

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HEBER PELEG CORNELIO SANTIAGO

EXTRAÇÃO DE ÓLEOS RICOS EM OMEGA-3, -6 OU -9 DA AMÊNDOA DE CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*), PEQUI (*Caryocar brasiliensis*) E SACHA INCHI (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) USANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS

Pirassununga

2019

HEBER PELEG CORNELIO SANTIAGO

EXTRAÇÃO DE ÓLEOS RICOS EM OMEGA-3, -6 OU -9 DA AMÊNDOA DE CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*), PEQUI (*Caryocar brasiliensis*) E SACHA INCHI (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) USANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS

Versão Corrigida

Tese apresentado à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Contratação: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira

Pirassununga

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C814e Cornelio-Santiago, Heber Peleg
 Extração de óleos ricos em omega-3, -6 ou -9 da
 amêndoa de castanha do Brasil (*Bertholletia
 excelsa*), pequi (*Caryocar brasiliensis*) e sacha
 inchi ... / Heber Peleg Cornelio-Santiago ;
 orientadora Alessandra Lopes de Oliveira. --
 Pirassununga, 2019.
 195 f.

 Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
 e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
 Paulo.

 1. CO2 supercrítico. 2. Óleo. 3. B-sitosterol .
 4. Ácidos graxos insaturados. 5. Compostos
 fenólicos. I. Oliveira, Alessandra Lopes de, orient.
 II. Título.

Este trabalho é dedicado a meu pai amado por sempre proteger-me, abençoar-me e não me desamparar na minha vida toda. A minha querida mãe Gloria Santiago Bustamante com todo meu amor e carinho pelo constante amor, conselhos sábios, pela ajuda moral e econômica para alcançar meus objetivos. A meus irmãos (as) Judith, Christian e Katherin, pelo imenso amor, carinho, respeito e ajuda incondicional que todos os dias compartilhados comigo. A meu filho Arthur Santiago e as pessoas que me fizeram feliz durante esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha prezada orientadora Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira pela oportunidade de receber-me e incluir na família do LTAPPN, pelo carinho, conhecimentos compartilhados e constante orientação na realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Zootecnia de Engenharia de Alimentos FZEA-USP que de alguma maneira contribuíram na minha formação acadêmica. Um agradecimento pessoal à Profa. Dra. Monica que me ajudou na análise de β -sitosterol.

Aos meus queridos amigos e colegas: Nilson, Debora, Naila, Víctor, Diana, Gilda, Lia, Hubert, Julio, Santiago, José, Luís, Rocio obrigado pelos momentos de alegria, descontração e apoio.

Aos prezados técnicos Fabinho, Keila, Marcelo, Carla e Rodrigo obrigada pelo apoio técnico prestado.

Agradeço ao FONDECYT pela concessão da bolsa de Doutorado.

Agradeço à CAPES pelo apoio de 02 meses de bolsa e custeio na participação de congresso nacional.

RESUMO

CORNELIO-SANTIAGO, H.P. **Extração de óleos ricos em omega-3, -6 ou -9 da amêndoa de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), Pequi (*Caryocar brasiliensis*) e Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana sp. nov.*) usando fluidos pressurizados.** 2019. 192 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

O objetivo da pesquisa foi estudar os efeitos do processo de extração com líquido pressurizado (PLE): tempo estático (St, 2 – 10 min), da razão solvente-alimentação (S/F, 4,5 – 5,8 mL/g) e da temperatura (T, 60 – 90 °C) e os efeitos do processo de extração com CO₂ supercrítico: T (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e pressão (P, 25 e 35 MPa) no rendimento da extração do óleo (X₀) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, e nos ácidos graxos livres (FFA), conteúdo de fenólicos totais (TPC), conteúdo de β-sitosterol e perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis dos óleos obtidos pelos processos de extração. Além disso, também foi determinado a solubilidade e a pressão de vapor dos óleos obtidos com CO₂ supercrítico, e a viscosidade e a densidade de todos os óleos obtidos. No processo de PLE, a quantidade de solvente utilizada (S/F) não influenciou o X₀, mas o St e a T influenciaram significativamente (p < 0,05) o X₀. O máximo X₀ (% , massa) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi foram 60,40%, 39,66% e 46,38%, respectivamente e ocorreram quando o St foi de 9 min e a T de 86 °C. Também o St e T influenciaram significativamente (p < 0,05) o TPC (64,23 a 589,46 e 19,77 a 43,86 mg EAG/kg de óleo) dos óleos da amêndoa de pequi e sachá inchi, respectivamente, mas não influenciaram os FFA (0,25 a 0,31; 0,21 a 0,25 e 0,25 a 0,30), conteúdo de β-sitosterol (9,51 a 40,32; 3,96 a 6,3 e 31,71 a 57,22 mg/100 g de óleo) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, respectivamente, e também não influenciou o TPC (39,58 a 108,41 mg EAG/kg de óleo) do óleo da amêndoa de castanha do Brasil. No processo de extração com CO₂ supercrítico, os maiores X₀ (% , massa) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi foram 67,51 ± 0,16%, 40,47% e 48,84% sob as condições de 70 °C e 35 MPa, 60 °C e 35 MPa e 80°C a 35 MPa, respectivamente; e o FFA (0,27 ± 0,01 a 0,32 ± 0,01; 0,21 a 0,25 e 0,25 a 0,31), o TPC (6,37 ± 0,23 a 43,83 ± 0,35; 85,21 a 154,35 e 6,37 a 48,35 mg EAG/kg de óleo) e o conteúdo de β-sitosterol (15,52 ± 1,67 a 23,63 ± 3,12; 3,91 a 6,44 e 46,58 a 253,67 mg/100 g de óleo) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, respectivamente foram determinados. A solubilidade do óleo da amêndoa de castanha do Brasil variou pela influência direta da pressão de vapor do óleo, mas a solubilidade dos óleos da amêndoa de pequi e sachá inchi variaram pela influência direta da densidade do CO₂ supercrítico. De forma geral, os processos de extração não influenciaram sobre o perfil

dos ácidos graxos e triacilglicerois, os principais ácidos graxos e triacilglicerois do óleo da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sacha inchi foram ácido linoleico (ω -6) e SLO + SOL, ácido oleico (ω -9) e OOP e ácido linolênico (ω -3) e LLLn, respectivamente, assim mesmo, a densidade e viscosidade dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sacha inchi não foram influenciados pelos processos de extração empregados.

Palavra chave: CO₂ supercrítico, Óleo, β -sitosterol, Ácidos graxos insaturados, Compostos fenólicos

ABSTRACT

CORNELIO-SANTIAGO, H.P. **Extraction of omega-3, -6 or -9 rich oils from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*), Pequi (*Caryocar brasiliensis*) and Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. Nov.) kernel using pressurized fluids.** 2019. 192 f. PhD. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The objective of the research was to study the effects of extraction with pressurized liquid (PLE) process: static time (St, 2 - 10 min), solvent-feed ratio (S/F, 4.5 - 5.8 mL/g) and temperature (T, 60 - 90 °C) and the effects of the supercritical CO₂ extraction process (T, 40, 50, 60, 70 and 80 °C) and pressure (P, 25 and 35 MPa) in the oil extraction yield (X₀) of Brazil nut, pequi and sachá inchi kernel and in the free fatty acids (FFA), total phenolic content (TPC), β-sitosterol and fatty acid and triacylglycerol profile of the oils obtained by the extraction processes. In addition, the solubility and vapor pressure of the oils obtained with supercritical CO₂, and the viscosity and density of all oils obtained were determined. In PLE process, the amount of solvent used (S/F) did not influence X₀, but St and T significantly (p < 0.05) influenced X₀. The maximum X₀ (% mass) of Brazil nut, pequi and sachá inchi kernel were 60.40%, 39.66% and 46.38%, respectively, and they occurred when St was 9 min and the T was 86 °C. In addition, St and T significantly (p < 0.05) influenced TPC (64.23 to 589.46 and 19.77 to 43.86 mg EAG/kg oil) of pequi and sachá inchi kernel oils, respectively, but did not influence FFA (0.25 to 0.31; 0.21 to 0.25 and 0.25 to 0.30), β-sitosterol content (9.51 to 40.32; 3.96 to 6.3 and 31.71 to 57.22 mg/100 g of oil) of the Brazil nut, pequi and sachá inchi kernel oils, respectively, and also did not influence the TPC (39.58 to 108.41 mg EAG/kg oil) of Brazil nut kernel oil. In the extraction process with supercritical CO₂, the highest X₀ (% mass) of Brazil nuts, pequi and sachá inchi kernel were 67.51 ± 0.16%, 40.47% and 48.84% under the conditions of 70 °C and 35 MPa, 60 °C and 35 MPa and 80 °C at 35 MPa, respectively. FFA (0.27 ± 0.01 to 0.32 ± 0.01; 0.21 to 0.25 and 0.25 to 0.31), TPC (6.37 ± 0.23 to 43.83 ± 0.35, 85.21 to 154.35 and 6.37 to 48.35 mg EAG/kg oil) and the β-sitosterol content (15.52 ± 1.67 to 23.63 ± 3.12; 3.91 to 6.44 and 46.58 to 253.67 mg/100 g of oil) for Brazil nut, pequi and sachá inchi kernel oils, respectively, were determined. The solubility of Brazil nut kernel oil varied by the direct influence of oil vapor pressure, but the solubility of pequi and sachá inchi kernel oils varied by the direct influence of supercritical CO₂ density. Overall, the extraction processes did not influence the fatty acids and triacylglycerols profile. The main fatty acids and triacylglycerols in Brazil nut, pequi and sachá inchi kernel oil were linoleic acid (ω-6) and SLO + SOL, oleic acid (ω-9) and OOP and

linolenic acid (ω -3) and LLLn, respectively. The density and viscosity of Brazil nut, pequi and sacha inchi kernel oils were not influenced by the extraction processes employed.

Keywords: supercritical CO₂, Oil, β -sitosterol, Unsaturated fatty acid, Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas moleculares dos principais compostos bioativos encontrados na semente oleaginosa de algumas espécies dos gêneros <i>Bertholletia</i> , <i>Plukenetia</i> e <i>Caryocar</i>	24
Figura 2 - <i>Bertholletia excelsa</i> (fruta, semente e amêndoa).....	24
Figura 3 - <i>Plukenetia huayllabambana</i> sp. nov. (fruto, semente e amêndoa) e <i>Plukenetia volubilis</i> (semente e amêndoa)	26
Figura 4 - <i>Caryocar brasiliense</i> (fruta, semente e amêndoa).....	29
Figura 5 - Fluxograma do processamento de óleo das sementes oleaginosas de algumas espécies dos gêneros <i>Bertholletia</i> sp. (a), <i>Plukenetia</i> sp. (b) e <i>Caryocar</i> sp. (c).....	35
Figura 6 - Estado supercrítico para um componente puro.....	46
Figura 7 - Comportamento da solubilidade de uma substância de baixa volatilidade (líquidos ou sólidos) em um fluido subcrítico ($T < T_c$) ou um fluido supercrítico ($T > T_c$) como função da temperatura	46
Figura 8 - Digrama de pressão-temperatura-densidade do CO_2	47
Figura 9 - Processo de SFE a partir de uma matriz vegetal	48
Figura 10 - Curva de extração global de uma matriz vegetal com fluido supercrítico	49
Figura 11 - Sistema esquemático de extração com líquido pressurizado (a) e a célula de extração condicionada (b).....	73
Figura 12 - Diagrama de Pareto (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência de St e S/F em X_0 (%); Diagrama de Pareto (c) e superfície de resposta (d) mostrando a influência de St e T em X_0 (%).....	85
Figura 13 - Diagrama de Pareto (a) mostrando a influência de St e S/F em TPC (mg EAG/kg de óleo); Diagrama de Pareto (b) mostrando a influência de St e T em em TPC (mg EAG/kg de óleo).....	86
Figura 14 - Comportamento do rendimento da extração do óleo (X_0) e do teor de β -Sitosterol pela temperatura (a) e tempo estático (b)	91
Figura 15 - Frutos de pequi (<i>C. brasiliensis</i>) (a), endocarpo (polpa amarelo-alaranjada) (b), sementes (c), casca da semente (marrom e duro) (d) e amêndoa (incluindo embrião, endosperma e tegumento) (e).....	102
Figura 16 - Diagrama de Pareto (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência de St e T no X_0 (% massa); Diagrama de Pareto (c) e curva de contorno (d) mostrando a influência de St e T no TPC (mg EAG/kg de óleo).....	111
Figura 17 - Diagrama de Pareto (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência de St e T no X_0 (% massa); Diagrama de Pareto (c) e (d) mostrando a influência de St e T no TPC (mg EAG/kg de óleo) e conteúdo de β -sitosterol (mg/100 g óleo).	134
Figura 18 - Sistema de extração supercrítica SFE-500 (Thar SFC Waters, Milford, EUA) (A) e acondicionamento do leito fixo (B)	149

Figura 19 - As curvas de extração global obtido à 60 °C e 30 MPa usando um extrator de leito fixo com 290 cm ³ com 10 g de amêndoa triturada de castanha do Brasil; C1: 7 g/min e 120 min; C2: 10 g/min e 230 min; e C3: 15 g/min e 230 min.....	154
Figura 20 - Curvas cinéticas obtidos à 15 g/min durante 240 min usando um extrator de leito fixo com 290 cm ³ com 10 g de castanha do Brasil triturada: (a) à 60 °C e (b) a 35 MPa....	157
Figura 21 - Curva cinética a 60 °C, 35 MPa e 15 g/min usando 10 g de amêndoa de Pequi triturada	160
Figura 22 - Sistemas de extração com fluido supercrítico, SFE-1, usado para medir a solubilidade pelo método estático	169
Figura 23 - Curvas termogravimétricas do óleo das amêndoas de castanha do Brasil —, sachá inchi — e pequi —	181
Figura 24 - Termogravimetriado com a linha de DSC para determinar a região onde serão medidas as entalpia do óleo das amêndoas de castanha do Brasil —, sachá inchi — e pequi —	182
Figura 25 - Termogravimetriado com a linha de DSC para determinar a entalpia do óleo das amêndoas de castanha do Brasil (A), Pequi (B) e Sachá Inchi (C)	183
Figura A1 - Curva padrão da relação entre a concentração e a % em área dos picos cromatográficos do éster metílico de ácido mirístico	191
Figura A2 - Curva padrão de ácido gálico	192
Figura A3 - Curva padrão da relação entre a concentração e a % em área dos picos cromatográficos do β-sitosterol.....	196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de óleo nas amêndoas de algumas espécies dos gêneros <i>Bertholletia</i> , <i>Plukenetia</i> e <i>Caryocar</i> , métodos de extração e solvente utilizados	36
Tabela 2 - Resumo de condições experimentais de extração de óleo usando CO ₂ supercrítico. Considerando a redução de tamanho por trituração e moagem	52
Tabela 3 - Níveis das variáveis independentes de dois delineamentos composto central rotacional (DCCR) utilizados para otimizar o processo de PLE do óleo de amêndoa de castanha do Brasil	74
Tabela 4 - Composição da amêndoa de castanha do Brasil e propriedades físicas do leiteo fixo.....	77
Tabela 5 - Matriz DCCR - 1 com os resultados para X ₀ , TPC e FFA de óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido com álcool IPA pressurizado	80
Tabela 6 - Matriz DCCR - 2 com os resultados para X ₀ , TPC, FFA e β-Sitosterol de óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido com álcool IPA pressurizado	82
Tabela 7 - Coeficientes e valor-p dos modelos (DCCR-1 e DCCR-2) para óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtidos com álcool IPA pressurizado	83
Tabela 8 - Perfis de ácidos graxos (% , massa) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil obtidos por extração com Soxhlet e álcoois IPA e EtOH pressurizados	89
Tabela 9 - Matriz de DCCR com resultados de rendimento de extração de óleo (X ₀), conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β-sitosterol do óleo de amêndoa de pequi obtido por álcool isopropílico pressurizado.....	104
Tabela 10 - Coeficientes de regressão, valor-p e análise de variância (ANOVA). Modelos de primeira ordem para rendimento de extração de óleo (X ₀) e conteúdo de fenólicos totais (TPC) de óleo de amêndoa de pequi obtido por álcool isopropílico pressurizado	110
Tabela 11 - Perfis de ácidos graxos (% , massa) do óleo de amêndoa de pequi obtido por extração com Soxhlet e álcool isopropílico pressurizado	115
Tabela 12 - Provavel composição de triacilglicerois do óleo de amêndoa de pequi	115
Tabela 13 - Matriz de CCRD com resultados de rendimento de extração de óleo (X ₀), conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β-sitosterol do óleo de amêndoa de sacha inchi obtidos por álcool isopropílico pressurizado	128
Tabela 14 - Coeficientes de regressão, valor-p e análise de variância (ANOVA). Modelos de primeira ordem para rendimento de extração de óleo (X ₀) e conteúdo de fenólicos totais (TPC) de óleo de amêndoa de sacha inchi obtido por álcool isopropílico pressurizado	133
Tabela 15 - Perfis de ácidos graxos (% , massa) do óleo de amêndoa de sacha inchi obtido por extração com Soxhlet e álcool isopropílico pressurizado	139
Tabela 16 - Provavel composição de triacilglicerois do óleo de amêndoa de sacha inchi ..	139
Tabela 17 - Parâmetros operacionais constantes adotados na extração com CO ₂ supercrítico para a determinação do rendimento de extração de óleo	150

Tabela 18 - Rendimento de extração de óleo e porcentagem de recuperação de óleo da amêndoa triturada de castanha do Brasil nas condições C1, C2 e C3.....	153
Tabela 19 - Planejamento experimental não aleatorizado com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), óleo recuperado, conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol de óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido por extração com CO_2 supercrítico	156
Tabela 20 - Planejamento experimental não aleatorizado com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), óleo recuperado, conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol de óleo de amêndoa de pequi obtido por extração com CO_2 supercrítico.....	159
Tabela 21 - Planejamento experimental não aleatorizado com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), óleo recuperado, conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol de óleo de amêndoa de Sacha Inchi obtido por extração com CO_2 supercrítico	161
Tabela 22 - Provavel composição de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de castanha do Brasil	174
Tabela 23 - Provavel composição de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de Sacha Inchi .	175
Tabela 24 - Provavel composição de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de Pequi.....	175
Tabela 25 - Estudo do tempo de equilíbrio para determinar a solubilidade e média de Tukey experimental do óleo em CO_2 supercrítico.....	176
Tabela 26 - Média de Tukey da solubilidade de óleo de castanha do Brasil em CO_2 supercrítico à 35MPa após 3h de tempo de equilíbrio.....	176
Tabela 27 - Média de Tukey da solubilidade de óleo de Sacha Inchi em CO_2 supercrítico à 35MPa após 3h de tempo de equilíbrio.....	177
Tabela 28 - Média de Tukey da solubilidade de óleo de Pequi em CO_2 supercrítico à 35MPa após 3h de tempo de equilíbrio.....	178
Tabela 29 - Densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido via extração com CO_2 supercrítico e extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico como solvente.....	179
Tabela 30 - Densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de Sacha Inchi obtido via extração com CO_2 supercrítico e extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico como solvente.....	180
Tabela 31 - Densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de Pequi obtido via extração com CO_2 supercrítico e extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico como solvente	181
Tabela 32 - Dados termogravimétricos da variação de energia em função da temperatura utilizadas no cálculo da pv e a massa molar estimada (M).....	185
Tabela 33 - Valores de pv encontrados a partir da Equação de Clausius-Clapeyron	186

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
CAPÍTULO 1: Sementes oleaginosas nativas do Bioma Amazônico e Cerrado Brasileiro: compostos bioativos, impacto na saúde, interesse comercial e novos processos de produção verde	22
1. Características gerais da família botânica, constituintes químicos e propriedades biológicas das sementes oleaginosas	23
1.1. <i>Bertholletia</i>	23
1.2. <i>Plukenetia</i>	25
1.3. <i>Caryocar</i>	28
2. Interesse comercial	33
3. Processos de extração de óleo atual e novo para as amêndoas das sementes oleaginosas de <i>Bertholletia</i> , <i>Plukenetia</i> e <i>Caryocar</i>	34
4. Tecnologias verdes: Extração com líquido pressurizado e com fluido supercrítico	42
4.1. Processo de extração com líquido pressurizado	43
4.2. Processo de extração com fluido supercrítico	45
4.2.1. Curva de extração global (OEC)	48
5. Referências bibliográficas	53
CAPÍTULO 2: Extração de óleo de amêndoa de castanha do Brasil usando solventes verdes: Efeitos das variáveis do processo no rendimento e composição do óleo	67
Resumo.....	68
Aplicação prática.....	68
1. Introdução	69
2. Material e Métodos.....	71
2.1. Matéria-prima e reagente	71
2.2. Extração por percolação usando Soxhlet.....	72
2.3. Extração com líquido pressurizado (PLE)	72
2.4. Caracterização do extrato.....	74
2.4.1. Métodos de referência	74
2.4.2. Conteúdo de fenólicos totais (TPC).....	75
2.4.3. Quantificação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	76

2.5. Análise estatística	76
3. Resultados e Discussão	77
3.1. Matéria-prima.....	77
3.2. Rendimento da extração de óleo	78
3.2.1. Seleção de solvente.....	78
3.2.2. Efeitos das variáveis do processo na extração com líquido pressurizado (PLE)	78
3.3. Caracterização do extrato.....	85
3.3.1. Efeitos das variáveis do processo nos ácidos graxos livres (FFA)	85
3.3.2. Efeitos das variáveis do processo no conteúdo de fenólicos totais (TPC) ..	86
3.3.3. Composição de ácidos graxos (FA)	87
3.3.4. Efeitos das variáveis do processo no conteúdo de β -sitosterol	88
4. Conclusões	91
5. Referências bibliográficas	92
CAPÍTULO 3: Efeito do processo de extração no rendimento e composição de óleo de amêndoa de pequi (<i>Caryocar brasiliensis</i>) utilizando álcool pressurizado como solvente	
Resumo.....	99
1. Introdução	100
2. Material e Métodos.....	101
2.1. Material.....	101
2.2. Planejamento experimental.....	102
2.3. Caracterização da matéria-prima	105
2.4. Métodos de extração do óleo.....	105
2.4.1. Extração por Soxhlet.....	105
2.4.2. Extração com líquido pressurizado (PLE)	105
2.5. Ácidos graxos livres, perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis.....	106
2.6. Conteúdo de fenólicos totais (TPC)	106
2.5. Determinação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	107
3. Resultados e Discussão	108
3.1. Caracterização da matéria-prima	108
3.2. Rendimento da extração de óleo	108
3.2.1. Extração com líquido pressurizado (PLE)	109

3.3. Caracterização do óleo	112
3.3.1. Influência das variáveis do processo nos ácidos graxos livres	112
3.3.2. Influência das variáveis do processo no conteúdo de fenólicos totais (TPC)	113
3.3.3. Influência das variáveis do processo no perfil de ácidos graxos (FA) e triacilgliceróis	114
3.3.4. Influência das variáveis do processo no conteúdo de β -sitosterol	116
4. Conclusões	116
5. Referências bibliográficas	117
CAPÍTULO 4: Extração com líquido pressurizado de óleo rico em ω -3 da semente de Sacha inchi (<i>Plukenetia huayllabambana</i> sp. Nov.): Efeitos do processo de extração no rendimento e composição do óleo	
Resumo.....	122
Relevância industrial	123
1. Introdução	124
2. Material e Métodos.....	125
2.1. Material.....	125
2.2. Métodos experimentais	126
2.2.1. Caracterização do sachá inchi	126
2.2.2. Planejamento experimental.....	126
2.2.3. Extração por Soxhlet.....	129
2.2.4. Extração com líquido pressurizado (PLE)	129
2.2.5. Ácidos graxos livres, ácidos graxos e triacilgliceróis	130
2.2.6. Conteúdo de fenólicos totais (TPC).....	130
2.2.7. Determinação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	131
3. Resultados e Discussão	131
3.1. Matéria-prima.....	131
3.2. Rendimento da extração de óleo	132
3.2.1. Influência das variáveis do processo na extração com líquido pressurizado (PLE)	132
3.3. Caracterização do óleo	135
3.3.1. Influência das variáveis do processo nos ácidos graxos livres	135

3.3.2. Influência das variáveis do processo no conteúdo de fenólicos totais (TPC)	136
3.3.3. Influência das variáveis do processo no perfil de ácidos graxos (FA) e triacilgliceróis	137
3.3.4. Influência das variáveis do processo no conteúdo de β -sitosterol	138
4. Conclusões	140
5. Referências bibliográficas	140
CAPÍTULO 5: Extração com CO ₂ supercrítico de óleo de amêndoa de castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.), pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) e sacha inchi (<i>Plukenetia huayllabambana</i> sp. nov.): Efeito das variáveis do processo e composição do óleo	
Resumo.....	145
1. Introdução	146
2. Material e Métodos.....	147
2.1. Matéria-prima e solvente.....	147
2.2. Extração com dióxido de carbono supercrítico.....	148
2.2.1. Rendimento de extração do óleo.....	148
2.3. Caracterização do óleo	151
2.3.1. Ácidos graxos livres	151
2.3.2. Conteúdo de fenólicos totais (TPC).....	151
2.3.3. Determinação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	151
3. Resultados e Discussão	152
3.1. Extração com dióxido de carbono supercrítico.....	152
4. Conclusões	162
5. Referências bibliográficas	162
CAPÍTULO 6: Propriedades físicas do óleo da amêndoa de castanha do Brasil, Sacha inchi e pequi extraídos com CO ₂ supercrítico e isopropanol pressurizado	
Resumo.....	165
1. Introdução	166
2. Material e Métodos.....	168
2.1. Matéria-prima.....	168
2.2. Determinação experimental da solubilidade dos óleos em CO ₂ supercrítico	168
2.3. Extração do óleo utilizando CO ₂ supercrítico e isopropanol pressurizado	170

2.4. Determinação experimental da densidade e viscosidade.....	170
2.5. Análise termogravimétrica (TGA) dos óleos obtidos por extração com CO ₂ supercrítico	171
2.6. Predição da pressão de vapor dos óleos utilizando análise termogravimétrica (TGA) e a equação de Clausius-Clapeyron	171
2.7. Estimativa da massa molar dos óleos	174
3. Resultados e Discussão	175
3.1. Determinação experimental da solubilidade dos óleos em CO ₂ supercrítico	175
3.2. Determinação experimental da densidade e viscosidade.....	179
3.3. Análise termogravimétrica (TGA) dos óleos obtidos por extração com CO ₂ supercrítico	181
3.4. Predição da pressão de vapor dos óleos utilizando análise termogravimétrica (TGA) e a equação de Clausius-Clapeyron	185
4. Conclusões	186
5. Referências bibliográficas	187
CAPÍTULO 7: Conclusão geral.....	191

INTRODUÇÃO

A floresta amazônica, denominada de bioma amazônico é uma das regiões detentoras de riquezas naturais e possui grande parte da maior e mais diversa floresta tropical restante do mundo, o bioma amazônico engloba 6,7 milhões de km² e é compartilhado por oito países (Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana e Suriname), bem como o território no exterior da Guiana Francesa (SALAZAR *et al.*, 2015; WWF, 2010). Alguns produtos nativos do bioma amazônico, como castanha do Brasil e grãos de sacha inchi, reconhecidos internacionalmente por a sua riqueza nutricional e funcional, se caracterizam como atrativas matérias-primas para produção e desenvolvimento de produtos altamente nutritivos com propriedades funcionais e características sensoriais exigidos pelos atuais mercados.

