sendo as coordenadas geográficas de 1° 43' 46"S e 48° 52' 27"W. A palmeira de açaí, a qual os frutos foram coletados, foi identificada a partir de análises de exemplares de frutos, folhas e ramos previamente secos, sendo que uma amostra foi incorporada ao acervo do Instituto Federal do Pará, no Campus de Abaetetuba (Abaetetuba-Pará, Brasil), com registro HIFPA: 500.

2.2 CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA PRIMA

2.2.1 Biometria dos frutos

A Biometria dos frutos foi determinada através da medida dos diâmetros (ϕ_1), comprimentos (**L**) utilizando-se um paquímetro (Vonder 150 mm - 6''), e das massas (m_i) utilizando-se balança semi-analítica com precisão de 0.01 gramas (Logen Scientific, Modelo: 1087).

Para a realização da biometria os frutos de açaí foram distribuídos em bandejas e divididos em 25 grupos, em cada grupo selecionavam-se 10 amostras para análise biométrica. No total foram analisados 210 frutos de açaí.

2.2.2 Despulpamento

Os frutos de açaí foram previamente lavados com água corrente para a retirada das sujidades aderidas aos frutos e, em seguida, imersos em tanques com água quente a 50°C para o amolecimento do mesocarpo e endocarpo durante 15 (quinze) minutos, com a finalidade de facilitar o despulpamento. Depois, com a injeção de água os frutos foram despulpados com auxílio da despulpadeira mecânica de açaí. A polpa obtida foi armazenada em sacos plásticos e congelada em freezer. A figura 7 ilustra o procedimento de despulpamento.

Segundo COHEN e ALVES (2008), nessa etapa de processo, a temperatura da água e o tempo de imersão, são variáveis conforme a procedência dos frutos. A água pode estar à temperatura ambiente ou entre 40 e 60°C, não devendo exceder a este

valor. O tempo de amolecimento dos frutos varia entre 10 a 60 minutos de acordo com o grau de maturação dos frutos. Esses valores são empíricos, pois não existem pesquisas que comprovam, tecnicamente, a temperatura da água e o tempo de imersão adequado para amolecimento do epicarpo e mesocarpo que favoreçam o despoldamento, sem degradar as propriedades da matéria-prima.



Figura 7. Amolecimento da polpa e despoldadeira de açai utilizada

2.2.3 Liofilização

A etapa de liofilização foi realizada no Laboratório de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Inicialmente, a polpa de açai foi acondicionada nas bandejas do liofilizador e levadas em freezer vertical (BRASTEMP) para congelamento na temperatura de -25°C durante 24 horas. Em seguida a polpa congelada junto às bandejas foi colocada no liofilizador (LIOTOP, modelo: L101), e submetidas a condições de liofilização a uma pressão de $138\ \mu\text{ mmHg}$ e temperatura do condensador de -51°C durante 72 horas. A polpa de açai liofilizada foi armazenada em sacos plásticos a vácuo revestidos com folha de alumínio para impedir a passagem da luz e levados ao freezer. A figura 8 ilustra o equipamento utilizado e polpa liofilizada obtida.



Figura 8 Liofilizador utilizado e polpa liofilizada obtida

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE AÇAÍ LIOFILIZADA

2.3.1 Determinação da granulometria

A polpa de açaí liofilizada foi introduzida num jogo de peneiras de série padrão Tyler 8 a 42 meshes. A distribuição granulométrica foi realizada através de um agitador de peneiras tipo magnético (BERTEL, N° 1713) durante 30 minutos. A quantidade de massa retida em cada peneira foi pesada em balança semi-analítica (QUIMIS, Q520). O diâmetro médio das partículas foi determinado de acordo com o método da ASAE (1998), segundo a equação 2.1:

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^n (W_i \log d_i)}{\sum_{i=1}^n W_i} \quad (2.1)$$

Onde:

$$d_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$$

d_i = abertura nominal da i-ésima peneira (mm);

d_{i+1} = abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm);

W_i = massa do material retido na i-ésima peneira.

2.3.2 Determinação da umidade, densidade real das partículas, densidade aparente do leito e porosidade do leito

A umidade foi determinada segundo o método 931.0 da AOAC (1997). Pesaram-se 5 g de amostra em um cadinho previamente tarado. Posteriormente, o cadinho juntamente com a amostra foi colocado em estufa de secagem (Modelo TE 395-1, Tecnal) à 105 °C e teve sua massa mensurada até valor constante.

A densidade real das partículas (ρ_r) foi determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP, utilizando um picnômetro de gás hélio conforme manual de operação de equipamento (Picnômetro automático Quantachrome Ultrapyc 12200e).

A densidade aparente do leito foi calculada dividindo-se a massa da matéria-prima utilizada para empacotar o leito pelo volume do leito no extrator segundo a Equação 2.2.

$$\rho_a = \frac{F}{V} \quad (2.2)$$

Onde:

ρ_a = densidade aparente do leito (Kg/m³);

F = massa da matéria-prima alimentada (Kg);

V = volume interno do extrator ocupado pela matéria-prima (m³).

A porosidade do leito (ϵ) foi calculada dividindo-se a densidade aparente do leito (ρ_a) pela densidade real das partículas (ρ_r) conforme a Equação 2.3.

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (2.3)$$

2.3.3 Análise da composição centesimal

2.3.3.1 Proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado seguindo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), que se baseia na determinação do nitrogênio total, envolvendo duas etapas: digestão e destilação.

2.3.3.2 Cinzas

A determinação do resíduo mineral fixo (cinzas) foi realizada pela incineração em mufla (QUIMIS, modelo Q 310-25) á 550°C.

2.3.3.3 Lipídios Totais

O teor de lipídeos foi determinado segundo o método 963.15 da AOAC (1997), por extração da fração etérea por fluxo não contínuo, utilizando aparelho de Soxhlet (TECNAL, modelo TE-044) e o solvente éter de petróleo sob refluxo.

2.3.3.4 Fibras totais

O teor de fibras foi determinado segundo o método oficial 991.43 da AOAC (1997). O teor de fibras foi calculado pela Equação (2.4).

$$fibras(\%) = \frac{[(M_T - M_F)] - M_C}{M_A} \times 100 \quad (2.4)$$

Onde:

M_T é a massa do conjunto (cadinho + resíduo + papel de filtro seco) após lavagem e secagem (g),

M_A é a massa da amostra (g),

M_F é a massa do papel filtro (g)

M_C é a massa do conjunto cadinho/cinza estabilizado (g).

2.3.3.5 Carboidratos

A quantificação de carboidratos foi calculada por diferença entre 100 e a soma dos teores de umidade, cinzas, lipídeos totais, proteínas e fibras.

2.3.4 Determinação da concentração de compostos fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada por espectrometria no visível utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC) segundo o método descrito por SINGLETON & ROSSI (1965). O método baseia-se na formação de óxidos de compostos fenólicos, através da mistura de solução de FC, que contém heteropolifosfotunstato-molibdato e sulfato de lítio e apresenta coloração amarela, a uma solução altamente básica (5%-10% solução aquosa de Na_2CO_3). Sequências de reações de transferência de elétrons levam a formação de uma espécie azul ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}$)-4, o molibdênio é reduzido a forma Mo (VI). A absorvância deste meio é lida a 750 nm.

Reagentes:

Ácido acético glacial PA 99,5% (CRQ, Impex, Isofar, Synth, Tedia); ácido clorídrico PA 95% (CRQ, Impex, Isofar, Synth, Tedia); álcool PA 95% (CRQ, Impex, Isofar, Synth, Tedia); Acetona PA 99,5% (CRQ, Impex, Isofar, Synth, Tedia); Reagente de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich); Carbonato de sódio (Reagen, Sigma-Aldrich, Synth).

Procedimento:

Inicialmente pesou-se 1 g da amostra em um tubo de ensaio e adicionou-se 19 mL da solução de acetona:água:ácido acético. Homogeneizou-se a solução em agitador magnético por mais ou menos 1 minuto até completa solubilização da amostra. Em seguida, colocou-se em microtubos para saturação com gás inerte N_2 . Depois, centrifugou-se por 20 minutos a 4°C e velocidade de agitação de 8.000 rpm. Após a centrifugação, prepararam-se as amostras para análises nas seguintes ordens e proporções: 500µL de amostra, 1250µL de solução de carbonato de sódio e 250µL de Folin 1N. Após a mistura, homogeneizaram-se as amostras e transferiu-se para a microplaca. Para a amostra “branco”, seguiu-se o mesmo procedimento substituindo a amostra por água purificada. Todas as amostras foram feitas em duplicata. As amostras

foram lidas em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60) a 750 nm. O conteúdo de compostos fenóis totais nas amostras foi expresso em equivalente de ácido gálico (GAE) utilizando a equação da reta resultante da regressão linear da curva padrão para determinação da composição.

2.3.5 Determinação de teor antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado no Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI) da UFPA, segundo o método adaptado de por Fuleki e Francis (1968). Utilizou-se 1 grama de amostra e 1 ml para os extratos, solução extratora, preparada com etanol 95%: HCl 1,5N (85:15, v/v), na proporção de 1:4. Após maceração e sob refrigeração por 16 horas, na ausência de luz, os extratos foram filtrados. O resíduo lavado repetidamente com o etanol acidificado, até extração completa das antocianinas. A solução resultante foi deixada em 40 repouso por 2 horas, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, para estabilização das formas antociânicas. Posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-visível da SHIMADZU modelo 160-A, selecionando o comprimento de onda 535nm. Para o cálculo da concentração utilizou-se a Equação, proposta por Fuleki e Francis (1968):

$$\text{Antocianinas totais (mg. 100 g}^{-1}\text{ de amostra)} = \frac{\text{Abs. } \lambda_{\text{máx}} \times Fd \times 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (2.5)$$

Onde:

$\text{Abs. } \lambda_{\text{máx}}$ = absorbância no comprimento de onda máximo (535nm).

Fd = Fator de diluição

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (absortividade molar a 535 nm) = 98,2.

2.3.6 Determinação de metais

A determinação de metais na polpa de açaí liofilizada foi realizada no Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LAQUANAM) da Universidade Federal do Pará.

Inicialmente, 0,4 g da amostra foram dissolvidas em 3 mL HNO₃ concentrado mais 2 mL HNO₃ e 1 mL H₂O₂. Após o processo de digestão as amostras foram filtradas e armazenadas e balão volumétrico limpo e sem contaminação para posterior análise.

Para identificação de elementos Ag, Al, B, Ca, Co, Cr, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Si, Sn, Sr, Ti, V e Zn foi utilizado o Espectrofotômetro de Emissão Atômica por Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado Vista Pro (Varian) com configuração axial, equipado com bobina de radio frequência de 40 MHz e sistema de introdução da amostra constituído de nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica (Varian, Austrália). Para decomposição total de amostras foi utilizado sistema de aquecimento de amostras por radiação de microondas DGT 100 da Provecto. Toda água utilizada tinha resistividade mínima de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ e foi fornecida pelo sistema de purificação *Purelab ultra analytical* da Elga, que usou água destilada como alimentação.

Primeiramente, foram elaborados programas analíticos para a determinação de todos os elementos de interesse. O equipamento utilizado dispõe de recursos em seu programa que permitem fazer uma escolha criteriosa das linhas de emissão a serem utilizadas para cada elemento. Utilizou-se o método da curva analítica na determinação dos elementos, através do uso de soluções-padrão multielementar. Os parâmetros operacionais do aparelho são mostrados na Tabela 5.

A seleção dos comprimentos de onda utilizados para cada elemento foi feita de forma a obter a maior altura dos picos e menor interferência espectral com o sinal de outros elementos

Tabela 5. Parâmetros operacionais usados no ICP OES.

Parâmetros	
Potência da rádio-frequência (KW)	1,40
Pressão do nebulizador (Kpa)	180
Fluxo de Argônio do Plasma (L/min.)	15
Fluxo de Argônio auxiliar (L/min.)	0,75
Tempo de introdução da amostra (seg)	40
Tempo de Lavagem (seg)	30
Tempo de estabilização (seg)	15
Tempo de Leitura (seg)	1,00
Velocidade da bomba peristáltica (rpm)	15

Fonte: Varian Ind. & Com. Ltda.

2.4 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

O processo de extração com fluido supercrítico constitui na obtenção de extratos da polpa de açaí liofilizada (fração lipídica) utilizando CO_2 como solvente e da polpa desengordurada (fração de antocianinas) utilizando CO_2 e cossolvente. A figura 9 esquematiza o processo de obtenção dos extratos da polpa de açaí.

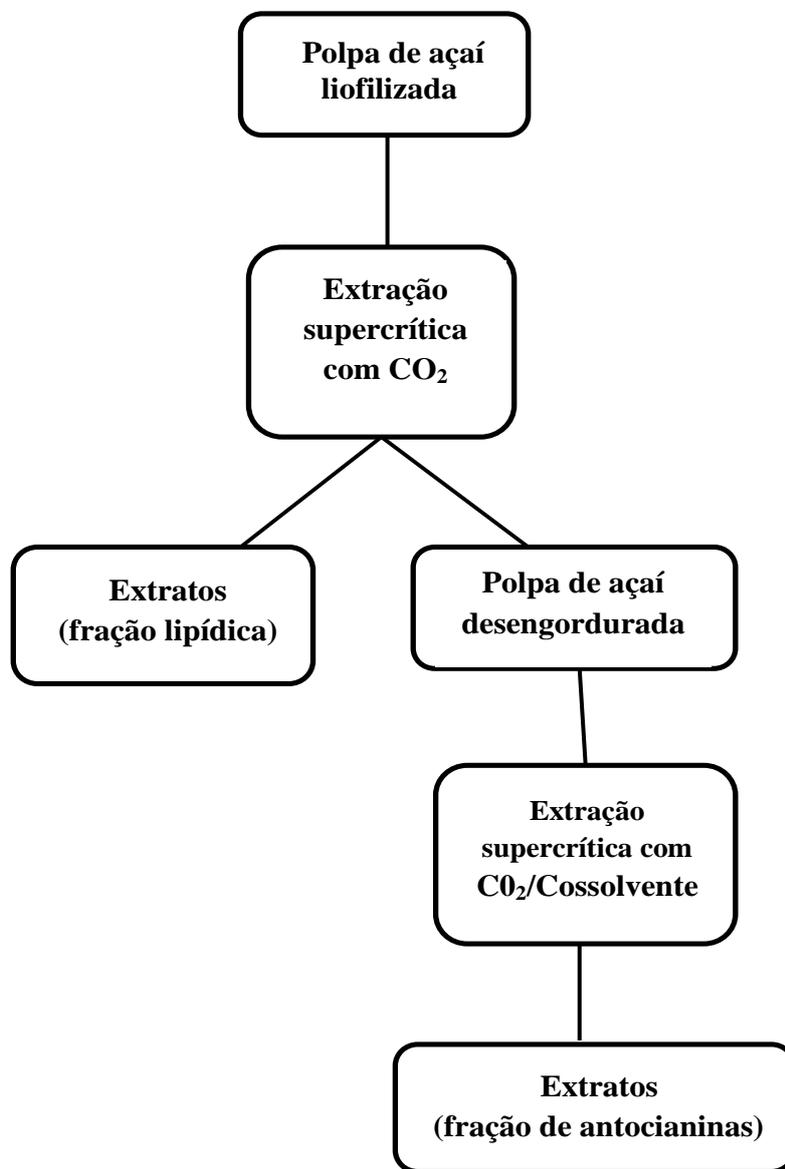


Figura 9. Fluxograma esquemático da obtenção de extratos da polpa de açaí

2.4.1 Extração supercrítica com CO₂

2.4.1.1 Unidade de Extração Supercrítica

Para obtenção dos extratos ricos em ácidos graxos da polpa de açaí foi utilizado a unidade *Spe- ed* SFE (Applied Separations, Inc., Allentown, PA USA, modelo 7071) equipada com recirculador (POLYSCIENCE, F08400796), um compressor (SCHULZ, modelo CSA 7,8), um medidor de vazão de CO₂ na saída do sistema (Alicat Scientific, M5SLPM) e um cilindro de CO₂ (Pureza 99,9%, LINDE). A representação esquemática do sistema de extração supercrítica está representada na Figura 10.

2.4.1.2 Determinação de Isotermas de Rendimento Global

Os experimentos para a determinação das isotermas de rendimento global foram realizados na célula de extração com 1,4 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura. Foram realizadas extrações em três temperaturas (50, 60 e 70°C) combinadas com densidade de CO₂ (ρ_{CO_2}) de 700, 800 e 900 Kg/m³ e pressões que variaram de 150 a 490 bar totalizando nove ensaios que foram replicados. O tempo de processo de extração estático (t_E) e de dinâmico (t_D), a massa de matéria-prima alimentada (F) na célula e a vazão de CO₂ (Q_{CO_2}) foram mantidos constantes. As condições operacionais foram selecionadas fixando densidade e temperatura, e calculando a pressão através do programa *TermoDi* (CARVALHO Jr. *et al*, 2004). Os parâmetros utilizados na determinação das isotermas de rendimento global estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Condições operacionais adotadas para a determinação das isotermas de rendimento global.

Parâmetros	
F (Kg)	0,01
T (°C)	50, 60 e 70
ρ_{CO_2} (Kg/m ³)	700, 800 e 900
P (bar)	150, 190, 220, 270, 320, 350, 420 e 490
Q_{CO_2} (L/min)	3
t_E (min)	30
t_D (min)	210

2.4.1. 3 Procedimento operacional

O procedimento experimental na unidade de extração supercrítica foi padrão para todos os ensaios.

I) Inicialmente ligou-se o banho termostático (R) e esperou-se até atingir a temperatura desejada (-10°C).

II) Ligou-se o compressor (CP).

III) Na unidade *Spe-ed* SFE verificou-se as válvulas de entrada (V3) e saída de CO₂(V4) e de ventilação estavam fechadas e a válvula micrométrica parcialmente fechada (V5).

IV) Conectou-se a coluna de extração (CE) devidamente preparada com a amostra, utilizando-se algodão para evitar a migração de partículas da amostra para os capilares do equipamento e para preencher o volume restante da coluna. Em seguida, observou-se que não havia vazamento de CO₂ no sistema, verificando possíveis vazamentos nos pontos de conexão entre coluna e dutos do equipamento por meio da liberação da entrada de CO₂ no sistema.

V) Ligou-se a unidade *Spe-ed* SFE, iniciou-se a compressão do sistema pela rotação manual da válvula de pressão do ar até atingir o valor da pressão de operação desejada para o sistema. E após, o alcance das temperaturas da válvula micrométrica e do forno programadas, iniciou-se o processo de extração com a abertura da válvula de entrada de CO₂(V3) no sistema.

VI) Aguardou-se 30 minutos, tempo de processo de extração estático, período em que CO₂ solubiliza a substância e estabiliza-se o CO₂ no leito. Logo após o período estático, abriu-se a válvula de saída do CO₂ (V4) bem de vagar para coleta do extrato no frasco, controlando a vazão no painel e fazendo o ajuste na válvula micrométrica.

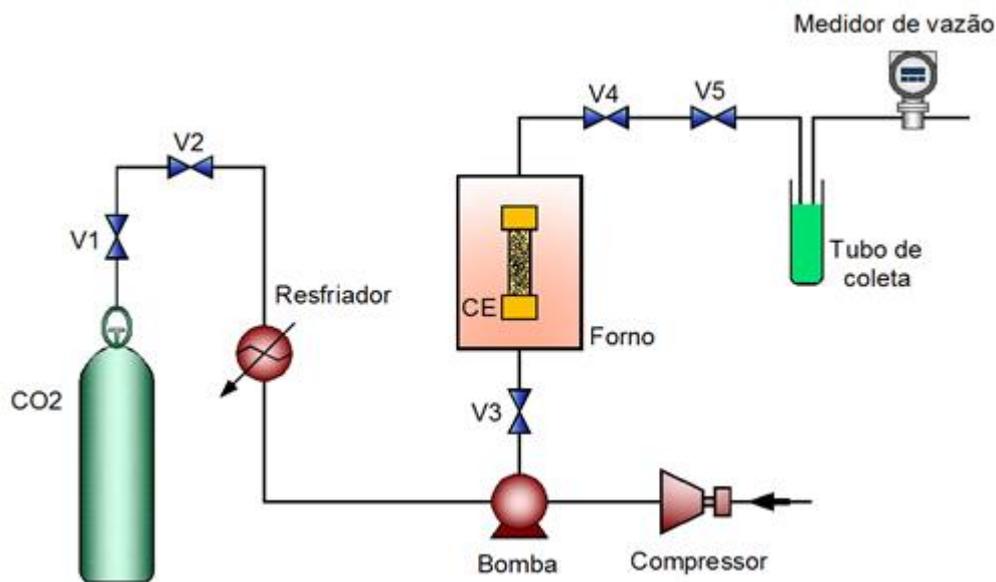


Figura 10. Fluxograma esquemático da unidade de extração *Spe-ed*

2.4.2 Extração supercrítica com CO₂ e cossolvente

As extrações utilizando CO₂ e cossolvente foram realizadas com matriz vegetal obtida após extração com CO₂ supercrítico (polpa desengordurada). Utilizou-se a unidade *Spe-ed* SFE (Applied Separations, Inc., Allentown, PA USA, modelo 7071) descrita no item 4.4.1.1 equipada com bomba de cossolvente (Series 1500). A representação esquemática do sistema de extração está representada na Figura 11. Os ensaios de extração foram realizados na célula de extração de 1,4 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, com massa de alimentação de 5 gramas. A temperatura utilizada foi de 50°C, e pressões de 220 bar e 350 bar, estas condições operacionais foram selecionadas a partir dos estudos preliminares na extração supercrítica com CO₂, condições satisfatórias de extração da fração lipídica e consequentemente conservação e concentração das antocianinas na polpa.

Os cossolventes utilizados foram água, etanol e etanol/água (1:1), a relação de CO₂ e cossolvente foi de 80:20 (v/v). Os solventes foram selecionados de acordo com estudos prévios de extração de antocianinas por extração com fluidos supercríticos (CALVANCANTI, 2012; PAULA et al, 2012; PAES et al., 2012). A vazão volumétrica de CO₂ (3L/min) e cossolvente (0,8 mL/min) foram mantidos constantes.

2.4.2.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental na unidade de extração supercrítica foi padrão para todos os ensaios, como descrito no item 2.4.1.3. Realizou-se a purga na bomba de cossolvente para evitar bolhas de ar no sistema. Após o alcance das temperaturas da válvula micrométrica e do forno programadas, iniciou-se o processo de extração ligando a bomba de cossolvente com a vazão previamente programada, e com a abertura da válvula de entrada de CO₂ (V3) no sistema.