Desenvolvimentos recentes na área de óleos e gorduras têm levado à produção de lipídios especiais de novas fontes, tais como castanhas, sementes de frutas e de plantas menores, devido à importância de seus componentes minoritários como carotenoides, fitoesteróis, tocoferóis, tocotrienóis, entre outros, que podem dar as características de qualidade e estabilidade requerida em algumas áreas de aplicação. Ou, estes componentes podem ser isolados durante o processamento e usados como nutracêuticos e ingredientes alimentares funcionais (FEREIDON, 2005).

Na última década, os lipídios ricos em ácidos graxos ômega-3, -6 ou -9, e outros compostos bioativos como carotenoides, tocoferóis, fitoesteróis, fenólicos, etc. têm ganhado um grande interesse comercial nas indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias, devido a suas propriedades funcionais, físicas e químicas. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs - *polyunsaturated fatty acids*) como ômega-3 e -6, oferecem importantes benefícios nutricionais e de saúde, como a proteção contra doenças cardiovasculares (REIS, 2014), artrite reumatoide, câncer, contra a gravidade das infecções virais (FERNANDES; VENKATRAMAN, 1993) e possibilita o funcionamento correto do organismo, influenciando a fisiologia da pele (MENON; CLEARY; LANE, 2012).

Dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs - *monounsaturated fatty acids*) podem melhorar os fatores de riscos metabólicos em pacientes com diabetes tipo 2 (IMAMURA *et al.*, 2016; QIAN *et al.*, 2016). Além disso, os componentes minoritários presentes no óleo tais como os tocoferóis e tocotrienóis atuam como antioxidantes naturais incrementando a vida útil e a estabilidade dos alimentos (KAMAL-ELDIN; BUDILARTO, 2015; SEPPANEN; SONG; CSALLANY, 2010), assim como na atividade fotoprotetora e estabilizadora da barreira cutânea (THIELE; HSIEH; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE,

2005). Os lipídios podem também agir como emolientes, emulsificantes, transportadores, modificadores de viscosidade, ligantes e lubrificantes, em muitos produtos.

A indústria de óleos e gorduras possui tecnologia muito desenvolvida, com décadas de experiência de extração e refinamento por trás das práticas atuais. No entanto o desenvolvimento tecnológico não é e nem deve ser estático. Pressões de ativistas ambientais exigem processos mais limpos, e há, com isso um interessante do mercado para o desenvolvimento de novas tecnologias e novos produtos.

Os desenvolvimentos tecnológicos atuais estão direcionado para três áreas; uma delas é a química "verde", que está relacionada ao emprego de processos mais limpos, a outra está relacionada com o menor consumo de energia e a outra enfatiza o uso de recursos renováveis (SCRIMGEOUR, 2005). Os processos de extração com fluido supercrítico (SFE) e com líquido pressurizado (PLE) estão enquadrados entre as tecnologias verdes.

Na SFE, há uma vasta gama de compostos que podem ser usados como fluidos supercríticos (FSC), mas o dióxido de carbono (CO_2) é o mais utilizado, o qual é frequentemente promovido como um solvente sustentável amplamente utilizado por ser relativamente barato e possuir propriedades críticas (temperatura crítica $31,3^\circ\text{C}$ e pressão crítica 74 bar) fácil de serem obtidas em equipamentos industriais, e por ser um solvente não poluente (REVERCHON; DE MARCO, 2006), não inflamável, que exibe toxicidade relativamente baixa, naturalmente abundante (BECKMAN, 2004) e geralmente reconhecido como seguro para a saúde (GRAS).

Além disso, a propriedade que torna o CO_2 particularmente atraente é a possibilidade da sua separação completa no final do processo, o seja, ao final do processo em condições de baixa pressão, o CO_2 se torna gás e libera o extrato deixando-o livre de solvente. A única desvantagem do SFE é o alto custo de investimento inicial quando comparado às técnicas de extração tradicionais à pressão atmosférica. No entanto, o esquema do processo que envolve a extração e a separação, é relativamente econômico e simples de ser dimensionado em escala industrial. Outras vantagens imediatas sobre as técnicas de extrações tradicionais é a flexibilidade do processo, devido à possibilidade de modulação contínua do poder de solubilização e seletividade do fluido supercrítico (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

No caso da PLE, tecnologia, também conhecida como "*Accelerated Solvent Extraction* (ASE)", extração com solvente pressurizado ou extração com solvente acelerado é uma técnica versátil que envolve a extração de compostos naturais utilizando solventes líquidos a uma temperatura e pressão elevada, o que aumenta o desempenho da extração quando comparado com as técnicas tradicionais realizadas em condições de temperatura ambiente

e à pressão atmosférica (MUSTAFA; TURNER, 2011). Geralmente, usada como uma ferramenta analítica, a PLE utiliza temperaturas elevadas (de 60 a 200 °C) e moderadas ou altas pressões (de 3,5 a 20 MPa) para facilitar e melhorar o processo de extração. Várias características tais como a utilização de menores quantidades de solventes, o tempo de extração reduzido e nenhuma exposição dos compostos ao oxigênio e à luz, conferem à esta técnica vantagens em relação aos processos tradicionais de extração com solvente (OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

Estudos atuais descrevem que produtos ricos e enriquecidos com compostos como ômega-3 têm experimentado um aumento em sua produção nos EUA e na Europa nos últimos anos (GANESH; HETTIARACHCHY, 2016). Por isso, muitos produtos oleaginosos nativos do bioma amazônico têm sido arduamente pesquisados por diferentes segmentos industriais e tem atraído investimentos com o objetivo de extrair e/ou isolar seus principais compostos nutricionais e funcionais. O principal interesse industrial nas matérias-primas nativas refere-se à sua fração lipídica focando investigar o isolamento e/ou extração mais rentável e econômica.

O presente projeto de pesquisa visou estudar a extração de óleos ricos em ácidos graxos ômega-3, -6 ou -9, e compostos bioativos de três matrizes vegetais, castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), Pequi (*Caryocar brasiliense*) e Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.), utilizando processo de SFE e PLE. A caracterização do produto foi feita para complementar o estudo do comportamento das diferentes extrações com ênfase no estudo de componentes de interesse como ômega-3, -6 ou -9, e outros compostos bioativos como fitosteróis e fenólicos.

CAPÍTULO 1: Sementes oleaginosas nativas do Bioma Amazônico e Cerrado Brasileiro: compostos bioativos, impacto na saúde, interesse comercial e novos processos de produção verde

CAPÍTULO 1: Sementes oleaginosas nativas do Bioma Amazônico e Cerrado Brasileiro: compostos bioativos, impacto na saúde, interesse comercial e novos processos de produção verde

O No Brasil, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia, existem diferentes tipos de terras e climas que resultam em uma grande diversidade de espécies oleaginosas que ainda são subexplorados e que representam importância econômica com potencial para contribuir no desenvolvimento de novos alimentos, fármacos, cosméticos e no agronegócio.

As sementes oleaginosas nativas do bioma Amazônico e Cerrado Brasileiro como dos gêneros *Bertholletia*, *Plukenetia* e *Caryocar* são consideradas uma boa fonte de lipídios, proteínas, minerais e vitaminas, e de outros compostos bioativos como os ácidos graxos essenciais (Omega-3 e -6), os polifenóis, o esqualeno, os tocoferóis e os fitoesteróis. Estes compostos e alguns minerais (por exemplo selênio) são frequentemente associados às atividades fisiológicas benéficas para a saúde humana, como antioxidantes, antiinflamatórios, anti-câncer, controle de glicemia e peso, cardio-protetores e redutores do risco de diabetes tipo 2 (ARANCETA; PÉREZ-RODRIGO, 2012; CARDOSO et al., 2017; DESAI; DONG; MILLER, 2016; DUTRA et al., 2016; IMAMURA et al., 2016; QIAN et al., 2016; SHAHZAD et al., 2017; YANG, 2009).

Existe uma tendência relevante por manter o extrativismo e cultivar estas sementes oleaginosa visando a sua comercialização, assim como também pela obtenção do seu óleo e proteína em grande parte da América do Sul. Estas sementes possuem características organolépticas desejáveis e compostos bioativos que causam benefício à saúde humana e por isso há o interesse em utilizá-las como matéria-prima na elaboração de alimentos funcionais.

Em países com florestas tropicais e tropicais sazonais, especialmente na América do Sul, há uma grande quantidade de espécies oleaginosas nativas obtidas principalmente por extrativismo. Algumas são conhecidas como a castanha do Brasil (*Bertholletia*) e outras, muito pouco como as sementes do Pequi (*Caryocar*) e as sementes de alguns gêneros de *Plukenetia* que poderiam ser mais exploradas do ponto de vista organoléptico, funcional ou na forma de obter seu principal componente, o óleo e seu coproduto (material desengordurado), e assim incrementar seu valor comercial.

A floresta amazônica, denominada de bioma amazônico é uma das regiões detentoras de riquezas naturais e possui grande parte da maior e mais diversa floresta tropical restante do mundo, o bioma amazônico engloba 6,7 milhões de km² e é compartilhado por oito países (Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana e Suriname), bem como o território no exterior da Guiana Francesa (SALAZAR et al., 2015; WWF, 2010).

Algumas plantas nativas do bioma amazônico, como a castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) e a Sacha Inchi (*Plukenetia sp*), reconhecidos internacionalmente pela riqueza nutricional e funcional de suas sementes, se caracterizam como atrativas matérias-primas para produção e desenvolvimento de produtos altamente nutritivos com propriedades funcionais exigidas pelos atuais mercados. Embora os mercados norte-americano, japonês, europeu e países como Hong Kong e Austrália tenham interesse nos produtos da castanha do Brasil como suplementos dietéticos, alimentos e bebidas funcionais, há um conhecimento escasso sobre outros produtos do bioma amazônico.

O Cerrado brasileiro tem a flora mais rica entre as savanas do mundo (> 7000 espécies) e altos níveis de endemismo (KLINK; MACHADO, 2005). Algumas espécies nativas do cerrado, como o *Caryocar*, nos últimos anos têm ganhado grande interesse como uma matéria-prima para desenvolver produtos com características nutricionais e funcionais.

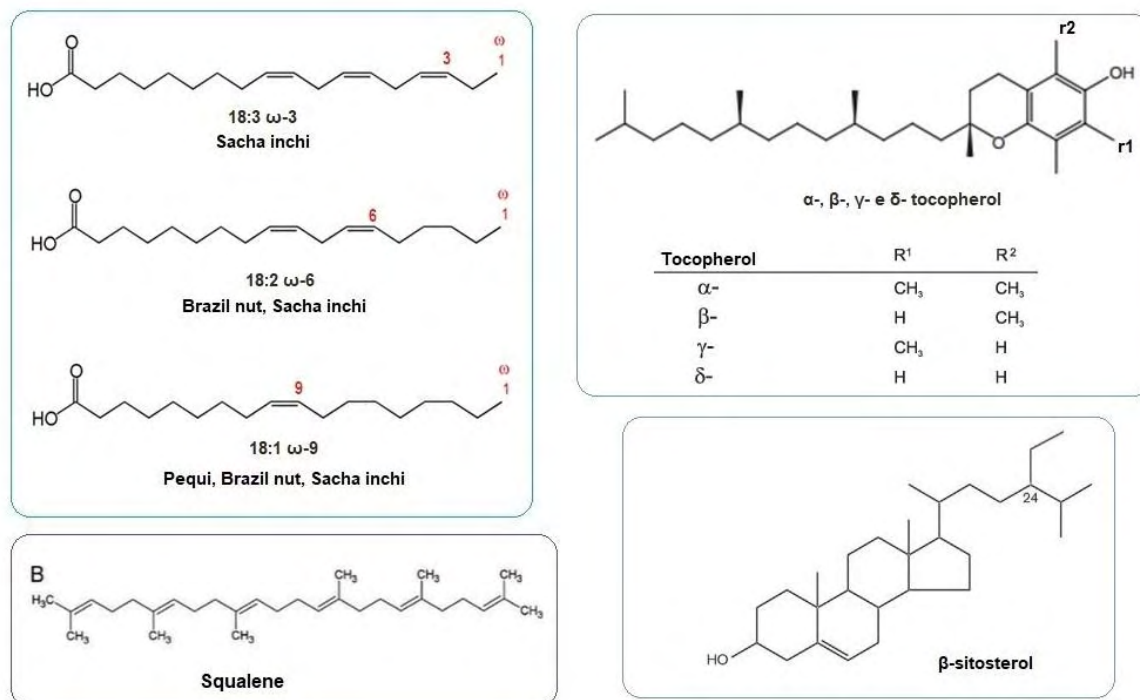
1. Características gerais da família botânica, constituintes químicos e propriedades biológicas das sementes oleaginosas

As estruturas moleculares dos principais compostos bioativos encontrados no óleo das sementes oleaginosas são mostradas na Figura 1.

1.1. *Bertholletia*

A castanheira (*Bertholletia excelsa*) nativa do bioma amazônico é a espécie mais importante economicamente da família *Lecythidaceae* (MORI; PRANCE, 1990) (Figura 2). A semente da *Bertholletia excelsa* popularmente conhecida no mercado internacional como Brazil nut e na América do Sul chamada também de castanha do Brasil, castanha-da-Amazônia, castanha-do-Pará e castanha-do-maranhão, é um dos mais importantes produtos florestais não-madeireiros. É reconhecida como a pedra angular da economia extrativista da floresta amazônica do Brasil, Bolívia e Peru. É colhida na floresta e não de plantações (RIBEIRO et al., 2014), e sua comercialização é uma importante fonte de renda para as famílias indígenas e ribeirinhas nestas regiões.

Figura 1 - Estruturas moleculares dos principais compostos bioativos encontrados na semente oleaginosa de algumas espécies dos gêneros *Bertholletia*, *Plukenetia* e *Caryocar*.



Fonte: Própria autoria.

Figura 2 - *Bertholletia excelsa* (fruta, semente e amêndoa).



Fonte: Própria autoria.

As amêndoas da castanha do Brasil contêm de 60,80 a 72,50% de lipídios (CHUNHIENG et al., 2008; RYAN et al., 2006) (25,35 a 26,21% de ácidos graxos saturados, 29,04 a 29,97% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), 43 a 45,61% de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (RYAN et al., 2006). Possui ainda de 13,93 a 14,29% de proteínas, de 16,08 a 19,45% de carboidratos totais (DE SOUZA; DE MENEZES, 2004; VENKATACHALAM; SATHE, 2006) e, de 21,8 a 43,9 μ g de selênio/g de amêndoa

(PACHECO; SCUSSEL, 2007). Além da composição majoritária, a castanha do Brasil possui uma boa fonte de componentes minoritários como os fitoesteróis (1.929,80 µg/g de óleo), o esqualeno (1.377,80 µg/g de óleo), os tocoferóis (199,10 µg/g de óleo) (RYAN et al. , 2006) e os polifenóis (112 a 331 mg EAG/100g de amêndoa) (JOHN; SHAHIDI, 2010) com características nutricionais e funcionais, e por isso há interesse da indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos neste óleo.

Estudos de atividade biológica do óleo de amêndoa de *B. excelsa* ainda não foram relatados na literatura. No entanto, extratos de amêndoa de *B. excelsa* mostram atividade biológica como atividade antioxidante (YANG, 2009), anti-inflamatório e a redução do estresse oxidativo e risco cardiovascular (CARDOSO et al., 2017; DUTRA et al., 2016).

1.2. Plukenetia

A *Plukenetia* é um gênero de 21 espécies pertencentes à família *Euphorbiaceae* liana e perene com rápido crescimento e desenvolvimento (CARDINAL-MCTEAGUE; GILLESPIE, 2016). As duas espécies nativas do bioma amazônico com maior valor comercial são a *Plukenetia volubilis* e *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Figura 3). Estas espécies são popularmente chamadas de amendoim inca, inca inchi ou amendoim da montanha pelos habitantes do antigo Peru que consumiam a farinha e o óleo obtidos a partir destas sementes há centenas de anos. Atualmente é chamada de Sacha inhci no mercado internacional.

A *Plukenetia volubilis* é uma trepadeira nativa do bioma amazônico, com centro de origem no Peru, Colômbia, Venezuela e Brasil (BORDIGNON; AMBROSANO; RODRIGUES, 2012). As suas sementes são ricas em proteína (27%) contendo os aminoácidos essenciais como cistina, tirosina, treonina e triptofano (411 mg/g de proteína) (HAMAKER et al., 1992), lipídios (26,7 a 54,0%) (CHIRINOS et al., 2013; HAMAKER et al., 1992; ZANQUI et al., 2016) contendo ácidos graxos poli-insaturados como ácido α -linolênico e linoleico (83% do teor total de lipídios) (FANALI et al., 2011) e outros compostos minoritários como os tocoferóis, δ -tocoferol (0,82 a 1,25 g/kg de óleo) γ -tocoferol (1,14 a 1,29 g/kg de óleo) (CHIRINOS et al., 2015; FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2017), fitoesteróis como β -Sitosterol (1,27 g/kg de óleo), estigmasterol (0,59 g/kg de óleo) e campesterol (0,15 g/kg de óleo) (CHIRINOS et al., 2015) e compostos fenólicos (6,2 mg EAG/100 g de óleo) (FANALI et al., 2011).

Figura 3 - *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (fruto, semente e amêndoa) e *Plukenetia volubilis* (semente e amêndoa).



Fonte: Própria autoria.

O óleo comercial de Sacha inchi é normalmente extraído por prensagem a frio. Um estudo in vivo, com este óleo foi utilizado para avaliar o efeito dos ácidos graxos após uma única administração oral em voluntários saudáveis e foi observada uma redução no colesterol das lipoproteínas ricas em delta triacilglicerol no plasma. Também o consumo de óleo aumentou o ácido α -linolênico (ALA) e ácido docosahexaenóico (DHA) no plasma (GONZALES; GONZALES; VILLEGAS, 2014). Outros estudos também foram relatados usando o mesmo óleo para avaliar a aceitabilidade e os efeitos colaterais do seu consumo deste por adultos (de 20 a 55 anos). Os efeitos colaterais foram reduzidos com o tempo, os marcadores bioquímicos da função hepática e renal foram mantidos inalterados, os níveis séricos de colesterol total e colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL) e pressão arterial foram reduzidos e um incremento no lipoproteína de alta densidade (HDL) foi observado no quarto mês. O óleo administrado como líquido em volume de 10 (4,4 mg ALA/dia) ou 15 mL (6,6 mg ALA/dia) por 16 semanas apresentou ter boa aceitabilidade após a primeira semana de consumo e foi seguro após 16 semanas de consumo (GONZALES; GONZALES, 2014).

O óleo comercial de Sacha inchi extraído por prensagem a frio, decantado e filtrado foi utilizado para testar a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* em células de queratinócitos humanos e discos de explantes de pele humana, e também para verificar a citotoxicidade nessas células. Os ensaios mostraram que óleo não foi tóxico para as células de queratinócitos e explantes de pele humana, e também não foram bactericidas contra o *S. aureus*. No entanto, este o óleo foi capaz de impedir a aderência do *S. aureus* às células de queratinócitos (efeito preventivo) e removeu de forma eficiente o *S. aureus* dos explantes de pele humana (efeito curativo) (GONZALEZ-ASPAJO et al., 2015).

Em outro estudo o óleo refinado comercial de Sacha inchi e outros óleos vegetais foram avaliados em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade das enzimas antioxidantes na secreção hepática e epitelial em ratos. Avaliou-se parâmetros de estresse

oxidativo na biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFA) n-3, na atividade e expressão das enzimas dessaturase Δ -5 e Δ -6, na expressão e atividade de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) do receptor ativado por proliferador de peroxissoma - α (PPAR- α) e na atividade da proteína de ligação do elemento regulatório do esterol-1c (SREBP-1c). Os ratos foram alimentados com óleo de girassol com 1% de o ácido α -linolênico (ALA) como grupo controle e outros óleos como óleo de canola (10% ALA), óleo de rosa mosqueta (33% ALA) e óleo de chia (64% ALA) visando a comparação com o óleo de Sacha inchi. Os resultados relatam que um maior suprimento de ALA aumentou a secreção de n-3 LCPUFA, a atividade e expressão de dessaturases, o estado antioxidante, a expressão e ligação de DNA de PPAR- α , a oxidação de ácidos graxos e a atividade de enzimas antioxidantes, enquanto a expressão e a atividade de ligação ao DNA do SREBP-1c e a biossíntese de ácidos graxos diminuíram. Concluíram que o óleo de sachá inchi (49% ALA) pode desencadear respostas metabólicas em ratos, como aqueles produzidos por ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) n-3 e pode suprir eficientemente o déficit dietético crônico de LCPUFA n-3 (RINCÓN-CERVERA et al., 2016).

Um outro estudo in vivo onde avaliou-se a toxicidade do óleo de *P. volubilis* obtido por prensagem a frio, o óleo mostrou-se seguro para os ratos Holtzman e camundongos Balb C57 em um teste em dose repetidas por 60 dias. Constatou-se que a administração do óleo diminuiu os níveis de colesterol, triglicérides e aumentou a HDL em relação ao grupo controle, e a dose letal (LD₅₀) foi de 37 g/kg de massa corporal (Gorriti et al., 2010). Também outros estudos relatam que uma dose de 5 mL de óleo comercial de sachá inchi mostrou uma diminuição das concentrações das frações aterogênicas do sangue e, ao mesmo tempo, aumentou os níveis de HDL em indivíduos (idade 35 a 75 anos) com hipercolesterolemia, sendo considerado o óleo como uma alternativa para o tratamento de dislipoproteinemias (GARMENDIA; PANDO; RONCEROS, 2011).

Dentre as diferentes Sachá inchi, a *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. é uma nova espécie do gênero *Plukenetia* (BUSSMANN; TÉLLEZ; GLENN, 2009) com potencial aplicação para a indústria farmacêutica e de alimentos, devido à capacidade de suas sementes de biossintetizar e acumular quantidades consideráveis de lipídios (44,1 a 62,4%) (CHIRINOS et al., 2015; CHIRINOS et al., 2016) e proteína (20,33 a 27,9%) (MUÑOZ JÁUREGUI et al., 2013; LÓPEZ; CRUZ; GUTIÉRREZ, 2016; RUIZ et al., 2013). O óleo de *P. huayllabambana* é muito valorizado por ter uma alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ácido α -linolênico e linoleico (84,3% do teor total de lipídios) (CHASQUIBOL et al., 2014), tocoferóis (1,41 a 2,82 g/kg de óleo) e fitosteróis (1,91 a 1,93 g/kg de óleo) (CHASQUIBOL et al., 2014; CHIRINOS et al., 2015).

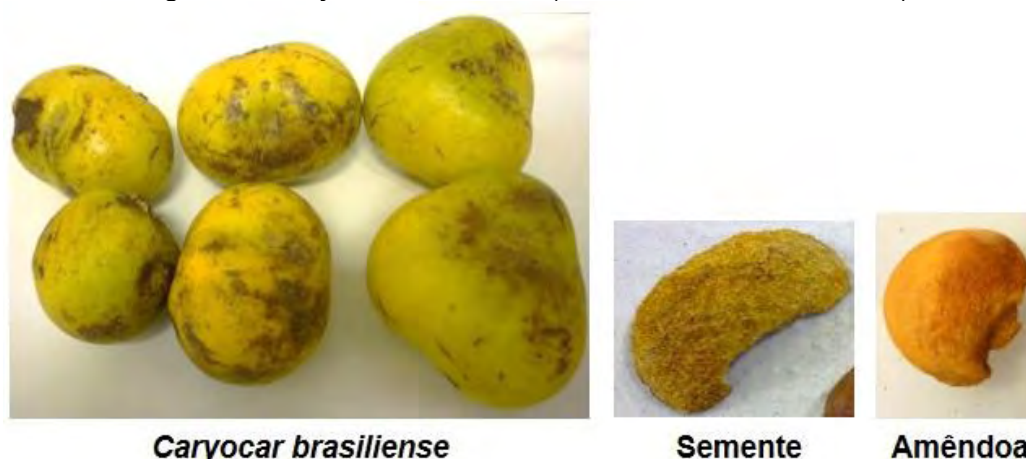
Atividade biológica do óleo ou semente de *P. huayllabambana* ainda não foram relatados na literatura.

1.3. Caryocar

O *Caryocar* é um gênero de 16 espécies que pertence à família *Caryocaraceae* e estende-se desde a Costa Rica até o Sul do Brasil (PRANCE, 1990). Algumas espécies deste gênero como a *Caryocar brasiliense*, *C. villosum* e *C. coriaceum* são reconhecidas por ter frutos comestíveis, sendo o fruto, a polpa e a amêndoa (Figura 4) os principais produtos com razoável importância econômica para as comunidades locais das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (ARAUJO, 1995) e outras regiões dos outros países por onde elas estendem-se.

A *Caryocar brasiliense* comumente conhecido como Pequi é uma espécie arbórea da savana brasileira ou cerrado brasileiro, classificada como uma das espécies vegetais mais importantes e úteis desta região, devido à sua alta importância ecológica e econômica e seu fruto é um dos mais consumidos no cerrado brasileiro (ARAUJO, 1995; DE MELO JR. et al., 2012). O seu fruto não processado tem uma composição de 6% de sementes, 59% de endocarpo e 35% de mesocarpo (JOHNER; HATAMI; MEIRELES, 2018) e seu mesocarpo é uma polpa amarela alaranjada com alto conteúdo de lipídios (33,4% em base úmida a 57,6% em base seca) (DE LIMA et al., 2007; JOHNER; HATAMI; MEIRELES, 2018), óleo essencial (0,47%, em base seca) (GEÓCZE et al., 2013) e carotenoides (11,4 mg/100 g de polpa fresca) (OLIVEIRA et al., 2006). Assim também a sua semente possui um alto teor de proteína (25,27%) e lipídios (34,4 a 51,51%) (DE LIMA et al., 2007; FARIA-MACHADO et al., 2015) com alta porcentagem de ácido oleico (43,59 a 55,38%) e palmítico (35,89 a 43,76%) (DE LIMA et al., 2007; FARIA-MACHADO et al., 2015; TORRES et al., 2016b).

Figura 4 - *Caryocar brasiliense* (fruta, semente e amêndoa)



Fonte: Própria autoria.

São poucos os estudos de atividade biológica feitos com óleo de amêndoa de *C. brasiliense*, os mesmos são relatados a continuação: O estudo feito com o óleo de amêndoa de *C. brasiliense* produzido manualmente de forma rústica (imersão em água quente) ou por prensagem a frio indicaram que este óleo atenuou o dano hepático agudo induzido pelo tetracloreto de carbono em ratos devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (TORRES et al., 2016a).

Os outros estudos de atividade biológica reportados na literatura foram feitos com óleo de polpa de *C. brasiliense* os quais são descritos a seguir.

Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e subcrônica do óleo de polpa de *C. brasiliense* obtido por prensagem a frio foram relatados e demonstraram baixa toxicidade após exposição oral aguda e subcrônica ao óleo, e a dose letal mediana (DL₅₀) foi estabelecida como superior a 2.000 mg/kg de peso corporal (TRAESEL et al., 2016). Também outros estudos relataram a atividade antibacteriana, antioxidante e citotóxica do óleo de polpa de *C. brasiliense* obtidos por cozimento da polpa em água fervente (FERREIRA et al., 2011). Outros estudos também relataram a análise da tensão cicatrizante em incisões cutâneas de ratos, após terapia com óleo de polpa de *C. brasiliense* extraído com hexano como solvente, o estudo demonstrou que aumentou a resistência tênsil da pele, melhorando a resposta reparacional, reduzindo riscos de deiscência e complicações pós-cirúrgicas (NASCIMENTO et al., 2015).

Estudos também mostram que o óleo de polpa de *C. brasiliense* exerce um efeito hepatoprotetor contra o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas induzidas por carcinógeno dietilnitrosamina e adenoma em camundongos e o potencial uso na prevenção de câncer de fígado (PALMEIRA et al., 2016).

Colombo et al. (2015) relataram que o consumo do óleo de polpa de *C. brasiliense* obtido por maceração a frio utilizando clorofórmio como solvente pode proteger contra a genotoxicidade in vivo e o estresse oxidativo.

Outros relatos mostraram os efeitos citotóxicos, genotóxicos e clastogênicos do óleo da polpa de *C. brasiliense* in vivo e in vitro (TRAESEL et al., 2017). Assim, também mostraram os efeitos do consumo prolongado de óleo de polpa de *C. brasiliense* em fatores de risco cardiovascular sistêmico e na função cardíaca ex vivo de ratos (OLIVEIRA et al., 2017).

O grupo de pesquisa da professora Miranda-Vilela relataram estudos sobre as propriedades anti-inflamatórias do óleo de polpa de *C. brasiliense*, obtido por maceração a frio utilizando clorofórmio como solvente, e seus efeitos sobre a lipídemia pós-prandial e a pressão arterial em atletas (76 masculinos e 49 femininos) de diferentes idades (15 a 67 anos), e os resultados mostraram os efeitos anti-inflamatórios e a redução do colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade principalmente em homens acima de 45 anos, e mostraram também uma tendência geral de redução da pressão arterial, sugerindo que o óleo de pequi pode ter efeito hipotensivo e por ele ter propriedades nutricionais pode ser considerado como um bom suplemento para os atletas (MIRANDA-VILELA et al., 2009).

Outros estudos do grupo de pesquisa relataram sobre o uso de óleo encapsulado de polpa de *C. brasiliense*, obtido por maceração a frio utilizando clorofórmio como solvente, para diminuir o dano ao DNA em atletas (76 masculinos e 49 femininos com idades de 15 a 67 anos) submetidos a condições aumentadas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e naqueles menos favorecidos geneticamente por defesas antioxidantes, e os resultados mostraram que a diminuição do dano ao DNA induzido pelo exercício foi influenciada pelo sexo, idade e todos os polimorfismos genéticos estudados, indicando que as corridas de longa distância podem ser prejudiciais, para atletas mais velhos, devido ao aumento do estresse oxidativo acima da adaptabilidade do organismo, mesmo com uso de um suplemento antioxidante, existiu diferenças nas respostas dos genótipos e sob condições aumentadas de H_2O_2 , os genótipos glutathione peroxidase 1 (GPx-1) homocigoto de referência (Pro/Pro) e a enzima conversora da angiotensina (ACE) ID foram mais susceptíveis à suplementação antioxidante (MIRANDA-VILELA et al., 2011a).

Outros estudos sobre a influência de 12 polimorfismos genéticos em marcadores inflamatórios, lipídios pós-prandiais, pressão arterial e peroxidação lipídica plasmática de corredores (N = 125), antes e após os 14 dias de suplementação (400 mg de óleo encapsulado de polpa de *C. brasiliense*), e após corridas em condições comparáveis também foram relatados pelo mesmo grupo de pesquisa, e os resultados mostraram que os polimorfismos catalase (CAT), glutathione S-transferases (GST) M1/T1, proteína reativa-C

(CRP)-G1059C e metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)-C677T influenciaram no leucograma; haptoglobina (Hp) e MTHFR-C677T nas plaquetas; Hp, enzima conversora da angiotensina I (ACE), GSTT1 e MTHFR-A1298C no perfil lipídico; MTHFR-A1298C nos níveis de CRP e Hp, e enzima Manganês Superóxido Dismutase (MnSOD) no ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estes resultados podem ser usados para contribuir em uma maior compreensão da influência de polimorfismos genéticos (a herança genética é um dos fatores que impulsionam as anormalidades lipídicas envolvidas na progressão da aterosclerose) em situações que promovem o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Facilitam o entendimento de como a suplementação antioxidante afeta os genes de uma pessoa e como a composição genética individual dos atletas pode afetar o modo como responde aos suplementos antioxidantes (MIRANDA-VILELA et al., 2011b). Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa mostra a influência do polimorfismo interleucina-6 (IL6) -174 G/C nos marcadores de dano tecidual e inflamação, peroxidação lipídica, hemograma e perfil lipídico em corredores antes e após da ingestão de 400 mg de óleo encapsulado de polpa de *C. brasiliense* por 14 dias consecutivos, e os resultados indicam que os genótipos de IL-6 mostraram diferenças significativas na peroxidação lipídica, entre os genótipos (induzido pelo exercício e os níveis de proteína reativa-C), que o dano muscular ocorreu no genótipo heterozigoto, embora o genótipo mutante homozigoto (CC) tenha apresentado um aumento nos níveis de proteína reativa-C após a suplementação; a falta de correlação positiva entre triglicérides e alta sensibilidade de proteína reativa-C para esse genótipo mutante após a suplementação indicou efeito protetor do pequi. Como o óleo de pequi tem sido associado a um efeito aterogênico, piorando o perfil lipídico e ao mesmo tempo modulando a lipemia pós-prandial e reduzindo a inflamação induzida pelo exercício e a pressão arterial de corredores humanos, esses achados merecem investigações adicionais, nas quais as avaliações da IL-6 níveis também devem ser executados (MIRANDA-VILELA; RIBEIRO; GRISOLIA, 2016).

Estudos também relataram e sugerem que uma dieta rica em óleo de pequi comercial retarda a aterogênese nos estágios iniciais devido à sua atividade antioxidante. No entanto, o aumento do colesterol sérico induz uma migração mais proeminente de LDL para o interior das artérias, aumentando a placa aterosclerótica avançada, o seja, o óleo de pequi associado a uma dieta aterogênica agrava o perfil lipídico e acelera a formação de lesões ateroscleróticas avançadas, apesar de sua ação antioxidante (AGUILAR et al., 2012).

O óleo comercial de pequi obtido por presamagem a frio também foi usado para avaliar o efeito do aumento da concentração deste óleo nas características de fermentação e abundância de bactérias metanogênicas e fibrolíticas utilizando a técnica de simulação ruminal. E os resultados mostram que o óleo de pequi foi ineficaz na mitigação das

emissões de metano e teve alguns efeitos adversos sobre a digestibilidade e seleção de bactérias fibrolíticas (DUARTE et al., 2017).

A *Caryocar villosum* ou chamado também como piquiá-pequi é uma espécie que cresce nas florestas virgens do Bioma Amazônico, principalmente na regiões próximas ao rio Amazonas. A sua polpa representa o 12%, a semente o 24% e a casca o 64% do peso total da fruta não processada (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012b). A sua polpa contém alto teor de lipídios (52,7 a 64,50%, base seca) (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012b; MARX; ANDRADE; MAIA, 1997) contendo principalmente ácido oleico (29,50%) e palmítico (33,50%) e compostos minoritários como fitoesteróis (580 mg/ 100g de polpa seca), esqualeno (63,80 mg/ 100g de polpa seca) (MARX; ANDRADE; MAIA, 1997), fenólicos totais (589,4 µg/g de polpa fresca), carotenoides (17,3 µg/g de polpa fresca) (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012b) e α-tocoferol (1,2 mg/100g de polpa seca) (ALMEIDA et al., 2012).

O óleo da polpa de *Caryocar villosum* apresentou efeitos biológicos, como atividade anti-inflamatória tópica (XAVIER et al., 2011), propriedades antioxidantes (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012b; CHISTÉ et al., 2012a).

Estudos realizados com polpa de *Caryocar villosum* demonstraram que a polpa não era genotóxica e inibiu a genotoxicidade induzida pela doxorrubicina (ALMEIDA et al., 2012). A capacidade antioxidante da polpa de *C. villosum*, como ORAC, foi de $3,74 \pm 1,09$ mmol Trolox/100 g de fruta fresca (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012b; CHISTÉ et al., 2012a).

Outra espécie semelhante é *Caryocar coriaceum* ou chamada também de pequirim-pequi, predominante no Nordeste brasileiro. A sua polpa tem um alto teor de lipídios (33,53 a 49,58%, base úmida) (PESSOA et al., 2015; SENA et al., 2010) e os principais ácidos graxos presentes neste óleo são o oleico (55,79%) e o palmítico (34,18%) (SENA et al., 2010). E sua amêndoa também possui alto teor de proteína (27,12%) e lipídios (48,52%) (RAMOS; SOUZA, 2011).

Efeitos biológicos como atividade anti-inflamatória tópica e a cicatrização de feridas cutâneas apresentou-se para o óleo comercial de amêndoa de *C. coriaceum* (DE OLIVEIRA et al., 2010). Outros estudos demonstraram que o óleo de polpa de *C. coriaceum* apresentou atividade anti-inflamatória (DE FIGUEIREDO et al., 2016; SARAIVA et al., 2011) e a cicatrização de feridas e úlceras gástricas (QUIRINO et al., 2009), e pela primeira vez, descrevem os efeitos hipolipidêmicos (DE FIGUEIREDO et al., 2016).

Costa et al. (2011) relataram que óleo de polpa de *C. coriaceum* obtido usando hexano como solvente apresentou atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM), inibindo o crescimento de *Salmonella choleraesuis* (CIM<1,25%), *Staphylococcus aureus* (CIM = 1,25%), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 1,25%) e *Streptococcus pneumoniae* (CIM = 5%).

Estudos também relataram o efeito tópico do óleo de polpa de *C. coriaceum* obtido por Soxhlet utilizando acetato de etila como solvente contra diferentes agentes irritantes in vivo, a fim de verificar seu efeito antiedema e desvendar seus mecanismos de ação, e o óleo exibiu um perfil similar de atividade anti-inflamatória tópica à de drogas que classicamente modulam a produção de metabólitos do ácido araquidônico. O estudo também relata a potencial aplicação do óleo como um importante remédio herbal a ser usado contra doenças inflamatórias da pele. (SARAIVA et al., 2011).

2. Interesse comercial

Estilos de vida atuais estão baseados em consumo de amêndoas e castanhas por elas serem saborosas e nutritivas e também no consumo dos óleos especiais obtidos destas amêndoas e/ou castanhas, que de forma geral contribuem para uma alimentação saudável. Elas são normalmente consumidas como amêndoas ou castanhas inteiras (crus, torradas ou salgadas) ou usados como ingredientes em uma variedade de alimentos processados, especialmente em produtos de barra de amêndoa e/ou castanha, pão integral e granola, entre outros. E o óleo destas amêndoas ou castanhas, em particular os óleos de castanha do Brasil, sacha inchi e pequi são utilizados para vários fins, como para cozinhar, em molhos de saladas e ingredientes aromatizantes, entre outros. Além disso, também são componentes de alguns hidratantes da pele e produtos cosméticos.

A castanha do Brasil é uns dos principais produtos extrativadas da Bolívia, do Brasil e Peru, estes países são os principal exportador deste produto sendo a Bolívia o principal exportador da castanha do Brasil com 14 mil toneladas no ano 2017 (US\$ 156 milhões) e os principais destinos foram Alemanha, EUA, Reino Unido, Países Baixos e Coreia do Sul (IBCE, 2017).

O Brasil produz 41 mil toneladas de castanha de Brasil por ano sendo o consumo interno de 33 mil toneladas e a exportação de 8 mil toneladas (US\$ 14,7 milhões) (CONAB, 2017). No caso das exportações de castanha in natura e processadas, destacam-se como principais destinos a Bolívia, EUA, Hong Konge, Europa e Austrália. E o Peru exportou 5,45 mil toneladas de castanha do Brasil à China, EUA, Suíça e Coreia do Sul (US\$ 9 milhões) (MICETUR, 2018).

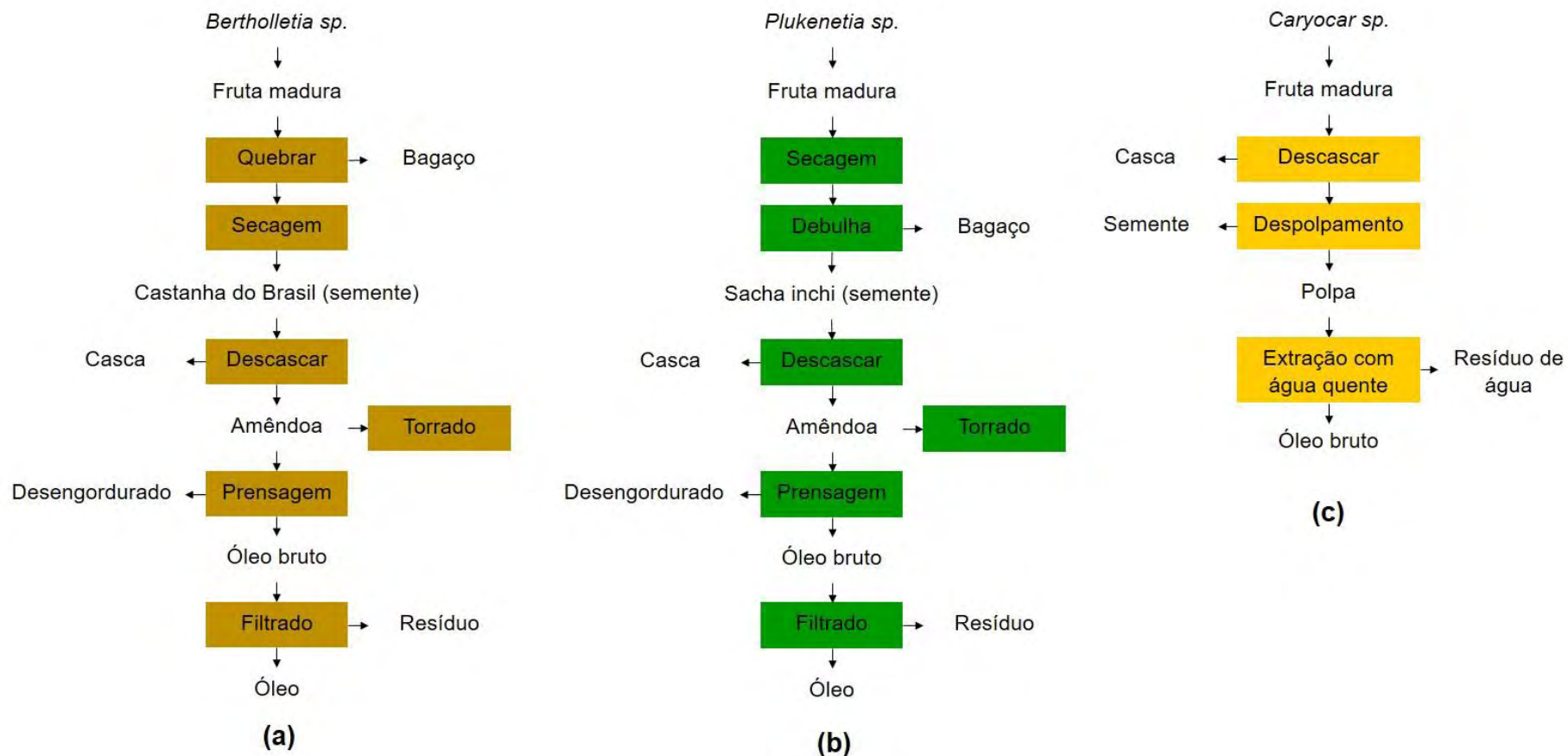
O óleo e a amêndoa de sacha inchi é outro produto que está sendo acolhido nos mercados da Ásia, Europa e dos EUA, o principal produtor e exportador é o Peru, Colômbia e Equador também vem implantando também o cultivo e comércio. No ano de 2017 as exportações cresceram em 137 % para as exportações peruanas de sacha inchi gerando US\$ 9,2 milhões (ADEX, 2018).

3. Processos de extração de óleo atual e novo para as amêndoas das sementes oleaginosas de *Bertholletia*, *Plukenetia* e *Caryocar*

O melhor processo de extração de óleo a partir de sementes oleaginosas nativas do Bioma Amazônico e Cerrado Brasileiro está limitado as características do produto final e aos objetivos específicos do modelo de negócio. Na atualidade, as pequenas indústrias, cooperativas e associações de produtores que têm como os principais produtos o óleo e o material desengordurado obtidos a partir de algumas espécies do gênero *Bertholletia* e *Plukenetia* utilizam a prensagem a frio (*expeller*) para obter estes produtos e também ainda parte deste grupo de empresários utilizam técnicas rústicas como água em ebulição na extração de óleo a partir de *Caryocar* (Figura 5).

Os meios atuais de extração por prensagem ou imersão em água em ebulição são também utilizados para outras sementes oleaginosas. Estes métodos podem ser agressivos para compostos minoritários presentes em óleos vegetais além de proporcionarem baixos rendimentos. As pesquisas que buscam melhores processo de extração de óleo a partir de sementes oleaginosas sem o emprego de solventes orgânicos como o hexano, leva em consideração o pré-tratamento da matéria-prima, o rendimento e a qualidade do óleo, assim como também a qualidade do material desengordurado. Embora o hexano seja o solvente comercial mais utilizado na extração de óleo a partir de sementes oleaginosas e permitido pela administração de alimentos e medicamentos (*FDA*) para alimentos, seu uso tem sido questionado por ser um poluente, tóxico, inflamável e proveniente de uma fonte não renovável. Extração de óleo a partir de *Bertholletia excelsa* foram realizados com o intuito de caracterizar o material extraído ou comparar o rendimento e a qualidade do óleo utilizando hexano (CHUNHIENG et al., 2008; DA SILVA, 2014; FERREIRA et al., 2006; MIRALIAKBARI; SHAHIDI, 2008; NETO et al., 2009; RAMOS; BORA, 2003; SANTOS et al., 2012), éter de petróleo (SANTOS et al., 2012; DE SOUZA et al., 1987; SRUR, 1976; VENKATACHALAM; SATHE, 2006), benzina de petróleo (ANDRADE et al., 1999), cloroformo e metanol (MIRALIAKBARI; SHAHIDI, 2008; MOODLEY; KINDNESS; JONNALAGADDA, 2007), álcool etílico (FREITAS et al., 2007), CO₂ supercrítico (SANTOS et al., 2013) como solventes. Além disso, prensa hidráulica (CARDARELLI; OLIVEIRA, 2000; DA SILVA, 2014; FERREIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2012; DE SOUZA; DE MENEZES, 2004) também foi utilizada para extrair este óleo com fins de comparação (Tabela 1).

Figura 5 - Fluxograma do processamento de óleo das sementes oleaginosas de algumas espécies dos gêneros *Bertholletia* sp. (a), *Plukenetia* sp. (b) e *Caryocar* sp. (c).



Fonte: Própria autoria.

Tabela 1 - Teor de óleo nas amêndoas de algumas espécies dos gêneros *Bertholletia*, *Plukenetia* e *Caryocar*, métodos de extração e solvente utilizados.

Amêndoa	Métodos de extração	Solvente	Condições de extração	Óleo (% massa)	Referência
<i>Bertholletia excelsa</i>	Soxhlet	Petroleum ether	According to the AOAC method 27.004 (1970).	65.45	Srur (1976).
		Petroleum ether	According to the IAL method (1976).	63.76	De Souza et al. (1987).
		Petroleum benzine	According to the IAL method (1985).	66.80	Andrade et al. (1999).
		Hexane	According to the AOAC method (1990).	68.60	Ramos e Bora (2003).
		Petroleum ether	According to the AACC method (1995).	67.30	De Souza e De Menezes (2004).
		Hexane	According to the IAL method (1985).	61.00	Ferreira et al. (2006).
		Petroleum ether	According to the AOAC method 984.22 (1995).	66.71	Venkatachalam e Sathe (2006).
		Petroleum ether	T = 50 °C for 12 h	65.00	Freitas et al. (2007).
		Hexane	Sample/solvent (1:12,5, m/v) for 6 h	72.50	Chunhieng et al. (2008).
		Hexane	For 12 h.	68.58	Neto et al. (2009).
		Petroleum ether	According to the AOAC method 984.22 (1997).	65.33	Santos (2008).
		Petroleum ether	According to the AOAC method (2000) for 12 h.	67.32	Santos (2012).
		Hexane	According to the AOAC method (2000) for 12 h.	67.73	Santos (2012).
		Hexane	According to the AOAC method 984.22 (2005).	67.03	Da Silva (2014).
	Maceração e agitação	Hexane (H)/isopropyl alcohol (IPA)	Sample/solvent (1:3, m/v) and H/IPA (3:2, v/v) room temperature, stirring for 1 h.	60.80	Ryan et al. (2006).
	Ethyl alcohol	Sample/solvent (1:4, m/v) at 65 °C, stirring of 30 rpm for 1 h.	48.40	Freitas et al. (2007).	

Tabela 1 – Continuação

Amêndoa	Métodos de extração	Solvente	Condições de extração	Óleo (% massa)	Referência
		Chloroform/metanol	Sample/solvent (1:5, m/v) and CHCl ₃ /MeOH (2:1, v/v) under stirring for 15 min.	65.00	Moodley, Kindness e Jonnalagadda (2007).
		Chloroform/metanol	Three extractions: sample/solvent (1:10, m/v) and CHCl ₃ /MeOH (1:1, v/v) at room temperature under stirring of 8000 rpm for 3 min.	68.90	Miraliakbari e Shahidi (2008).
		Hexane	Three extractions: sample/solvent (1:10, m/v) under stirring of 8000 rpm for 3 min.	67.40	Miraliakbari e Shahidi (2008).
	Prensado		Hydraulic pressing.	34.00	Cardarelli e Oliveira (2000).
			A screw press (Ecirte, MP 40) and hydraulic pressing (Charlott) at 50°C used 40 Tn/kgf for 10 min.	42.17	De Souza e De Menezes (2004).
			Hydraulic pressing (Marconi, ME 098) at 31°C used of 3 - 12 Tn of pressure.	41.83	Ferreira et al. (2006).
			Two pressing: Hydraulic pressing (Marconi, MPH 15) with 15 Tn of pressure.	39.24	Santos (2008).
			Hydraulic pressing (FMB SIWA) with 15 Tn of pressure. Preheated sample feed of 0.5 kg for 5 min.	52.00	Santos (2012).
			Cold hydraulic pressing (Carver).	36.07	Da Silva (2014).
	Fluido pressurizado	CO ₂	T= 60 °C, P = 30 MPa, flow rate of 1,17 × 10 ⁻⁴ kg CO ₂ /s and extraction time of 120 min.	67.20	Santos et al. (2013).
<i>Plukenetia volubilis</i>	Soxhlet	Petroleum ether	According to the AACC method 30-25 (1983) used roasted seed.	54.00	Hamaker et al. (1992).
		Hexane	T = 60°C for 20 h	54.30	Follegatti-Romero et al. (2009).