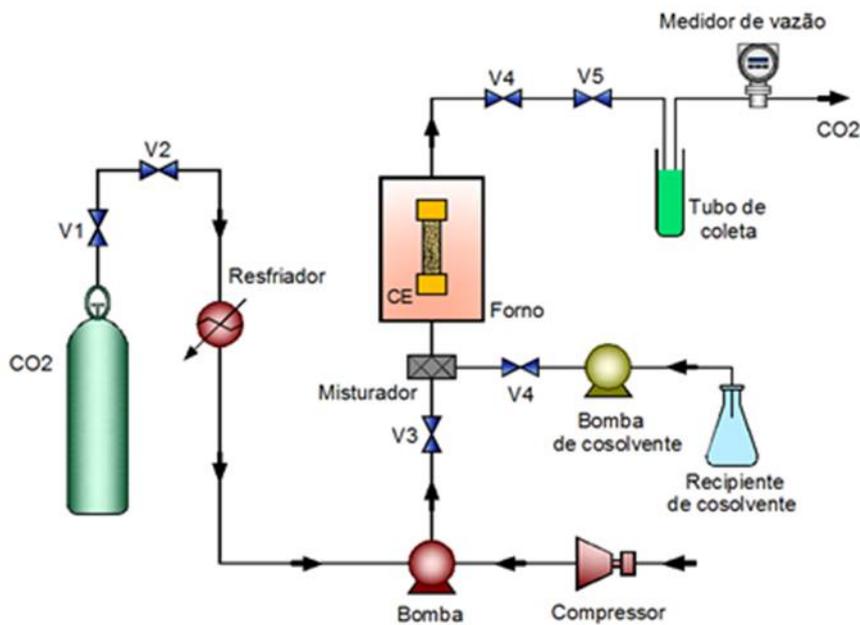


Figura 11. Fluxograma esquemático da unidade de *Spde-ed* equipada com bomba de cossolvente.

2.5 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

O rendimento da extração (X_o), em percentual, foi calculado pela relação massa do extrato (M_{ext}) e massa de alimentação da matéria prima (F) em base seca, conforme a equação 2.6 :

$$X_o(\%) = \frac{M_{ext}}{F} \times 100 \quad (2.6)$$

2.6 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS DA EXTRAÇÃO SUPERCRTICA COM CO₂

A composição em ácidos graxos dos extratos obtidos da polpa de açaí liofilizada a partir da extração supercrítica com CO₂ foi determinada pela conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) de acordo com o método proposto por Rodrigues *et al.* (2010), utilizando para análise um 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 (splitratio 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.

2.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO COM CO₂

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Agropecuária da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Belém/PA.

Para condução dos experimentos foram utilizadas como espécies receptoras, as plantas daninhas: *Mimosa pudica* (malícia) e *Senna obtusifolia* (Mata-pasto). As sementes foram coletadas em áreas de produtores, no município de Terra Alta, Estado do Pará. As sementes passaram por processo de limpeza, foram acondicionadas em sacos de papel e tratadas com ácido sulfúrico para superação da dormência, com imersão por 20 minutos para o Mata-pasto e 15 minutos para a Malícia. Ao final de um período de 6 dias de crescimento, mediu-se o comprimento da radícula e do hipocótilo para determinar a variação de desenvolvimento.

Na germinação das sementes, o bioensaio foi realizado em câmara tipo BOD, em condições controladas de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, com monitoramento por três dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Consideraram-

se sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular de 2.00 mm. Cada placa de Petri de 9,00 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel filtro qualitativo recebeu 20 sementes, conforme proposto por Sousa Filho et al., (2009).

Os bioensaios para o estudo do potencial fitotóxico no alongamento da radícula e do hipocótilo foram realizados em condições de 25 °C de temperatura e fotoperíodo de 24 horas. Foram usadas duas sementes pré-germinadas, com três dias de germinação, adicionadas em placas de Petri (uma espécie em cada placa). Ao final de um período de 6 dias de crescimento, mediu-se o comprimento da radícula e do hipocótilo para determinar a variação de desenvolvimento.

Para todos os bioensaios, os extratos supercríticos foram avaliados na concentração de 1% (m/v), utilizando como veículo de dispersão n-Hexano. Foram adicionados em cada placa de Petri 3,0 mL de solução dos extratos supercríticos. Após a evaporação do solvente, adicionou-se 3,0 mL de água destilada e, durante o período, foi adicionada água destilada sempre que necessário.

2.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E TEOR DE ANTOCIANINAS NA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA

A determinação de concentração de compostos fenólicos e teor de antocianinas totais na polpa de açaí desengordurada foram determinados segundo metodologias descritas no item 2.3.4 e 2.3.5, respectivamente.

2.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA

A caracterização micrografica foi realizada usando um microscópio eletrônico de varredura TM 3000 tabletop microscope. O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação. Esta técnica é aplicada diretamente sobre a amostra, baseia na luz, monocromática e de determinada frequência, espalhada ao incidir sobre o material a ser estudado. A amostra analisada foi a polpa obtida após extração supercrítica a 50°C/350 bar.

2.10 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO

A determinação das curvas globais de extração foi realizada na célula de 1,4 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura a unidade de extração *Spe-ed* SFE descrita no item 2.4.1.1, nas condições de extração de 220 e 350 bar para temperatura de 50°C, no visando que menores valores de pressão e temperatura proporcionam menores custos de manufatura, além do fato de que uma menor temperatura implica em menor degradação térmica dos compostos. O tempo estático e dinâmico foi mantido, coletando-se amostras em três intervalos de 10 min, três intervalos de 20 min e cinco intervalos de 30 min. A vazão volumétrica foi de CO₂ foi de 3L/min.

Durante os experimentos, os frascos de coleta de extratos foram substituídos por frascos limpos e previamente tarados para a determinação da massa de extrato coletada por tempo até o fim da extração. Por fim, as curvas de extração foram construídas relacionando rendimento acumulado de extrato em função do tempo.

2.10.1 Cálculo de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos do período de taxa de extração constante (CER): taxa de transferência de massa do período CER (M_{CER}), a duração do período CER (t_{CER}) e período de taxa decrescente de extração (t_{FER}) foram calculados através do aplicativo computacional desenvolvido por Santos (2007) e validado por Santana (2013).

O aplicativo consiste em uma planilha de cálculo em Excel com uso da função PROJ.LIN para a determinação do ponto de encontro das retas associado a um algoritmo implementado em Visual Basic para Aplicações no Excel (VBA) para a busca exaustiva (entre o tempo de extração zero até o tempo final) dos melhores t_{CER} e t_{FER} (para três retas), obedecendo ao critério do algoritmo de encontrar o melhor coeficiente de correlação obtido pela função PROJ. LIN.

O aplicativo de três retas ajusta em um spline de três retas as curvas de extração onde a intersecção entre as duas primeiras retas determina o término do período CER (t_{CER}) e a intersecção entre a segunda e a terceira reta determina o final do período FER (t_{FER}), onde a partir deste ponto se inicia a etapa difusional. Para a utilização do aplicativo é necessário fornecer informações experimentais como a vazão de solvente, massa de

alimentação, os intervalos de tempo de coleta do produto e as massas acumuladas em cada tempo (SANTANA, 2013).

2.11 MODELAGEM MATEMÁTICA

Os modelos matemáticos de Tan e Liou (1989), Goto et al. (1993) e Martinez et al. (2003) foram aplicados aos dados experimentais da extração supercrítica com CO₂ da polpa de açaí. O ajuste do modelo foi realizado com auxílio do aplicativo computacional desenvolvido em Excel por Santos (2007) e validado por Santana (2013) para a determinação dos parâmetros dos modelos de transferência de massa. O aplicativo utiliza a função SOLVER, que usa o código de otimização não linear de gradiente reduzido genérico (GRG2).

Foram utilizados os seguintes parâmetros estatísticos para análise da modelagem matemática: erro relativo (e), erro médio relativo (E_m), desvio padrão (R) e faixa de erro (S), representados pelas equações 2.7 a 2.10

$$e = \frac{m_{cal} - m_{exp}}{m_{ext\ total}} \quad (2.7)$$

$$E_m = \frac{1}{N} \sum_i e \quad (2.8)$$

$$R = e_{max} - e_{min} \quad (2.9)$$

$$S = \left[\frac{1}{N-1} \sum_i (e - E_m)^2 \right]^{1/2} \quad (2.10)$$

Onde:

e : Erro relativo;

m_{cal} : Massa calculada;

m_{exp} : Massa medida experimentalmente;

$m_{ext\ total}$: Massa extraída total;

E_m : Erro máximo;

N : Número de pontos;

e_{max} : Erro máximo;

e_{min} : Erro mínimo.

Para a sua aplicação a curvas experimentais, cada modelo exige uma série de parâmetros de processo que devem ser obtidos experimentalmente ou estimados.

Na modelagem do modelo Tan e Liou (1989), os parâmetros necessários são: porosidade do leito (ϵ), rendimento global (X_0), densidade do sólido (ρ_r), densidade do solvente (ρ_{sol}), vazão de solvente (Q), altura do leito (H_B) e área superficial (S). No modelo Goto et al. (1993) são: porosidade do leito, rendimento global, densidade do sólido, densidade do solvente, vazão de solvente, área superficial, volume do leito, e massa de matéria-prima (F). Para Martínez et al. (2003), considerando o extrato como um único pseudocomposto, são necessários os seguintes parâmetros: rendimento global e massa de matéria-prima usada. Os parâmetros ajustáveis para cada modelo foram os seguintes:

- Modelo de Tan e Liou (1989): K_d que é o coeficiente de dessorção.
- Modelo de Goto et al. (1993): o coeficiente global de transferência de massa (φ) e a constante de equilíbrio de dessorção (k).
- Modelo de Martinez et al. (2003), b_i e t_{mi} , são parâmetros ajustáveis do modelo.

CAPÍTULO 3 –RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1.1 Biometria dos frutos

A tabela 6 apresenta os resultados da biometria dos frutos de açaí onde se observa as médias e os respectivos desvios padrões das medidas de massa (m), diâmetro (ϕ) e comprimento (L). A média dos resultados obtidos neste trabalho estão próximos aos parâmetros biométricos encontrados por Almeida *et al.* (2011) para frutos de açaizeiro (*Euterpe Oleracea* Mart.) cultivados no município de Areia (Paraíba-Brasil), e acima de valores encontrados por Moraes et al. (2015) para frutos de um plantio em Porto Velho (Rondônia-Brasil) .

Tabela 6. Caracterização física dos frutos de açaí

Característica	Neste trabalho	Almeida et al., (2011)	Moraes et al., (2014)
m (g)	1,96± 0,49	2,14	1,29
ϕ (cm)	1,52 ±0,11	1,51	1,30
L (cm)	1,37±0,12	1,32	1,46

3.4.2 Composição centesimal, o teor de umidade, compostos fenólicos e antocianinas totais

A composição centesimal, o teor de umidade, compostos fenólicos e antocianinas totais da polpa de açaí liofilizada encontram-se dispostos na Tabela 7. Os resultados indicam que a polpa de açaí possui elevado valor nutricional contendo altos teores de lipídios, carboidratos e proteínas.

Os teores de proteínas, lipídeos e cinzas obtidos da polpa de açaí liofilizada são similares aos reportados por Rogez (2000) e Menezes et al. (2008). Para o teor de umidade, este é inferior ao relatado por Menezes (2008). Contudo, o baixo teor de água

na matéria-prima facilita a extração supercrítica de compostos apolares utilizando CO₂ como solvente. Segundo MEIRELES (2006), a água, apesar de ser muito utilizada como cossolvente em alguns processos para a extração de alcalóides e glicosídeos, interfere de forma negativa na extração de substâncias lipídicas. Portanto, quando se opta pela extração supercrítica, umas das primeiras etapas do processo é a redução da umidade da matriz biológica, em geral, a umidade da matriz biológica não deve ser superior a 18%.

Tabela 7. Composição, teor de umidade, compostos fenólicos e antocianinas totais na polpa de açaí liofilizada.

Composição	Neste trabalho*	Rogez (2000)	Menezes et al.(2008)*	Cohen et al. (2009)*
Umidade (%)	2,8 ±0,02	---	4,92±0,12	---
Proteínas (%)	8,93 ±0,38	13	8,13±0,63	19,69±0,23
Lipídios (%)	45,37±0,71	52,64	40,75±2,75	40,92±0,42
Cinzas (%)	3,20±0,03	3,09	3,68±0,63	0,19±0,01
Fibras totais (%)	10,05± 0,22	25,22	----	---
Carboidratos (%)	30,1±0,16	---	----	---
Compostos fenólicos (mg/100g)	5520 ± 1,03	---	----	---
Antocianinas totais (mg/100 g)	96,58±0,11	1020	----	45,31±0,82

*resultados expressos em média ±desvio padrão (em base seca)

3.4.3 Determinação de metais

O resultado da determinação de metais na polpa de açaí liofilizada pode ser observado na Tabela 8. O metal presente em maior quantidade foi o potássio com concentração de 22,69 ± 0,71 µg/g, em seguida, o manganês, magnésio e cálcio, com concentrações de 7,69 ± 0,24; 6,49 ± 0,21 e 6,13 ± 0,19 µg/g, respectivamente. O teor de metais contaminantes em alimentos, como Cobre, Chumbo e Estanho, estão abaixo dos limites máximos recomendados pela legislação brasileira.

Tabela 8. Determinação de metais na polpa de açaí liofilizada

Macroelementos	Média (µg/g)
Potássio	22,69 ± 0,71
Cálcio	6,13 ± 0,19
Magnésio	6,49 ± 0,21
Manganês	7,69 ± 0,24
Fósforo	4,14 ± 0,23
Sódio	1,47 ± 0,15
Microelementos	Média (µg/g)
Alumínio	0,23 ± 0,13
Boro	0,01 ± 0,01
Cobre	0,0276 ± 0,002
Níquel	0,008 ± 0,006
Chumbo	0,02 ± 0,01
Silício	0,38 ± 0,09
Estanho	0,11 ± 0,08
Estrôncio	0,02 ± 0,004
Titânio	0,01 ± 0,001
Vanádio	0,007 ± 0,001
Zinco	0,15 ± 0,008

3.4.4 Diâmetro médio das partículas, Densidade real, Densidade aparente e Porosidade do leito

A determinação de parâmetros característicos da matéria prima, como diâmetro médio das partículas, densidade e porosidade do leito, é importante para auxiliar no desenvolvimento da pesquisa, e em especial, no entendimento do comportamento do fluido supercrítico junto à matriz vegetal. A tabela 9 apresenta os parâmetros característicos do processo de extração com fluido supercrítico da polpa de açaí liofilizada.

Tabela 9. Parâmetros característicos do processo de extração com fluido supercrítico da polpa de açaí liofilizada

Parâmetro	
Diâmetro da partícula (m)	$8,66 \times 10^{-4}$
Densidade real da partícula (Kg/m^3)	1230 ± 0.01
Densidade aparente do leito (Kg/m^3)	246
Porosidade do leito (-)	0,8

A representação gráfica da distribuição granulométrica da polpa de açaí liofilizada é apresentada na Figura 12.

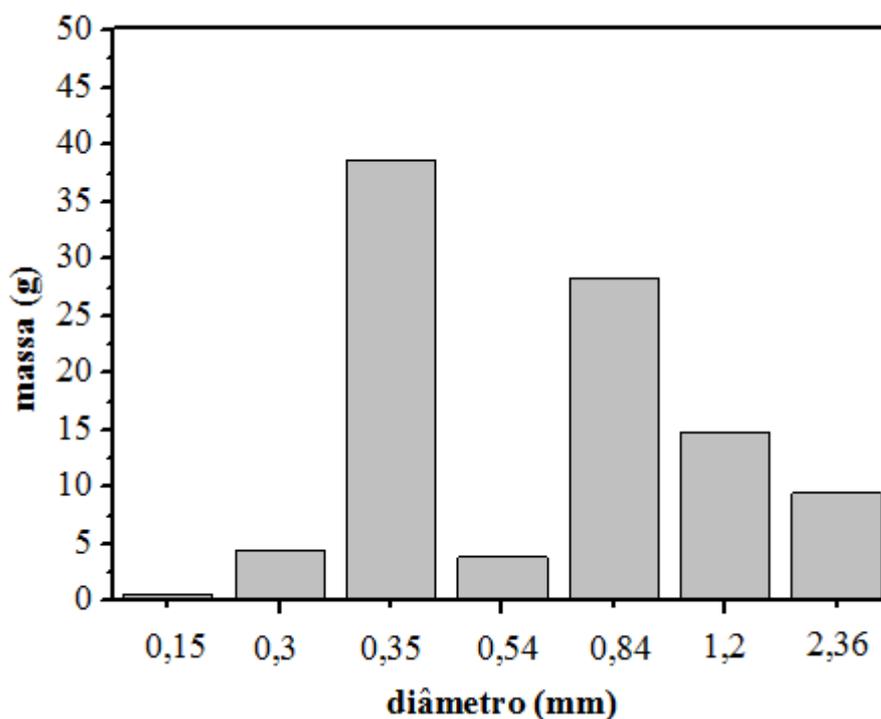


Figura 12. Distribuição de tamanho de partículas da polpa de açaí liofilizada

O valor médio do diâmetro da partícula, densidade real da partícula, densidade aparente do leito e porosidade do leito de extração estão apresentados na Tabela 9. O diâmetro de partícula da polpa de açaí liofilizada foi $8,66 \times 10^{-4}$ m (aproximadamente 0,87 mm). De acordo com REVERCHON & MARCO (2006), em regra, utilizam-se as partículas com diâmetros médios variando de aproximadamente entre 0,25 e 2,0 mm. O tamanho médio de partículas tem um papel importante nos processos de extração

controlada pelas resistências internas à transferência de massa, uma vez que o tamanho médio de partícula relativamente pequeno reduz o comprimento de difusão do solvente.

3.5 ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL

Na Figura 13 estão apresentados os resultados obtidos experimentalmente das Isotermas de rendimentos globais para as temperaturas de 50, 60 e 70°C, com seus respectivos desvios pontuais. Pode-se observar que o maior rendimento foi obtido na condição experimental de 70 °C e 490 bar, enquanto que o menor rendimento foi obtido na condição de 60°C e 190 bar, que correspondem a 45,4±0,58% e 9,07±0,6 %, respectivamente.

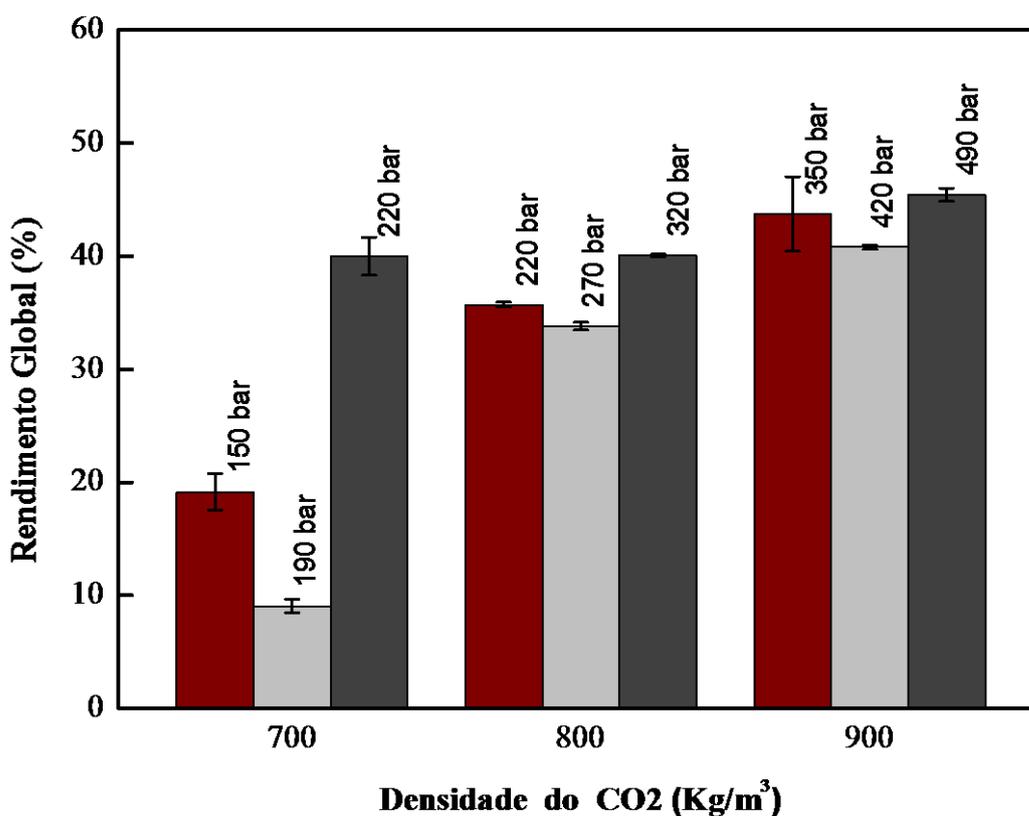


Figura 13. Isotermas de rendimento global. Isotermas: (■) 50 °C, (■) 60 °C e (■)70 °C

A isoterma de 70°C foi a que apresentou maior rendimento para todas as pressões aplicadas enquanto a isoterma de 60°C foi a que apresentou menor rendimento.

A influência da temperatura no rendimento das extrações apresentou um efeito complexo, pois o rendimento da extração diminuiu com o aumento da temperatura de 50 a 60°C, e aumentou com o aumento da temperatura para 70°C.

À pressão constante e com o aumento da temperatura a volatilidade dos componentes aumenta e a densidade do solvente diminui. Enquanto que a temperatura constante e com o aumento da pressão a densidade do solvente aumenta. A tendência predominante de um destes efeitos (densidade e pressão de vapor) caracteriza o fenômeno de retrogradação que pode ser visualizado nas isotermas de extração supercrítica. Com intuito de verificar a ocorrência do fenômeno de retrogradação na extração supercrítica de componentes da polpa de açaí, plotou-se o gráfico pressão versus rendimento, Figura 14.