Tabela 1 – Continuação.

Amêndoa	Métodos de extração	Solvente	Condições de extração	Óleo (% massa)	Referência
		Hexane	Sample/solvent (1:7, m/v) for 5 h.	42.00	Gutiérrez et al. (2011).
		Hexane	According to the AOAC method (2000).	45.00	Adrianzén, Rojas e Luján (2011)
		Petroleum ether	Sample/solvent (1:10, m/v) for 6 h.	37.60	Chirinos et al (2013).
		Petroleum ether	According to the AOAC method (2005).	49.00	Ruiz et al. (2013).
		Petroleum ether	Sample/solvent (1:10, m/v) for 6 h.	35.40	Chirinos et al. (2015).
		Petroleum ether	According to the AOAC method (2005).	45.49	López, Cruz e Gutiérrez, (2016).
		Ethyl ether/ Petroleum ether	Solvent/solvent (1:1, v/v) for 16 h.	42.00	Zanqui et al. (2016).
		Hexane	T = 60°C for 20 h	40.55	Triana-Maldonado, Torijano-Gutiérrez e Giraldo-Estrada (2017)
	Maceração e agitação	Chloroform/metanol	Two extractions: sample/solvent (1:10, m/v) and CHCl ₃ /MeOH (1:1, v/v) under stirring.	41.10	Gutiérrez et al. (2011).
		Chloroform/methanol/ water	Ratio of solvent CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (2:2:1, v/v/v) according to Bligh and Dyer (1959).	48.52	De Souza et al. (2013)
	Prensado		Hydraulic pressing (Charlott) with 60 Tn.	40.48	Follegatti-Romero (2007).
			Hydraulic pressing with preheated sample (100 °C for 14 min), 150 kgf/cm ² for 30 min.	26.54	Adrianzén, Rojas e Luján (2011)
			Commercial pressing	41.20	Ruiz et al. (2013).
	Fluido pressurizado	CO ₂	60°C, 40 MPa, 0.4 × 10 ⁻⁴ kg CO ₂ /s, extraction time of 270.83 min and mean particle size of 0.84 mm.	50.10	Follegatti-Romero et al. (2009).
		CO ₂	60 °C, 45 MPa, flow ratio of 221.7 × 10 ⁻⁴ kg CO ₂ /s for 105 min.	24.55	Triana et al. (2016).
		n-propane	60 °C, 12 MPa, flow ratio of 1 mL/min, 60 min.	29.70	Zanqui et al. (2016).

Tabela 1 – Continuação

Amêndoa	Métodos de extração	Solvente	Condições de extração	Óleo (% massa)	Referência
		CO ₂	T = 60 °C, P = 50 MPa, flow ratio of 6.7× 10 ⁻⁴ kg CO ₂ /s, extraction time of 180 min and particle size of 1.51–2.01 mm.	23.48	Triana-Maldonado, Torijano-Gutiérrez e Giraldo-Estrada (2017)
<i>Plukenetia huayllabambana</i> sp. nov.	Soxhlet	Petroleum ether	According to the AOAC method 963.15 (2005).	54.30	Ruiz et al. (2013).
		Petroleum ether	According to the AOAC method 920.39 (1995) for 4 h.	48.84	Muñoz Jáuregui et al. (2013).
		Petroleum ether	Sample/solvent (1:10, m/v) for 6 h.	44.10	Chirinos et al. (2015).
		Petroleum ether	According to the AOAC method (2005).	52.11	López, Cruz e Gutiérrez (2016).
	Petroleum ether	Sample/solvent (1:10, m/v) for 6 h. (Preheated sample at T of 100°C for 30 min).	62.40	Chirinos et al. (2016).	
	Prensado		Hydraulic pressing assisted by a motor of 1 horsepower.	30.30	Chasquibol et al. (2014).
<i>Caryocar brasiliense</i>	Soxhlet	Hexane	According to the AOAC (1998).	51.51	De Lima et al. (2007).
		Petroleum ether	T= 30 a 60 °C for 16 h.	48.5	Faria-Machado et al. (2015).
	Maceração	Chloroform/methanol/water	Ratio of solvent CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (2:2:1, v/v/v) according to Bligh and Dyer (1959).	30,02	Machado, Mello e Hubinger (2013)
<i>Caryocar villosum</i>	Maceração	Chloroform/methanol/water	Ratio of solvent CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (2:2:1, v/v/v) according to Bligh and Dyer (1959).	34,70	Berto et al. (2015).
<i>Caryocar coriaceum</i>	Maceração e agitação	Chloroform/metanol	Ratio of solvent CHCl ₃ /MeOH (2:1, v/v) and under stirring used Ultra-Turrax.	64.40	Dresen, Prasad e Gülz (1989).
	Soxhlet	Hexane	According to the IAL method (1985).	48.52	Ramos e Souza (2011)

AOAC: Association Official Analytical Chemistry, AACC: American Association of Cereal Chemists, ALI: Adolfo Lutz Institute; T: temperatura; P: pressão.

O material desengordurado, o concentrado e o isolado protéico de *Bertholletia excelsa* foram também estudados após a extração do óleo por prensagem e extração com hexano (GLÓRIA; REGITANO-D'ARCE, 2000), prensagem hidráulica (SANTOS et al., 2010), extração com hexano (RAMOS; BORA, 2003), extração com éter de petróleo (VENKATACHALAM; SATHE, 2006) e extração com CO₂ supercrítico (SANTOS et al., 2013) com o intuito de caracterizar as propriedades funcionais (solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, e de formação de espuma), análise morfológica e os aminoácidos presentes neles. Também os fosfolipídios (CHUNHIENG et al., 2008; LIMA et al., 2014) contidos nas amêndoas de *Bertholletia excelsa* foram caracterizados por eles ter similar composição aos encontrados na lecitina de girassol.

Extração de óleo a partir de *Plukenetia* foram estudados com objetivo de caracterizar a composição proximal e o óleo obtido, avaliar o rendimento e a qualidade do óleo, sendo as duas espécies principais mais estudadas a *P. volubilis* onde usaram hexano (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009; GUTIÉRREZ; ROSADA; JIMÉNEZ, 2011; ADRIANZÉN; ROJAS; LUJÁN, 2011; LÓPEZ; CRUZ; GUTIÉRREZ, 2016; RUIZ et al., 2013; TRIANA-MALDONADO; TORIJANO-GUTIÉRREZ; GIRALDO-ESTRADA, 2017), éter de petróleo (HAMAKER et al., 1992; CHIRINOS et al., 2013; CHIRINOS et al., 2015), éter etílico e éter de petróleo (ZANQUI et al., 2016), cloroformio e metanol (GUTIÉRREZ; ROSADA; JIMÉNEZ, 2011), cloroformio, metanol e água (DE SOUZA et al., 2013), n-propano pressurizado (ZANQUI et al., 2016) e CO₂ supercrítico (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009; TRIANA; TORIJANO; GIRALDO-ESTRADA, 2016; TRIANA-MALDONADO; TORIJANO-GUTIÉRREZ; GIRALDO-ESTRADA, 2017) como solvente de extração, e também usaram prensagem (ADRIANZÉN; ROJAS; LUJÁN, 2011) com fins de comparação. E para a *P. Huayabambina* usaram hexano (RUIZ et al., 2013; LÓPEZ; CRUZ; GUTIÉRREZ, 2016) e éter de petróleo (MUÑOZ JÁUREGUI et al., 2013; CHIRINOS et al., 2015; CHIRINOS et al., 2016) como solventes de extração e a prensagem (CHASQUIBOL et al., 2014) para fins de comparação.

Extração de óleo a partir de amêndoa de *Caryocar* foram estudadas com o propósito de caracterizar o óleo presente nelas. Três espécies deste gênero são as mais estudadas, mas a extração de óleo a partir da amêndoa foram apenas estudados na *C. brasiliense* onde usaram hexano (DE LIMA et al., 2007), éter de petróleo (FARIA-MACHADO et al., 2015) e clorofórmio, metanol e água (MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2013), na *C. villosum* usaram clorofórmio, metanol e água (BERTO et al., 2015) e na *C. coriaceum* usaram clorofórmio e metanol (DRESEN; PRASAD; GÜLZ, 1989) e hexano (RAMOS; SOUZA, 2011) como solventes de extração (Tabela 1).

Processos de extração baseados em fluidos comprimidos usando solvente como CO₂ em estado supercrítico (Extração com fluido supercrítico - SFE) e álcoois de cadeia curta como álcool etílico e isopropílico (Extração com líquido pressurizado - PLE) seriam alternativa aos processos de extração tradicionais como prensagem e técnicas rústicas (imersão em água fervendo) empregadas na indústria de pequena escala para obtenção de óleo destas oleaginosas nativas do bioma amazônico e do cerrado Brasileiro.

A SFE em escala industrial é uma técnica de extração que atualmente está também sendo utilizada na Korea para obtenção de óleo de gergelim empregando CO₂ supercrítico como solvente (NATEX, 2018). O dióxido de carbono é frequentemente promovido como um solvente sustentável devido às suas propriedades únicas e numerosas vantagens incluindo não ser explosivo, não inflamável, ter baixa toxicidade relativa, baixo custo, abundância natural, fácil remoção dos materiais extraídos, além de ter baixa polaridade além de ser um solvente reconhecido como seguro (Generally Recognized as Safe - GRAS) para uso em produtos alimentícios (CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017). Embora encontrem-se muitos estudos na literatura sobre efeito dos parâmetros do processo, solubilidade, estudo da cinéticas de extração, aumento de escala e avaliação econômica do processo para algumas oleaginosas (BERNARDO-GIL; CASQUILHO, 2007; BOZAN; TEMELLI, 2002; DEL VALLE; FUENTE; CARDARELLI, 2005; DUBA; FIORI, 2016; PASSOS et al., 2011; PRADO et al., 2010; KING, 2004; REVERCHON; MARRONE, 2001) ainda é importante continuar estudando todos estes tópicos mencionados para as novas oleaginosas, como as descritas neste manuscrito já que elas possuem características fisiológicas (> 45 % de óleo na estrutura celulósica) diferentes que podem influenciar o pre-tratamento da matéria-prima e consequentemente o processo de extração de óleo em termos de seu rendimento.

A PLE surgiu como uma técnica analítica que foi desenvolvida para extrair os compostos minoritários, contaminantes em solos e vegetais, a serem analisados e para acelerar a sua extração (RICHTER et al., 1996) mas esta técnica vem ganhando espaço no últimos anos como uma técnica de extração de óleo a partir de diferentes matérias-primas (BELANDRIA et al., 2016; CASTRO-PUYANA et al., 2016; COLIVET; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016; CONTE et al., 2016; GILBERT-LÓPEZ et al., 2017; HU et al., 2011; JABLONSKÝ et al., 2015; POURALINAZAR; YUNUS; ZAHEDI, 2012) em função das vantagens que o solvente líquido em condições de alta pressão e temperaturas moderadas apresenta como, o aumento na taxa de transferência de massa, o aumento na solubilidade dos solutos e a diminuição na viscosidade do solvente e tensão superficial, assim facilitam ainda mais a taxa de extração porque o solvente penetrará mais facilmente na matriz, atingindo áreas menos superficiais e aumentando o contato, melhorando assim também a transferência de massa do soluto para fase solvente (RICHTER et al., 1996; KAUFMANN;

CHRISTEN, 2002; OLIVEIRA et al., 2014; HERRERO et al., 2015) quando comparado com as técnicas de extração de óleo que empregam solventes líquidos a pressão atmosférica.

4. Tecnologias verdes: Extração com líquido pressurizado e com fluido supercrítico

Atualmente, os desafios lançados pela competitividade do mercado globalizado e pela proteção do ambiente exigem fortemente inovações tecnológicas que rompem com o passado e não com a simples continuidade (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012). Neste contexto, a química verde, o desenvolvimento de tecnologias verdes e a utilização de matérias-primas renováveis ocupam um papel fundamental nos processos que são mais ambientalmente corretos.

A química verde envolve uma redução em, ou a eliminação de substâncias perigosas em um processo químico ou a geração de intermediários ou produtos perigosos ou tóxicos. Isso inclui matéria-prima, reagentes, solventes, produtos e subprodutos. Inclui também o uso de matérias-primas e fontes de energia sustentáveis neste processo de fabricação (DOBLE; KRUTHIVENTI, 2007). Também Chemat, Vian e Cravotto (2012) definem a química verde como a invenção, concepção e aplicação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias perigosas. E em relação à extração verde de produtos naturais, eles modificaram a definição da seguinte forma: "A extração verde baseia-se na descoberta e concepção de processos de extração que irão reduzir o consumo de energia, permitir o uso de solventes alternativos e produtos naturais renováveis, e garantir uma segurança e alta qualidade extrato e/ou produto". Então identificaram três soluções principais para projetar e demonstrar a extração verde em escala laboratorial e industrial para abordar um ótimo consumo de matérias-primas, solventes e energia: (1) melhoria e otimização de processos existentes; (2) utilizando equipamentos não dedicados; e (3) inovação em processos e procedimentos, mas também na descoberta de solventes alternativos.

Os projetos de métodos de extração verde e sustentável de produtos naturais são temas de pesquisa atuais na área multidisciplinar da química aplicada, biologia e tecnologia (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012). Estreitamente relacionado com este ponto, a sustentabilidade dos processos utilizados para extrair e purificar os compostos bioativos é de extrema importância. Atualmente, não só são procuradas a eficiência das técnicas de extração de bioativos com o maior rendimento e sua bioatividade associada, mas o desenvolvimento de processos de extração favoráveis ao meio ambiente também é preferível sobre os protocolos de extração convencionais (HERRERO et al., 2015). Estes novos desenvolvimentos são fortemente desejados para respeitar os princípios de química

verde relacionadas à extração (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; HERRERO et al., 2015):

1. Inovação através da seleção de recursos renováveis;
2. Utilização de solventes alternativos e principalmente água ou agro-solventes;
3. Redução do consumo de energia através da recuperação de energia e utilizando tecnologias inovadoras;
4. Produção de co-produtos em vez de resíduos;
5. Redução das operações unitárias, promovendo a automação de processos;
6. Para extratos biodegradáveis não desnaturados sem contaminantes.

A fim de atender a esses requisitos e aumentar ainda mais a denominação "verde" desses processos, estão sendo desenvolvidos conceitos de biorrefinaria, baseados no uso de biomassa natural para obter uma ampla gama de produtos úteis em diferentes campos de produção (por exemplo, Alimentos, produtos farmacêuticos ou agrícolas), juntamente com a geração de energia, a fim de minimizar ou eliminar quaisquer resíduos industriais. Como parte destas abordagens de biorrefinaria, são necessárias as técnicas de extração adequadas, eficientes, rápidas, baratas e verdes (HERRERO et al., 2015). Neste sentido, as tecnologias baseadas em fluidos comprimidos desempenham um papel importante. Entre estas tecnologias, a SFE e a PLE são os mais amplamente utilizados na extração de compostos bioativos a partir de fontes naturais. Em adição, estes métodos de extração, utilizam ambientes livre de oxigênio e luz o que tem promovido ainda mais sua ampla utilização na extração de compostos nutracêuticos.

4.1. Processo de extração com líquido pressurizado

O termo PLE envolve a aplicação de uma técnica de extração que também é chamado ou encontra-se na literatura como extração com fluido pressurizado (PFE - *pressurized fluid extraction*), extração com solvente quente pressurizado (PHSE - *pressurized hot-solvent extraction*) ou extração acelerada com solvente (ASE - *accelerated solvent extraction*). Em qualquer caso, esta técnica baseia-se na utilização de solventes orgânicos pressurizados (pressões de moderadas a elevadas) a altas temperaturas (sempre abaixo dos seus pontos críticos), sob condições em que os solventes são mantidos no estado líquido durante o processo de extração. Quando o solvente de extração é água, esta técnica também é chamada de extração subcrítica de água (SWE - *subcritical water extraction*), extração de água superaquecida (SHWE - *superheated water extraction*) ou extração de água quente pressurizada (PHWE - *pressurized hot-water extraction*) (HERRERO et al., 2015).

A PLE é uma alternativa atraente porque o processo permite uma extração rápida e o consumo de solvente é reduzido quando comparado com as técnicas de extração tradicionais, tais como a extração Soxhlet (OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013; HERRERO et al., 2015). Estas características são proporcionadas pelo aumento na taxa de transferência de massa, o aumento na solubilidade dos solutos e as diminuições na viscosidade do solvente e tensão superficial que ocorrem sob condições de PLE. Estas últimas propriedades facilitam ainda mais a taxa de extração, considerando que o solvente penetrará mais facilmente na matriz, atingindo áreas mais profundas e aumentando o contato superficial, melhorando assim a transferência de massa para o solvente (HERRERO et al., 2015). É uma técnica caracterizada por ser facilmente automatizada, tornando-se uma técnica diferenciada com baixo custo e impacto ambiental favorável devido ao baixo uso de solvente e energia (OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013). Os requisitos instrumentais para PLE compreende de uma bomba de alta pressão para transportar o solvente para uma célula de extração, que é mantida num forno para controlar a temperatura de extração, com diferentes válvulas e limitadores para controlar a pressão de extração. Obviamente, estes requisitos básicos podem ser tornados mais ou menos sofisticados pela adição de outras peças adicionais, tais como válvulas de controlador de solvente, linhas de purificação de hidrogênio, células de extração e bandejas de frasco para automatização. A possibilidade de automação é uma vantagem adicional da PLE, uma vez que a automação ajuda a reduzir a variação nas extrações, aumentando a reprodutibilidade (HERRERO et al., 2015). Devido a estas características e aos seus requisitos instrumentais relativamente simples, a PLE vem ganhando popularidade nos últimos anos como técnica de extração para o isolamento de compostos bioativos naturais. Embora a abordagem do tema de pesquisa utilizando a PLE em muitos casos seja a extração de compostos bioativos utilizando água como solvente. Atualmente, pesquisas recentes também estão utilizando esta técnica para a extração de compostos funcionais naturais (como ácidos graxos essenciais e metabólitos secundários) a partir de fontes naturais (Plantas, algas marinhas, microalgas e subprodutos alimentares) empregando outros solventes alternativos como por exemplo o etanol (BELANDRIA et al., 2016; CASTRO-PUYANA et al., 2016; COLIVET; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016; HU et al., 2011; CONTE et al., 2016; GILBERT-LÓPEZ et al., 2017; JABLONSKÝ et al., 2015; POURALINAZAR; YUNUS; ZAHEDI, 2012).

Pouralinazar, Yunus e Zahedi, (2012) estudaram a extração de óleo de *Orthosiphon stamineus* utilizando PLE e etanol como solvente. Neste caso, com base no método de projeto experimental Box-Behnken, foi realizado trabalho experimental para encontrar o efeito da temperatura, tempo e número de ciclos de extração sobre o rendimento de extração. Foram utilizados dezessete dados experimentais diferentes e foi utilizada a

metodologia de superfície de resposta para encontrar relação entre o rendimento da extração e as variáveis de processo. Um polinômio de segunda ordem baseado em análise estatística com limites de confiança de 95% foi encontrado para estimar o rendimento de extração. Na seguinte etapa do estudo, uma rede neural artificial foi aplicada como um método computacional para prever o rendimento de óleo. Utilizou-se um perceptron multicamada neste estudo. Para implementar uma rede neural artificial, a temperatura, o tempo e o número de ciclos de extração foram selecionados como variáveis de entrada e o rendimento de óleo foi considerado como variável alvo. 70% dos dados foram utilizados para treinamento e 30% dos dados restantes foram utilizados para testar a melhor rede obtida. Os resultados mostraram que o método rede neural artificial é mais confiável do que a metodologia de superfície de resposta para a predição e otimização da extração. As condições ótimas de processo foram encontradas a 100 °C, 10 min e 2 ciclos.

Conte et al. (2016) estudaram o processo de extração de óleo de Cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) utilizando etanol pressurizado e compararam composição química dos extratos obtidos (em termos de ácidos graxos) com outras técnicas de extração (Soxhlet e Ultrassom). Soxhlet e Ultrassom apresentaram rendimento global máximo de 36,53% e 30,41%, respectivamente (70 °C e 240 min). PLE apresentou rendimentos globais máximas de 25,62% (3 mL/min), 19,94% (2 mL/min) e 12,37% (1 mL/min) a 40 °C, 100 bar e 60 min. O ácido palmítico mostrou menor concentração em todas as condições experimentais (de 5,70% para 7,17%); o ácido esteárico e o ácido linoléico apresentaram concentrações intermediárias (de 2,93% para 25,09% e 14,09% para 19,06%, respectivamente); o ácido oleico apresentou maior composição (de 55,12% para 83,26%) e foram observadas diferenças entre as porcentagens de ácidos graxos, dependendo do método.

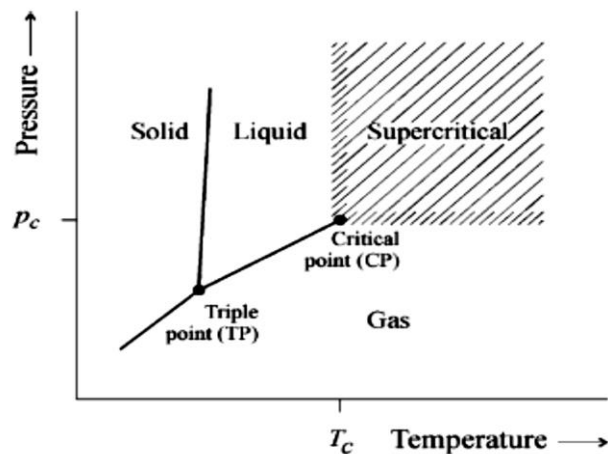
4.2. Processo de extração com fluido supercrítico

O processo SFE é uma operação unitária de separação sólido-fluido, em que o solvente, um fluido no estado supercrítico interage com uma matriz sólida e flui através dela, que se fundamenta no equilíbrio das fases e na integridade das propriedades físico-químicas do fluido supercrítico (FSC), como o alto poder de solvatação, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (BRUNNER, 1994).

FSC são solventes com propriedades únicas (BRENNECKE; ECKERT, 1989). Estes evidenciam propriedades físico-químicas entre um líquido e um gás (RIZVI et al., 1986) quando são conduzidos a pressão e temperatura acima do seu ponto crítico (Figuras 6 e 7) (BRUNNER, 2005). Embora a densidade do FSC seja semelhante à de um líquido, a sua viscosidade é semelhante à de um gás e a sua difusividade é intermédia entre os dois estados. Assim, o estado do FSC tem sido definido como um estado no qual o líquido e gás

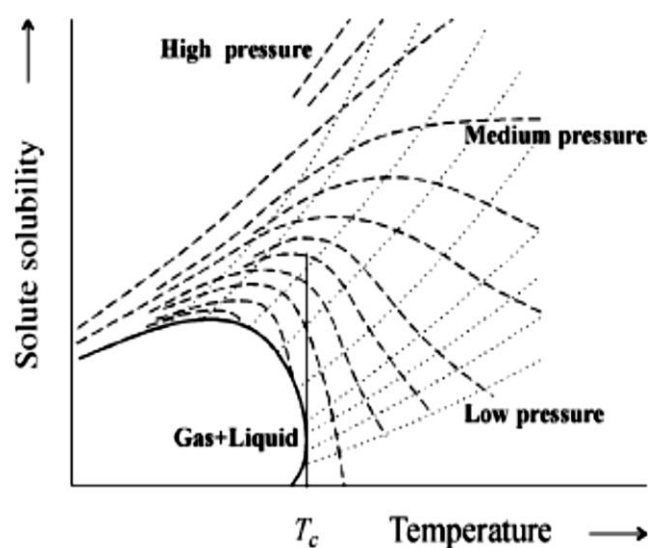
são indistinguíveis uns dos outros, ou como um estado em que o fluido é compressível (ou seja, o comportamento semelhante a um gás), com uma densidade semelhante à de um líquido e, portanto, poder solvente semelhante (HERRERO; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2006). Além disso, a propriedade que o torna particularmente atraente é a possibilidade da sua separação completa no final do processo, quando por exemplo, se utiliza o CO_2 , este solvente ao final do processo, em condições de baixa pressão se torna gás e libera o extrato deixando-o livre de solvente (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Figura 6 - Estado supercrítico para um componente puro



Fonte: BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process. v. 4. Darmstadt: Steinkopff, 1994. p 59.

Figura 7 - Comportamento da solubilidade de uma substância de baixa volatilidade (líquidos ou sólidos) em um fluido subcrítico ($T < T_c$) ou um fluido supercrítico ($T > T_c$) como função da temperatura

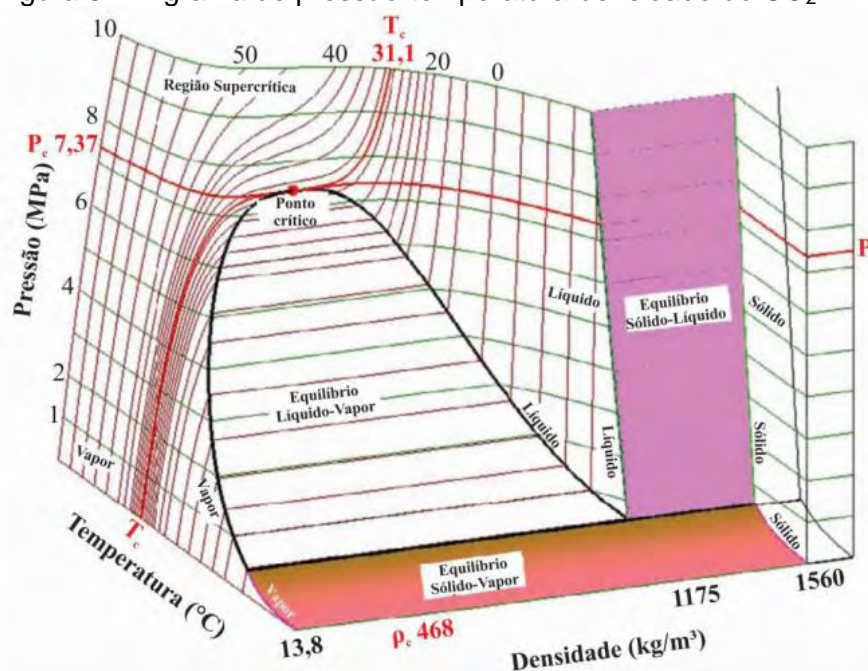


Fonte: BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process. v. 4. Darmstadt: Steinkopff, 1994. p 60.

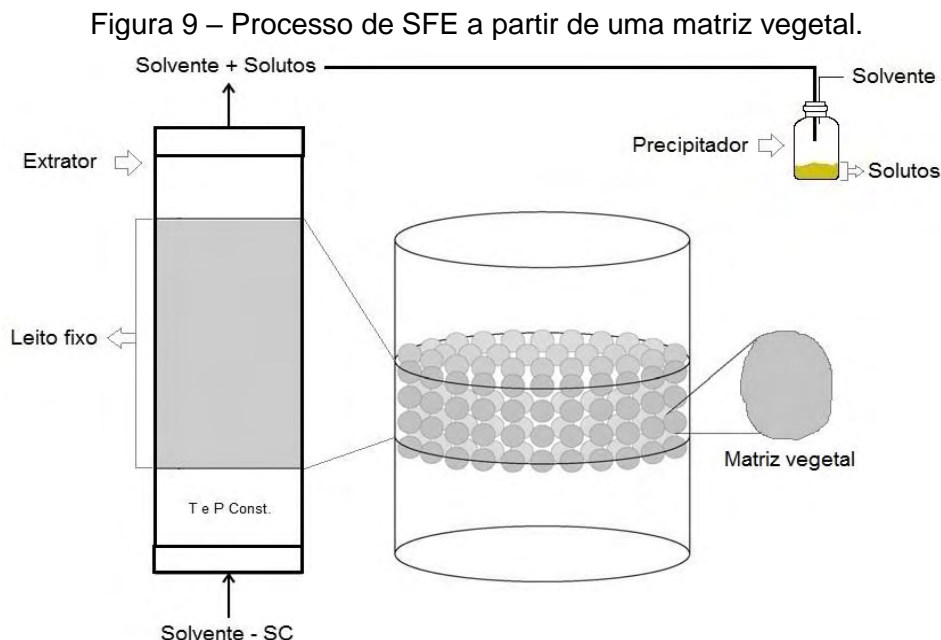
Quanto aos solventes, há uma vasta gama de compostos que podem ser usados como FSC. O CO_2 é o mais utilizado por ser relativamente barato e possuir propriedades críticas (temperatura crítica $31,3\text{ }^\circ\text{C}$ e pressão crítica 74 bar) (Figura 8) fáceis de serem alcançadas em aparelho industrial, e por ser um solvente não poluente e geralmente reconhecido como seguro para a saúde (GRAS) (REVERCHON; DE MARCO, 2006). E também por ser um bom solvente para muitas moléculas não polares, e algumas polares com baixo peso molecular (NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006).

O processo de SFE a partir de uma matriz vegetal consiste em duas etapas, extração e separação do extrato (Figura 9). Na extração, o solvente é alimentado no extrator e uniformemente distribuído na entrada do leito fixo por onde escoam dissolvendo os solutos extraíveis da matriz vegetal sob condições de temperatura e pressão constantes. Na separação, a mistura (solutos + solvente) deixa o extrator e passa pelo coletor (vaso precipitador), onde finalmente os solutos são separados (BRUNNER, 2005). Durante a extração de componentes solúveis a partir de um produto natural, Brunner (1994) também observou que a matriz vegetal absorve o fluido supercrítico e outros solventes, os quais são adicionados para atuar sobre o processo de extração como modificadores de polaridade. Como consequência, a estrutura celular dilata-se e a resistência ao transporte de solutos diminui. Em seguida os componentes solúveis são dissolvidos pelo fluido supercrítico. Os compostos dissolvidos são transportados para a superfície da matriz vegetal. Estes componentes, agora dissolvidos, formam a fase fluida e escoam para a saída do extrator. Algumas reações químicas podem ocorrer antes da solvatação.

Figura 8 – Diagrama de pressão-temperatura-densidade do CO_2



Fonte: CARVALHO, P. I. N. Avaliação técnico-econômica do processo de obtenção de extrato de cúrcuma utilizando CO₂ supercrítico e estudo da distribuição de temperatura no leito durante a extração. 20016. 178p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.



Fonte: CORNELIO-SANTIAGO, H. P. Medida da solubilidade de óleo de café verde (*Coffea arabica* L.) em dióxido de carbono supercrítico e modelagem termodinâmica. 2015. 90p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

4.2.1. Curva de extração global (OEC)

A trajetória da SFE pode ser avaliada analisando as seguintes variáveis: a) a quantidade total de extrato, b) a taxa de extração, c) a quantidade remanescente de extrato na matriz, e d) a concentração do extrato no solvente supercrítico na saída do extrator (BRUNNER, 1994; JESUS; MEIRELES, 2014). Todas as variáveis mencionadas podem ser apresentadas em função do tempo de extração ou da quantidade de solvente consumido. Na maioria dos estudos reportados na literatura, a variável (a) é a mais utilizada em forma de massa acumulada de extrato em função do tempo de extração ou a quantidade de solvente consumido, também comumente conhecida como curva de extração global (OEC – *overall extraction curve*).

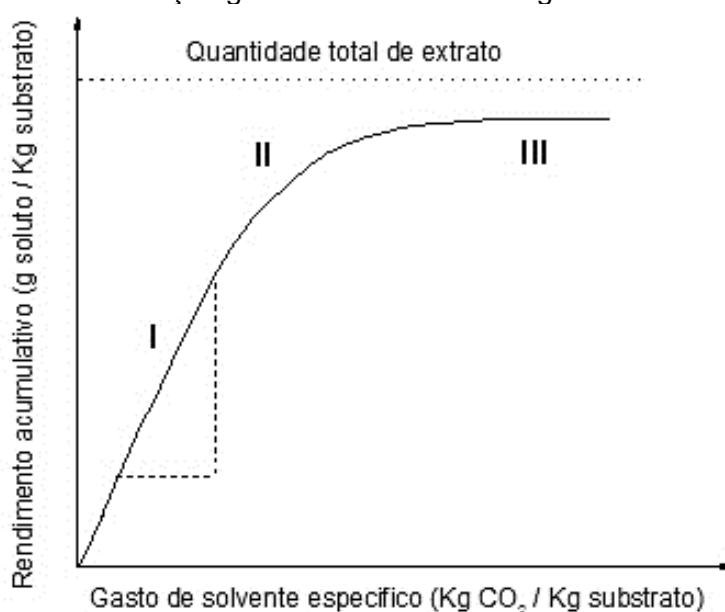
O comportamento de uma OEC a partir da extração de uma matriz vegetal utilizando fluido supercrítico não é uma função linear do tempo. Em geral uma OEC possui ou se divide em três regiões (Figura 10). Na zona I, chamada também de taxa de extração constante (*CER – constant extraction rate*), a curva tem inclinação constante, a superfície externa da matriz vegetal é coberta por uma mistura de solutos facilmente acessíveis que

podem ser extraídos ao mesmo tempo. Nesta fase a extração é limitada pela solubilidade dos solutos no dióxido de carbono supercrítico sob as condições do processo, o que representa a denominada solubilidade "aparente" do extrato no dióxido de carbono supercrítico, onde o mecanismo dominante de transferência de massa é a convecção na fase do dióxido de carbono supercrítico.

Na zona II ou taxa decrescente de extração (*FER – Falling extraction rate*), a inclinação da curva de extração global diminui continuamente porque não há solutos livres suficientes na superfície da matriz vegetal, existem restrições à transferência de massa no interior da matriz vegetal, e/ou existem restrições de equilíbrio para a liberação dos solutos a partir da matriz vegetal para a fase do dióxido de carbono supercrítico. Nesta fase, tanto a difusão dentro da matriz vegetal quanto a convecção na fase do dióxido de carbono supercrítico são importantes para a transferência de massa.

E finalmente, na zona III, chamada de difusão controlada (*DC – Diffusion controlled*), a curva de extração global se aproxima a uma assíntota horizontal, onde a transferência de massa ocorre principalmente pela difusão na camada externa e no interior da matriz vegetal, sob a condição do processo. Em geral 50 a 90% do total do extrato é obtido na taxa constante de extração (CER) (MUKHOPADHYAY, 2000; FERREIRA; MEIRELES, 2002; QUISPE-CONDORI et al., 2005; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; DEL VALLE; UREGO, 2012).

Figura 10 – Curva de extração global de uma matriz vegetal com fluido supercrítico.



Fonte: CORNELIO-SANTIAGO, H. P. Medida da solubilidade de óleo de café verde (*Coffea arabica* L.) em dióxido de carbono supercrítico e modelagem termodinâmica. 2015. 90p.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Os fluidos supercríticos (FSCs) são aplicáveis em vários processos desenvolvidos em escala comercial em indústrias farmacêuticas, alimentícias e têxteis (KNEZ et al., 2014), assim como numerosas usinas de SFE em escala industrial estão em operação em muitas partes do mundo para a extração de materiais vegetais, como constituintes de lúpulo, descafeinação de café e chá e separação da lecitina partir do óleo (REVERCHON; DE MARCO, 2006). Também unidades industriais menores são usadas para a extração de especiarias na indústria de alimentos e para substâncias naturais usadas em cosméticos (KNEZ; ŠKERGET; HRŇIČ, 2010). Embora o foco da pesquisa do FSC esteja se movendo atualmente para novas áreas, tais como formação de partículas, reações químicas e bioquímicas, síntese de novos materiais e novos suportes de catalisadores, como aerogels, ainda, a aplicação industrial mais extensa do FSC continua sendo a extração com CO₂ supercrítico a partir de vegetais. Também pesquisas recentes (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009; LASEKAN; ABDULKARIMB, 2012; SANTOS et al., 2013; JAHURUL et al., 2014; BELAYNEH et al., 2015; ÇELIK; GÜRÜ, 2015; RAI; MOHANTY; BHARGAVA, 2016; ÖZKAL; YENER, 2016; KOUBAA et al., 2017; CRUZ et al., 2017) mostram que a extração de lipídios com CO₂ supercrítico a partir de sementes estão se desenvolvendo continuamente com o fim de otimizar os parâmetros de extração e obter novos produtos ricos ou/e enriquecido em compostos ativos ou em ácidos graxos essenciais com propriedades funcionais, nutricionais e ação antimicrobiana.

Cruz et al. (2017) estudaram diferentes métodos de extração a partir de semente de *Butia moída* e foram comparados em termos de rendimento global do processo, composição do extrato, conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e antimicrobiano. Os métodos utilizados foram: SFE conduzido a 40, 50 e 60 °C e pressões de 100 a 300 bar, e as outras extrações utilizando Ultra-sônico e Soxhlet com diferentes solventes. Para o método SFE as condições de 60°C e 300 bar proporcionou o melhor rendimento de extração (13,9%) e o extrato foi considerado um forte inibidor bacteriano.

Santos et al. (2013) estudaram o rendimento de extração, a qualidade nutricional e a estabilidade térmica-oxidativa do óleo de castanha de Brasil obtido pela SFE em diferentes condições de temperatura (40 a 60 °C) e pressão (20 a 30 MPa), e parâmetros constates como, a vazão (7,04 g/min) e tempo de extração (120 min). Maior rendimento (67,2%) foi obtido na condição 60 °C e 300 bar, as avaliações colorimétricas revelaram um material com forte tendência à cor amarela, o seu perfil de ácidos graxos mostrou predominância de ácidos graxos insaturados (75%), foi termicamente estável sob aumentos progressivos de temperatura até 300 °C e a estabilidade oxidativa mostrou tempo de indução de oxidação

em torno de 14,85 h. Outros exemplos de trabalhos recentes nos quais condições experimentais de extração semelhantes foram utilizados são resumidos na Tabela 2. Estas condições serviram de parâmetros para o estudo desenvolvido nesta pesquisa.

Tabela 2 – Resumo de condições experimentais de extração de óleo usando CO₂ supercrítico. Considerando a redução de tamanho por trituração e moagem.

Matéria-prima	Célula de Extração				Condições de extração						Ref.
	d _p (mm)	V (cm ³)	H _c /d _c	ε	T (°C)	P (MPa)	Q _{co2} (g/min) ^o ou (mL/min) ⁺	t _R /t _E (min)	X ₀ (%)	OR (%)	
Semente de butia (<i>Butia catarinensis</i>) Linhaça	0,5	nr	nr	nr	40-60	10-30	6,6°	240	13,9	79,4	Cruz et al. (2017)
Sementes de girassol	< 0,85-0,92	10	nr	nr	50-70	40-60	2-4°	60	31,2	nr	Özkal e Yener, (2016)
Semente de Perâ (<i>Opuntia stricta</i>)	0,5-1,0	1000	2,5	0,47	60-100	20-40	4,98-15°	250	99,6	nr	Rai, Mohanty e Bhargava, (2016)
Sementes de cardo de leite	0,36	nr	nr	nr	40	35	141,7°	10/120	58,6	49,9	Koubaa et al. (2016)
Sementes de Camelina sativa	0,303 - 1,2	24	nr	nr	40-80	16-22	3-5 ⁺	120	3,3	nr	Çelik e Gürü, (2015)
Amêndoa de Manga var. Maça	0,30	nr	nr	nr	43,2-76,8	31,6-48,4	1 ⁺	20/510	31,6	nr	Belayneh et al. (2015)
Castanha do Brasil	< 0,20	2,5	nr	nr	60-72	35-42,2	3,4 ⁺	300	13,1	nr	Jahurul et al. (2014)
Nozes de tigre (<i>Cyperus esculentus</i>)	1,0	nr	nr	nr	40-60	20-30	7,04	120	67,20	nr	Santos et al. (2013)
Sementes de Sacha Inchi	0,54	nr	nr	nr	40-80	20-40	3 ⁺	210	26,3	63,8	Lasekan e Abdulkarimb, (2012)
	0,716	50	nr	nr	40-60	10-40	2,4°	271	50,1	92,3	Follegatti-Romero et al. (2009)

T: Temperatura; P: Pressão; t_E: tempo de extração; V: volume; H_c: altura da célula de extração; d_L: diâmetro da célula de extração; d_p: diâmetro da partícula; ε: porosidade; t_R: tempo estático; X₀: rendimento da extração de óleo; OR: óleo recuperado; Ref.: Referência; nr: não reportado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEX, Asociación de Exportadores. (2018). <http://www.adexperu.org.pe/lista-prensa/?tipo=&texto=sacha+inchi/> Accessed 10 October 2018.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Seed composition of Amazonian lecythidaceae species: part 3 in the series “Studies of edible Amazonian plants”. *Journal of food composition and analysis*, v. 12, n. 1, p. 37-51, 1999.
- ADRIANZÉN, N.; ROJAS, C.; LUJÁN, G. L. Efecto de la temperatura y tiempo de tratamiento térmico de las almendras trituradas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sobre el rendimiento y las características físico-químicas del aceite obtenido por prensado mecánico en frío. *Agroindustrial Science*, v. 1, n. 2, p. 46-55, 2011.
- AGUILAR, E. C. et al. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, n. 7, p. 601-609, 2012.
- ALMEIDA, M. R. et al. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. *Plant foods for human nutrition*, v. 67, n. 2, p. 171-177, 2012.
- ARANCETA, J.; PÉREZ-RODRIGO, C. Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, v. 107, S8 - S22, 2012.
- ARAUJO, F. D. A Review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – An Economically Valuable Species of the Central Brazilian Cerrados. *Economic Botany*, New York, v. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.
- BECKMAN, E.J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, *Journal Supercritical Fluids*. v. 28, p. 121–191, 2004.
- BELANDRIA, V.; DE OLIVEIRA, P. M. A.; CHARTIER, A.; RABI, J.A.; OLIVEIRA, A.L.; BOSTYN, S. Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 37, p. 145–152, 2016.
- BELAYNEH, H.D.; WEHLINGA, R.L.; CAHOON, E.; CIFTCI, O.N. Extraction of omega-3-rich oil from *Camelina sativa* seed using supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*. v. 104, p. 153–159, 2015.
- BERNARDO-GIL, M. G.; CASQUILHO, M. Modeling the supercritical fluid extraction of hazelnut and walnut oils. *AIChE journal*, v. 53, n. 11, p. 2980-2985, 2007.
- BERTO, A. et al. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. *Food Research International*, v. 77, p. 441-449, 2015.

- BORDIGNON, S. R.; MARIA, G.; AMBROSANO, B.; HERCILIO, P.; RODRIGUES, V. Propagação in vitro de Sacha inchi. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1168 -1172, 2012.
- BOZAN, B.; TEMELLI, F. Supercritical CO₂ extraction of flaxseed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, n. 3, p. 231-235, 2002.
- BRENNECKE, J.F.; ECKERT, C. A. Phase equilibria for supercritical fluid process desing. Review. *American Institute of Chemical Engineers*, v. 35, n. 9, p. 1409-14027, 1989.
- BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process. v. 4. Darmstadt: Steinkopff, 1994. 59-144p.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Enginneering*, v. 67, p. 21–33, 2005.
- BUSSMANN, R. W.; TÉLLEZ, C.; GLENN, A. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany*, West Sussex, 27, 313-315, 2009.
- CASTRO-PUYANA, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; VALDÉS, A.; IBRAHIM, O.H.M.; SUAREZ-ÁLVAREZ, S.; FERRAGUT, J.A.; MICOL, V.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; GARCÍA-CAÑAS, V. Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells, *Food Research International*, 2016.
- CARDARELLI, H. R.; OLIVEIRA, A. J. Conservação do leite de castanha-do-Pará. *Scientia Agrícola*, v. 57, n. 4, p. 617-622, 2000.
- CARDINAL-MCTEAGUE, W. M.; GILLESPIE, L. J. Molecular phylogeny and pollen evolution of Euphorbiaceae tribe Plukenetieae. *Systematic Botany*, v. 41, n. 2, p. 329-347, 2016.
- CARDOSO, Bárbara R. et al. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food research international*, v. 100, p. 9-18, 2017.
- CARVALHO, P. I. N. Avaliação técnico-econômica do processo de obtenção de extrato de cúrcuma utilizando CO₂ supercrítico e estudo da distribuição de temperatura no leite durante a extração. 20016. 178p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- ÇELİK, H.T.; GÜRÜ, M. Extraction of oil and silybin compounds from milk thistle seeds using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. v. 100, p. 105–109, 2015.
- CHASQUIBOL, N. A. et al. Characterization of Glyceridic and Unsaponifi able Compounds of Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana* L.) Oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 62, p. 10162–10169, 2014.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. Review, *Int. J. Mol. Sci.*, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

- CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food chemistry*, 141(3), 1732-1739, 2013.
- CHIRINOS, R. et al. Comparison of the physico-chemical and phytochemical characteristics of the oil of two *Plukenetia* species. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 173, p. 1203 – 1206, 2015.
- CHIRINOS, R. et al. Impact of Roasting on Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols, and Phenolic Compounds Present in *Plukenetia huayllabambana* Seed. *Journal of Chemistry*, Nottingham, v. 1, p. 1-10, 2016.
- CHISTÉ, R. C. et al. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Food chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1740-1749, 2012a.
- CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 23, p. 5884-5892, 2012b.
- CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed Study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids, Tocopherols and Sterols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 7, p. 1374 – 1380, 2008.
- COLIVET J.; OLIVEIRA, A.L.; CARVALHO, R.A. Influence of the bed height on the kinetics of watermelon seed oil extraction with pressurized ethanol. *Separation and Purification Technology*. v. 169, p. 187–195, 2016.
- COLOMBO, N. B. R. et al. *Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 9, p. 852-862, 2015.
- CONTE, R.; GULLICH, L.M.D.; BILIBIO, D.; ZANELLA, O.; BENDER, J.P.; CARNIEL, N.; PRIAMO, W.L. Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. *Food Chemistry*, v. 213, p. 425–430, 2016.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Proposta de Preços mínimos Safra 2015-2016. *Produtos da Sociobiodiversidade* v. 2, Brasília, p. 1 -159, 2015.
- CORNELIO-SANTIAGO, H. P. Medida da solubilidade de óleo de café verde (*Coffea arábica* L.) em dióxido de carbono supercrítico e modelagem termodinâmica. 2015. 90p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- CORNELIO-SANTIAGO, H.P.; GONÇALVES C.B.; DE OLIVEIRA, N.A.; OLIVEIRA, A.L. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol

- composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 386 – 394, 2017.
- COSTA, J. G. M. et al. Antibacterial properties of pequi pulp oil (*Caryocar coriaceum*-Wittm.). *International journal of food properties*, v. 14, n. 2, p. 411-416, 2011.
- CRUZ, P.N.; PEREIRA, T.C.S.; GUINDANI, C.; OLIVEIRA, D.A.; ROSSI, M.J.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. v.119, p. 229–237, 2017.
- Da Silva, A. F. Efeito das etapas de processamento sobre a qualidade de Castanhas-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*, H.B.K.): avaliação da fração lipídica e contaminação por aflatoxinas. 2014. 95p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- DE FIGUEIREDO, P. R. L. et al. *Caryocar coriaceum* Wittm.(Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, v. 191, p. 87-94, 2016.
- DE LIMA, A.; DE OLIVEIRA E SILVA, A.M.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA POLPA E NA AMÊNDOA DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.
- DEL VALLE, J. M.; JUAN, C.; CARDARELLI, D. A. Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. *Journal of Food Engineering*, v. 67, n. 1-2, p. 35-57, 2005.
- DEL VALLE J.M.; URREGO, F.A. Free solute content and solute-matrix interactions affect apparent solubility and apparent solute content in supercritical CO₂ extractions. A hypothesis paper. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 66, p. 157–175, 2012.
- DE MELO JR, A. F. et al. Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb.(*Caryocareceae*) in the North of Minas Gerais, Brazil. *Biochemical systematics and ecology*, v. 43, p. 205-209, 2012.
- DE OLIVEIRA, M. L. M. et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. *Journal of ethnopharmacology*, v. 129, n. 2, p. 214-219, 2010.
- DESAI, ADITYA J.; DONG, MAOQING; MILLER, LAURENCE J. Beneficial effects of β -sitosterol on type 1 cholecystokinin receptor dysfunction induced by elevated membrane cholesterol. *Clinical Nutrition*, v. 35, n. 6, p. 1374-1379, 2016.

- DE SOUZA, A. H. P. et al. Sacha inchi as potential source of essential fatty acids and tocopherols: multivariate study of nut and shell. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 35, n. 4, p. 757-763, 2013.
- DE SOUZA, M. L.; DE MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 24, n. 1, p. 120-128, 2004.
- DE SOUZA, M. L. et al. Processamento e Estabilidade de Amêndoa de Torrada e Salgada Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B.K.). *B. CEPPA*, v.5, n. 1, p. 16 – 25, 1987.
- DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K. *Green Chemistry & Engineering*. Academic Press. Burlington, MA.01803, USA. p. 2007.
- DRESEN, H.; PRASAD, R. B .N.; GÜLZ, P. Composition of lipids of piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.) seed and pulp oil. *Zeitschrift fur Naturforschung*. v. 44, n. 9-10, p. 739-742, 1989.
- DUARTE, A. C. et al. Dose-response effects of dietary pequi oil on fermentation characteristics and microbial population using a rumen simulation technique (Rusitec). *Anaerobe*, v. 48, p. 59-65, 2017.
- DUBA, K. S.; FIORI, L. Solubility of grape seed oil in supercritical CO₂: Experiments and modeling. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 100, p. 44-52, 2016.
- DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v.112, p. 4 – 29, 2016.
- FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M.; GRASSO, S.; DACH, M.; MONDELLO, L. Chemical Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil. *J. Agric. Food Chem*, v. 59, p. 13043 – 13049, 2011.
- FARIA-MACHADO, A. F. et al. Discrimination of Pulp Oil and Kernel Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense*) by Fatty Acid Methyl Esters Fingerprinting, Using GC-FID and Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 63, p. 10064 –10069. 2015.
- FEREIDOON, S. *Bailey's industrial oil & fats products*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2005, 1- 3687.
- FERNANDES, G.; VENKATRAMAN, J. T. Role of omega-3 fatty acids in health and disease. *Nutrition Research*. v. 13, n. 1, p.19 - 45, 1993.
- FERREIRA, B. S. et al. Comparative properties of amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*, v. 16, n. 7, p. 5875-5885, 2011.
- FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização Físico-Química da Amêndoa, Torta e Composição dos Ácidos Graxos Majoritários do Óleo Bruto

- da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). Alimentos e Nutrição, v. 17, n. 2, p. 203–208, 2006.
- FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M.A.A. 2002. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. Journal of Food Engineering, v. 54, n. 4, p. 263–269, 2002.
- FOLLEGATTI-ROMERO, L. A. Extração de óleo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) com dióxido de carbono supercrítico. 2007. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- FOLLEGATTI-ROMERO L.A.; PIANTINO, C.R.; GRIMALDI, R.; CABRAL F.A. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. J. of Supercritical Fluids. v. 49, p. 323–329, 2009.
- FREITAS, S.P.; FREITAS-SILVA, O.; De MIRANDA, L.C.; COELHO, M.A.Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 27, p. 14-17, 2007.
- GANESH, V.; HETTIARACHCHY, N.S. A Review: Supplementation of Foods with Essential Fatty Acids—Can It Turn a Breeze without Further Ado?. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 56, n. 9, p. 1417-1427, 2016.
- GARMENDIA, F.; PANDO, R.; RONCEROS, G. Efecto del aceite de sachá inchi (*plukenetia volubilis* l) sobre el perfil lipídico en pacientes con hiperlipoproteinemia. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, v. 28, p. 628-632, 2011.
- GEÓCZE, K. C. et al. Essential oils from pequi fruits from the Brazilian Cerrado ecosystem. Food research international, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2013.
- GILBERT-LÓPEZ, Bienvenida et al. Development of new green processes for the recovery of bioactives from *Phaeodactylum tricornutum*. Food Research International, v. 99, p. 1056-1065, 2017.
- GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. Food Science and Technology, v. 20, n. 2, p. 240-245, 2000
- GONZALES, G. F.; GONZALES, C. A randomized, double-blind placebo-controlled study on acceptability, safety and efficacy of oral administration of sachá inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) in adult human subjects. Food and chemical toxicology, v. 65, p. 168-176, 2014.
- GONZALES, G.F.; GONZALES, C.; VILLEGAS, L. Exposure of fatty acids after a single oral administration of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) and sunflower oil in human adult subjects. Journal Toxicology Mechanisms and Methods, v. 24, n. 1, p. 60 - 69, 2014.