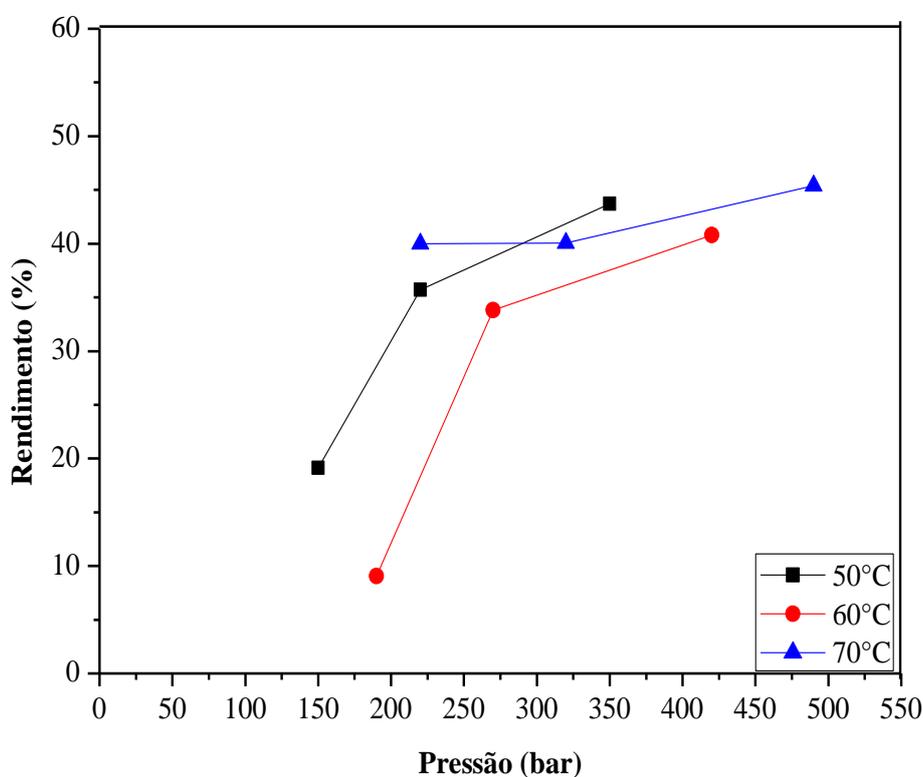


Figura 14. Pressão versus rendimento para isotermas

Nas faixas de temperatura avaliadas foi possível observar o fenômeno de inversão entre 220 bar até 350 bar, para as isotermas de 50 e 70 °C, onde ocorreu uma

diminuição no rendimento da extração com o aumento da temperatura e o efeito da densidade do solvente tem maior relevância que o efeito da pressão de vapor.

O efeito da temperatura e pressão influencia diretamente na densidade e, conseqüentemente, no poder de solubilização do solvente. Os resultados indicam que o aumento na densidade do dióxido de carbono acarreta um aumento no rendimento global de extrato em todas as condições experimentais estudadas. Portanto, analisando os efeitos dos parâmetros da extração, temperatura, pressão, a densidade de CO₂ sobre os rendimentos de extração, observou-se que a densidade foi o efeito que mais prevaleceu.

3.6 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO COM CO₂

O perfil de ácidos graxos dos extratos de polpa de açaí liofilizada obtidos através de extração com dióxido de carbono no estado supercrítico em diferentes condições operacionais está apresentado na Tabela 11. O desvio padrão para todos os ácidos graxos foi menor que 1.8%. A quantidade total de ácidos graxos nos extratos de açaí variou de 0.02 a 65.81%.

Na tabela 11 observou-se a presença de ácido caprílico (C8:0) em todas as condições experimentais utilizadas para obter o extrato de açaí. A condição 320 bar/70°C apresentou maior concentração de ácido caprílico enquanto a menor concentração foi encontrada na condição de 490 bar/70°C. Traços de ácido cáprico (C10:0) foi obtido nas condições de 150 bar/50°C, 220 bar/70°C, 320 bar/70°C e 490 bar/70°C. Para o ácido tridecanoico (C13:0), ácido pentadecanoico (C15:0) e ácido linolênico (C18:3) apenas traços foram encontrados em todas as condições experimentais.

Tabela 10. Composição em ácidos graxos

Concentração de Ácidos Graxos em % g/100mg									
Ácidos Graxos	50°C, 150	50°C, 220	50°C, 350	60°C, 190	60°C, 270	60°C, 420	70°C, 220	70°C, 320	70°C, 490
	bar								
C8:0	0.69	1.26	0.83	0.77	1.58	0.40	0.33	2.27	0.02
C10:0	-----	0.03	0.02	0.02	0.04	0.03	-----	-----	-----
C12:0	0.07	0.17	0.17	0.13	0.19	0.25	0.07	0.33	0.14
C13:0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.02	0.21	-----
C14:0	0.13	0.24	0.16	0.19	0.21	0.30	0.13	0.42	0.18
C15:0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C16:0	28.15	30.91	23.47	26.29	29.20	28.58	25.41	90.86	27.81
C16:1	4.95	0.03	5.49	6.14	7.08	6.83	4.16	0.08	5.81
C17:0	-----	0.04	0.14	0.03	-----	-----	0.05	0.19	0.03
C18:0	1.05	1.25	1.02	0.80	1.14	1.16	1.43	5.35	1.33
C18:1	64.86	65.81	52.73	50.78	60.42	62.41	55.71	0.23	64.65
C18:2	-----	-----	15.54	14.80	-----	-----	12.59	-----	-----
C18:3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C20:0	0.08	-----	-----	-----	0.10	-----	-----	-----	-----
C22:0	-----	0.22	0.38	-----	-----	-----	0.04	-----	-----
SFA	30.18	34.15	26.22	28.25	32.48	30.74	27.53	99.67	29.53
MUFA	69.81	65.84	58.23	56.93	67.51	69.25	59.87	0.32	70.46
PUFA	-----	-----	15.54	14.80	-----	-----	12.59	-----	-----

C8:0 (ácido caprílico); C10:0 (ácido capríco); C12:0 (ácido láurico); C13:0 (ácido tridecanoíco); C14:0 (ácido míristico); C15:0 (ácido pentadecanoíco); C16:0 (ácido palmítico); C16:1 (ácido palmitoleíco); 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).

O principal ácido graxo saturado (SFA) em todas as condições de extração foi o ácido palmítico (C16:0), seguido pelo ácido esteárico (C18:0). Em relação aos ácidos graxos insaturados, o ácido oleico (C18:1) apresentou maior concentração 65.81% seguido pelo linoleico (C18:2) e o ácido palmitoleico (C16:1). Análises do perfil de ácidos graxos de extrato de açaí indicam uma razão de saturado/insaturado baixo e a quantidade de MUFA é maior que a de PUFA.

Os resultados encontrados neste trabalho para o ácido oleico são próximos aos encontrados por Nascimento et al., (2008) e Monteiro (2011) que obtiveram 52% e 58.2%, respectivamente, com exceção do extrato obtido nas condições de 320 bar/70°C, no qual o percentual desse ácido foi de 0.23%, sendo que nessas condições operacionais observou-se maior concentração de ácido palmítico (90.86%), onde possivelmente pode ter ocorrido erro experimental.

Considerando os resultados reportados na literatura, é possível que para esta condição, a amostra tenha sofrido processo de degradação provavelmente relacionada às condições de armazenamento, pois os ácidos graxos que apresentam polinsaturações são mais propensos a processos oxidativos, principalmente aqueles com proporções variáveis dos ácidos oleico, linoleico e linolênico. Em dados reportados por Santos (2014), onde analisa a composição de ácidos graxos da torta de açaí por extrações por solvente, fluído supercrítico e *bligh dyer*, também obteve maior concentração de ácido palmítico em suas amostras e a média dos valores de compostos saturados obtidos nos três processos de extração foi maior que 90%, e comparando seus resultados com de outros autores o autor atribui o fato ao processo de degradação do material durante o armazenamento.

Nascimento et al. (2008) avaliou a composição em ácidos graxos da fração lipídica da polpa de açaí pelo processo enzimático e por extração com n-hexano. Em ambos os casos houve predominância de ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poliinsaturados, e na composição em ácidos graxos não houve diferença significativa. Diferentemente dos resultados obtidos pelo autor, neste trabalho, em alguns casos, verifica-se uma variância significativa na composição dos ácidos graxos, o que é comum na extração supercrítica avaliando diferentes condições de operação, uma vez que o processo extrair seletivamente na ordem de solubilidade de ácidos graxos.

No intuito de verificar o efeito da densidade de CO₂ da extração supercrítica na concentração dos ácidos graxos majoritários dos extratos, o ácido oleico, ácido palmítico e ácido palmitoleico, plotou-se gráfico de composição de ácidos graxos versus densidade de CO₂ para cada temperatura.

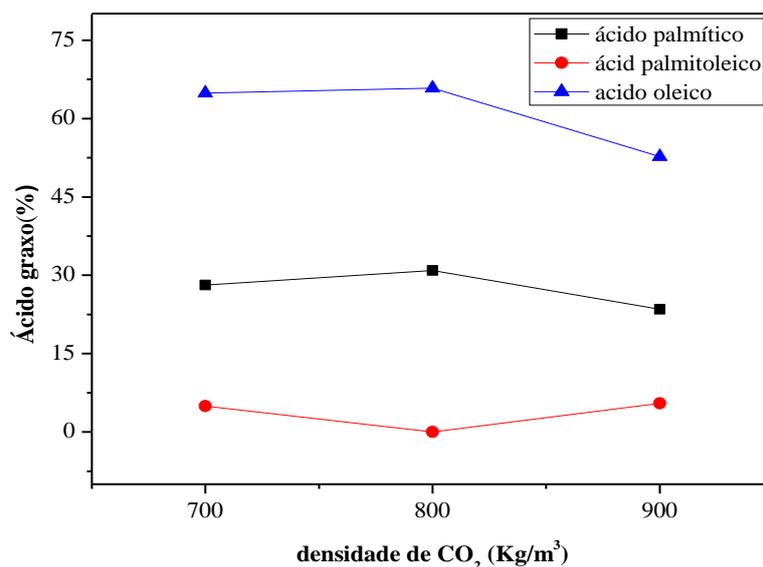


Figura 15. Variação na porcentagem de ácido oleico, ácido palmítico e ácido palmítoleico com aumento da densidade de CO₂ para temperatura de 50°C

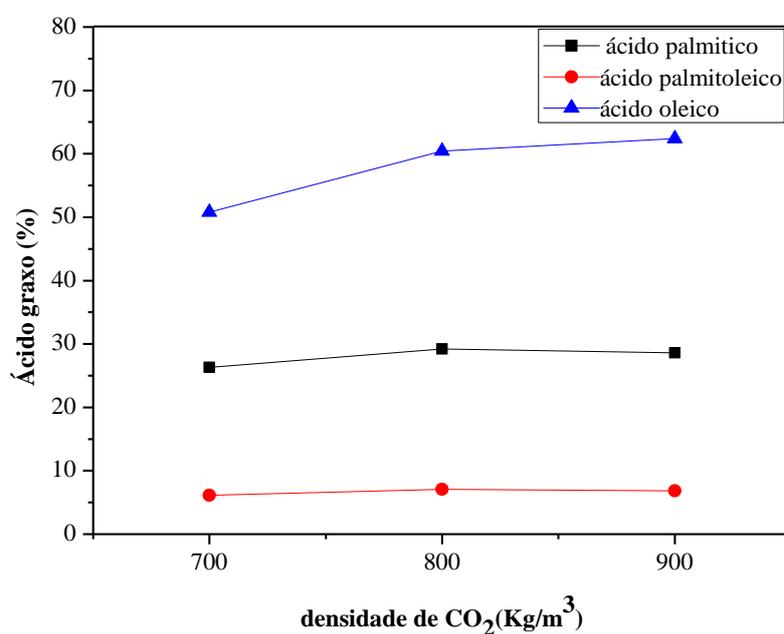


Figura 16. Variação na porcentagem de ácido oleico, ácido palmítico e ácido palmítoleico com aumento da densidade de CO₂ para temperatura de 60°C.

Considerando as diferentes densidades de CO₂ utilizadas na extração supercrítica a 50°C da polpa de açaí liofilizada, é possível observar, através da Figura 15, que aumento da densidade de 700 Kg/m³ para 800 Kg/m³ acarreta acréscimo na

porcentagem de ácido oleico e palmítico, no entanto, o aumento da densidade de 800 Kg/m³ para 900 Kg/m³ na temperatura de 50°C ocorre uma diminuição na concentração desses ácidos. Com a concentração do ácido palmitoleico para esta temperatura, o efeito é inverso.

Diferentemente como ocorre na temperatura a 50°C, observando a Figura 16, para a temperatura de 60°C, é possível afirmar que ocorre um aumento nas porcentagens dos ácidos majoritários com ou aumento da densidade de CO₂.

3.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS

Observou-se que todas as condições supercríticas estabelecidas para obtenção do óleo de *E. oleracea* apresentaram potencial para inibir a germinação de sementes de *M. pudica*, sendo aquela com menor potencial fitotóxico a que envolveu a combinação de pressão de 220 bar e temperatura de 50°C, a qual proporcionou inibição da ordem de 25,33% e os com maior potencial foram aqueles obtidos à pressão e temperaturas de 190 bar/60°C e °C que evidenciaram 57,78% e 60% de inibição respectivamente como se pode observar na Figura 17. Esses resultados indicam que a variação na pressão foi mais determinante para os efeitos observados do que a variação da temperatura, embora o aumento da pressão, em alguns casos, não tenha correspondido a aumentos na intensidade de inibição.

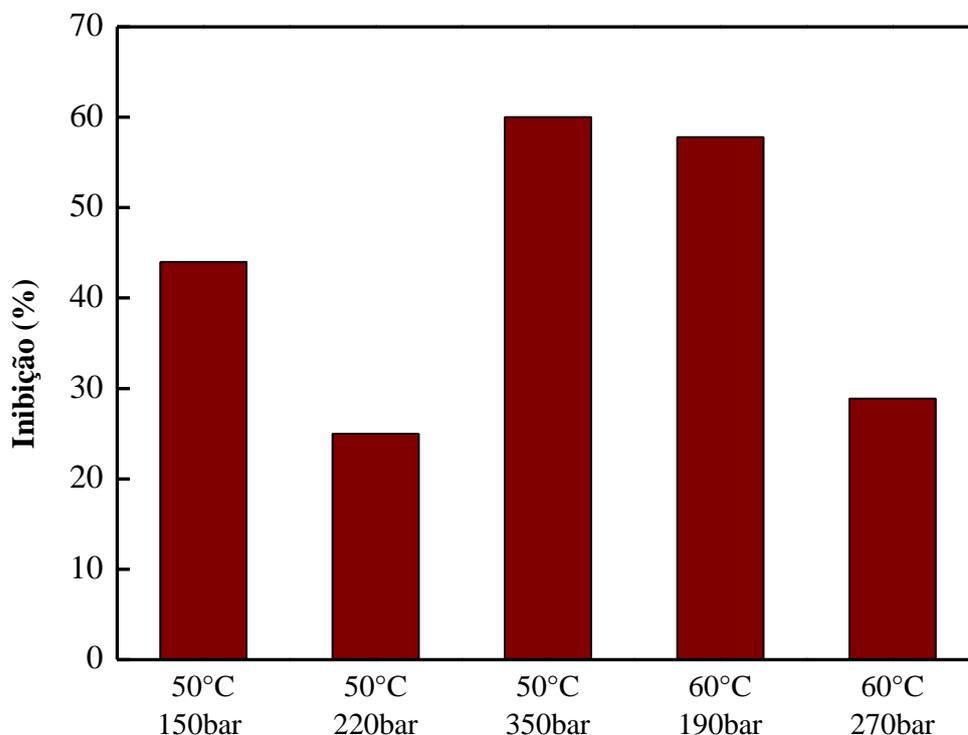


Figura 17. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre a germinação de sementes de *Mimosa pudica* (malícia). Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha. Efeito Inibitório: (■)

Os efeitos promovidos pelos extratos sobre a germinação de *S. obtusifolia* foram diferentes daqueles verificados para *M. pudica* (Figura 18). Os resultados demonstraram que apenas os extratos obtidos nas condições supercríticas de temperatura e pressão de 50°C/220 bar e 50°C/350 bar revelaram atividade inibitória da germinação sendo essas de 11,53% e 5,76% respectivamente, os demais extratos promoveram efeito estimulatório para a germinação de *S. obtusifolia* sendo o extrato obtido em 50°C e 150 bar o que teve o maior efeito estimulatório com 13,46%. Os efeitos podem assumir características distintas, como efeito estimulatório e efeito fitotóxico em algumas espécies de vegetais, sendo que a manifestação de tais efeitos pode estar relacionada à concentração de teste (RICE, 1984; AN & LOVETT, 1993; BATISH, 2008).

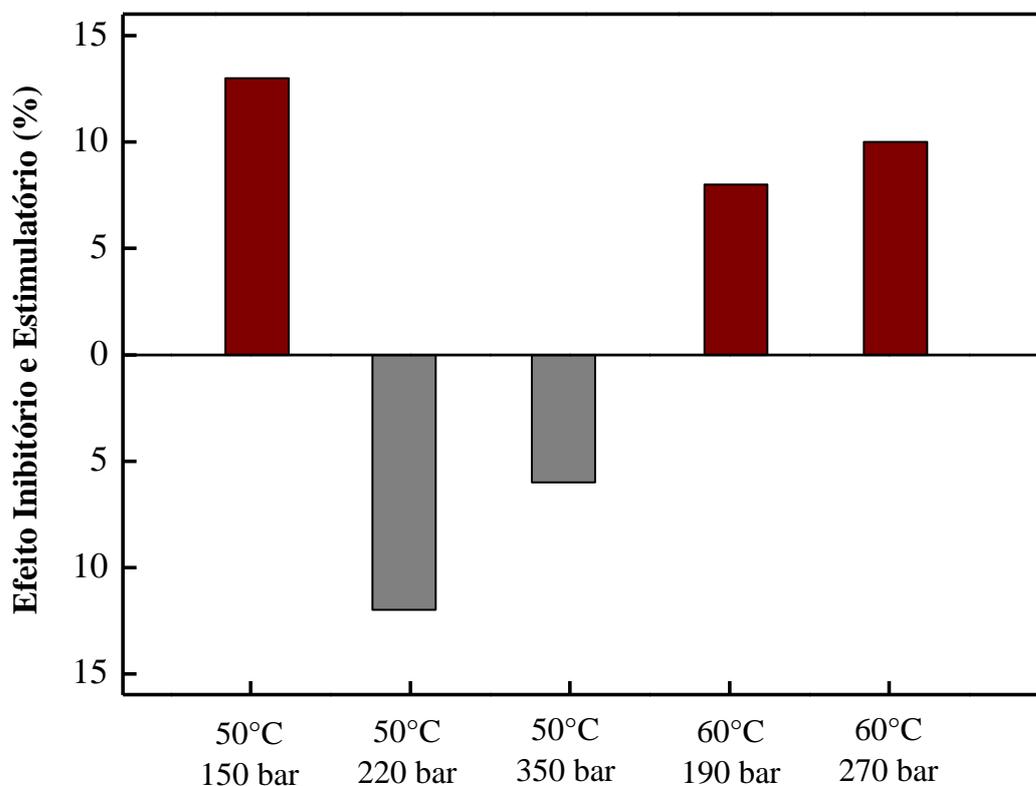


Figura 18. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açai sobre a germinação de sementes de *Senna obtusifolia* (mata-pasto). Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha. (■) Efeito Estimulatório e (■) Efeito Inibitório.

As análises cromatográficas realizadas nos diferentes extratos demonstraram que há semelhança na composição de ácidos graxos, no entanto existem outros metabólitos secundários que não foram identificados que também podem estar associados à fitotoxicidade dos extratos e ao efeito estimulatório para as diferentes sementes analisadas.

Para González et al. (2002), o processo de germinação é desencadeado após as sementes serem saturadas em água. Algumas substâncias são capazes de inibir ou retardar a proliferação ou crescimento das células. Ao analisar o alongamento radicular para as espécies *S. obtusifolia* e *M. pudica*, nos diferentes extratos, observou-se menor efeito inibitório para os extratos obtidos nas condições de temperatura e pressão de 50°C a 150 bar e 60°C a 270 bar respectivamente, demonstrando a baixa sensibilidade dessas espécies quando expostas as moléculas bioativas presentes nos extratos, no entanto, ambas as espécies estudadas tiveram maior sensibilidade para o extrato obtido na condição de temperatura e pressão de 50°C a 350 bar, com valores de 0,48 cm e 0,98 cm de alongamento radicular de *M. pudica* e *S. obtusifolia* respectivamente como pode ser observado na Figura 19. Entretanto, as inibições máximas foram extremamente

baixas o que denota que os compostos químicos presentes nos extratos supercríticos apresenta baixa capacidade fitotóxica, especificamente para inibir o alongamento da radícula. Comparativamente, a tendência foi de o alongamento da radícula de *S. obtusifolia* ser inibido com mais intensidade do que *M. pudica*.

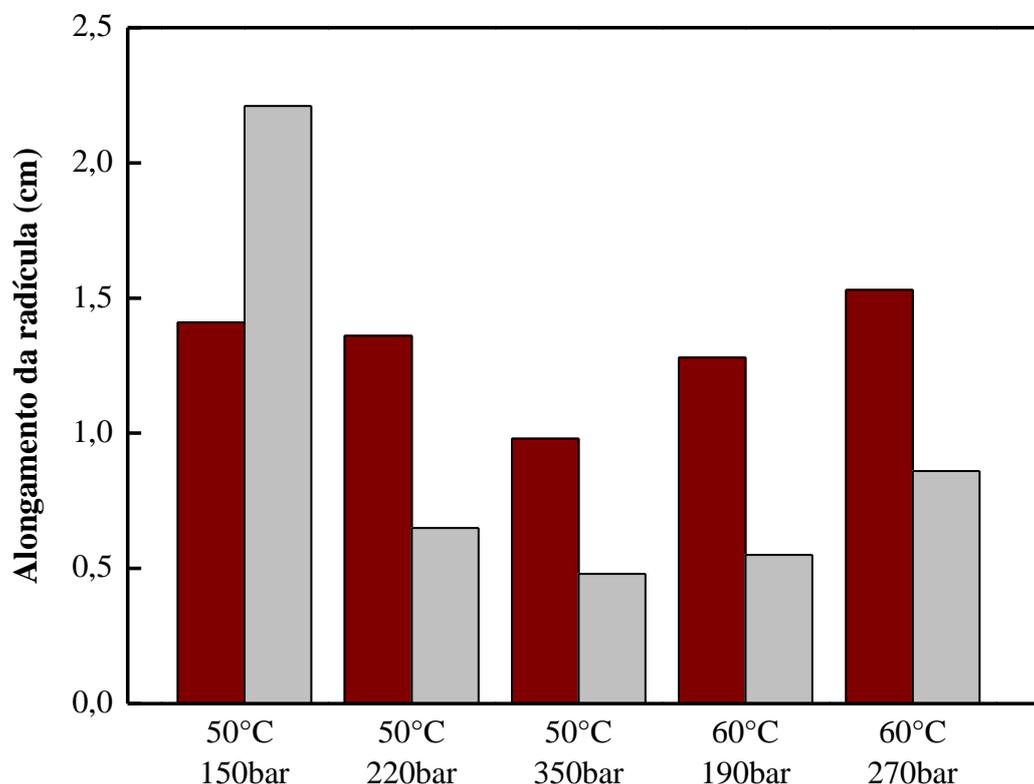


Figura 19. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre o alongamento da radícula de *S. obtusifolia* (■) e *M. pudica* (■). Os dados expostos são expressos em centímetros.