- GONZALEZ-ASPAJO, G. et al. Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococcus aureus* to human skin explant and keratinocytes in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, v. 171, p. 330-334, 2015.
- GUTIÉRREZ, L. F. et al. Physicochemical properties of oils extracted from γ -irradiated sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *Food chemistry, Amsterdam*, v. 237, p. 581-587, 2017.
- GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADA, L.M.; JIMÉNEZ, Á. Chemical composition of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas Aceites*, v. 62, p. 76 - 83, 2011.
- HAMAKER, B.R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R.M.; CLARK, D.; GARCIA, H.H.; GONZALES, A.E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRIGUEZ, T.; LESCANO, M. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chem.* v. 69, p. 461 - 463, 1992.
- HERRERO, M. CIFUENTES, C.; IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.
- HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 26–38, 2015.
- HU, J.; GUO, Z.; GLASIUS, M.; KRISTENSEN, K.; XIAO, L.; XU, X. Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with bioethanol: An efficient and sustainable approach. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 34, p. 5765–5773, 2011.
- IBCE, El Instituto Boliviano de Comercio Exterior. Bolivia Exportación de Castaña. (2017). <http://www.ibce.org.bo/ibcecifras/index.php?id=602/> Accessed 10 October 2018.
- IMAMURA, F.; MICHA, R.; WU, J. H. Y.; DE OLIVEIRA OTTO, M. C.; OTITE, F. O.; ABIOYE, A. I.; MOZAFFARIAN, D. Effects of Saturated Fat, Polyunsaturated Fat, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomised Controlled Feeding Trials. *Journal PLoS Medicine*. v. 13, n.7, p. 1 - 18, 2016.
- JABLONSKÝ, M.; VERNARECOVÁ, M.; HÁZ, A.; DUBINYOVÁ, L.; ŠKULCOVÁ, A.; SLADKOVÁ, A.; ŠURINA, I. EXTRACTION OF PHENOLIC AND LIPOPHILIC COMPOUNDS FROM SPRUCE (*Picea abies*) BARK USING ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION BY ETHANOL. *WOOD RESEARCH*, v. 60, n.4, p. 583-590, 2015.

- JAHURUL, M.H.A.; ZAIDUL, I.S.M.; NORULAINI, N.N.A.; SAHENA, F.; JAFFRI, J.M.; OMAR, A.K.M. Supercritical carbon dioxide extraction and studies of mango seed kernel for cocoa butter analogy fats. *CyTA – Journal of Food*. v. 12, n. 1, p. 97–103, 2014.
- JESUS, S. P.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extraction: A Global Perspective of the Fundamental Concepts of this Eco-Friendly Extraction Technique. In: CHEMAT, F.; VIAN, M.A. *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*. London: Berlin Heidelberg, 2014. p. 39 – 72.
- JOHNER, J. C. F.; HATAMI, T.; MEIRELES, M. A. A. Developing a supercritical fluid extraction method assisted by cold pressing for extraction of pequi (*Caryocar brasiliense*). *The journal of supercritical fluids*, v. 137, p. 34-39, 2018.
- JOHN, J.A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of functional foods*, v. 2, p. 196 – 209, 2010.
- KAMAL-ELDIN, A.; BUDILARTO, E. Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. In: Shahidi, F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 1st. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. p. 1 - 487.
- KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 105–113, 2002.
- KING, J. W. Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products. *Comptes Rendus Chimie*, v. 7, n. 6-7, p. 647-659, 2004.
- KLINK, CARLOS A.; MACHADO, RICARDO B. Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation biology*, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005
- KNEZ, Z.; MARKOCIC, E.; LEITGEB, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ HRNCIC, M. K.; SKERGE, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, v. 77, p. 235 – 243, 2014.
- KNEZ, Ž.; ŠKERGET, M.; HRŃCIČ, M. K. Principles of supercritical fluid extraction and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. In: Rizvi SH, editor. *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*. Cambridge: Woodhead Publishing; 2010. pp. 3 -38.
- KOUBAA, M.; MHEMDI, H.; BARBA, F.J.; ANGELOTTI, A.; BOUAZIZ, F.; CHAABOUNIC, S.E.; VOROBIEV, E. Seed oil extraction from red prickly pear using hexane and supercritical CO₂: assessment of phenolic compound composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, n. 2, p. 613 - 620, 2017.

- LASEKAN, O; ABDULKARIMB, S.M. Extraction of oil from tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) with supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). *LWT - Food Science and Technology*. v. 47, n. 2, p. 287–292, 2012.
- LIMA, B. R. et al. Solid phase extraction of phospholipids from Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) and their characterization by mass spectrometry analysis. *Mass Spectrometry Letters*, v. 5, n. 4, p. 115-119, 2014.
- LÓPEZ, K.; CRUZ, C. S.; GUTIÉRREZ, A. Protein profile of “Sacha Inchi” seeds (*Plukenetia volubilis* L. and *Plukenetia huayllabambana* Bussmann, Téllez & Glenn). *The Biologist*, Lima, v. 14, n. 1, p. 11-20, 2016.
- MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, v. 117, n. 4, p. 450-457, 2013.
- MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, v. 204, n. 6, p. 442-444, 1997.
- MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. Review. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 435, n. 1, p. 3 - 9, 2012.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R.S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 51, n.1, p. 10–16, 2009.
- MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents. *Journal of Food Lipids*, v. 15, p. 81 – 96, 2008.
- MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Under increased hydrogen peroxide conditions, the antioxidant effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) to decrease DNA damage in runners are influenced by sex, age and oxidative stress-related genetic polymorphisms. *Free Radicals and Antioxidants*, v. 1, n. 3, p. 27-39, 2011a.
- MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Genetic polymorphisms influence runners’ responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. *Genes & nutrition*, v. 6, n. 4, p. 369, 2011b.
- MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition research*, v. 29, n. 12, p. 850-858, 2009.
- MIRANDA-VILELA, A. L.; RIBEIRO, I. F.; GRISOLIA, C. K. Association between interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and runners' responses to the dietary ingestion

- of antioxidant supplementation based on pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil: a before-after study. *Genetics and molecular biology*, v. 39, n. 4, p. 554-566, 2016.
- MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA, S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 42, n. 5, p. 585-591, 2007.
- MORI, S.A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Advances in Economic Botany*, v. 8, p. 130-150, 1990.
- MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Florida: CRC Press LLC, 2000. 83p.
- MUÑOZ JÁUREGUI, A. M. et al. Estudio nutricional de *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 79, n. 1, p. 47-56, 2013.
- MUSTAFA A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. v. 703, p. 8 – 18, 2011.
- NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 1, p. 19–43, 2006.
- NASCIMENTO, W. M. et al. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*). *ConScientiae Saúde*, v. 14, n. 3, p. 449-455, 2015.
- NATEX Prozesstechnologie GesmbH: Acesso 08/04/2018
https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/edible_oil_extraction.pdf.
- NETO, V. Q.; BAKKE, O. A.; RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S.; LETELIER, J. C.; CONCEIÇÃO, M. M. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: Characterization and thermal stability. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 3, n. 1, p. 33–42, 2009.
- OLIVEIRA, A.L.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, v. 145, p. 522 – 529, 2014.
- OLIVEIRA, L. G. et al. *Caryocar brasiliense* oil improves cardiac function by increasing Serca2a/PLB ratio despite no significant changes in cardiovascular risk factors in rats. *Lipids in health and disease*, v. 16, n. 1, p. 37, 2017.
- OLIVEIRA, M. N. S. et al. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n. 3, p. 380-386, 2006.

- OSORIO-TOBÓN, J. F.; MEIRELES M. A. A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. *Food and Public Health*. v. 3, n. 6, p. 289 – 303, 2013.
- ÖZKAL, S.G.; YENER, M.E. Supercritical carbon dioxide extraction of flaxseed oil: Effect of extraction parameters and mass transfer modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 112, p. 76–80, 2016.
- PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 26, p. 11087-11092, 2007.
- PALMEIRA, S. M. et al. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *European journal of câncer prevention*, v. 25, n. 4, p. 299-305, 2016.
- PASSOS, C. P. et al. Modelling the supercritical fluid extraction of edible oils and analysis of the effect of enzymatic pre-treatments of seed upon model parameters. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 89, n. 7, p. 1118-1125, 2011.
- PESSOA, A. S. et al. Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. *The journal of supercritical fluids*, v. 101, p. 95-103, 2015.
- POURALINAZAR, F.; YUNUS, M.A.C.; ZAHEDI, G. Pressurized liquid extraction of *Orthosiphon stamineus* oil: Experimental and modeling studies. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 62, p. 88–95, 2012.
- PRADO, J. M. et al. Manufacturing cost of supercritical-extracted oils and carotenoids from Amazonian plants. *Journal of food process engineering*, v. 33, n. 2, p. 348-369, 2010.
- PRANCE, G. T. The genus *Caryocar* L.(Caryocaraceae): an underexploited tropical resource. *Advances in Economic Botany*, p. 177-188, 1990.
- QIAN, F.; KORAT, A. A.; MALIK, V.; HU, F. B. Metabolic Effects of Monounsaturated Fatty Acid–Enriched Diets Compared With Carbohydrate or Polyunsaturated Fatty Acid–Enriched Diets in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes Care*. v. 39, n. 8, p. 1448 -1457, 2016.
- QUIRINO, G. S. et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. *Phytochemistry Letters*, v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009.
- QUISPE-CONDORI S.; SÁNCHEZ, D.; FOGLIO, M:A.; ROSA, P.T.V.; ZETZL, C.; BRUNNER G.; MEIRELES, M.A.A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, n. 1, p. 40–48, 2005.

- RAI, A.; MOHANTY, B.; BHARGAVA, R. Fitting of broken and intact cell model to supercritical fluid extraction (SFE) of sunflower oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. v. 38, p. 32–40, 2016.
- RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S. Extraction and functional characteristics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) globulin. *Food science and technology international*, v. 9, n. 4, p. 265-269, 2003.
- RAMOS, K. M. C.; SOUZA, V. A. B. Características físicas e químico-nutricionais de frutos de pequi (Caryocar coriaceum Wittm.) em populações naturais da região Meio-Norte do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 2, p. 500-508, 2011.
- REIS, J. P. Dietary Fatty Acids and Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 34, p. 2520-2521, 2014.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. Review. *The Journal of Supercritical Fluids*. v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.
- REVERCHON, E.; MARRONE, C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, n. 2, p. 161-175, 2001.
- RIBEIRO, M.B.N.; JEROZOLIMSKI, A.; DE ROBERT, P.; WILLIAM, E. MAGNUSSON, W.E. Brazil nut stock and harvesting at different spatial scales in southeastern Amazonia. *Forest Ecology and Management*. v. 319, p. 67–74, 2014.
- RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.*, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996.
- RINCÓN-CERVERA, M. Á. et al. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 111, p. 25-35, 2016.
- RIZVI, S.S.H.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A.; DANIELS, J.A. Supercritical fluid extraction: Fundamental Principles and Modeling Methods. *Food Technology*, 55-65, 1986.
- RUIZ, C. et al. Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *Revista Sociedad Química del Perú, Lima*, v. 79, n. 1, p. 29-36, 2013.
- RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.57, n.3/4, p. 219 – 228, 2006.
- SALAZAR, A.; BALDI, G.; HIROTA, M.; SYKTUS, J.; MCALPINE, C. Land use and land cover change impacts on the regional climate of non-Amazonian South America: A review. *Global and Planetary Change*. v. 128, p. 103 - 119, 2015.

- SANTOS, O. V. Desenvolvimento de barras de alto teor proteico a partir da castanha-do-brasil. 2008. p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
- SANTOS, O. V. Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos. 2012. 214p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; CARVALHO Jr. R.N.; COSTA, C. E. F.; LANNES, S. C. Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* H.B.K) obtained by supercritical extraction. *Journal of Food Engineering*. v. 117, p. 499–504, 2013.
- SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; SOARES, F. A. S. M.; GIOIELLI, L. A.; COSTA, C. E. F.; LANNES, S. C. S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. *Food Research International*. v. 47, p. 253–258, 2012.
- SANTOS, O. V. et al. Processamento de farinha de castanha-do-brasil: caracterização, análises térmicas e morfológicas. *Food Science and Technology*, v. 30, p. 264-269, 2010.
- SARAIVA, R. A. et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm.(Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *Journal of ethnopharmacology*, v. 136, n. 3, p. 504-510, 2011.
- SCRIMGEOUR, C. Chemistry of Fatty Acids. In: FERREIDON, S. *Bailey's industrial oil & fats products*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2005, p. 1- 3687.
- SENA, D. M. et al. Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil. *Grasas y Aceites*, v. 61, n. 2, p. 191-196, 2010.
- SEPPANEN, C.M.; SONG, Q.; CSALLANY, A.S. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, n. 5, p. 469 – 481, 2010.
- SHAHZAD, NAIYER et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 88, p. 786-794, 2017.
- SRUR, A. U. O. S. Processamento de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B.K.). 1976. 60p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Uinversidade de Campinas, Campinas, 1976.
2007. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- THIELE, J.J.; HSIEH, S.N.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. Vitamin E: Critical Review of Its Current Use in Cosmetic and Clinical Dermatology. *Dermatologic surgery*, v. 31, p. 805-813, 2005.

- TORRES, L. R. O. et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, Kidlington, v. 97, p. 205-216, 2016.
- TORRES, L.R.O. et al. Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. *International Food Research Journal*, Selangor, v. 23, n. 4, p. 1541-1551, 2016.
- TRAESEL, G. K. et al. Safety assessment of oil from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): evaluation of the potential genotoxic and clastogenic effects. *Journal of medicinal food*, v. 20, n. 8, p. 804-811, 2017.
- TRAESEL, G. K. et al. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 97, p. 224-231, 2016.
- TRIANA, D. M.; TORIJANO, S. A.; GIRALDO-ESTRADA, C. Diseño del proceso de extracción de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) con CO₂ supercrítico. *Agronomía Colombiana*, v. 34, n. 1Supl, p. S485-S488, 2016.
- TRIANA-MALDONADO, D. M.; TORIJANO-GUTIÉRREZ, S. A.; GIRALDO-ESTRADA, C. Supercritical CO₂ extraction of oil and omega-3 concentrate from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from Antioquia, Colombia. *Grasas y Aceites*, v. 68, n. 1, p. 172, 2017.
- VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 4705 – 4714, 2006.
- WWF. WWF's living Amazon initiative A Comprehensive Approach to Conserving the Largest Rainforest and Rivers System on Earth, Worldwide Fund for Nature, 2010.
- XAVIER, W. K. S. et al. Topical anti-inflammatory action of *Caryocar villosum* oil (Aubl) Pers. *Journal of applied pharmaceutical science*, v. 1, n. 3, p. 62, 2011.
- YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1573–1580, 2009.
- ZANQUI, A. B. et al. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil composition varies with changes in temperature and pressure in subcritical extraction with n-propane. *Industrial Crops and Products*, v. 87, p. 64-70, 2016.

CAPÍTULO 2: Extração de óleo de amêndoa de castanha do Brasil usando solventes verdes: Efeitos das variáveis do processo no rendimento e composição do óleo

(Artigo aceito no Journal of Food Process Engineering)

CAPÍTULO 2: Extração de óleo de amêndoa de castanha do Brasil usando solventes verdes: Efeitos das variáveis do processo no rendimento e composição do óleo

Resumo

A eficiência de extração dos álcoois isopropílico (IPA) e etílico (EtOH) pressurizados foi estudada, e os efeitos das variáveis de processo, tempo estático (St), razão solvente-alimentação (S/F) e temperatura (T) foram avaliados em relação à extração de óleo (X_0), ao conteúdo de ácidos graxos livres (FFA, Free Fatty Acids), conteúdo de fenólicos totais (TPC) e teor de β -sitosterol. A quantidade de solvente utilizada (S/F) não influenciou o X_0 , mas o St e a T influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o X_0 . A condição de máximo rendimento (X_0) (60,40%) ocorreu quando o St foi de 9 min e a T de 86 °C. Baixos níveis de ácidos graxos livres (FFA) (0,25 a 0,28%) foram observados em todos os óleos obtidos, indicando que as condições de processo não interferem nesta variável. Estas variáveis, também não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) no TPC (29,10 a 38,47 mg GAE/kg óleo) e conteúdo de β -sitosterol (9,51 a 40,32 mg/100 g de óleo). Este óleo, como conhecido, é uma alta fonte de ácido graxo insaturado e a extração com líquido pressurizado apresentou-se como uma técnica promissora para a extração rápida de óleo de castanha do Brasil. Este processo recuperou 90,58% de óleo presente na castanha quando em 27 min, ou seja 3 ciclos de 9 min de tempo estático em um processo intermitente.

Palavras-chaves: Solvente pressurizado, Omega-6, castanha do Brasil, β -sitosterol.

Aplicação prática

A otimização da extração com solvente verde pressurizado tem sido estudada para demonstrar que esta tecnologia, mesmo empregando solventes polares, proporciona altos rendimentos na extração de óleo. É uma tecnologia em estudo que não deixa resíduos de solventes tóxicos em óleos vegetais. Nesta pesquisa, o uso de extração com líquido pressurizado com álcool isopropílico (IPA) e etílico (EtOH) como solventes foi empregado na extração de óleo de castanha do Brasil, com foco na recuperação rápida do óleo como um processo alternativo para aumentar a produção e melhorar o uso de produtos florestais não-madeireiros no bioma Amazônia.

1. Introdução

A castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K) nativa do bioma amazônico é uma espécie pertencente à família Lecythidaceae (MORI; PRANCE, 1990). A suas sementes são conhecidas também como castanha do Brasil, castanha-da-Amazônia, castanha-do-Pará ou Pará *nut*, castanha-do-Maranhão mas é popularmente conhecida no mercado internacional como *Brazil nut* é um dos mais importantes produtos florestais não-madeireiros do Brasil e ainda colhida por extrativismo e não de plantações (RIBEIRO et al., 2014). É reconhecida como a pedra angular da economia extrativista da floresta amazônica (KAINER, 2007) do Brasil, Bolívia e Peru, e sua comercialização é uma importante fonte de renda para as famílias indígenas e ribeirinhas nestas regiões (RIBEIRO et al., 2014).

O Brasil produz 41 mil toneladas destas sementes por ano sendo o consumo interno de 33 mil toneladas e a exportação de 8 mil toneladas o que representa US\$ 14,7 milhões (CONAB, 2015). No caso das exportações de castanha *in natura* e processadas, destacam-se como principais destinos a Bolívia, EUA, Hong Kong, Europa e Austrália.

As amêndoas da castanha do Brasil contêm de 63,7 a 66,7% de lipídios (15,3 a 25,4 % de ácidos graxos saturados, 27,4 a 29,1% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), 21 a 45,6% de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (COTTA, 2008; RIBEIRO et al., 2014). Possui ainda 13,9 a 14,5% de proteínas, 15,1 a 16,8% de carboidratos (VENKATACHALAM; SATHE, 2006) e 31,3 µg de selênio/g de amêndoa (DUTRA et al., 2016), sendo estas características nutricionais e funcionais o que atraiu grande interesse à indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos. Também são uma boa fonte de fitoesteróis (1.930 mg/g de óleo), esqualeno (1.378 mg/g de óleo), tocoferóis (199 mg/g de óleo) (RYAN et al., 2006) e fenólicos (112 a 331 mg EAG/100g de amêndoa) (JOHN; SHAHIDI, 2010), todos atribuídos a vários benefícios potenciais à saúde.

Na atualidade as indústrias dedicadas à produção de óleo da castanha do Brasil utilizam a prensagem mecânica (*expeller*) para obtenção deste produto, ainda esta técnica têm desvantagens com relação à qualidade e o baixo rendimento do óleo. Os processos industriais de obtenção de óleos de sementes oleaginosas empregam, normalmente o hexano como solvente, mas algumas pesquisas têm testado solventes seguros para a saúde como o etanol, por exemplo (FREITAS et al., 2007). Outras técnicas de extração podem ser aproveitadas para obter óleo a partir de sementes oleaginosas, como por exemplo a extração com líquido pressurizado (PLE) usando solventes alternativos como os álcoois isopropílico (IPA) e etílico (EtOH), por exemplo.

A extração com líquido pressurizado (PLE) é uma técnica alternativa atraente que usa solventes a temperaturas acima do seu ponto de ebulição e sob altas pressões para

augmentar a eficiência do processo de extração (RICHTER et al., 1996), permitindo assim uma extração rápida e o um consumo de solvente reduzido quando comparado com as técnicas de extração tradicionais. Estas características são proporcionadas pelo aumento na taxa de transferência de massa, o aumento na solubilidade dos solutos e a diminuição na viscosidade do solvente e tensão superficial que ocorrem nestas condições de PLE. Estas últimas propriedades facilitam ainda mais a taxa de extração, considerando que o solvente penetrará mais facilmente na matriz, atingindo áreas menos superficiais e aumentando o contato, melhorando assim a transferência de massa do soluto para fase solvente (RICHTER et al., 1996; KAUFMANN; CHRISTEN, 2002; OLIVEIRA et al., 2014; HERRERO et al., 2015). Devido a estas características e aos seus requisitos instrumentais relativamente simples, a PLE vem ganhando popularidade nos últimos anos como técnica de extração para o isolamento de compostos funcionais (como ácidos graxos essenciais e metabólitos secundários) a partir de fontes naturais (Plantas, algas marinhas, microalgas e subprodutos alimentares) empregando álcool etílico como solvente (HU et al., 2011; POURALINAZAR; YUNUS; ZAHEDI, 2012; JABLONSKÝ et al., 2015; COLIVET; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016; CASTRO-PUYANA et al., 2016; BELANDRIA et al., 2016; CONTE et al., 2016; GILBERT-LÓPEZ et al., 2017).

Estudos sobre o emprego de solventes alternativos como o etanol (EtOH) e o isopropanol (IPA) na extração de óleo tem ocorrido há duas décadas (HRON; KOLTUN; GRACI, 1982; JHONSON; LUSAS, 1983) e nos últimos anos o interesse pelos solventes alternativos vem crescendo consideravelmente (TIR; DUTTA; BADJAH-HADJ-AHMED, 2012; LI et al., 2014; BAÜMLER; CARRÍN; CARELLI, 2016; NAVARRO et al., 2016) devido à crescente preocupação ambiental em relação ao uso extensivo de hexano no processo de extração de óleo (HRON et al., 1994; ZHANG; RHEE; KOSEOGLU, 2002). Além disso, o EtOH e o IPA são solventes GRAS (Generally recognized as safe) (FDA, 2003, 2016). O hexano é o solvente mais empregado na extração de óleo a partir de matrizes oleaginosas, conhecido industrialmente como hexana (mistura de isômeros de hexano). No entanto, o hexano é extremamente inflamável e não renovável, além disso, tem toxicidade aguda e crônica por inalação, ingestão e contato com os olhos ou pele (WYPYCH, 2001; TIR; DUTTA; BADJAH-HADJ-AHMED, 2012).

A metodologia de superfície de resposta (Response Surface Analysis - RSA) é muito utilizada para estudos de otimização de processos (BAS; BOYACI, 2007), a fim de avaliar o efeito de múltiplos fatores e suas interações sobre as respostas dependentes. Especificamente para novos processos de extração, a RSA tem sido de grande utilidade quando pouco ou quase nada se conhece a respeito da influência das variáveis estudadas no rendimento e composição dos extratos.

Neste contexto, o objetivo do estudo foi otimizar o processo de PLE de óleo da castanha do Brasil utilizando os álcoois IPA e EtOH como solventes. Primeiramente estudou-se a eficiência de extração dos álcoois IPA e EtOH em termos do rendimento da extração de óleo (X_0) de óleo e perfil de ácidos graxos (FA). Na segunda etapa investigou-se a influência do tempo estático, razão entre o volume do solvente e a massa da amêndoa triturada e temperatura (T) sobre o X_0 de óleo, ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de fenólicos totais (TPC). O X_0 e a caracterização do óleo foram avaliados pela metodologia de análise de superfície de resposta (SRA) empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR).

2. Material e Métodos

2.1. Matéria-prima e reagentes

A matéria-prima utilizada foram as amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) de qualidade de exportação da safra 2016, adquiridas da Indústria Comércio Importações e Exportações de Cereais RR Ltda. proveniente de Humaitá, estado de Amazonas, Brasil (07° 30' 22" S e 63° 01' 15" W). As amostras foram recebidas em sacos de 20 kg embaladas à vácuo.

No Laboratório de Tecnologia à Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN), as amêndoas foram trituradas usando um liquidificador doméstico (Walita, São Paulo, BR) e as amêndoas trituradas foram utilizadas no processo de extração.

Os solventes utilizados na PLE foram os álcoois IPA e EtOH (LABSYNTH, São Paulo, BR) com pureza de 99,5 % e 99,9 %, respectivamente. O hexano e o éter de petróleo (LABSYNTH, São Paulo, BR) com pureza de 98,5 % e 98,9 %, respectivamente foram usados para a extração via percolação a pressão atmosférica utilizando Soxhlet. Todos os outros solventes e reagentes usados foram de grau analítico.

A amêndoa triturada foi caracterizada pela classificação de tamanho em um sistema vibratório vertical com seis peneiras da série padrão Tyler (Bertel, Caieiras, Brasil) com aberturas sequenciais de 10, 14, 20, 28, 35, 48 e 65 mesh e o diâmetro médio de partícula foi calculada de acordo ao método ANSI/ASAE S319.4 (ASABE, 2012).

A densidade real (ρ_r) da amêndoa triturada foi medida em picnômetro de gás hélio (Quantachrome Ultrapyc 1200e, FL, USA) pela Central Analítica-IQ/UNICAMP. A densidade aparente foi determinada empiricamente pela relação entre massa da amêndoa triturada acondicionado na célula do extrator (34 cm³). Em seguida, calculou-se a porosidade do extrator de leito fixo (ϵ) utilizando a Equação (1).

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

As amêndoas trituradas foram submetidas às análises de teor de umidade de acordo com o método 931.04 (AOAC, 2005). A determinação dos lipídios totais foi realizada segundo o método 963.15 (AOAC, 2005). As proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl (método 970.22), utilizando fator de 5,3 (VENKATACHALAM; SATHE, 2006) para conversão do nitrogênio total em proteína (AOAC, 2005). A determinação de cinzas foi realizada de acordo ao método 972.15 (AOAC, 2005) e os carboidratos totais foram determinados por diferença. As análises descritas nesta seção foram realizadas em triplicata.

2.2. Extração por percolação usando Soxhlet

Os lipídios totais foram também extraídos por percolação utilizando Soxhlet e hexano como solvente (AOCS, 2009; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017). Em cada extração, foram colocados aproximadamente 10 g de amêndoa triturada no cartucho e inseridos no extrator Soxhlet. Hexano (200 mL) foi adicionado e aqueceu-se o sistema até à ebulição (69 °C). O refluxo foi mantido durante 6 h e, em seguida, o solvente foi evaporado sob vácuo (50 °C), o extrato restante foi seco até o peso constante e armazenado (-20 °C) para análises posterior. As extrações foram realizados em triplicata.

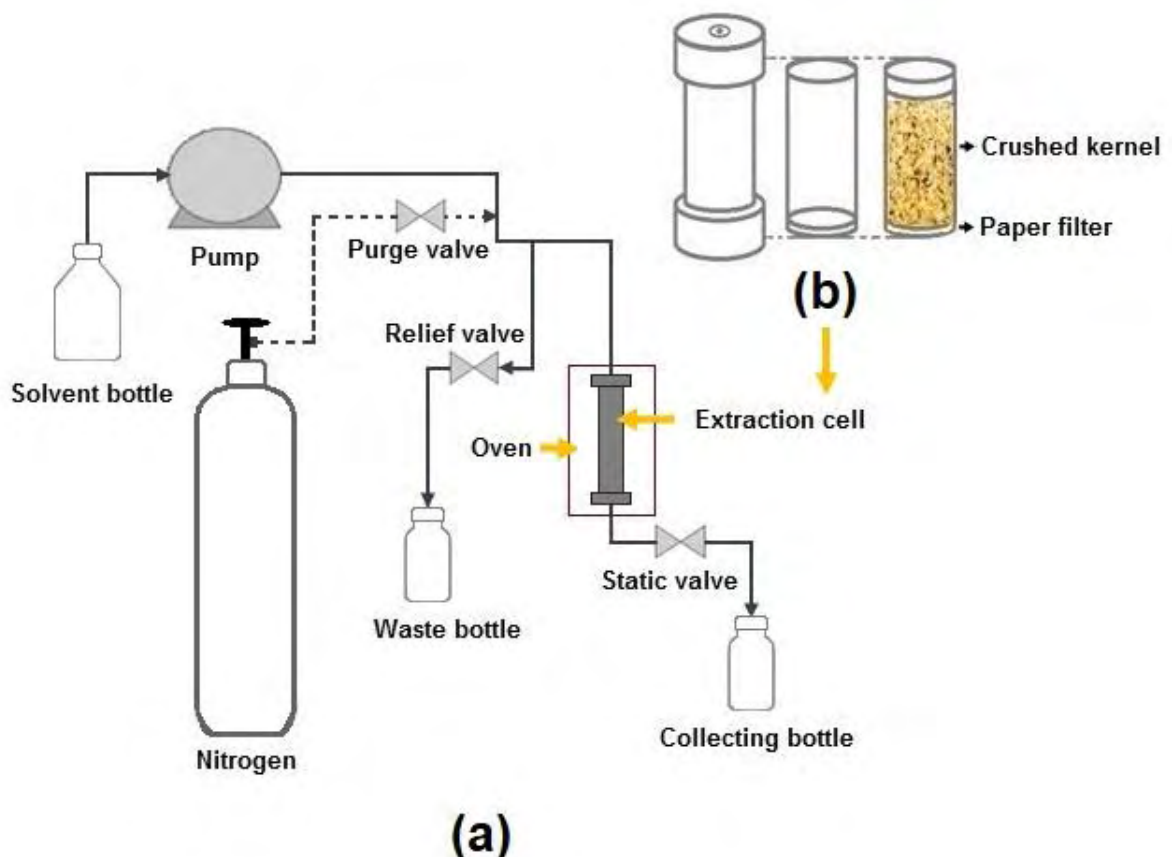
2.3. Extração com líquido pressurizado (PLE)

O processo de PLE foi realizado em um sistema em escala laboratorial Dionex ASE 150 (Thermo Fisher Scientific, Newington, EUA) (Figura 11a) localizado em LTAPPN, ZEA, FZEA, USP. Aproximadamente 10 g de amêndoa triturada foi colocado em uma célula de extração (34 cm³, dimensões de 2,9 cm de diâmetro interno e 5,19 cm de altura interna) previamente fechada em uma de suas extremidade (saída) e acondicionado com um filtro de papel (Figura 11b), e em seguida os parâmetros do processo (tempo estático (St), temperatura (T), número de batelada ou ciclo (C), volume de solvente (Vs) e tempo de purga (tP) foram programados no painel de controle do sistema Dionex ASE 150.

O processo intermitentes de extração constou de duas fases, a primeira fase iniciou-se com o aquecimento do forno até atingir a temperatura de operação escolhida (Tabela 3), em seguida a célula de extração acondicionada (Figura 1b) foi colocada no forno e iniciou-se o aumento da pressão (até 10,35 MPa) pelos efeitos do preenchimento da célula de extração

com o solvente e o aquecimento da célula até atingir o equilíbrio da T de operação escolhida. Após atingir o equilíbrio da T e da P (10,35 MPa) na célula de extração, se iniciou a segunda fase do processo intermitente, no qual ocorreu a primeira coleta ou primeira batelada ou ciclo (C) no St estabelecido (Tabela 3). Ou seja, após este tempo de contato entre a amêndoa triturada e o solvente o extrato foi coletado, uma nova corrente de solvente puro entrou na célula de extração sendo o extrato coletado novamente após o St programado, mantendo sequencialmente as condições do processo até se completar o número de bateladas (C fixo em 3). Ao final o gás N_2 foi utilizado para remover o extrato remanescente na célula com um tempo de purga fixo ($t_P = 100$ s). Então o sistema foi despressurizado. Após o término da extração o solvente da miscela (óleo e solvente) foi evaporado no evaporador rotativo (MARCONI, MA-120, Piracicaba, BR) a 50 °C, o óleo recuperado foi seco até o peso constante e armazenado (-20 °C) para análises posterior.

Figura 11 - Sistema esquemático de extração com líquido pressurizado (a) e a célula de extração condicionada (b)



Fonte: Própria autoria.

O rendimento da extração de óleo (X_0) foi calculado pela razão entre massa total do óleo (m_e) e massa da amêndoa triturada (fm_{db}) em base seca, de acordo com a Equação (2).

$$X_0 = \frac{m_e}{fm_{db}} \times 100 \quad (2)$$

Para determinar o efeito sobre a eficiência de extração no processo PLE dois solventes (IPA e EtOH) foram utilizados. Os parâmetros tais como a St (9 min), T (60 °C), P (10,35 MPa), C (3), tP (100 s) e Vs (96% do volume da célula) ou razão (S/F = 5,6) entre o volume do solvente (S, mL) e a massa da amêndoa triturada (F, g) foram mantidos constantes no processo de PLE quando se utilizou o IPA ou EtOH como solvente. Estes parâmetros foram definidos segundo testes preliminares e estudo (OLIVEIRA et al., 2014; COLIVET; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016) de nosso grupo de pesquisa.

A otimização do processo de PLE foi feita para o solvente de maior eficiência de extração utilizando dois delineamentos composto central rotacional (DCCR-1 e DCCR-2), cujos níveis das variáveis independentes são apresentados na Tabela 3. Para o DCCR-1 os parâmetros do processo como a T (60 °C), P (10,35 MP), C (3) e tP (100 s) foram mantidos constantes, e a influência do tempo estático (St) de 2 a 10 min e o volume de solvente ou a relação entre o solvente e massa da amêndoa triturada (S/F) variou de 4,5 a 5,8. As variáveis respostas foram o rendimento da extração de óleo (X_0), o conteúdo de fenólicos totais (TPC) e os ácidos graxos livres (FFA). E no DCCR-2 a influência das variáveis independentes (St, de 2 a 10 min) e temperatura (T, de 60 a 90 °C) também foram estudadas com relação às mesmas respostas (X_0 , TPC, FFA) e no perfil de ácidos graxos (FA). Neste DCCR-2 foram mantidas constantes as seguintes variáveis de processo S/F (5,8), P (10,35 MP), C (3) e tP (100 s).

Tabela 3 - Níveis das variáveis independentes de dois delineamentos composto central rotacional (DCCR) utilizados para otimizar o processo de PLE do óleo de amêndoa de castanha do Brasil.

Parâmetros do processo	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
Variáveis independentes					
		DCCR - 1			
St (min)	2	3*	6	9*	10
S/F (mL/g)	4.5	4.7*	5.1	5.6*	5.8
		DCCR - 2			
St (min)	2	3*	6	9*	10
T (°C)	60	64*	75	86*	90

* Valores ajustados para o equipamento.

2.4. Caracterização do extrato

2.4.1. Métodos de referência

Os óleos obtidos de amêndoa triturada da castanha do Brasil por PLE foram avaliados em termos de seu perfil de ácidos graxos (FA) e ácidos graxos livres (FFA). Determinou-se o valor de ácidos graxos livres (FFA), utilizando o método oficial AOCS Cd 3d-63 (AOCS, 2009).

Os óleos foram preparados em forma de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) de acordo com o método 991.39 (AOAC, 2005). Os FAME foram analisados por cromatografia gasosa (CG) acoplado ao espectro de massas para determinar o perfil dos FA, de acordo com uma forma adaptada por Cornelio-Santiago et al., (2017) do método 996.06 (AOAC, 2005).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por comparação com o espectro de massa usando o software GC/MS solutions v. 2.5 que tem como base de dados a livreria de NIST 11 e NIST 11s. A quantificação de ácidos graxos (% massa) foram realizados usando como padrão externo o éster metílico de ácido mirístico e os resultados foram apresentados em equivalentes a este éster (Figura A1).

2.4.2. Conteúdo de fenólicos totais (TPC)

O ensaio da capacidade de redução de Folin-Ciocalteu (F-C) é um dos métodos mais comuns na investigação da ciência dos alimentos e nutrição, e da indústria para avaliar a capacidade de reação de redução do molibdênio de Mo^{6+} a Mo^{5+} (complexo azul) por compostos fitoquímicos presentes nas amostras, em um meio alcalino. Geralmente o tampão carbonato de sódio é usado para fornecer um pH alcalino ao meio e favorecer a completa reação de redução, após 120 min (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

A extração metanólica dos compostos fitoquímicos a partir dos extratos obtidos por PLE foram realizados empregando a metodologia descrita por Montedoro et al. (1992) com adaptação. O extrato (0,5 g) foi misturado com metanol (0,5 mL), agitado com Vortex a 6000 rpm por 20 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min e o sobrenadante recuperado. Este procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante recuperado foi misturado com água destilada (0,25 mL), agitado com Vortex 6000 rpm por 2 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min e o sobrenadante recuperado.

O conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos extratos foram avaliados empregando o método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós, (1999) com adaptação para um volume final de reação de 3 mL. Nesta análise, 0,3 mL de extrato metanólico foi misturado com 1,364 mL de água destilada em um tubo de ensaio de 10 mL, seguido pela adição de 0,136 mL de reagente F-C. Esta solução ficou em repouso durante 8 min à

temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C). Em seguida foi adicionado 1,2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. Após os 120 min de reação à temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C), a absorbância foi lida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10S, EUA). A reação do padrão foi preparada da mesma forma usando 0,3 mL de metanol e água destilada (v/v, 80/20) em substituição do extrato metanólico. A TPC foi calculado usando a curva padrão de ácido gálico, nas concentrações de solução padrão de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L (Figura A2).

2.4.3. Quantificação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras foram preparadas como base na metodologia descrito por Mazalli, et al. (2003) e Ortíz et al. (2006). Aproximadamente 0,25 g de óleo foi saponificada com 20 mL da solução etanólica de KOH à 15% a temperatura ambiente por 12 h, posteriormente adicionou-se 10 mL de solução saturada de NaCl e a extração da fase orgânica foram realizadas duas vezes usando 5 mL de n-hexano após a agitação com vortex por 5 minutos.

A quantificação do β -sitosterol foi realizado com base na metodologia descrita por Mazalli, et al. (2003) usando um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de arranjo de diodo (SPD –M20A), uma coluna analítica C18 (100 mm \times 4.6 mm, 4.0 μ m de tamanho de partícula) (Chromolith, Merck, Darmstadt, Alemanha), temperatura do forno de 40 °C, fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15), vazão 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 μ L, e os cromatogramas foram obtidos na leitura de 208 nm. O β -sitosterol foi identificado através da comparação do tempo de retenção de cada amostra com o padrão de β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e quantificação através das áreas dos picos correspondentes, por padronização externa e os resultados foram expressos em mg por 100 g de óleo (Figura A3).

2.5. Análise estatística

Os resultados experimentais foram analisados utilizando o programa Statistica (StatSoft, Inc., v.12.0, EUA) para identificar os efeitos das variáveis de processo nas respostas de interesse. As análises estatísticas dos modelos de primeira e segunda ordem foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Esta análise inclui o teste F e o coeficiente de determinação (R^2), que mede a qualidade de ajuste do modelo de regressão. Os efeitos das variáveis foram exibidos nas superfícies de resposta e nos gráficos de contorno. Para testar a capacidade preditiva dos modelos estatísticos, o desvio médio absoluto (AAD) foi calculado usando a Equação 3.

$$AAD(\%) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (|Y_{i,exp} - Y_{i,pred}| / Y_{i,exp}) \times 100 \quad (3)$$

onde n é o número total de dados experimentais, pred é o valor previsto do modelo e exp é o valor experimental determinado em cada condição do processo de extração (i).

3. Resultados e Discussão

3.1. Matéria-prima

A composição das castanhas do Brasil usadas nestes experimentos são apresentadas na Tabela 4. A matéria-prima apresentou baixo teor de umidade (2,32 % ± 0,13). Nos processos de extração, baixos teores de umidade são importantes para facilitar a penetração do solvente na matriz vegetal, que pode ser dificultada pela presença de água, principalmente quando o solvente tem características polar (hidroxila) e apolar (etil) como o álcool EtOH, ou seja, a capacidade do álcool em uma mistura com água para dissolver e extrair o óleo é mais limitada quanto maior é a fração de água, em função das forças das interações moleculares da água por ligações de hidrogênio. Além disso, a água presente na matriz vegetal compete com o soluto para interagir com o solvente, diminuindo o rendimento do processo de extração (DOS SANTOS et al., 2015). O resultado de teor de umidade da presente pesquisa é coerente com o conteúdo de umidade reportado por outros autores (FERREIRA et al., 2006; NETO et al., 2009; USDA Nutrient Database 2016: USNDB). Vale ressaltar que, tanto neste trabalho, como nos referenciado, as amêndoas foram secas.

Tabela 4 - Composição da amêndoa de castanha do Brasil e propriedades físicas do leito fixo.

Parâmetros	Resultados
Umidade (%)	2,32 ± 0,13
Lipídios totais* (%)	66,68 ± 0,01
Proteína* (%)	15,15 ± 0,07
Cinzas* (%)	3,93 ± 0,01
Carboidratos totais* (%)	14,24 ± 0,08
Diâmetro médio das partículas (mm)	1,09 ± 0,01
Densidade real (g/cm ³)	1,01 ± 0,01
Densidade aparente (g/cm ³)	0,36 ± 0,01
Porosidade	0,64

Dados expressos como média ± desvio padrão; * Dados expressos em base seca.

O conteúdo de lipídios totais foram de 66,68 % (± 0,01), utilizando éter de petróleo como descrito na metodologia. Estudos sobre castanha do Brasil têm reportando conteúdo de lipídios, variando de 65 a 68 % (FERREIRA et al., 2006; NETO et al., 2009; USDA Nutrient Database 2016: USNDB), semelhantes aos obtidos no presente estudo. O teor de

proteína foi de 15,15% ($\pm 0,07$) e o teor de cinzas foi de 3,93 ($\pm 0,01$). Estes valores são consistentes com vários outros resultados da literatura científica (FERREIRA et al., 2006; VENKATACHALAM; SATHE, 2006; NETO et al., 2009; USDA Nutrient Database 2016: USNDB).

3.2. Rendimento da extração de óleo

3.2.1. Seleção do solvente

Os álcoois isopropílico (IPA) e etílico (EtOH) foram examinados quanto ao efeito sobre a eficiência de extração no processo de extração com líquido pressurizado (PLE). O IPA recuperou uma quantidade significativamente maior de óleo ($> 22,94\%$) em comparação com o EtOH e quando comparado com a quantidade de óleo obtida por percolação com hexano via Soxhlet ($69,30\% \pm 0,46$) foi $< 14,68\%$.

O rendimento da extração de óleo (X_0) calculado conforme a equação (2), obtido com o IPA ($54,62 \pm 0,16\%$) foi maior do que o X_0 de óleo obtido com o EtOH ($31,68 \pm 0,23\%$) para as mesmas condições de PLE, utilizando a mesma quantidade de solvente. O EtOH apresentou um menor X_0 de óleo devido à sua solvatação ineficiente quando comparada à do IPA para as mesmas condições de extração. O óleo obtido com EtOH apresentou maior turbidez ($1,48 \pm 0,03\%$, massa) que quando obtido com o IPA ($0,026 \pm 0,001\%$, massa). Estes extratos obtidos com EtOH pressurizado apresentou uma quantidade significativa de material precipitado na miscela (óleo + solvente) após a evaporação do solvente e armazenamento a $25\text{ }^\circ\text{C}$, indicando que outros compostos foram extraídos juntamente com o óleo. O EtOH é menos seletivo, além dos triacilgliceróis extrai outros compostos de maior polaridade durante o processo de extração (MOREAU; POWELLA; SINGH, 2003) como polifenóis (SINEIRO et al., 1996), fosfolípidios e açúcares solúveis (BAÜMLER; CARRÍN; CARELLI, 2016). Estes resultados indicam que a polaridade dos solventes influencia a sua seletividade. Quando empregou-se o IPA, a eficiência da extração foi maior, e embora também seja um solvente polar, identificou-se pouco ($0,026 \pm 0,001\%$, massa) material precipitado quando o óleo foi removido do extrato. O IPA foi escolhido como solvente a ser utilizado na otimização da PLE de óleo da castanha do Brasil devido a esta sua boa capacidade extrativa e maior seletividade que o EtOH.

3.2.2. Efeitos das variáveis do processo na extração com líquido pressurizado (PLE)

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados obtidos para as diferentes condições de extração, os níveis das variáveis, os valores experimentais, os previstos pelo modelo para o X_0 e seus desvios relativos para o DCCR-1 e DCCR-2, respectivamente.

De acordo com os parâmetros da Tabela 5, o X_0 de óleo variou de 48,7(%) a 54,66% e os maiores valores foram obtidos quando as extrações foram realizadas nas condições dos ensaios 4 (54,62%) e 9 (54,66%). Ao avaliar-se a influência das variáveis do processo, o tempo estático (St) em cada ciclo ou batelada e a razão entre o solvente e a amêndoa triturada (S/F) no X_0 de óleo obtido, constatou-se, na análise estatística dos efeitos principais (ensaios de 1 a 7, Tabela 5) que a S/F e a interação entre St \times S/F não influenciaram significativamente no X_0 , mas St influenciou no X_0 do óleo ($p < 0,05$) como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 12a). Segundo a Tabela 7, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 5 % e os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para avaliar o modelo de primeira ordem e prever o X_0 do óleo extraído. Assim o teste F ($F_{\text{calc}} = 12,84 > F_{\text{tab}} = 9,12$) para a regressão foi significativo e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,93$) (Tabela 7). Estes resultados mostram que o modelo de primeira ordem (Equação 4) se ajustou bem aos dados experimentais do X_0 em função de St. Foi possível verificar através da curva de contorno (Figura 12b) que para o St a faixa ótima variou de 6 a 9 minutos para qualquer volume de solvente (S/F) utilizado no processo, tanto que esta variável não apresentou efeito sobre o X_0 . Ainda assim, nesta curva (Figura 12b) nota-se maiores valores de X_0 para uma razão de S/F entre 5,1 a 5,6.

Tabela 5 - Matriz DCCR -1 com os resultados para X_0 , TPC e FFA de óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido com álcool IPA pressurizado.

Ensaio	St (min)	S/F(mL/g)	X_0 (% , massa)			óleo recuperado	TPC (mg EAG/kg óleo)	FFA (%)
	Real (C) variáveis	Exp ^a	Pred	AAD (%)	(%)	Exp	Exp	
1	3 (-1)	4,7 (-1)	48,70	49,82	2,29	73,04	31,57	0,25
2	9 (1)	4,7 (-1)	53,38	54,44	1,99	80,05	36,43	0,28
3	3 (-1)	5,6 (1)	50,04	49,82	0,45	75,05	34,30	0,25
4	9 (1)	5,6 (1)	54,62	54,44	0,33	81,92	34,40	0,28
5*	6 (0)	5,1 (0)	52,73	52,13	1,14	79,08	29,05	0,25
6*	6 (0)	5,1 (0)	52,70	52,13	1,08	79,03	29,10	0,25
7*	6 (0)	5,1 (0)	52,70	52,13	1,09	79,04	28,91	0,25
8	2 (-1,41)	5,1 (0)	52,44	48,87	6,80	78,64	37,66	0,25
9	10 (1,41)	5,1 (0)	54,66	55,39	1,34	81,97	34,39	0,28
10	6 (0)	4,5 (-1,41)	51,67	52,13	0,89	77,49	32,47	0,25
11	6 (0)	5,8 (1,41)	52,74	52,13	1,15	79,09	38,47	0,25

*Ponto central; C: codificado; ^abase seca; St: tempo estático; S/F: relação solvente e alimentação; Exp: valores experimentais; Pred: valores previstos por modelo; AAD: desvio médio absoluto; TPC: conteúdo de fenólicos totais; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA: ácido graxo livre expresso em percentagem de ácido oleico.