Os extratos evidenciaram baixo potencial para inibição do alongamento do hipocótilo, embora diferença entre as espécies receptoras tenham sido observadas, sendo *M. pudica* mais sensível aos efeitos fitotóxicos. Os resultados mais expressivos sobre o alongamento do hipocótilo foi para o extrato obtido na temperatura de 60°C e pressão de 190 bar para a *M. pudica* e temperatura de 50°C e pressão de 150 bar para a *S. obtusifolia*. (Figura 20).

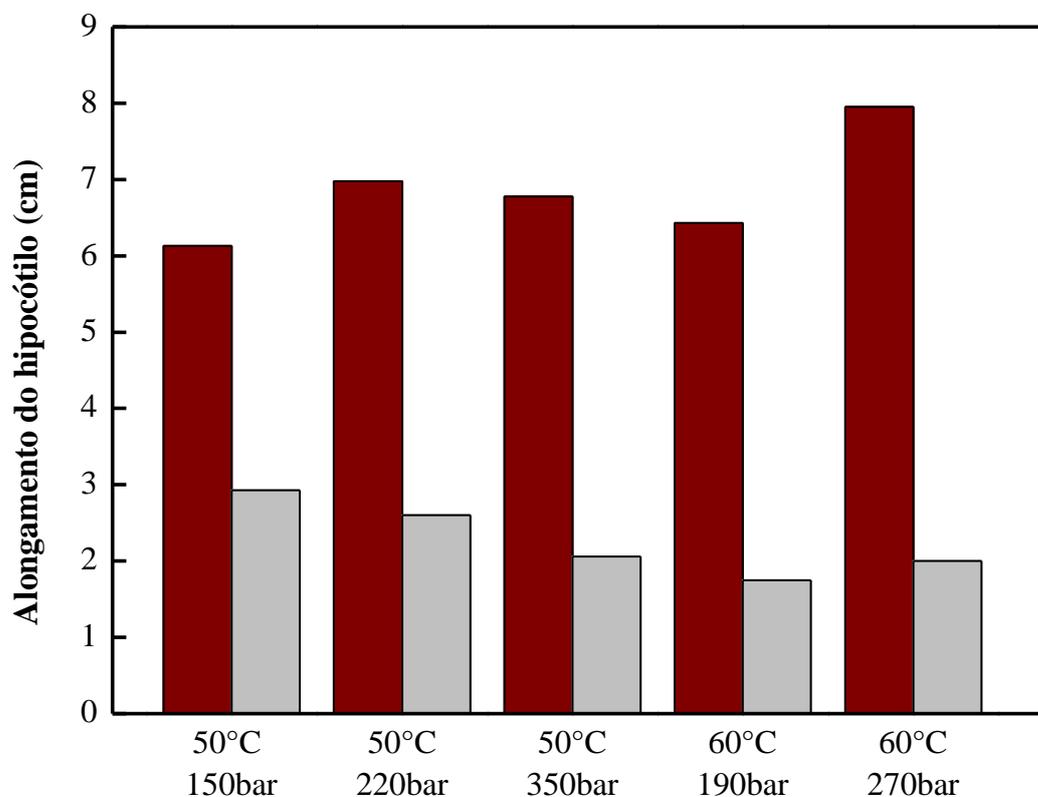


Figura 20. Efeitos fitotóxicos de extratos supercríticos de açaí sobre o alongamento do hipocótilo de *S. obtusifolia* (■) e *M. pudica* (■). Os dados expostos são expressos em centímetros.

As várias combinações entre pressão e temperatura utilizadas para obtenção dos extratos brutos de *E. oleracea*, obtidos neste trabalho, envolvem basicamente compostos apolares, sendo formados em sua totalidade por ácidos graxos. Dessa forma, pode-se inferir que os efeitos inibitórios e estimulatórios verificados sobre a germinação de sementes e alongamento da radícula e do hipocótilo pode ser atribuído à presença de compostos tais como ácidos graxos livres, incluindo linolênico, linoleico, oleico e ácido palmítico, a estes têm sido atribuído efeitos fitotóxicos o número de instaurações e a concentração também são fatores preponderantes para a fitotoxicidade de ácidos graxos (IN-ZE *et al.*, 2004; JIUNN-TZONG *et al.*, 2006). No cômputo geral, verifica-se que os extratos são mais efetivos sobre a germinação de sementes, com maior especificidade para a espécie *M. pudica*.

3.9 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS TOTAIS NA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA

O teor de compostos fenólicos totais nas polpas de açaí desengorduradas em diferentes condições operacionais variou de 5457 a 7565 mg/100g da amostra. A Figura 21 apresenta os valores, os resultados mostraram aumento significativo na concentração de compostos fenólicos totais em sete das nove amostras.

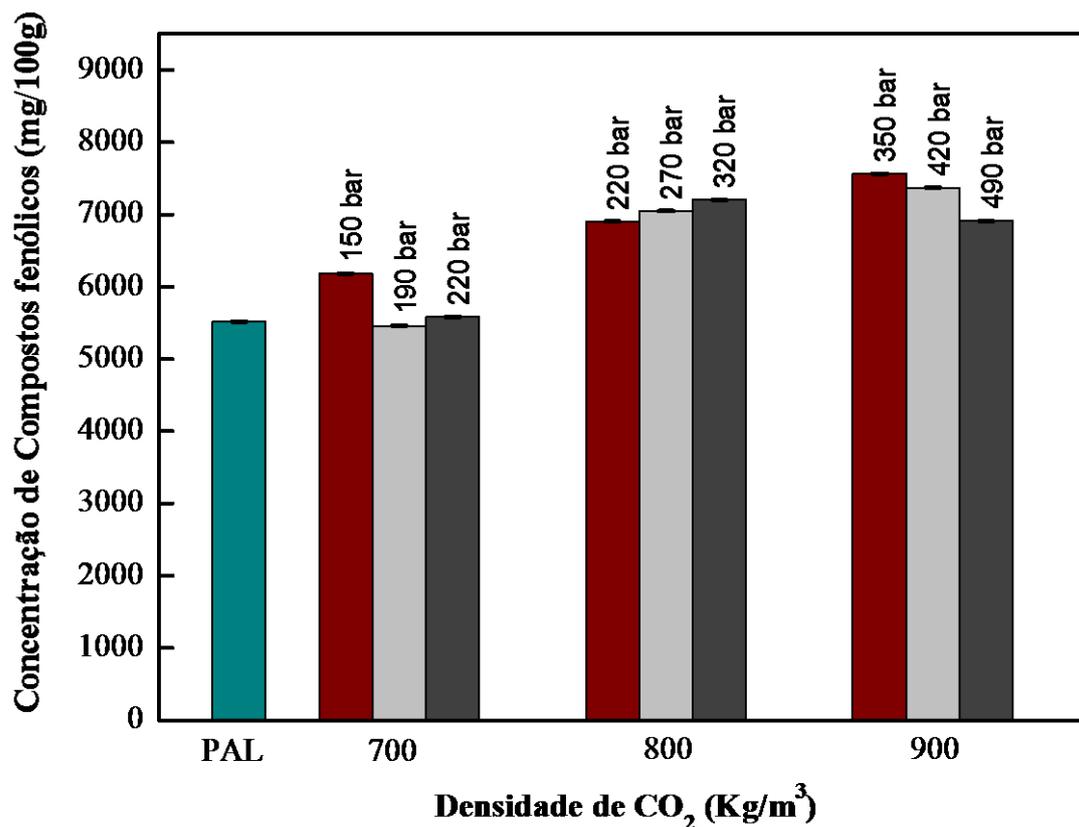


Figura 21. Concentração de compostos fenólicos na polpa de açaí liofilizada e nas polpas após extração com CO₂ supercrítico. Isotermas: (■) 50 °C, (■) 60 °C e (■) 70°C

Na polpa de açaí desengordurada a 50°C/350 bar com densidade de solvente a 900 Kg/m³ obteve-se maior concentração de compostos fenólicos totais. Apenas na amostra obtida por extração a 60°C/190 bar e 700 Kg/m³ o valor foi aproximadamente igual ao encontrado na polpa de açaí liofilizada antes da extração.

De acordo com a Figura 21, verifica-se que as melhores concentrações de compostos fenólicos foram obtidas na ordem crescente de extração com o aumento densidade de CO₂.

O teor de antocianinas totais nas polpas de açaí desengorduradas em diferentes condições operacionais variou de 96,1 a 137,5 mg/100g da amostra. A Figura 22 apresenta os valores obtidos, pode ser observado que a concentração de antocianinas na polpa após extração com CO₂ aumenta em virtude da redução da quantidade de fração lipídica extraída no processo. Nas amostras desengorduradas a 50°C/220 bar e 50°C/350 bar foram possíveis obter teores significativos de antocianinas. Em alguns casos, nas condições de 70°C/320 bar e 70°C/490 bar, pode ter ocorrido houve possíveis perdas de antocianinas em decorrência de sua baixa estabilidade à temperaturas mais elevadas, a presença de luz e oxigênio, além de outros fatores não avaliados.

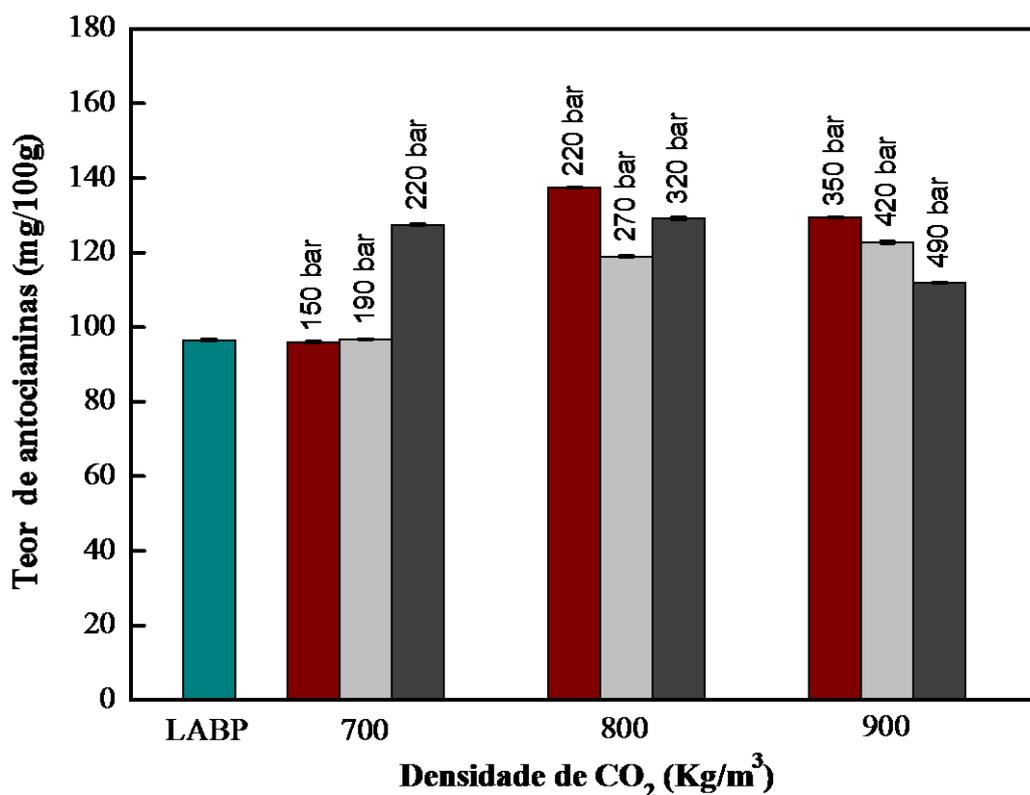


Figura 22. Teor de antocianinas na polpa de açaí liofilizada (PAL) e nas polpas após extração com CO₂. Isotermas: (■) 50 °C, (■) 60 °C e (■) 70 °C

Os resultados de concentração de compostos fenólicos e antocianinas reportadas na literatura variam de acordo com os métodos de extração, condições operacionais e solventes adotados, assim como decorrem da variedade da planta, da época da colheita dos frutos, do processamento industrial ou das condições de condicionamento e armazenamento.

Monteiro (2011) realizou extrações supercríticas com CO₂ na pressão de 200 a 300 bar a 50°C com a polpa de açaí desidrata, observou-se que o processo não

favoreceu à perda destes pigmentos gerando um pó desengordurado com alta concentração de antocianina, além disso verificou que as extrações feitas à pressão de 300 bar resultaram em rendimento acima de 95 % e em menor tempo de extração, fato este que segundo o autor era esperado em virtude do aumento do poder de solvatação do CO₂ com o aumento da pressão.

O processo de extração supercrítica é capaz de extrair os compostos lipofílicos e de baixa polaridade, o que resulta na concentração de compostos fenólicos e outras substâncias polares na matriz vegetal, como as antocianinas, para uma subsequente extração.

3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA

Como observado nas Figuras 23, 24 e 25, através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível determinar a morfologia da polpa de açaí liofilizada e desengordurada. Pelas imagens obtidas pelo MEV, pode-se observar que as partículas apresentam forma e tamanho irregular, e demonstram a porosidade das partículas desidratadas por liofilização. De acordo com Ezhilarasi et al., 2013, as imagens são coerentes com que se espera do processo de liofilização, considerando que na retirada de água são formados poros microscópicos criados pela sublimação dos cristais de gelo.

O EDS (Energy Dispersive System) permitiu determinar a composição semiquantitativa dos minerais, presentes na amostra (Figura 26). Através do EDS foi verificado que o potássio está em maior porcentual de metal dentre os outros metais, com 3,88 % em peso.

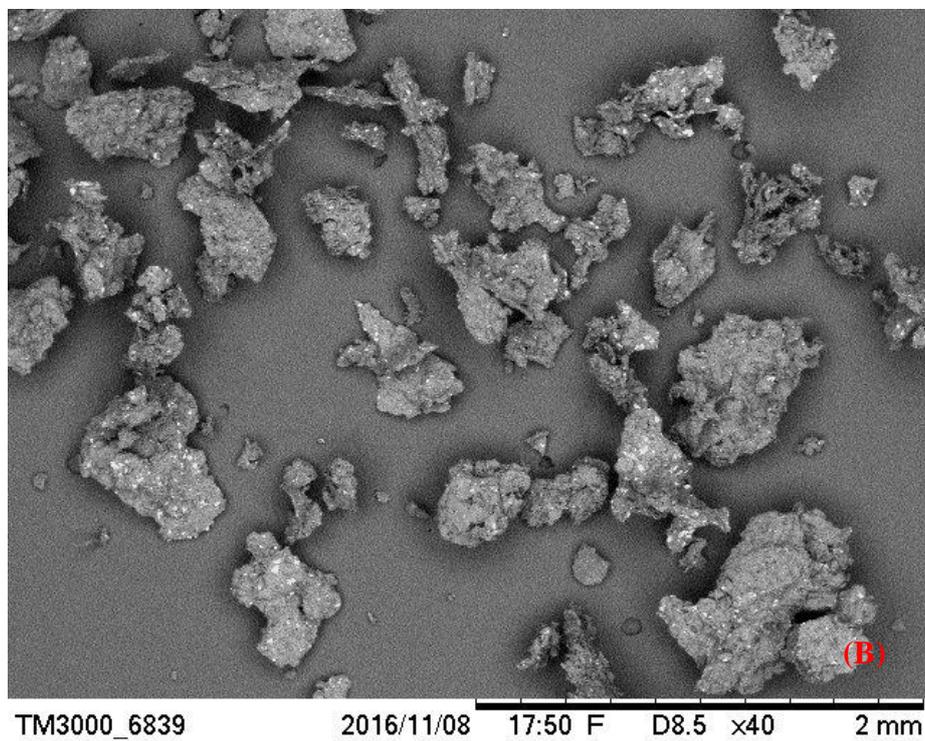
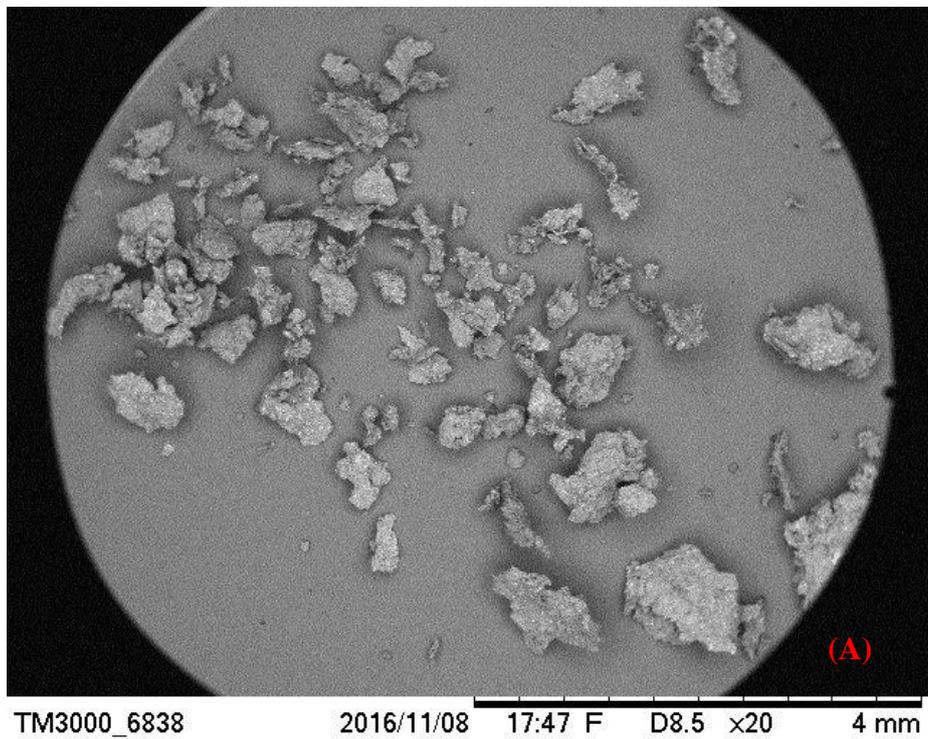


Figura 23. Análise de MEV que mostra a morfologia da polpa de açaí desengordurada. (B): Ampliação de (A)

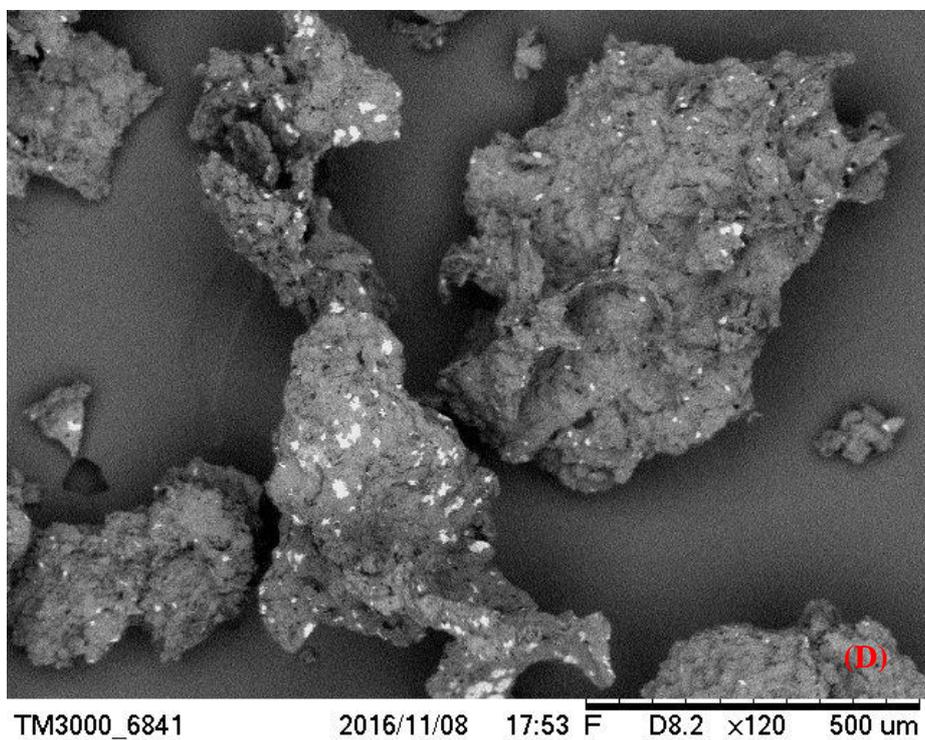
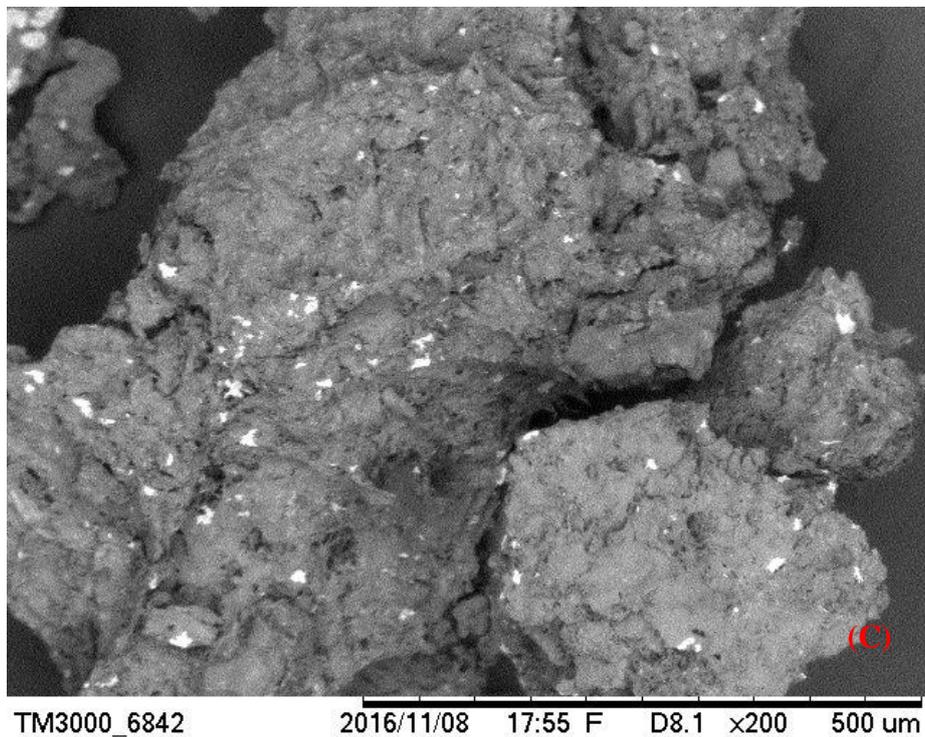


Figura 24. Análise de MEV que mostra a morfologia da polpa de açaí desengordurada. (C): Ampliação de (B), (D): Ampliação de (C)

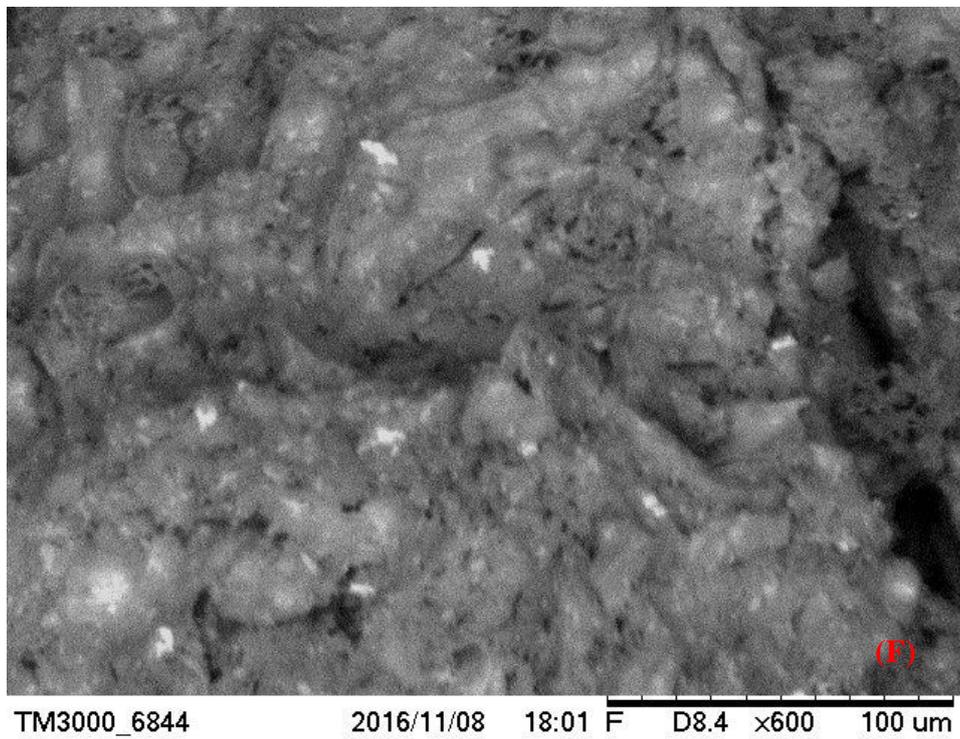
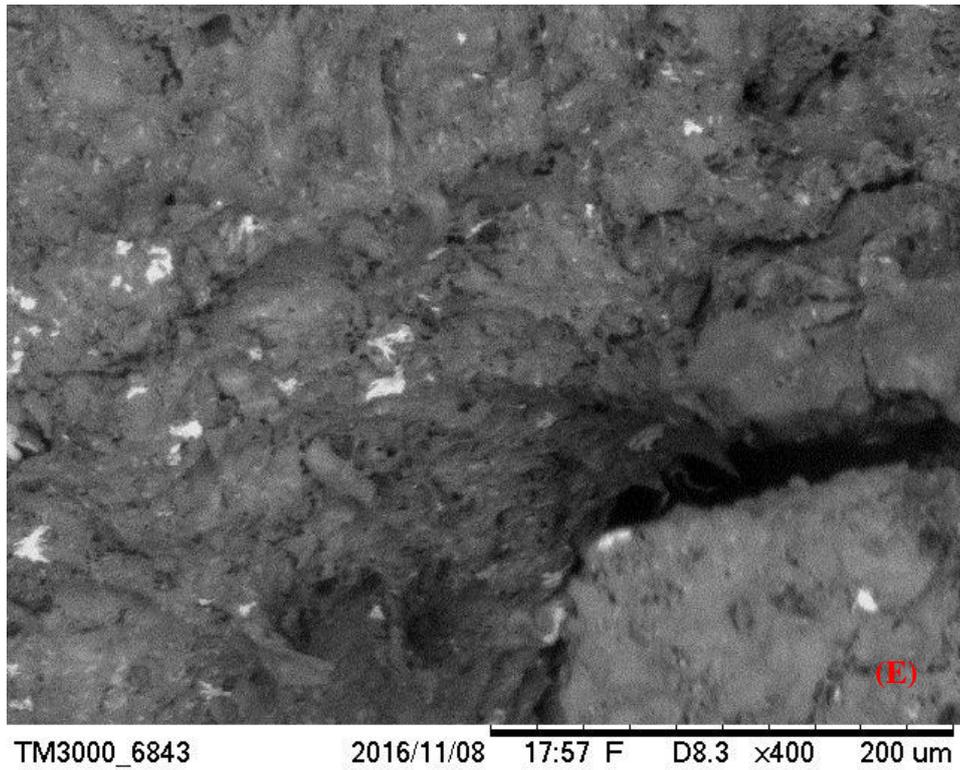
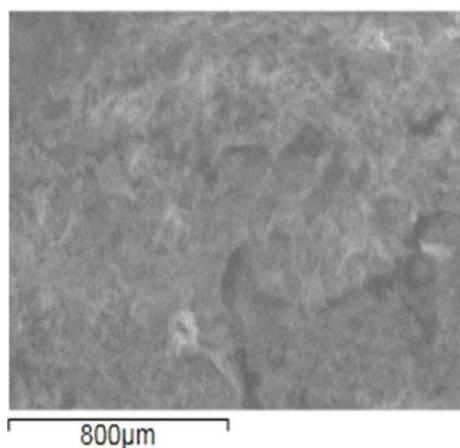


Figura 25. Análise de MEV que mostra a morfologia da polpa de açaí desengordurada. (E): Ampliação de (D), (F): Ampliação de (E)



Summary results

Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Oxygen	84.070	0.576	91.732
Magnesium	2.448	0.313	1.758
Silicon	0.965	0.177	0.600
Phosphorus	0.873	0.185	0.492
Sulfur	2.000	0.185	1.089
Chlorine	2.557	0.197	1.259
Potassium	3.882	0.208	1.733
Calcium	2.713	0.191	1.182
Manganese	0.492	0.169	0.156

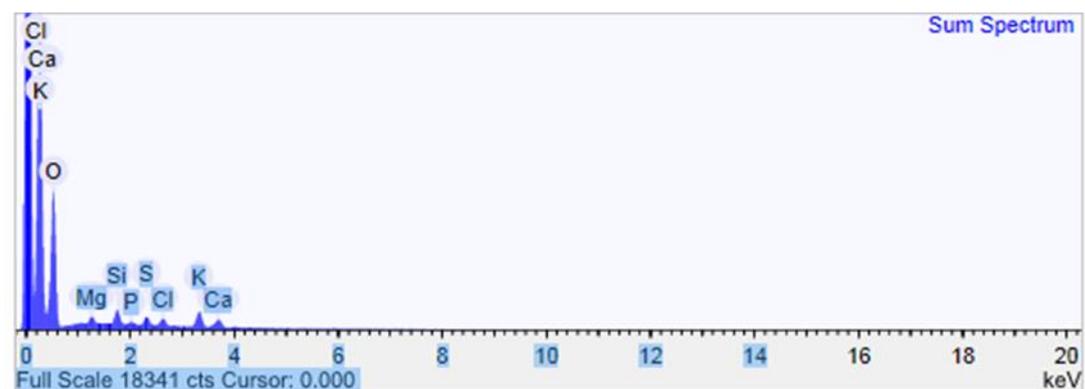


Figura 26. Imagem projetada pelo MEV e a análise gráfica realizada pelo EDS da polpa de açaí desengordurada

3.11 AVALIAÇÃO DE ETANOL, ÁGUA E ETANOL/ÁGUA COMO COSSOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM CO₂ PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DA POLPA DE AÇAÍ DESENGORDURADA

A Tabela 11 apresenta os resultados do teor de antocianinas nos extratos obtidos da extração supercrítica com cossolvente da polpa desengordurada. Pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos na presença de água na mistura de solventes, e o aumento da pressão acarretou no aumento do teor de antocianinas. O emprego de etanol com CO₂ não mostrou eficiência, no entanto quando se adicionou água, formando mistura de solvente ternária (água, etanol e CO₂) foi possível obter antocianinas nos extratos. Na condição de extração supercrítica de 50°C/350°C na

presença de água como cossolvente obteve-se maior concentração de antocianinas nos extratos.

Diferentemente de métodos convencionais onde se faz necessário acidificar a água ou outros solventes para extração de antocianinas, na extração supercrítica com CO₂-cossolvente, a água ou etanol utilizados no processo não precisam estar acidificados, pois de acordo com Seabra et. al (2008), há uma possível formação de ácido carbônico, acarretando na diminuição do pH, o que influencia na estabilidade desses pigmentos, uma vez que são estáveis em pH ente 1 e 3, assim o CO₂ desempenha um papel semelhante como os dos sulfitos e ácidos fracos nos processos de extração convencionais.

Tabela 11. Teor de antocianinas nos extratos obtidos da extração supercrítica CO₂ e cossolvente.

Extrato	Condição de extração supercrítica	Cossolvente utilizado	Teor de antocianinas no extrato (mg/100 g)
E1	T=50°C, P=220 bar	ÁGUA	101,6 ±1,2
E2	T= 50°C, P=350 bar	ÁGUA	136,2±1,8
E4	T=50°C, P=220 bar	ETANOL	*
E5	T =50°C, P =350 bar	ETANOL	*
E6	T = 50°C, P = 220 bar	ETANOL/ÁGUA (1:1)	105,2±1,1
E7	T= 50°C, P =350 bar	ETANOL/ÁGUA (1:1)	110,5±1,4

Em trabalhos que envolvem extração supercrítica CO₂ com cossolvente para obtenção de extratos de antocianinas, o efeito de água e etanol como modificadores nas extrações com CO₂ apresentam resultados diferenciados, variam de acordo com matriz vegetal empregada, e condições operacionais aplicadas.

Na obtenção de extratos de antocianinas do jabolão (*Syzygium cumini Lamark*) a partir da extração supercrítica, Santos (2015) realizou testes prévios com etanol e, também verificou que o cossolvente não apresentou resultados satisfatórios, optando por utilizar a água nos processos.

Seabra et al. (2008) avaliou a extração de frações ricas em antocianinas do bagaço do sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) em uma extração sequencial realizada com CO₂ supercrítico seguido da extração reforçada com misturas de solventes (CO₂/água/etanol) em diferentes proporções para avaliar os efeitos. Maiores valores de rendimento de extrato e conteúdo de antocianinas ocorreram pela presença de água na mistura de solventes, e também, pela presença de água na matriz vegetal.

De acordo com Cavalcanti (2012), na extração supercrítica de antocianinas do resíduo da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), observou que os melhores rendimentos de antocianinas para os processos de extração supercrítica foram obtidos em ordem decrescente utilizando etanol, isopropanol, e água. Os rendimentos obtidos utilizando água como cossolvente apresentaram maximização contínua com o aumento da pressão.

De acordo com Paula et al. (2013), o processo de extração supercrítica, usando dióxido de carbono supercrítico, num primeiro passo, seguido por uma mistura (CO₂/etanol /água), num segundo passo, cuja polaridade pode ser manipulada fazendo variar a proporção do solvente, pode permitir o fracionamento dos componentes em grupos de polaridade para obter extratos com rendimento e composição interessante. Na obtenção de extratos de folhas *Arrabidaea chica*, o processo de extração de forma sequencial mostrou ser viável como uma técnica de fracionamento. Neste caso, em particular, observaram que a extração supercrítica com CO₂ pode extrair as antocianinas de menor polaridade com baixa extração rendimentos e presença de água na mistura solvente (CO₂ / etanol / água) foi essencial combinar elevado rendimento de extração e altos teores de compostos de interesse.

3.12 CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO E PARAMÊTROS CINÉTICOS

As Figuras 27 e 28 apresentam as curvas globais de extração (OECs) obtidos no decorrer do tempo de extração para os ensaios cinéticos realizados.

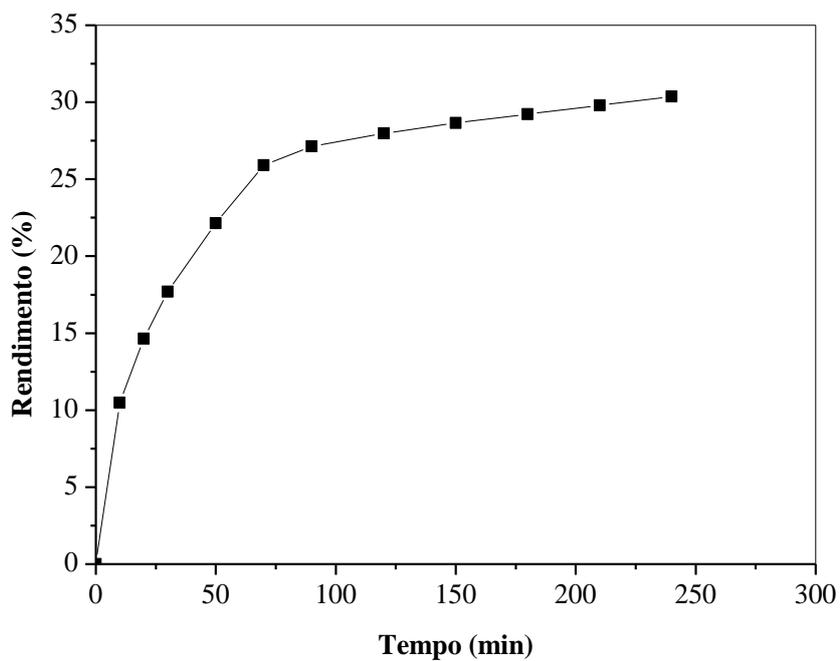


Figura 27. Curva global de extração obtida para cinética à 220 bar e 50°C em função do tempo.

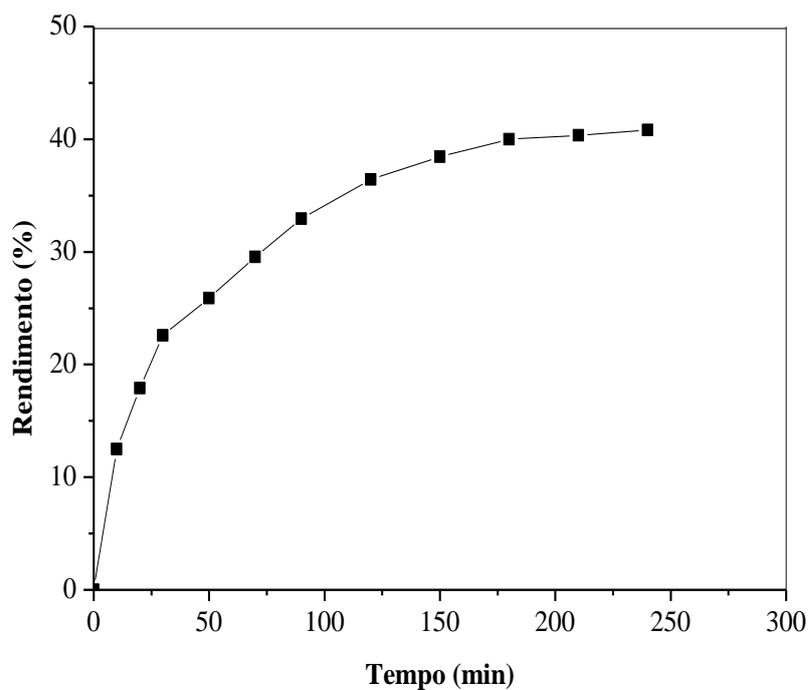


Figura 28. Curva global de extração obtida para cinética à 350 bar e 50°C em função do tempo.

Os parâmetros t_{CER} (min.), t_{FER} (min), M_{CER} (g/min) e Y_{CER} (g extrato/g CO_2) calculados pelo modelo obtido através do ajuste ao spline de três retas, estão apresentados na Tabela 12. O rendimento na cinética para etapa CER de extração (R_{CER}) foi calculado multiplicando-se a razão mássica de extrato na saída do leite (Y_{CER}) pela razão S/F_{CER} (g CO_2 / g alimentação). Da tabela 11 pode se observar que a vazão de obtenção de extrato (M_{CER}) e rendimento (R_{cer}) na etapa CER aumentou com o aumento da pressão de 220 bar para 350 bar.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos dos extratos obtidos ao spline de três retas

Condições de extração cinética (Pressão/ Temperatura)	M_{CER} (g/min)	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	Y_{CER} (g extrato/ g de CO_2)	S/F_{CER} (g CO_2/ g alimentação)	R_{CER} (g extrato/ g de alimentação)
220 bar, 50°C	0,1048	13	73	0,0499	2,73	0,1362
350 bar, 50°C	0,1229	15	106	0,0585	3,15	0,1842

M_{CER} : vazão de obtenção de extrato na etapa CER; t_{CER} : tempo da etapa CER; t_{FER} : tempo da etapa FER;; Y_{CER} : solubilidade de extrato em solvente na etapa CER;; R_{CER} : rendimento da etapa CER

3.13 MODELAGEM MATEMÁTICA

Os valores dos parâmetros dos modelos ajustados as curvas cinéticas de extração da fração lipídica da polpa de açaí liofilizada estão apresentados na Tabela 12. Nas Tabelas 13 a 15 estão apresentados os parâmetros estatísticos determinados a partir dos valores calculados das curvas de cinética de extração com CO_2 supercrítico, empregando os parâmetros ajustáveis dos modelos de transferência de massa de Tan e Liou (1989), Goto et al. (1993) e Martínez et al. (2003).

De acordo com os valores estatísticos os modelos Tan e Liou (1989) e Goto *et al.* (1993) e Martinez et al. (2003) reproduziram os dados experimentais. O modelo de Martinez et al. (2003) foi o que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais para todas as pressões estudadas, assim foi o modelo que apresentou menores erros e desvios padrões para curvas de extração seguido em ordem decrescente pelos modelos Tan e Liou (1989) e Goto et al. (1993).

O menor erro e desvio padrão foram observados no ponto da condição 220 bar a 50°C, onde o aplicativo em Excel descreveu melhor a cinética para o modelo de Martinez et al. (2003).

Nas duas cinéticas estudadas, o parâmetro t_{mi} , que corresponde ao instante em que a taxa de extração é máxima, apresentou valor negativo, perdendo seu significado físico. De acordo com Martínez (2002), neste caso, a taxa de extração é decrescente e, portanto o seu valor máximo é atingido no instante inicial, ou seja, no tempo igual a zero.

Para Santana (2013), os modelos Tan e Liou (1989) e Goto et al. (1993) puderam ajustar as curvas cinéticas de açaí medidas experimentalmente por Sousa (2006), os menores valores de erro médio, faixa de erro e desvio-padrão foram observados, e de acordo com a autora, para alguns experimentos foi observado que após atingir a etapa CER as curvas apresentaram pequenos desvios em relação aos dados experimentais.

As figuras 29 e 30 representam graficamente os dados cinéticos de extração e os ajustes ao modelo matemáticos.

Tabela 12. Parâmetros dos modelos de transferência de massa

Pressão (bar)	Parâmetros ajustáveis				
	Tan e Liou (1989)	Goto et al. (1993)		Martínez et al.(2003)	
	$Kdx10^{-5}(s^{-1})$	K	Φ	$t_{mi}/60(s)$	$bx60 (s^{-1})$
220	0,0265	0,0014	61124,29	-9,691	1,8127
350	0,0244	0,0012	61124,29	-9,669	1,4239

Tabela 13. Parâmetros estatísticos para o modelo Tan e Liou (1989)

Pressão (bar)	Parâmetros estatísticos		
	Erro médio	Faixa de erro	Desvio padrão
220	0,0124	0,1174	0,0436
350	0,0092	0,1029	0,0504

Tabela 14. Parâmetros estatísticos para o modelo Goto et al. (1993)

Pressão (bar)	Parâmetros estatísticos		
	Erro médio	Faixa de erro	Desvio padrão
220	0,0261	0,1717	0,0722
350	0,0402	0,2144	0,0916

Tabela 15. Parâmetros estatísticos para o modelo Martínez et al. (2003)

Pressão (bar)	Parâmetros estatísticos		
	Erro médio	Faixa de erro	Desvio padrão
220	0,0051	0,0748	0,0366
350	0,0054	0,0768	0,0517

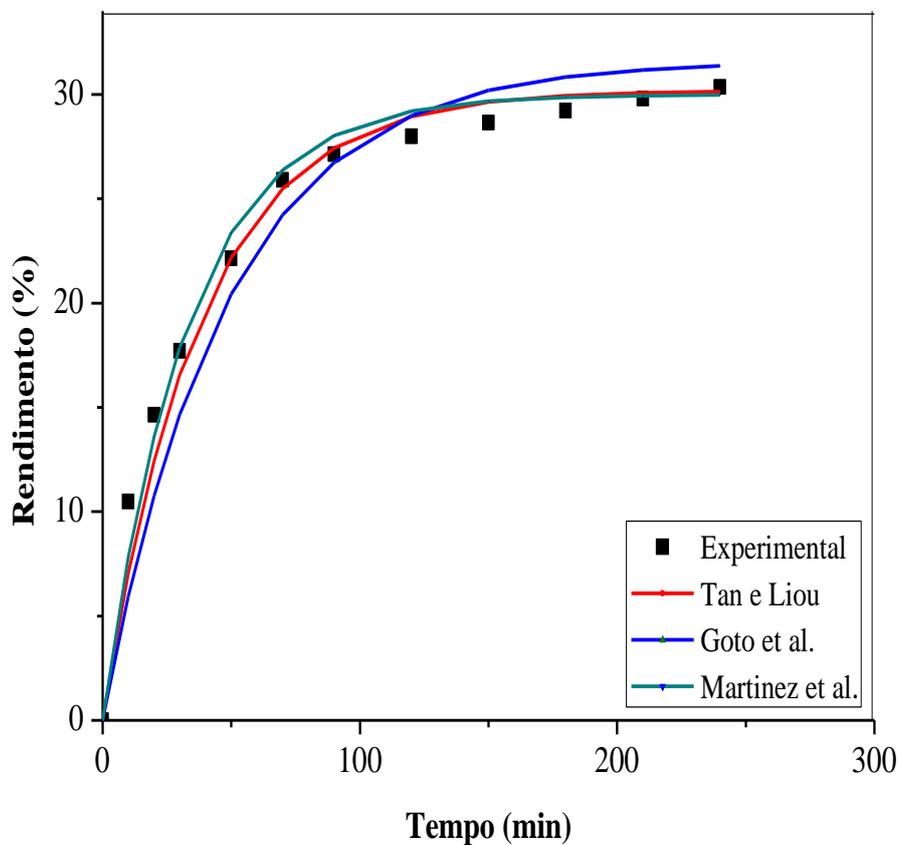


Figura 29. Modelagem da cinética de extração da fração lipídica do açaí a 220 bar.

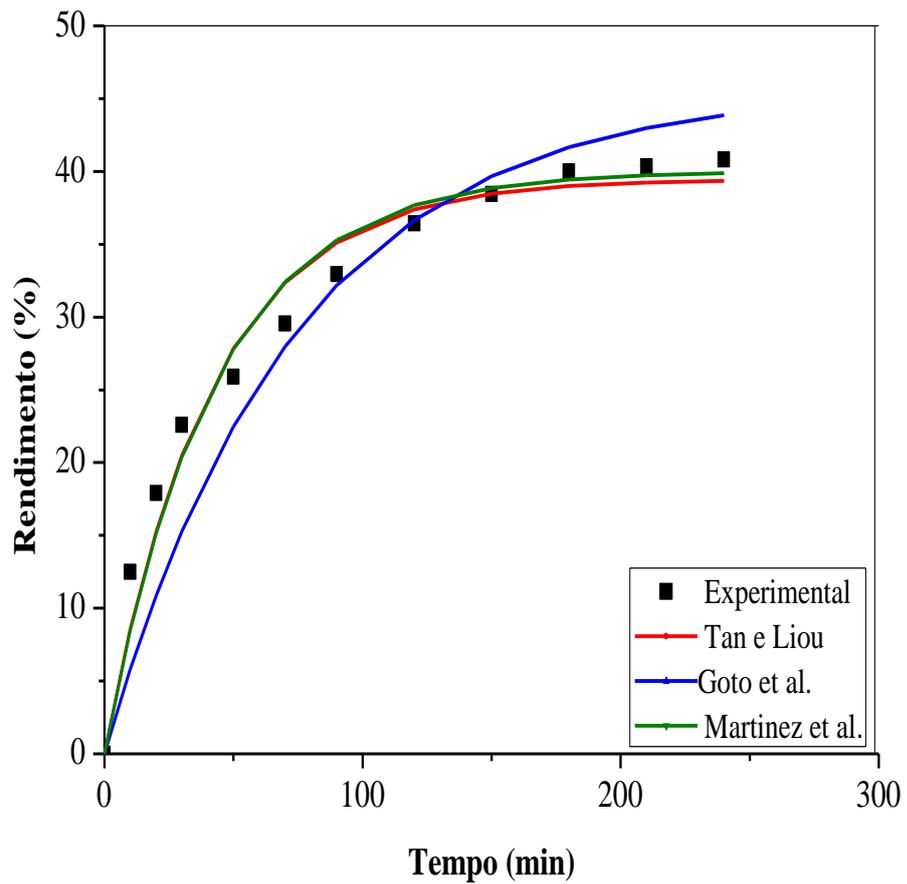


Figura 30. Modelagem da cinética de extração da fração lipídica do açai a 350 bar.

CAPITULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CONCLUSÃO

O método de extração com dióxido de carbono no estado supercrítico foi eficiente na obtenção de extratos da polpa de açaí liofilizada, principalmente na condição operacional de 70 °C e pressão de 490 bar onde se obteve maior rendimento em extrato. Todas as condições experimentais utilizadas, neste trabalho, foram eficazes na obtenção de ácido graxos saturados e insaturados principalmente na obtenção de ácidos graxos monoinsaturados onde se obteve extratos com concentração de 70,46%. A presença de ácidos graxos poli-insaturados representado pelo ácido oleico (C18:1), ácido palmitoleico (C16:1) e ácido linoleico (C18:2) foi significativa no extrato.

Os extratos obtidos da extração supercrítica com CO₂ estudados tiveram resultados distintos para as sementes analisadas, todos os extratos tiveram efeito fitotóxico para a espécie *M. pudica* e alguns extratos tiveram efeitos estimulatórios para a germinação de *S. obtusifolia*.

O desenvolvimento da radícula no âmbito geral foi menos acentuado para a espécie *M. pudica* em relação à *S. obtusifolia*, o desenvolvimento do hipocótilo também foi menor para *Mimosa pudica* em relação a *S. obtusifolia*. Estes resultados evidenciam a maior sensibilidade para o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de *M. pudica* diante dos compostos bioativos presentes nos extratos.

Comparando os resultados obtidos dos compostos fenólicos para a polpa de açaí liofilizada antes e depois da extração com CO₂ supercrítico, a melhor condição foi a 50°C / 350 bar, enquanto que para o conteúdo de antocianinas a melhor condição foi a 50°C / 220 bar. As amostras da polpa de açaí obtidas após extração com CO₂ supercrítico tornaram-se ricas em compostos fenólicos e antocianinas, evidenciando suas potenciais aplicações em fins de nutracêuticos. Contudo, o processo de extração supercrítica foi capaz de extrair os compostos lipofílicos e de baixa polaridade, o que resultou na concentração de compostos fenólicos e antocianinas, para uma subsequente extração.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar outros métodos de processamento para obtenção da polpa do açaí (*Euterpe oleracea*) seca e desengordurada para avaliar o rendimento e conteúdo total de antocianinas na extração das antocianinas com dióxido de carbono.
- Caracterizar os extratos da polpa do açaí (*Euterpe oleracea*) obtido da extração supercrítica com CO₂ (Índice de Acidez, Índice de Saponificação, Estabilidade Oxidativa, Densidade, Viscosidade, Umidade, entre outros.);
- Avaliar as variáveis do processo (temperatura, pressão, concentrações de solventes) no rendimento da extração supercrítica com CO₂ e cossolventes para obtenção de compostos bioativos da polpa de açaí seca e desengordurada.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 16^a ed. 3^a rev. Washington, 1997.

ALBUQUERQUE, C.L.C; MEIRELES, M.A.A. Deffating of Annatto Seeds Using Supercritical Carbon Dioxide as a Pretreatment for the Production of Bixin: Experimental, Modelling, and Economic Evaluation of the Process. *The Journal of Supercritical Fluids*, Article in Press, 2012.

ALMEIDA, E. I. B; COSTA, L. C; CARNEIRO, G. G; RIBEIRO, W. S; BARBOSA, J. A. Análise biométrica e físico-química de frutos de açaizeiros cultivados no Brejo paraibano. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, v.5, n.2, p.1-4, jun. 2011.

AN, M. I. R. J.; LOVETT, J. V. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation. *Journal of chemical ecology* 19.10 (1993) pp. 2379-2388.

ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. 5^a Edição. Viçosa-MG: Editora UFV, 2011.

BATISH, *et al.* D. R. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of plant physiology* 165.3 (2008) pp. 297-305

BELL, S.J.; BRADLEY, D.; FORSE, R.A.; BISTTRIAN, B.R. The new dietary fats in health and disease. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.97, p.280-286, 1997.

BERNAUD, F. S. R.; FUNCHAL, C. Atividade antioxidante do açaí. *Nutrição Brasil*, setembro/outubro, 2011.

BICHARA, C. M. G., ROGEZ, H. Chapter 1: Açaí (*Euterpe oleracea* Martius). In: Yahia, E.M.(Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Foods: Açaí to Citrus*, vol. 2. Woodhead Publishing, Oxford, England, p. 1–23, 2011.

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.

CAMPOS, L. M. A. S. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade de Campinas, 2004.

CASSEL, E; VARGAS, R. Supercritical Extraction of Essential Oil From *Ilex Paraguariensis* Leaves Natural Product Communications. v. 3, nº3, pp. 373 – 378, 2008.

COHEN, K. O; OLIVEIRA, M. S. P; CHISTÉ, R. C; PALLET, J. P.D; MONTE, D. C. Quantificação do teor de antocianinas da polpa de açaí de diferentes populações de açazeiro. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.

CUNHA, M. A. E; NEVES, R. F; SOUZA, J. N. S; FRANÇA, L. F; ARAÚJO, M. E; BRUNNER, G; MACHADO, N.T. Supercritical adsorption in γ -alumina: A methodology of buriti oil (*Mauritia flexuosa*, Mart.). for theenriching of anti-oxidants. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 66, p. 181-191, 2012.

EZHILARASI, P. N.; INDRANI, D; JENA, B. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN,c. Freeze drying technique for microencapsulation of garcinia fruit extract na its effect on brad quality . *Journal of Food Engineering*, v.117, nº4, 2013.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FARIAS NETO, J. T.; MÜLLER, C. H.; MÜLLER, A. A.; CARVALHO, J. E. U.; VIÉGAS, I. J. M. Cultivar e produção de mudas. In: NOGUEIRA, O. L; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. (Ed.). Açaí. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. p. 20-27. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistema de Produção, 4).

FAVACHO, H. A. S., OLIVEIRA, B. R., SANTOS, K. C., MEDEIROS, B. J. L., SOUSA, P. J. C., PERAZZO, F. F., et al. (2010). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 105–114.

GONZÁLEZ, H. R.; MEDEROS, D. M.; SOSA, I. H. Efectos alelopáticos de restos de diferentes espécies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) em condiciones de laboratorio. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 7.2 (2002) pp 67-72.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbondioxide. *J. Chem. Eng. Japan*, n. 26, p. 401 - 407, 1993.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P.; SCHULZ, D. F.; PACHECO, S., GODOY, R. L. O.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyaniding-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.32, p.43–46, 2012.

HERCULANO, F. E. B. (2013) Produção industrial de cosméticos: o protagonismo da biodiversidade vegetal da Amazônia. Tese. UFAM, 146p.

HYUN, J. W.; CHUNG, H. S. Cyanidin and malvidin from oryza sativa cv.heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 8, p. 2213-2217, 2004.

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

IN-ZE, C.; WEN-YA, H.; JIUNN-TZONG, W. Allelochemicals of botryococcus braunii (chlorophyceae)1. *Journal of phycology*, v. 40.3 (2004) pp. 474-480.

JIUNN-TZONG *et al.*, W Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology*, 80.4 (2006) pp. 338-345.

KAMEI, H. et al. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest*, v. 13, n. 6, p. 590-594, 1995.

KANG, J., THAKALI, K. M., XIE, C., KONDO, M., TONG, Y., OU, B., et al. (2012). Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and antiinflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*, 133, 671–677.

KONG, J. M.; CHIA, L.S; GOH, N. K; CHIA, T. F; BROUILLARD, F. Analysis and biological activities of anthocyanins. Review. *Phytochemistry*. V.64, p.923-933, 2003.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n. 4, p. 1283-1287, jul-ago, 2006.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; JURADO-LÓPEZ, A.; LUQUE-GARCIA, J.L. Drug extraction. In: York, P.; Kompella, U.B.; Shekunov, B.Y. *Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development*. New York: Marcel Dekker, p. 498-531, 2004.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratosnaturais. *Química Nova*, Vol. 31, n°. 5, p.1218-1223, 2008.

MARTIN, C. A; ALMEIDA, V. V; RUIZ, M. R; VISENTAINER, J. E. L; MATSHUSHITA, M; SOUZA, N. E; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista Nutrição*, Campinas, 19(6):761-770, nov./dez., 2006.

MARTÍNEZ, J. Estudo de Modelos de Transferência de Massa na Interface Sólido-Fluido durante Processos de Extração Supercrítica. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

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

- MATHERSON, B.; WALTER, K. Z.; TAYLOR, D. McD.; PETERKIN, R.; LUGG, D.; O'DEA, K. Effects serum lipids of monounsaturated oil and margarine in the diet of an Antarctic expedition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda, v.63, p.933-941, 1996
- MAUL, A. A. Situação atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Ano II, nº11, 1999.
- McHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. *Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice*. 2 nd ed. Butterworth-Heinemann, 1994.
- MEIRELLES, M. A. A. Extração Supercrítica: Aspectos Técnicos e Econômicos. *Revista Fitos*, Vol.2, nº01, junho/setembro, 2006.
- MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor Nutricional da polpa de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazônia*, vol.38(2), p.311-316, 2008.
- MERTENS-TALCOTT, S. U., RIOS, J., JILMA-STOHLAWETZ, P., PACHECO-PALENCIA, L. A., MEIBOHM, B., TALCOTT, S. T., et al. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7796–7802.
- MONTEIRO, Rosa Beatriz Barbosa. Produção de açaí (*Euterpe oleracea* mart.) em pó desengordurado através de processo combinado de desidratação e extração supercrítica. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.
- MORAES, K. K. S.; COSTA, P.S.; BELO, F. C.; CIPRIANI, H. N.; PINHEIRO, A. S. O.; ROCHA, R. B. Biometria de frutos em um plantio de açaí em Porto Velho, Rondônia. In: Encontro de Ciência e Tecnologia, 2014, Porto Velho. [Anais...]. Porto Velho: FARO, 2014.
- MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1998.
- MOURA, L. S. Obtenção supercrítica do extrato de funcho ((*Foeniculum vulgare*): determinação das isotermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos, do equilíbrio de fases. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2004.
- MULLER, A. A. Sistema de Produção do Açaí. Embrapa Amazônia Oriental, Sistema de Produção, 2ª Edição. ISSN 1809-4325, Versão eletrônica, Dez., 2006.
- NAM, S. H. et al. Antioxidative activities of bran from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chemistry*, v. 94, n. 4, p. 613-620, 2006.
- NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S; ANTONIASSI, R; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal- SP, v. 30, n.2, p. 498-502, jun., 2008.

NOGUEIRA, O.L; CARVALHO,C.J.R de; MÜLLER, C.H.; GALVÃO, E.U.P; SILVA, H.M e; RODRIGUES, J.E.L.F; OLIVEIRA, M do S.P de; CARVALHO, J.E.U de; ROCHA NETO, O.G da; NASCIMENTO, W.M.O do; CALZAVARA, B.B.G. A Cultura do açaí. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental – Brasília: EMBRAPA-SPS, 1995.

OLIVEIRA, J.E.D. *et al.* Nutrição Básica. 1 ed. São Paulo: Editora Almed, 1992.

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C H. Cultivo do açaizeiro para a produção de frutos. Belém: EMBRAPA, p.51, 2002 (Embrapa Amazônia Oriental. Circular técnica).

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Jaboticabal: FUNEP, 2000.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A.B.R.; SPOTO, M.H. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri-SP: Manole, 2006.

PACHECO-PALENCIA, L. A., DUNCAN, C. E., & TALCOTT, S. T. (2009). Phytochemical composition and thermal stability of two commercial acai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chemistry*, 115, 1199–1205.

PAES, J.; DOTTA, R.; GERARDO F. BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus*L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.95, p.8-16, 2014.

PAULA, J. T; PAVIANI, L. C; FOGGIO, M. A; SOUSA, I. M. O; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 81, p. 83-91, 2013.

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

PHILPOTT, M. *et al.* In situ and in vitro antioxidant activity of sweetpotato anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, n. 6, p. 1511-1513, 2004.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Beneficial effects of açaí. *International Journal of Nutrology*, v.5, n.1, p. 15-20, jan./abr., 2012.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, v.1163, p.2-24, 2007.

POZO-INSFRAN, D. Del.; PERCIVAL, S.S.; TALCOTT, S. T. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1222–1229.

QUISPE-CONDORI, S. Determinação de Parâmetros de Processo nas Diferentes Etapas da Extração Supercrítica de Produtos Naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare*. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RÊGO, Fernando Luiz Trindade. Estudo do perfil de ácidos graxos e a razão entre ômega 6 / ômega3 em pescado. Tese (doutorado). Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2012.

RICE, E. L. Allelopathy. New York: Academic Press, 1984. pp. 422.

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.

ROSA, P.T.V.; PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; SMITH JR.; R.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L.J.; PETERS, C.J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to the Food Industry. In: *Extractig Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. CRC Press. Boca Raton, 2009.

ROSA, T. V. R.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to Food Industry: Fundamentals Supercritical Extraction from Solid Matrices. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009. p.269-286.

RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of life sciences*, 2005.

SANTANA, A L. Determinação de Parâmetros de Transferência de Massa do Processo de Extração Supercrítica. Dissertação - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Belém, 2013.

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

SANTOS, Marcio José Teixeira dos. Aproveitamento de resíduos da indústria de óleos vegetais produzidos na Amazônia, 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *Journal Agricultural and Food Chemical*, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2000.

SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E . M.; BATISTA, M. T. P. Fractioned High Pressure Extraction of Anthocyanins from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Pomace. Food Bioprocess Technol. 2008. DOI:10.1007/s11947-008r-r0134-2.

SHANLEY Patrícia & Medina Gabriel. Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica. Embrapa/CIFOR, Imazon, 2005.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA JR., P. F.; SOARES, E. A. A importância de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação lactação. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil. Recife, 7 (2): p.123-133, abr./jun., 2007.

SOUZA FILHO *et al.*, A. P. S. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. Planta Daninha, 27, pp. 499-505, 2009.

SOUZA, R.S. Estudo da Cinética de Extração do Óleo da Polpa do Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) com Dióxido de Carbono a Altas Pressões. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, p. 35-52, 2005.

SUN, YA-PING. Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Syntheses, Properties and Applications. Marcel Dekker, Inc. New York, 2002.

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of Desorption. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 6, n. 35, p. 1029 – 1031, 1989.

TAYLOR, L.T. Supercritical Fluid Extraction. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996.

TINOCO, A.C. Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005.

TSUDA, T. et al. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, n. 2, p. 248-251, 1994.

VASCONCELOS, M. A. M; ALVES, S. M. Sistema de Produção do Açaí. Embrapa Amazônia Oriental, Sistema de Produção, 2ª Edição. ISSN 1809-4325, Versão eletrônica, Dez., 2006.

VILLACHICA, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperación Amazonia, p.33-42, 1996.

WANG, H. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglicons, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 2, p. 294-296, 1999.

WONG, D. Y. S.; MUSGRAVE, I. F.; HARVEY, B. S.; SMID, S. D. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against amyloid exposure in vitro, *Neurosci. Lett.* 556 (2013) 221–226.

WOODSIDE, J. V.; KROMHOUT, D. Fatty acids and CHD. *Proceedings of the Nutrition Society*. V. 64, p.554-564, 2005.

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 as normal consumption. *Journal Agricultural and Food Chemical*. V. 54, p. 4065-4075, 2006.

XIE, C., KANG, J., LI, Z., SCHAUSS, A. G., BADGER, T. M., NAGARAJAN, S., et al. (2012). The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: Blockade of LPS mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 23, 1184–1191.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*, v.179, p.137-151, 2015.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, K.; FÁVARO, D. I. T. T.; VASCONCELLOS, M. B. A. Açai como fonte de ferro: Mito ou realidade? *Acta Amazônica*, v.32, n.3, p.521-525, 2002.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J.; FÁVARO, D. I. T. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amazônica*, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

ZABOT, G.L; MORAES, M.N; MEIRELLES, M. A. A. Supercritical technology applied to the production of bioactive compounds: compilation of researches done at IASEFI from 2009-2012. III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia), 2013.

ZHAO, C. et al. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 20, p. 6122-6128, 2004.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos aceitos em periódicos

- 1) BATISTA, C. C. R.; OLIVEIRA, M. S. ARAÚJO, M. E; RODRIGUES, A. M. C.; BOTELHO, J. R. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; MACHADO, N. T.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Açai (*Euterpe oleracea*) berry extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, extracts ailelopathic, enrichment of anthocyanins and phenolic compounds in the residual pulp. The Journal of Supercritical Fluids. v. 107. p.364-369, 2016.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

- 1) C. C. R. BATISTA, A. P. M. SANTOS, A. P.S. SILVA, R. M. CORDEIRO, M. E. ARAÚJO, N. T. MACHADO, A. M. C. RODRIGUES, R. N. CARVALHO JR. Obtenção de extratos da polpa de açai (*Euterpe oleracea*) liofilizada por extração supercrítica: isotermas de rendimento global e composição em ácidos graxos. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2014. Florianópolis-SC. Anais do Congresso.
- 2) C. C. R. BATISTA, R. F. MOREIRA, J. E. RODRIGUES, R.N. CARVALHO Jr, N. T. MACHADO, M. E. ARAÚJO. Cinética de desorção do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*): experimentos e modelagem matemática. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2014. Florianópolis-SC. Anais do Congresso.
- 3) A. P.S. SILVA, R. M. CORDEIRO, C. C. R. BATISTA, J. R. S. BOTELHO, J. E. R. SILVA, M. E. ARAÚJO, R. N. CARVALHO JR. Modelagem Matemática das Cinéticas de Extração Supercrítica de Produtos Naturais. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2014. Florianópolis-SC. Anais do Congresso.
- 4) SILVA, N. J. N.; OLIVEIRA, G. R. F.; SANTOS, A. P. M. PINTO, R. H. H. BATISTA, C. C. R.; CARVALHO JR, R. N. Determinação da concentração de compostos fenólicos presentes na polpa de açai (*Euterpe oleracea*) liofilizada e desengordurada com CO₂ no estado supercrítico. In: XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2014. Aracaju-SE. Resumo.

APÊNDICE

ARTIGO: SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION OF ACAÍ (*EUTERPE OLERACEA*) BERRY OIL: GLOBAL YIELD, FATTY ACIDS, ALLELOPATHIC ACTIVITIES, AND DETERMINATION OF PHENOLIC AND ANTHOCYANINS TOTAL COMPOUNDS IN THE RESIDUAL PULP.



Supercritical CO₂ extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp



Camila de Cássia Rodrigues Batista^a, Mozaniel Santana de Oliveira^a,
Marilena Emmi Araújo^b, Antonio M.C. Rodrigues^a, José Rafael Santos Botelho^c,
Antonio Pedro da Silva Souza Filho^d, Nélio T. Machado^b, Raul N. Carvalho Junior^{a,*}

^a LABEX/FEA (Faculty of Food Engineering), Federal University of Pará, Rua Augusto Corrêa S/N, Guamá, 66075-900 Belém, Pará, Brazil

^b TERM@FEQ (School of Chemical Engineering)/UFPA, Rua Augusto Corrêa S/N, Guamá, 66075-900 Belém, Pará, Brazil

^c Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Pólo II, Rua Sílvio Lima, 3030-790 Coimbra, Portugal

^d Laboratory of Agro-industry, Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro S/N, Marco, 66095-100 Belém, Pará, Brazil

article info

Article history:

Received 9 June 2015

Received in revised form 7 October 2015

Accepted 7 October 2015

Available online 13 October 2015

Keywords:

Açai (*Euterpe oleracea*)

Supercritical fluid extraction

Fatty acids

Allelopathy

Phenolic compounds

Anthocyanins

abstract

Açai (*Euterpe oleracea*) is a very popular fruit in the Brazilian Amazon consumed as a nourishing and tasty food. Studies suggest that *E. oleracea* has therapeutic effects on problems like cancer, hypocholesterolemia, fatty liver, malaria, and neurodegeneration. The supercritical fluid extractions were performed with supercritical CO₂ at densities of 700, 800, and 900 kg/m³ while varying three and eight nominal values of temperature and pressure, respectively. The extracts were analyzed for total fatty acid contents and allelopathic effects. In addition, lyophilized açai berry pulp was analyzed before and after supercritical CO₂ extraction to determine phenolic compounds and anthocyanin contents. The açai extract isotherm of 70 °C showed the highest yields at the pressures applied while the isotherm of 60 °C showed the lowest yields. Thus, the fatty acids profile analysis of açai extract indicates a low saturated/unsaturated ratio and the amount of MUFA is greater than of PUFA. The extracts had phytotoxic effect for the species *Mimosa pudica* and some extracts had stimulatory effects on *Senna obtusifolia* germination. Radicle and hypocotyl growths were shorter for the species *M. pudica* than for *S. obtusifolia*. The phenolic compounds and anthocyanin contents in the lyophilized açai berry pulp after CO₂-SE shows potential applications for nutraceutical purposes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The açai (*Euterpe oleracea*) berry comes from the açai palm, a native tree of the Amazon, and this fruit is consumed on a large scale in this region. Besides the folk medicinal use, studies suggest that substances present in açai have therapeutic properties such as antiproliferative effects of HT-29 colon cancer cells [1], hypocholesterolemic effect [2], hepatic protection against steatosis [3], antiplasmodium effect [4], neuroprotection effects [5], and antileukemic effects [6].

Fatty acids are related to therapeutic effects of interest in serious problems such as coronary heart disease, hypertension, restenosis, Zellweger syndrome, adrenoleukodystrophy, depression, as well

as in inflammatory, autoimmune, and neonatal growth processes [7]. Mulabagal et al. [8] observed the presence of μ -linolenic acid, linoleic acid, palmitic acid, and oleic acid in organic and non-organic açai powder sample. In addition to these, other fatty acids have been observed such as oleic, linolenic, eicosanoic, trans-elaidic, and cis-11-vaccenic [9–11].

Phenolic compounds are secondary metabolites generated in pentose phosphate, shikimate, and phenylpropanoid pathways [12]. Studies suggest that phenolic compounds possess therapeutic effects such as against cardiovascular disease [13,14], antimicrobial properties [15], and antioxidant effects [16]. Studies show that açai is a source of significant amounts of phenolic compounds and that these may be related to positive effects of açai extracts regarding pathogenic microbial activity [17] and neuroprotective action [18,19].

Another group of compounds with significant presence in açai is anthocyanins [20–22]. Anthocyanins are plant-derived compounds

* Corresponding author.

E-mail address: raulncj@ufpa.br (R.N. Carvalho Junior).

belonging to the flavonoids subgroup of phenolic compounds group [23]. Besides antioxidative properties [24], anthocyanins are the focus of studies for application on humans against diseases such as cancer [25] and Alzheimer's [26,27].

Allelopathy is related to growth inhibition or stimulation that a vegetable organism can cause on another vegetable organism. This is fundamental to the development of crops because weeds can compromise cultivation. Therefore, plant extracts have the potential for posing alternatives for weed control [28].

In this study, the extracts of lyophilized açai berry pulp (LABP) obtained by CO₂ supercritical extraction (CO₂-SE) were studied in terms of global yield isotherms, fatty acids compositions, and allelopathic effects. Moreover, the total phenolic compounds and anthocyanin contents were studied in lyophilized açai berry pulp (LABP) obtained by CO₂-SE.

1. Materials and methods

1.1. Açai berry samples

The açai berries were purchased from the local market in Abaetetuba (Pará, Brazil). The fruits were immersed in drinking water at 50 °C for 900 s, then the pulp was extracted with drinking water in an electric depulper. This pulp was lyophilized (Liotop, model L101, São Paulo, Brazil) and stored at –25 °C. Particle size was analyzed using Tyler sieves (WS Tyler, USA) –8 + 42 mesh and the average particle diameter was determined according to the method by the ASAE [29]. The sample's true density was determined using a helium pycnometer (Quantachrome, model Ultrapyc 1200e, USA). Protein content was determined according to analytical methods in Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz [30], ash content was determined by incineration in a muffle furnace (Quimis, model Q 310-25) at 550 °C, lipids were determined according to method 963.15 of the AOAC [31], and moisture was determined by infrared moisture balance (Gehaka, model IV 2500, São Paulo, Brazil). These analyses were done in triplicate.

1.2. Extraction procedures: CO₂ supercritical extraction (CO₂-SE)

The assays were carried out in an SPE-ED SFE system from Applied Separations model 7071 (Allentown, PA, USA). For CO₂-SE, the extractor vessel used had height of 0.3248 m and inside diameter of 0.014 m. The global yield isotherms were determined using 10 g of LABP. CO₂ densities of 700, 800, and 900 kg/m³ were used. These densities were relative to temperatures of 50, 60, and 70 °C and pressures of 150, 190, 220, 270, 320, 350, 420, and 490 bar. The CO₂ (99.9% purity, Linde Gases, Pará, Brazil) flow rate used was 8.85 × 10⁻⁵ kg/s. Extraction was performed in two stages: a static period (supercritical CO₂ and açai berry pulp were in closed operation conditions in the extraction vessel) of 1800 s and a dynamic period (system was opened and just CO₂ and extract were released continuously from the vessel to the collector flask) of 10,800 s. The experiments were performed in duplicate. The global yield was calculated as the ratio between extract mass and açai berry pulp mass on dry basis (d.b.). The densities of supercritical CO₂ were calculated using the software TermoDi, developed by the Laboratory of Physical Separations (LASEFI) of the State University of Campinas (UNICAMP).

1.3. Determination of fatty acids in CO₂-SE extracts

The fatty acid composition was determined using a gas chromatograph (Varian model CP 3380) equipped with a flame ionization detector and with a CP-Sil 88 capillary column (length 60 m, internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 µm; Varian, Inc., USA). This method considers the conversion of fatty acid into

fatty acid methyl esters (FAMES). The gas chromatograph, used FID detector and injector (split ratio 1:100) temperatures of 250 °C, an injection volume of 1 µL, and helium as carrier gas at a flow rate of 0.9 mL/min. The column temperature was set to 80 °C for 4 min and increased to 205 °C at a rate of 4 °C/min. The software Varian Star 3.4.1 was used for the chromatograms and known mixtures of standard fatty acids (Nu-check-prep, Inc., USA) were used to quantify the fatty acids. The fatty acid contents were expressed as relative percentages of total fatty acids. These experiments were performed in duplicate.

1.4. Allelopathic activity

Based on contents of linoleic, oleic, and palmitic acids, the extracts used in the allelopathic assays were obtained in conditions of 50 °C/150 bar, 50 °C/220 bar, 50 °C/350 bar, 60 °C/190 bar, and 60 °C/270 bar. The extracts were evaluated at a concentration of 1% (w/v) using n-hexane as the dispersion vehicle. 3 mL of the extract solutions formed were added to each petri dish. After evaporation of the solvent, 3 mL of distilled water were added. The bioassay was conducted in a BOD chamber under controlled conditions of 25 °C and photoperiod of 12 h, with monitoring for 3 days, with daily counts and elimination of germinated seeds, i.e., those with 2 mm roots or more. Each petri dish was 9 cm in diameter and was lined with qualitative filter paper and received 20 seeds, as proposed by Souza Filho et al. [32].

The bioassays of the study of phytotoxic potential elongation of the radicle and hypocotyl were carried out under conditions of 25 °C and photoperiod of 24 h. Two pre-germinated seeds – whose germination occurred in 3 days – were used. After 6 days of growth, the lengths of the radicle and hypocotyl were measured to determine the variation in growth.

The weeds *Mimosa pudica* (malice) and *Senna obtusifolia* (sicklepod) were used as receptor species. The seeds were collected in the city of Terra Alta in the state of Pará, Brazil. The seeds were cleaned and placed in paper bags, then treated with sulfuric acid to break dormancy, with immersion for 20 min for sicklepod and 15 min for malice.

1.5. Determination of phenolic compounds and anthocyanins in LABP before and after CO₂-SE

The LABP samples before and after CO₂-SE were analyzed to determine total phenolic compounds and anthocyanin contents. Total phenolics compounds (TPC) content was determined by visible spectrometry using Folin-Ciocalteu reagent according to the method described by Singleton and Rossi [33]. Samples were processed in a spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 60) at 750 nm. The TPC in samples was expressed as gallic acid equivalent (GAE) using the equation derived from the standard curve's linear regression to determine the composition. These experiments were done in duplicate.

The total content of anthocyanins was determined by the method adapted by Francis [34] using a spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 60). These experiments were done in duplicate.

2. Results and discussion

2.1. Açai berry samples

The samples' true density was 1230 ± 10 kg/m³. The average particle diameter was 8.659 × 10⁻⁴ m while the mean moisture of the samples was 2.3 ± 0.02% (d.b.), protein content was

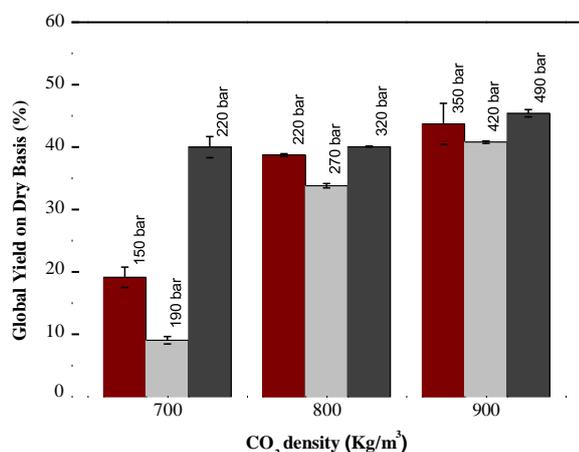


Fig. 1. Supercritical CO₂ extraction isotherms yield on dry basis versus density of lyophilized açai berry pulp. (■) 50 °C, (■) 60 °C and (■) 70 °C isotherms.

$8.93 \pm 0.38\%$, lipids were $45.37 \pm 0.71\%$, and ash content was $3.20 \pm 0.03\%$.

1.1. SFE global yield isotherms

Fig. 1 shows the experimental results of the 50, 60, and 70 °C isotherms on dry basis and their standard deviations. The highest global yield was obtained in the experimental condition of 70 °C/490 bar, while the lowest global yield was obtained under the condition of 60 °C/190 bar, corresponding to $45.4 \pm 0.58\%$ and $9.07 \pm 0.6\%$, respectively. The effect of temperature and pressure directly influence the density and, consequently, the solvent's solubility power. An analysis of the isotherms of at 50, 60, and 70 °C separately shows that, as carbon dioxide density increased, the overall extract yield increased in all the experimental conditions studied; therefore, the effect of carbon dioxide density was the most prevalent. However, the analysis of the isochoric at 700, 800, and 900 kg/m³ in the different experimental conditions of temperature and pressure used clearly shows the influence of these properties on global extract yield. In general, the isotherm of 70 °C showed the highest yields for the pressures applied while the isotherm of 60 °C showed the lowest yields.

1.2. Fatty acids extracts

The fatty acid profiles of LABP extracts obtained by CO₂-SE under different operating conditions are presented in Table 1. The standard deviations for all fatty acids were lower than 1.8%. The total amount of fatty acids in açai extracts ranged from 0.02 to 65.81%. Caprylic acid (C8:0) was present in all extracts. The extract obtained at 70 °C/320 bar showed higher caprylic acid concentration, while the lowest concentration was found at 70 °C/490 bar. Traces of capric acid (C10:0) were obtained under 50 °C/150 bar, 70 °C/220 bar, 70 °C/320 bar, and 70 °C/490 bar. Only traces of tridecanoic acid (C13:0), pentadecanoic acid (C15:0), and linolenic acid (C18:3) were found in all experimental conditions. The main saturated fatty acid (SFA) in all extraction conditions was palmitic acid (C16:0) with a concentration of 90.86% at 70 °C/320 bar followed by stearic acid (C18:0). As for polyunsaturated fatty acids (PUFA), oleic acid (C18:1) showed higher concentration at 65.81% followed by linoleic (C18:2) and palmitoleic acids (C16:1). The fatty acid profile analysis of açai extract indicates a low saturated/unsaturated ratio and the amount of monounsaturated fatty acids (MUFA) is greater than of PUFA. Considering oleic acid, Nascimento et al. [35], Schauss et al. [11], and Rogez [10] found similar results of

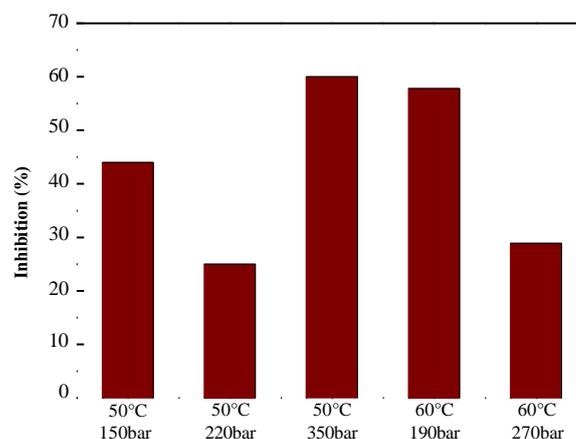


Fig. 2. Phytotoxic effects of açai supercritical extracts of açai on the germination of malice (*M. pudica*) seeds. Data expressed in percentage of inhibition compared to the control treatment. (■) Inhibitory effect.

52%, 56.2%, and 54.9%, respectively, except for the extract obtained under the conditions of 70 °C/320 bar, in which the oleic acid percentage was 0.23%, although these operational conditions showed higher selectivity for palmitic acid (90.86%). In terms of monounsaturated fatty acids, the present research found values similar to those obtained by Nascimento et al. [9] when using enzymatic and hexane extraction, while, in terms of polyunsaturated fatty acids, extracts obtained via CO₂-SE are free from solvent toxicity.

1.3. Allelopathic activity

Fig. 2 shows that all açai extracts obtained showed potential to inhibit the germination of *M. pudica* seeds, therewith the extracts with the lowest and highest phytotoxic potentials were obtained at 50 °C/220 bar with $25.33 \pm 2.04\%$ of inhibition, 60 °C/190 bar with $57.78 \pm 2.34\%$ of inhibition, and 60 °C/350 bar with $60 \pm 1.67\%$ of inhibition. These results indicate that, in some cases, the variation in pressure is more determining of the observed effects than the variation in temperature, although pressure increases.

For *S. obtusifolia* germination, Fig. 3 shows that only the extract obtained in conditions of 50 °C/220 bar and 50 °C/350 bar showed inhibitory activity - $11.53 \pm 2.23\%$ and $5.76 \pm 1.14\%$, respectively. The other extracts showed stimulatory effect and the one obtained at 50 °C/150 bar had the greatest stimulatory effect with $13.46 \pm 1.56\%$. The stimulatory and phytotoxic effects can be related to extract concentration [36–38].

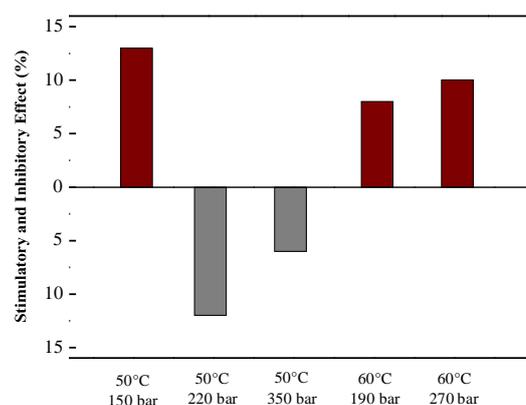


Fig. 3. Phytotoxic effects of açai supercritical extracts in the germination of forest pasture (*S. obtusifolia*) seeds. Data expressed in percentage of inhibition compared to the control treatment. (■) Stimulatory effect and (■) inhibitory effect.

Table 1
Total fatty acids contents of açai (*Euterpe oleracea*) extracts.

Fatty acids	Concentration of fatty acids in % g/100 g								
	50 °C 150 bar	50 °C 220 bar	50 °C 350 bar	60 °C 190 bar	60 °C 270 bar	60 °C 420 bar	70 °C 220 bar	70 °C 320 bar	70 °C 490 bar
C8:0	0.69	1.26	0.83	0.77	1.58	0.40	0.33	2.27	0.02
C10:0	–	0.03	0.02	0.02	0.04	0.03	–	–	–
C12:0	0.07	0.17	0.17	0.13	0.19	0.25	0.07	0.33	0.14
C13:0	–	–	–	–	–	–	0.02	0.21	–
C14:0	0.13	0.24	0.16	0.19	0.21	0.30	0.13	0.42	0.18
C15:0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
C16:0	28.15	30.91	23.47	26.29	29.20	28.58	25.41	90.86	27.81
C16:1	4.95	0.03	5.49	6.14	7.08	6.83	4.16	0.08	5.81
C17:0	–	0.04	0.14	0.03	–	–	0.05	0.19	0.03
C18:0	1.05	1.25	1.02	0.80	1.14	1.16	1.43	5.35	1.33
C18:1	64.86	65.81	52.73	50.78	60.42	62.41	55.71	0.23	64.65
C18:2	–	–	15.54	14.80	–	–	12.59	–	–
C18:3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
C20:0	0.08	–	–	–	0.10	–	–	–	–
C22:0	–	0.22	0.38	–	–	–	0.04	–	–
SFA	30.18	34.15	26.22	28.25	32.48	30.74	27.53	99.67	29.53
MUFA	69.81	65.84	58.23	56.93	67.51	69.25	59.87	0.31	70.46
PUFA	–	–	15.54	14.80	–	–	12.59	–	–
S/U	0.43	0.52	0.35	0.39	0.48	0.44	0.38	321.52	0.42

C8:0 (caprylic acid); C10:0 (capric acid); C12:0 (lauric acid); C13:0 (tridecanoic acid); C14:0 (myristic acid); C15:0 (pentadecanoic acid); C16:0 (palmitic acid); C16:1 (palmitoleic acid); C17:0 (margaric acid); C18:0 (stearic acid); C18:1 (oleic acid); C18:2 (linoleic acid); C18:3 (linolenic acid); C20:0 (arachidic acid); C22:0 (behenic acid); SFA (saturated fatty acids); MUFA (monounsaturated fatty acids); PUFA (polyunsaturated fatty acids); S/U (ratio between saturated/unsaturated fatty acids %/ %).

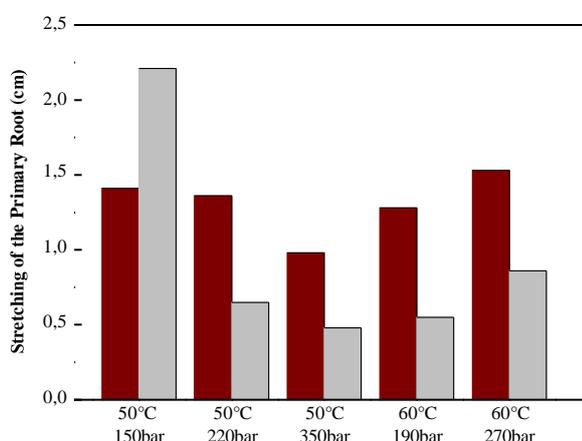


Fig. 4. Phytotoxic effects of supercritical extracts of açai on stretching of the primary root of *S. obtusifolia* (■) and *M. pudica* (■). The data presented are expressed in centimeters.

For González et al. [39], the germination process is triggered after the seeds are saturated in water. Regarding the root elongation of *S. obtusifolia* and *M. pudica*, the allelopathic assays showed the longest root elongation for the extract obtained at 50 °C/150 bar for *M. pudica* and 60 °C/270 bar for *S. obtusifolia*. These results show the low sensitivity of these species when exposed to bioactive molecules present in the extracts, however, both species were more sensitive to the extract obtained at 50 °C/350 bar, with values of 4.8×10^{-3} and 9.8×10^{-3} m of root elongation for *M. pudica* and *S. obtusifolia*, respectively, as shown in Fig. 4. However, maximum inhibition was very low, which indicates that the chemical compounds present in the supercritical extracts have low phytotoxic capacity, specifically to inhibit the elongation of the radicle. By comparison, the primary root elongation of *S. obtusifolia* was inhibited more than of *M. pudica*. Regarding hypocotyl elongation, *M. pudica* was more sensitive to the phytotoxic effects (Fig. 5) and the best results were observed under the conditions of 60 °C/190 bar for *M. pudica* and 50 °C/150 bar for *S. obtusifolia*.

The stimulatory and inhibitory effects recorded for seed germination and radicle and hypocotyl elongation can be attributed

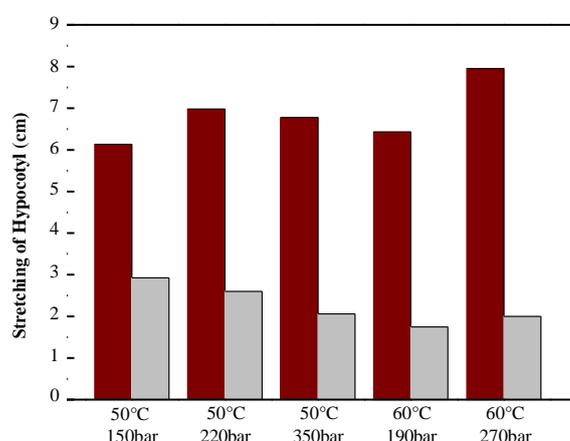


Fig. 5. Phytotoxic effects of supercritical extracts of açai on stretching of hypocotyl *S. obtusifolia* (■) and *M. pudica* (■). The data presented are expressed in centimeters.

to the presence of compounds such as free fatty acids, including linolenic, linoleic, oleic, and palmitic acids, since they have proven phytotoxic effects, and the concentration and number of unsaturations are also important factors for the phytotoxicity of fatty acids [40,41]. Nonetheless, the fatty acid profiles of the extracts are similar, however, there are other secondary metabolites that have not been identified and may be associated with the phytotoxicity and the stimulatory effect on the different seeds analyzed. Overall, the extracts are more effective on seed germination, mainly for the species *M. pudica*.

1.1. Contents of phenolic compounds and anthocyanins in LABP before and after CO₂-SE

The content of phenolic compounds in the LABP samples before CO₂-SE was 5520 ± 1.03 mg/100 g of sample. After CO₂-SE, this content in different operating conditions ranged from 5457 to 7565 mg/100 g of sample. The results showed an increase in the concentration of phenolic compounds in eight of nine samples, and the standard deviations were lower than 0.18% (Fig. 6). The highest concentration of phenolic compounds obtained was in

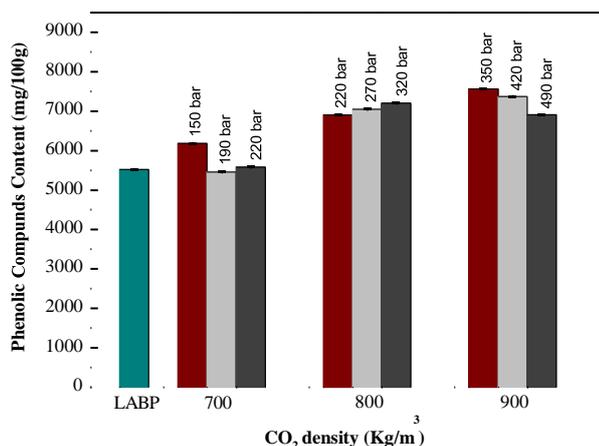


Fig. 6. Phenolic compounds content in lyophilized açai berry pulp before (LABP) and after CO₂-SE. (■) 50 °C, (■) 60 °C and (■) 70 °C isotherms.

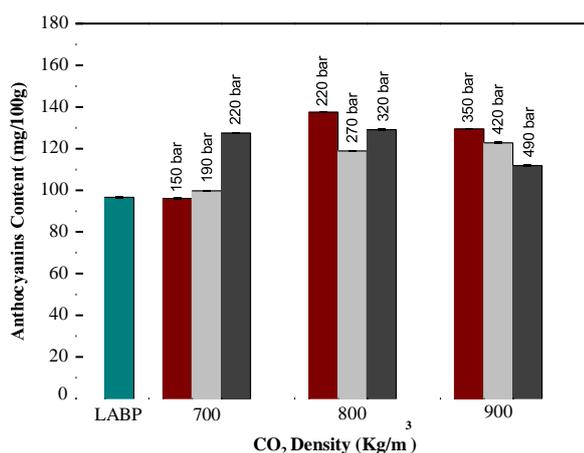


Fig. 7. Anthocyanins content in lyophilized açai berry pulp before (LABP) and after CO₂-SE. (■) 50 °C, (■) 60 °C and (■) 70 °C isotherms.

conditions of 70 °C/350 bar and solvent density of 900 kg/m³. The phenolic compound content in LABP after CO₂-SE sample obtained at 60 °C/190 bar and 700 kg/m³ was approximately equal to that found in pulp before CO₂-SE, i.e., 5457 mg/100 g of sample.

In the LABP before CO₂-SE, the total anthocyanin content was 96.58 ± 0.11 mg/100 g of sample. The total anthocyanin content in LABP samples after CO₂-SE in different operating conditions ranged from 96.1 to 137.5 mg/100 g of sample. Fig. 7 shows the values obtained and their specific deviation; the standard deviation for the samples was lower than 0.15% and the results showed an increase in the concentration of total anthocyanin content in eight of the nine samples. The sample obtained at 50 °C/220 bar and solvent density of 700 kg/m³ exhibited the highest concentration of anthocyanins. The sample obtained at 50 °C/150 bar and solvent density of 700 kg/m³ showed anthocyanin content of 96.58 mg/100 g of sample, which was approximately the same total anthocyanin content found in pulp before CO₂-SE.

The extracts obtained by CO₂-SE favor an increase in contents of phenolic compounds and anthocyanins in LABP, thus the lyophilized açai berry pulp after CO₂-SE has great potential in nutraceutical applications [12–27].

1. Conclusions

The highest global yield on dry basis of the açai extracts was obtained at 70 °C isotherms, while the lowest global yields were

obtained at 60 °C isotherms. The fatty acid profile analysis of açai extracts indicates a low saturated/unsaturated ratio except for 70 °C/320 bar. The amount of MUFA is greater than of PUFA and the SFA content varied from 26.22 to 99.67% at experimental conditions of 50 °C/200 bar and 70 °C/320 bar, respectively. Moreover, the extracts had phytotoxic effect for the species *M. pudica* and some extracts had stimulatory effects on *S. obtusifolia* germination. Radicle and hypocotyl growth were lower for the species *M. pudica* than *S. obtusifolia*. Comparing the phenolic compounds results obtained for LABP before and after CO₂-SE, the best condition was 50 °C/350 bar, while for anthocyanin contents the best condition was 50 °C/220 bar. The LABP samples obtained after CO₂-SE were rich in phenolic compounds and anthocyanins, which shows its potential applications in nutraceutical purposes.

Acknowledgements

Batista, C.C.R. thanks FAPESPA for the doctorate scholarship, J.R. Santos Botelho thanks CNPq – Brazil for the doctorate scholarship; Carvalho Junior, R.N.; Araújo, M. E.; and Machado, N. T. thank CNPq for project no. 486780/2012-0.

References

- [1] L.A. Pacheco Palencia, S.U. Mertens-Talcott, S.T. Talcott, In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.), *Food Chem.* 119 (2010) 1071–1078.
- [2] M.O. Souza, L.S. Silva, C.L.B. Magalhães, B.B. Figueiredo, D.C. Costa, M.E. Silva, M.L. Pedrosa, The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat, *Nutr. Res.* 32 (2012) 976–984.
- [3] J.F.C. Guerra, P.S. Maciel, I.C.M.E. Abreu, R.R. Pereira, M. Silva, L.M. Cardoso, H.M. Pinheiro-Sant’Ana, W.G. Lima, M.E. Silva, M.L. Pedrosa, Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice, *J. Funct. Foods* 14 (2015) 192–202.
- [4] D.G. Yapu, D.S. Mozombite, E.R.A.G. Salgado, Turba Evaluación de la actividad antiproliferativa in vitro de extractos de *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* y *Croton lechleri*, *Biofarbo* 16 (2008) 16–20.
- [5] S.M. Poulouse, D.R. Fisher, J. Larson, D.F. Bielinski, A.M. Rimando, A.N. Carey, et al., Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 1084–1093.
- [6] D. Del Pozo-Insfran, S.S. Percival, S.T. Talcott, Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1222–1229.
- [7] I.S. Newton, Long chain fatty acids in health and nutrition, *J. Food Lipids* 3 (1996) 233–249.
- [8] V. Mulabagal, A.I. Calderón, Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials, *Food Chem.* 134 (2012) 1156–1164.
- [9] J.S.d. Nascimento, S. Couri, R. Antoniassi, S.P. Freitas, Compositic ão em ácidos graxos do óleo da polpa de açai extraído com enzimas e com hexano, *Rev. Bras. Frutic.* 30 (2008) 498–502.
- [10] H. Rogez, Açai: preparo compositic ão e melhoramento da conservação, Universidade Federal do Pará, Belém, 2000.
- [11] A.G. Schauss, X. Wu, R.L. Prior, B. Ou, D. Huang, J. Owens, A. Agarwal, G.S. Jensen, A.N. Hart, E. Shanbrom, Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açai), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8604–8610.
- [12] R. Randhir, Y.-T. Lin, K. Shetty, Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 13 (2004) 295–307.
- [13] S. Samman, P.M. Lyons Wall, N.C. Cook, Flavonoids and coronary heart disease: dietary perspectives, in: C.A. Rice-Evans, L. Packer (Eds.), *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1998, pp. 469–482.
- [14] C. Manach, A. Mazur, A. Scalbert, Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Curr. Opin. Lipidol.* 16 (2005) 77–84.
- [15] R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia, et al., Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *J. Appl. Microbiol.* 90 (2001) 494–507.
- [16] Melissa Walter, Enio Marchesan, P.F.S. Massoni, L.P. da Silva, G.M.S. Sartori, R.B. Ferreira, Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing, *Food Res. Int.* 50 (2013) 698–703.

- [17] C.M. Belda-Galbis, A. Jiménez-Carretón, M.C. Pina-Pérez, A. Martínez, D. Rodrigo, Antimicrobial activity of ac, ai against *Listeria innocua*, *Food Control* 53 (2015) 212–216.
- [18] D.Y.S. Wong, I.F. Musgrave, B.S. Harvey, S.D. Smid, Ac, ai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against β -amyloid exposure in vitro, *Neurosci. Lett.* 556 (2013) 221–226.
- [19] S.M. Poulouse, D.R. Fisher, D.F. Bielinski, S.M. Gomes, A.M. Rimando, A.G. Schauss, B. Shukitt-Hale, Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açaí (*Euterpe* spp.) fruit pulp extracts in rodent brain cells in vitro, *Nutrition* 30 (2014) 853–862.
- [20] L.A. Pacheco-Palencia, S.T. Talcott, Chemical stability of ac, ai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems, *Food Chem.* 118 (2010) 17–25.
- [21] V. Vera de Rosso, S. Hillebrand, E.C. Montilla, F.O. Bobbio, P. Winterhalter, A.Z. Mercadante, Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and ac, ai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS, *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 291–299.
- [22] M. Heinrich, T. Dhanji, I. Casselman, Ac, ai (*Euterpe oleracea* Mart.)—a phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims, *Phytochem. Lett.* 4 (2011) 10–21.
- [23] M.A. Lila, Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach, *J. Biomed. Biotechnol.* 2004 (5) (2004) 306–313.
- [24] J. Hao, H. Zhu, Z. Zhang, S. Yang, H. Li, Identification of anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L.) by UPLC/Q-TOF-MS and their in vitro and in vivo antioxidant activities, *J. Cereal Sci.* 64 (2015) 92–99.
- [25] L.-S. Wang, G.D. Stoner, Anthocyanins and their role in cancer prevention, *Cancer Lett.* 269 (2008) 281–290.
- [26] J.M. Gutierrez, F.B. Carvalho, M.R.C. Schetinger, P. Marisco, P. Agostinho, M. Rodrigues, M.A. Rubin, R. Schmatz, C.R. da Silva, G.d.P. Cognato, J.G. Farias, C. Signor, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, M. Bogo, C.D. Bonan, R. Spanevello, Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type, *Life Sci.* 96 (2014) 7–17.
- [27] H. Badshah, T.H. Kim, M.O. Kim, Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro, *Neurochem. Int.* 80 (2015) 51–59.
- [28] A.P.d.S. Souza Filho, M.A.M.d. Vasconcelos, R.L. Cunha, M.d.G.B. Zoghbi, F.J.C. Figueiredo, S.d.M. Alves, Avaliac, ão de Efeito Alelopático do Óleo Essencial Obtido de Oriza sobre Plantas Daninhas, *Bol. Pesqui. Desenvol. - Embrapa Amazônia Orient.* 68 (2009) 1–18.
- [29] ASAE Standards, Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving, ASAE S319.3, 1998, pp. 547.
- [30] Instituto Adolfo Lutz, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed., IMESP, 2005.
- [31] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC 963.15-1973, Fat in Cacao Products - Soxhlet Extraction Method, 1973.
- [32] A.P.S. Souza Filho, et al., Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*, *Planta Daninha* 27 (2009) 499–505.
- [33] V.L. Singleton, J.A. Rossi Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144–158.
- [34] Analysis of anthocyanins, in: F.J. Francis, P. Markakis (Eds.), *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press, 1982, pp. 182–205.
- [35] R.J.S. Nascimento, S. Couri, R. Antoniassi, S.P. Freitas, Composic, ão em ácidos graxos do óleo da polpa de ac, ai extraído com enzimas e hexano, *Rev. Bras. Frutic.* 30 (2008) 498–502.
- [36] E.L. Rice, *Allelopathy*, Academic Press, New York, 1984, pp. 422.
- [37] M.I.R.J. An, J.V. Lovett, Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation, *J. Chem. Ecol.* 19 (10) (1993) 2379–2388.
- [38] D.R. Batish, et al., Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*), *J. Plant Physiol.* 165 (3) (2008) 297–305.
- [39] H.R. González, D.M. Mederos, I.H. Sosa, Efectos alelopáticos de restos de diferentes espécies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) em condiciones de laboratorio, *Rev. Cuba. Plantas Med.* 7 (2) (2002) 67–72.
- [40] C. In-Ze, H. Wen-Ya, W. Jiunn-Tzong, Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae), *J. Phycol.* 40 (3) (2004) 474–480.
- [41] W. Jiunn-Tzong, et al., Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria, *Aquat. Toxicol.* 80 (4) (2006) 338–345.

ANEXOS

Tabela A1- Dados experimentais da biometria dos frutos de açaí

Amostra	Peso (g)	Diâmetro (cm)	Comprimento (cm)
1	2,5789	1,7	1,5
2	2,9218	1,7	1,5
3	2,7285	1,6	1,5
4	2,1539	1,5	1,4
5	2,691	1,7	1,5
6	2,5907	1,6	1,4
7	2,3898	1,6	1,5
8	2,7167	1,7	1,5
9	2,4621	1,6	1,4
10	2,5993	1,6	1,3
11	2,3675	1,6	1,4
12	2,9767	1,8	1,5
13	2,5234	1,7	1,4
14	2,4886	1,6	1,5
15	2,6999	1,6	1,5
16	2,5267	1,6	1,4
17	2,5492	1,6	1,3
18	2,394	1,6	1,4
19	2,7565	1,6	1,5
20	2,4109	1,7	1,4
21	1,8803	1,5	1,3
22	2,3976	1,6	1,4
23	2,7455	1,7	1,5
24	2,4096	1,6	1,4
25	2,5347	1,6	1,4
26	2,5516	1,6	1,4
27	2,6632	1,6	1,5
28	2,5205	1,7	1,5
29	2,6464	1,6	1,3
30	2,6363	1,6	1,4
31	2,9349	1,8	1,5
32	2,7745	1,7	1,5
33	2,7001	1,6	1,4
34	2,6052	1,6	1,4
35	2,6604	1,6	1,4
36	2,9913	1,8	1,6
37	1,7125	1,5	1,2
38	2,3779	1,6	1,4
39	2,6882	1,7	1,5

40	2,5332	1,6	1,4
41	2,7381	1,7	1,5
42	2,0955	1,5	1,2
43	2,5577	1,7	1,5
44	2,3422	1,6	1,4
45	2,8088	1,7	1,5
46	2,3229	1,6	1,4
47	2,7944	1,7	1,5
48	2,0365	1,5	1,3
49	2,7811	1,7	1,5
50	1,7214	1,5	1,3
51	2,6516	1,6	1,4
52	2,8915	1,7	1,5
53	1,532	1,4	1,2
54	1,8638	1,5	1,3
55	2,5204	1,7	1,5
56	2,5758	1,6	1,4
57	2,5364	1,6	1,4
58	2,5002	1,6	1,4
59	1,4666	1,4	1,2
60	2,6485	1,7	1,5
61	2,1291	1,7	1,5
62	1,5457	1,4	1,2
63	2,6586	1,6	1,4
64	1,8062	1,6	1,4
65	2,5013	1,6	1,4
66	2,5013	1,6	1,4
67	2,5078	1,7	1,5
68	2,5274	1,7	1,5
69	2,6143	1,7	1,5
70	2,4914	1,6	1,4
71	1,9334	1,6	1,4
72	2,89	1,8	1,6
73	2,8998	1,6	1,4
74	2,431	1,4	1,3
75	1,578	1,5	1,2
76	2,3792	1,5	1,3
77	1,9719	1,5	1,3
78	1,6598	1,5	1,2
79	1,5615	1,4	1,1
80	1,611	1,6	1,2
81	2,2852	1,6	1,3
82	2,187	1,6	1,3
83	2,6246	1,7	1,3
84	1,8382	1,7	1,4
85	1,5188	1,4	1,1

86	1,2731	1,4	1,2
87	1,66272	1,4	1,1
88	1,8828	1,7	1,3
89	1,7805	1,5	1,1
90	1,5244	1,4	1,2
91	1,6932	1,5	1,3
92	1,6448	1,5	1,3
93	1,6904	1,5	1,3
94	1,7117	1,5	1,3
95	1,4125	1,4	1,4
96	2,3535	1,6	1,1
97	2,222	1,6	1,2
98	1,5844	1,4	1,1
99	1,2947	1,3	1,3
100	1,69	1,4	1,1
101	1,7346	1,5	1,2
102	1,6458	1,5	1,3
103	1,6157	1,5	1,3
104	1,609	1,5	1,5
105	1,4245	1,4	1,3
106	1,8465	1,5	1,4
107	1,2456	1,4	1,5
108	1,463	1,4	1,2
109	1,1432	1,4	1,3
110	1,4051	1,4	1,5
111	1,3127	1,4	1,4
112	2,5843	1,7	1,4
113	1,5399	1,4	1,4
114	1,5377	1,5	1,2
115	1,4538	1,4	1,5
116	1,4545	1,4	1,5
117	1,7399	1,6	1,2
118	1,4978	1,4	1,4
119	1,3905	1,4	1,4
120	1,2791	1,3	1,4
121	1,6788	1,4	1,4
122	1,6967	1,4	1,5
123	1,2944	1,4	1,5
124	2,2823	1,6	1,3
125	1,8424	1,5	1,2
126	1,69	1,5	1,3
127	1,3222	1,4	1,2
128	1,5049	1,4	1,2
129	1,1845	1,4	1,2
130	1,7901	1,6	1,5
131	1,3538	1,4	1,5

132	1,5546	1,4	1,6
133	2,504	1,6	1,4
134	1,5749	1,5	1,5
135	1,5987	1,4	1,4
136	1,6967	1,5	1,5
137	1,4725	1,4	1,4
138	1,6363	1,5	1,4
139	1,5941	1,4	1,4
140	1,686	1,5	1,4
141	1,4451	1,4	1,4
142	1,6635	1,5	1,7
143	2,4775	1,6	1,4
144	1,6963	1,5	1,5
145	1,7244	1,5	1,4
146	1,8704	1,5	1,4
147	1,5799	1,4	1,6
148	1,5518	1,4	1,4
149	1,6472	1,4	1,4
150	1,8008	1,5	1,3
151	1,722	1,5	1,4
152	1,7174	1,5	1,4
153	1,4019	1,4	1,4
154	1,425	1,4	1,3
155	1,7623	1,5	1,4
156	1,3036	1,4	1,5
157	1,7739	1,6	1,4
158	1,6012	1,5	1,3
159	1,4381	1,3	1,1
160	1,4847	1,4	1,2
161	1,8276	1,5	1,2
162	1,5786	1,4	1,2
163	1,8428	1,5	1,5
164	1,7021	1,4	1,3
165	1,2501	1,3	1,4
166	1,4842	1,4	1,2
167	1,3535	1,4	1,2
168	1,7297	1,5	1,3
169	1,4187	1,4	1,1
170	1,5838	1,5	1,2
171	1,3097	1,3	1,1
172	1,9444	1,5	1,2
173	1,8513	1,4	1,1
174	1,6092	1,5	1,3
175	1,6832	1,5	1,3
176	1,7528	1,5	1,4
177	1,572	1,4	1,3

178	1,6205	1,4	1,4
179	2,0343	1,6	1,5
180	1,3943	1,4	1,2
181	1,8349	1,5	1,4
182	1,418	1,4	1,4
183	1,7472	1,5	1,5
184	1,975	1,6	1,4
185	1,6463	1,4	1,5
186	1,8274	1,5	1,4
187	1,5351	1,4	1,5
188	1,6753	1,5	1,5
189	1,684	1,4	1,5
190	1,8509	1,5	1,5
191	1,6758	1,5	1,5
192	1,6182	1,5	1,5
193	1,775	1,5	1,5
194	1,682	1,5	1,5
195	1,8089	1,5	1,4
196	1,5765	1,5	1,5
197	1,6726	1,5	1,5
198	1,5917	1,4	1,5
199	1,4835	1,4	1,5
200	1,3013	1,4	1,3
201	2,3589	1,6	1,4
202	2,4504	1,6	1,3
203	1,6912	1,5	1,3
204	1,7614	1,5	1,4
205	1,8	1,5	1,5
206	1,688	1,5	1,4
207	2,2694	1,6	1,3
208	1,4276	1,3	1,2
209	2,6563	1,7	1,3
210	2,6239	1,7	1,4

Tabela A2- Dados experimentais da granulometria da polpa de açaí liofilizada

# Tyler	Diâmetro da malha (mm)	di+1	$(di \cdot di+1)^{0,5}$	Wi (g)	log d	wi.logdi	%
8	2,36			21,79	0,372912	8,125753	9,478446
14	1,2	2,36	1,6828547	34,09	0,079181	2,699289	14,82883
20	0,84	1,2	1,003992	64,97	-0,07572	-4,91957	28,26134
28	0,54	0,84	0,6734983	8,79	-0,26761	-2,35226	3,823568
42	0,35	0,54	0,4347413	88,71	-0,45593	-40,4457	38,58802
48	0,3	0,35	0,324037	10,22	-0,52288	-5,34382	4,445604
Fundo	0,15	0,3	0,212132	1,32	-0,82391	-1,08756	0,574188

Tabela A3- Dados experimentais das isotermas de rendimento global

Temperatura	Pressão,	Densidade,	Rendimento,	Desvio
	(bar)	(Kg/m³)	(%)	
50 °C	150	700	19,15	1,63
	220	800	35,72	0,23
	350	900	43,72	3,28
60 °C	190	700	9,07	0,60
	270	800	33,81	0,34
	420	900	40,78	0,19
70 °C	220	700	39,98	1,69
	320	800	40,07	0,08
	490	900	45,40	0,58

Tabela A4. Dados do ensaio cinético obtido via extração com fluido supercrítico com CO₂ a partir da polpa de açaí liofilizada a 50 °C, 220 bar e vazão de CO₂ de 3 L/min.

Coleta	Tempo	Massa de	Massa	Rendimento
	(min)	óleo	acumulada	(%)
		extraída (g)	de óleo (g)	
1	10	1,0538	1,0538	10,48
2	20	0,418	1,4718	14,64
3	30	0,3063	1,7781	17,69
4	50	0,4466	2,2247	22,14
5	70	0,3775	2,6022	25,90
6	90	0,1247	2,7269	27,14
7	120	0,0845	2,8114	27,98
8	150	0,067	2,8784	28,65
9	180	0,058	2,9364	29,22
10	210	0,057	2,9934	29,79
11	240	0,0577	3,0511	30,36

Tabela A5 - Dados do ensaio cinético obtido via extração com fluido supercrítico com CO₂ a partir da polpa de açaí liofilizada a 50 °C, 350 bar e vazão de CO₂ de 3 L/min.

Coleta	Tempo (min)	Massa de óleo extraída (g)	Massa acumulada de óleo (g)	Rendimento (%)
1	10	1,2537	1,2537	12,50
2	20	0,5421	1,7958	17,90
3	30	0,4684	2,2642	22,57
4	50	0,3326	2,5969	25,89
5	70	0,3668	2,9638	29,55
6	90	0,3414	3,3052	32,95
7	120	0,3470	3,6523	36,41
8	150	0,2042	3,8565	38,45
9	180	0,1562	4,0128	40,00
10	210	0,0346	4,0474	40,35
11	240	0,0457	4,0932	40,81