Na análise estatística das variáveis do processo (St e S/F) para os 11 ensaios verificou-se na ANOVA que o modelo de segunda ordem não foi significativo ($F_{\text{calc}} = 3,09 < F_{\text{tab}} = 5,05$) para o X_0 , comportamento confirmado também pelo baixo valor de R^2 (0,75). Com os resultados obtidos via DCCR-1 foi possível identificar as faixas ótimas para propor o novo planejamento experimental DCCR-2 (Tabela 3). Os resultados apresentados na Tabela 6 mostraram que o X_0 de óleo variou de 52,44 a 60,40% e o maior X_0 de óleo foi obtido quando a extração foi realizada na condição do ensaio 4 (60,40%). Na análise estatística dos efeitos principais (ensaios de 1 a 7, Tabela 6), constatou-se que a interação entre St x T não influenciou significativamente no X_0 , mas ambos o tempo estático (St) e a temperatura (T) influenciaram significativamente no X_0 de óleo ($p < 0,05$), como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 12c). Os resultados foram submetidos a ANOVA e foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 5 % (Tabela 7) para avaliar os modelos de primeira e segunda ordem para a predição de X_0 em função das variáveis estudadas. Embora, no modelo de segunda ordem (Equação 5), somente a variável St tenha apresentado significância (Tabela 7), este apresentou $F_{\text{calc}} = 63,12$, maior que o $F_{\text{tab}} = 5,05$, portanto considerado preditivo. Os valores do X_0 calculados por este modelo apresentaram valores baixos de desvio médio absoluto (ADD) com nível de confiança de 95%, além de um coeficiente de determinação (R^2) de 0,98, que pode ser considerado adequado para sistemas de extração de óleo (DE OLIVEIRA, et al., 2014). O comportamento observado indica que o X_0 de óleo aumentou com o aumento do St e a T dentro dos intervalos avaliados, o que pode ser visualizado na superfície de resposta descritas na Figura 12d. Os efeitos de aumento de St e da T levam a uma maior solubilidade do óleo pelo IPA principalmente devido a um incremento da T que pode estar ocasionando uma diminuição da viscosidade do óleo e aumentando a difusividade do solvente facilitando assim a difusão do óleo pela matriz.

$$X_0 = 52,13 + 2,31 (\text{St}) \quad (4)$$

$$X_0 = 56,76 + 1,81 (\text{St}) + 1,94 (\text{T}) + 0,46(\text{St}^2) \quad (5)$$

Tabela 6 - Matriz DCCR-2 com os resultados para X_0 , TPC, FFA e β -Sitosterol de óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido com álcool IPA pressurizado.

Ensaio	St (min)	T (°C)	X_0 (% massa)			Óleo recuperado (%)	TPC (mg EAG/kg óleo) Exp	FFA (%) Exp	β - Sitosterol ^b (mg/100g óleo) Exp	β - Sitosterol ^b (mg/100g amêndoa) Exp ^a
	Real (C)	variáveis	Exp ^a	Pred	AAD (%)					
1	3 (-1)	64 (-1)	52,44	52,55	0,21	78,64	61,75	0,25	40,32 ± 0,50	21,14 ± 0,26
2	9 (1)	64 (-1)	56,17	56,17	0,01	84,24	69,86	0,25	28,17 ± 0,96	15,82 ± 0,54
3	3 (-1)	86 (1)	56,10	56,43	0,58	84,14	53,10	0,28	32,53 ± 0,33	18,25 ± 0,19
4	9 (1)	86 (1)	60,40	60,05	0,58	90,58	46,67	0,28	27,06 ± 0,40	16,35 ± 0,24
5*	6 (0)	75 (0)	56,68	56,76	0,13	85,01	39,82	0,25	25,03 ± 0,19	14,18 ± 0,11
6*	6 (0)	75 (0)	56,84	56,76	0,13	85,24	39,58	0,25	25,51 ± 0,44	14,50 ± 0,25
7*	6 (0)	75 (0)	56,76	56,76	0,01	85,12	39,74	0,25	25,19 ± 0,50	14,30 ± 0,28
8	2 (-1,41)	75 (0)	53,31	53,29	0,03	79,95	85,09	0,28	15,18 ± 0,13	8,09 ± 0,07
9	10 (1,41)	75 (0)	57,83	58,40	0,98	86,72	91,62	0,31	24,35 ± 0,12	14,08 ± 0,07
10	6 (0)	60 (-1,41)	53,25	54,02	1,45	79,86	81,47	0,25	10,76 ± 0,18	5,73 ± 0,10
11	6 (0)	90 (1,41)	58,62	59,50	1,50	87,91	108,41	0,31	9,51 ± 0,13	5,58 ± 0,08

*Ponto central; C: codificado; ^abase seca; ^bresultado de três injeções; St: tempo estático; T: temperatura; Exp: valores experimentais; Pred: valores previstos por modelo; AAD: desvio médio absoluto; TPC: conteúdo de fenólicos totais; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA: ácido graxo livre expresso em percentagem de ácido oleico.

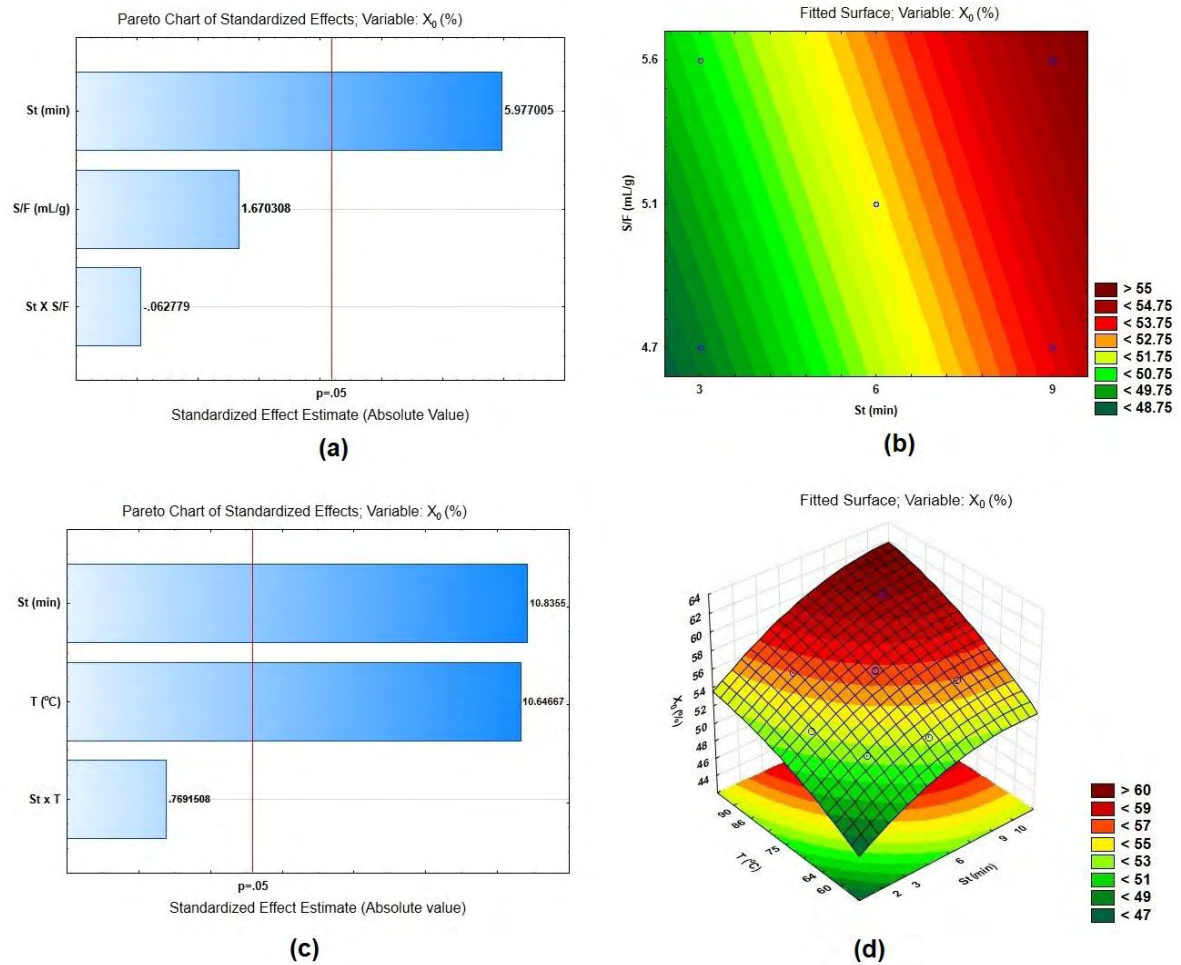
O aumento do St leva a um maior tempo de contato entre o solvente e o óleo disponível na superfície da matriz sólida o que facilita a maior solubilidade do óleo, assim os dois efeitos em conjunto favorecem uma maior extração de óleo e, conseqüentemente um maior X_0 .

Neste estudo de otimização do processo de extração de óleo via PLE, vale ressaltar que a variável que realmente comandou o processo foi o tempo de contato entre o solvente e a matriz no extrator (St). A importância desta variável foi constatada nos dois planejamentos experimentais aplicados (DCCR-1 e DCCR-2). Considerando os processos convencionais de extração de óleo, o emprego desta tecnologia a alta pressão em um processo semi-contínuo empregando ciclos de solventes em contato com a matriz, pode representar uma redução tanto no consumo de solvente quanto no consumo de energia, visto que temperaturas mais amenas poderão ser empregadas no processo.

Na obtenção de óleo de castanha do Brasil utilizando EtOH como solvente, Freitas et al. (2007), em um extrator isotérmico (65°C) que opera em batelada com agitador (30 rpm), alcançou 75% de recuperação de óleo da castanha do Brasil. Na comparação deste resultado com este estudo, constata-se que a PLE apresenta maior eficiência, 90,58% de recuperação de óleo. Além disso, neste processo empregou-se menor tempo (27 min) de extração.

Ensaio complementares foram realizados na condição otimizada para verificar a influência do aumento do volume do solvente ou da razão S/F no X_0 de óleo. O aumento da razão S/F poderia aumentar a difusão pelo aumento da disponibilidade de solvente e conseqüentemente seu poder de solvatação. Considerando o óleo solubilizado pelo solvente, ao aumentar a sua disponibilidade, uma diminuição na viscosidade também poderia influenciar o gradiente de migração do óleo da matriz para a superfície o que também resultaria em maiores rendimentos de extração (Freitas et al., 2013). Mas neste trabalho, não foi observado um aumento considerável do X_0 de óleo 60,40% ($\pm 0,31$), 61,41% ($\pm 0,18$) e 61,82% ($\pm 0,10$) quando aumentou-se a razão S/F de 5,8, 7,5 e 15,5, respectivamente na condição otimizada de 86°C , 10,35 MPa e 3 ciclos com 9 min.

Figura 12 - Diagrama de Pareto (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência de St e S/F em X_0 (%); Diagrama de Pareto (c) e superfície de resposta (d) mostrando a influência de St e T em X_0 (%).



Fonte: Própria autoria.

3.3. Caracterização do extrato

3.3.1. Efeitos das variáveis do processo nos ácidos graxos livres

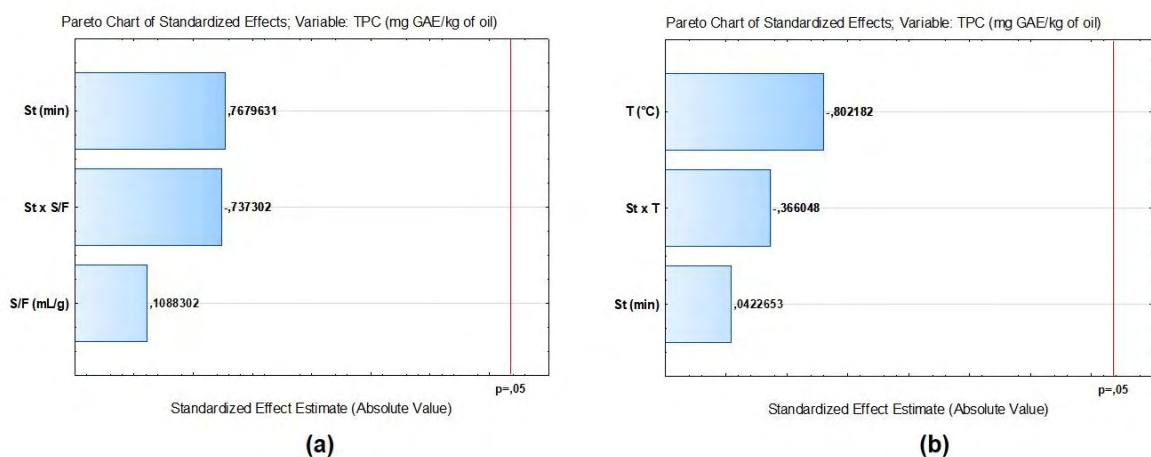
As Tabelas 5 e 6 mostram os valores de ácidos graxos livres (%), variando de 0,25 a 0,28 e de 0,25 a 0,31 para o DCCR-1 e DCCR-2, respectivamente. A análise estatística aplicada para avaliar o efeito das variáveis do processo (St e S/F) na quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo (ensaios 1 a 7, Tabela 5) mostrou que St, S/F e a interação entre eles não influenciaram significativamente os ácidos graxos livres ($p > 0,05$) presentes. Da mesma forma constatou-se que os efeitos principais das variáveis St e T também não influenciaram significativamente o teor de ácidos graxos livres ($p > 0,05$) presentes no óleo obtido. Considerando o solvente e as diferentes condições de processo empregadas, o St, a razão S/F e a T não tiveram influência direta na porcentagem de ácidos graxos livres,

provavelmente devido ao curto St, não dando tempo da T empregada atuar de uma forma desfavorável. Além disso, o sistema PLE fica livre de oxigênio. O que dá para afirmar que a porcentagem de ácidos graxos apresentados nos extratos obtidos (Tabelas 5 e 6), provavelmente representam aos ácidos graxos livres provenientes das amêndoas trituradas ou gerados no pré-tratamento das mesmas. Os valores de porcentagem de ácidos graxos livres é um dos parâmetros mais importantes de controle de qualidade em óleos. Os valores de FFA nos extratos de castanha obtidos nesta pesquisa estão com valores bem inferiores e de acordo com os padrões fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os óleos prensados a frio e não refinados, para os quais o valor máximo de ácidos graxos livres é 4 mg KOH/g (2,01%) (Brasil, 2005).

3.3.2. Efeitos das variáveis do processo no conteúdo de fenólicos totais (TPC)

Os resultados da TPC (Tabela 5) mostraram uma variação de 29,10 a 38,47 mg EAG/kg de óleo. Na análise dos efeitos principais das variáveis St e S/F nesta resposta, a análise estatística dos ensaios de 1 a 7 mostrou que o St, S/F e a interação entre eles também não influenciaram significativamente na TPC, assim como é mostrado no diagrama de Pareto (Figura 13a). A TPC variou de 25,74 a 108,41 mg EAG/kg de óleo quando o estudo de processo foi baseado na variação das variáveis St e T. A partir da análise estatísticas dos efeitos principais (ensaios de 1 a 7, Tabela 6) constatou-se, que embora tenha ocorrido maior extração de compostos fenólicos quando alta temperatura foi empregada (90 °C) as variáveis não mostraram influência significativa nesta resposta, como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 13b).

Figura 13 - Diagrama de Pareto (a) mostrando a influência de St e S/F em TPC (mg EAG/kg de óleo); Diagrama de Pareto (b) mostrando a influência de St e T em em TPC (mg EAG/kg de óleo).



Fonte: Própria autoria.

Os solventes polares em comparação com apolares são os que possuem maior eficiência na extração de compostos fenólicos (HAYOUNI et al., 2007). Assim, já era esperado que o IPA, com constante dielétrica de 18,3 a 20 °C, não seria muito mais eficiente na extração de TPC quando comparado como a água, o metanol ou acetona (SMALLWOOD, 1997). Vale ressaltar que a constante dielétrica diminui com o aumento da T e P o que torna o IPA menos polar. De uma forma geral, na maioria dos óleos vegetais não se espera altas concentrações de compostos fenólicos, mas no óleo de castanha do Brasil obtidos usando IPA pressurizado foi possível obter valores de TPC superiores às aquelas obtidas por Siger, Nogala-Kalucka e Lampart-Szczapa (2008) em óleo prensado de sementes de abóbora (24,6 mg EAC/kg de óleo), cânhamo (24,5 mg EAC/kg de óleo), soja (14,8 mg EAC/kg de óleo), farelo de arroz (14,4 mg EAC/kg de óleo), colza (13,1 mg EAC/kg de óleo), milho (12,6 mg EAC/kg de óleo), girassol (12,0 mg EAC/kg de óleo), linho (11,4 mg EAC/kg de óleo) e semente de uva (14,8 mg EAC/kg de óleo).

3.3.3. Composição de ácidos graxos (FA)

Os perfis de FA de óleo da castanha do Brasil obtidos por Soxhlet e PLE usando IPA e EtOH como solvente na condição otimizada do DCCR - 1, 60 °C, 10,35 MPa, 3 ciclos com 9 min de tempo estático e a relação entre solvente e a matriz (S/F) de 5,6 são apresentados na Tabela 6. O perfil de ácidos graxos também foi determinado para todas as condições do DCCR - 2 usando IPA (Tabela 8). Os resultados mostraram que não teve diferença no perfil de FA do óleo obtido por PLE quando foram usados IPA e EtOH como solvente, mesmo tendo sido melhor a eficiência do IPA.

Quando comparados o perfil de FA do óleo obtido por PLE nas diferentes condições do DCCR - 2 não foi observado diferença na composição do óleo da castanha do Brasil (Tabela 8). Também o perfil dos FA para o óleo extraído por PLE é muito semelhante ao do óleo extraído por Soxhlet, indicando que o processo de PLE não interfere na composição do óleo.

As proporções dos ácidos graxos presentes são, o ácido oleico (18:1 n-9) (O) com 35,21 – 37,13%, ácido linoleico (18:2 n-6) (L) com 28,08 - 30,86%, ácido palmítico (16:0) (P) com 16,77 – 18,43% e ácido esteárico (18:0) (S) com 14,47 – 18,60%. Esta composição de FA é similar aos obtidos por Ceriani et al. (2008), Chunhieng et al. (2008) e Miraliakbari e Shaidi (2008). Embora a porcentagem de ácido linoleico foi maior que oleico para a composição de FA obtidos por Rodrigues et al. (2005) e Santos et al. (2012), de forma geral o perfil de FA do óleo da castanha do Brasil são similares aos encontrados nesta pesquisa. A

soma de FA monoinsaturados (MUFA \geq 35,61%) apresentou a maior concentração, seguida de FA saturados (SFA \geq 31,91%) e poliinsaturados (PUFA \leq 30,88%). Os principais FA obtidos a partir de óleo da castanha do Brasil foram o ácido oleico (18:1 n-9) e ácido linoleico (18:2n-6), sendo 37% e 30%, respectivamente.

Dietas ricas em MUFA e PUFA (ácido linoleico) podem melhorar os fatores de riscos metabólicos em pacientes com diabetes tipo 2 (ARANCETA; PÉREZ-RODRIGO, 2012; QIAN et al., 2016; IMAMURA et al., 2016). E de acordo com Farvid et al, 2014 e Aranceta e Pérez-Rodrigo, 2012 o consumo de PUFA (ácido linoleico) em substituição de SFA é recomendado para a prevenção primária da doença cardíaca coronária. As evidências consideradas para estabelecer essas recomendações estão relacionadas aos efeitos favoráveis do ácido linoleico no perfil lipídico do sangue e sua associação com menor risco de eventos de doença cardíaca coronária e risco reduzido de diabetes tipo 2 (ARANCETA; PÉREZ-RODRIGO, 2012). Em geral, o óleo da castanha do Brasil pode ser considerado adequado para consumo humano devido à proporção equilibrada de ácidos graxos saturados e insaturados.

3.3.4. Efeitos das variáveis do processo no conteúdo de β -sitosterol

O teor de β -sitosterol foi quantificado nos óleos obtidos por PLE usando IPA como solvente sob as condições de processo do CCRD-2 e os resultados estão apresentados na Tabela 6. A análise estatística empregada para avaliar o efeito de variáveis de processo (St e T) sobre o conteúdo de β -sitosterol presente em óleos (ensaios 1 a 7, Tabela 6) mostra que St, T e a interação entre St x T não tiveram influência significativa no conteúdo de β -sitosterol ($p > 0,05$).

Tabela 8 - Perfis de ácidos graxos (% massa) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil obtidos por extração com Soxhlet e álcoois IPA e EtOH pressurizados.

FA (Símbolo)	Soxhlet*	Extração com líquido pressurizado												
		IPA ^a	EtOH ^a	IPA 1 ^b	IPA 2 ^b	IPA 3 ^b	IPA 4 ^b	IPA 5 ^b	IPA 6 ^b	IPA 7 ^b	IPA 8 ^b	IPA 9 ^b	IPA 10 ^b	IPA 11 ^b
14:0 (M)	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,10	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,02
16:0 (P)	16,77	17,45	17,59	17,16	17,25	17,23	17,64	18,10	17,59	17,53	17,10	18,43	18,25	17,13
16:1(Po)	0,09	0,23	0,40	0,04	0,03	0,05	0,08	0,04	0,07	0,10	0,07	0,04	0,15	0,05
18:0 (S)	15,08	18,60	17,81	16,54	15,40	16,57	16,51	14,47	16,28	16,07	16,75	14,86	15,86	16,54
18:1n-9 (O)	37,13	35,51	35,21	37,32	37,73	37,31	36,95	38,23	37,29	37,12	37,06	37,29	37,11	36,93
18:2n-6 (L)	30,86	28,09	28,37	28,84	29,53	28,63	28,58	29,08	28,61	29,03	28,83	29,32	28,38	29,19
20:0 (A)	0,06	0,02	0,36	0,08	0,03	0,09	0,11	0,03	0,09	0,11	0,12	0,03	0,13	0,11
18:3n-3 (Ln)	0,01	0,08	0,24	0,01	0,02	0,02	0,12	0,04	0,05	0,03	0,05	0,02	0,10	0,02
SFA	31,91	36,08	35,78	33,79	32,69	33,99	34,32	32,62	33,97	33,72	34,00	33,33	34,26	33,81
MUFA	37,22	35,74	35,61	37,36	37,76	37,36	37,00	38,26	37,36	37,21	37,12	37,34	37,26	36,98
PUFA	30,88	28,18	28,61	28,85	29,54	28,65	28,68	29,12	28,66	29,07	28,87	29,34	28,47	29,21
UFA/SFA	2,13	1,77	1,80	1,96	2,06	1,94	1,91	2,07	1,94	1,97	1,94	2,00	1,92	1,96

^a Óleos obtidos nas seguintes condições: 60 °C, 10,35 MPa e 3 ciclos com 9 min de tempo estático.

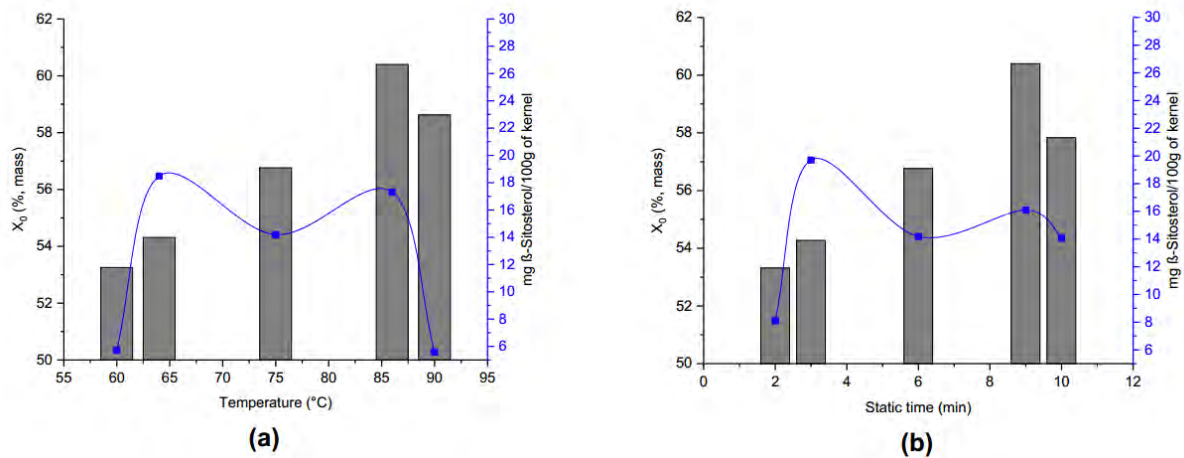
^b Óleos obtidos nas condições do DCCR-2.

O óleo obtido nas condições do processo de 3 min. De St e 64 ° C (ensaio 1) apresentou o maior teor de β -sitosterol ($40,32 \pm 0,50$ mg / 100 g de óleo). Outros resultados com maior teor de β -sitosterol presentes na amêndoa de castanha do Brasil foram publicados como 132,54 mg de β -sitosterol/100g de óleo (RYAN et al., 2006), 56 mg de β -sitosterol/100g de óleo (Ortiz, Moya & Navarro, 2006), 65,5 mg de β -sitosterol/100g amêndoa (Phillips, Ruggio & Ashraf-Khorassani, 2005) e 79 mg de β -sitosterol/100g amêndoa (Da Costa, Ballus, Teixeira-Filho & Godoy, 2010). Esta diferença no teor β -sitosterol presente no óleo ou amêndoa de castanha do Brasil provavelmente está relacionada com a mistura de solventes (hexano/isopropílico, cloroformo/metanol e hexano/etanol/acetona) empregados na extração da fração lipídica das diferentes amêndoa de castanha do Brasil estudadas. O β -sitosterol é bem reconhecido por sua eficácia terapêutica como agente que reduz os níveis do colesterol (colesterol total no plasma e lipoproteína de baixa densidade) (DESAI; DONG; MILLER, 2016), e possui atividades anti-câncer, antiinflamatórias e de proteção contra doenças cardiovasculares (DESAI; DONG; MILLER, 2016; SHAHZAD et al., 2017), sendo assim fontes atraentes para o desenvolvimento de uma variedade de alimentos enriquecidos com este esterol.

Na análise do conteúdo de β -sitosterol em função de cada uma das duas variáveis de processo independentes estudadas, observou-se comportamento semelhante da quantidade de β -sitosterol para a temperatura e o tempo estático (Figura 14a e 14b). Para cada uma das variáveis, duas regiões apresentaram picos de conteúdo de β -sitosterol. O maior teor foi alcançado quando se utilizou baixa temperatura (64 °C) (Figura 14a) e tempo de contato curto entre o solvente e a matriz (tempo estático) (Figura 14b) diferindo do rendimento dos extratos, cujos maiores valores foram alcançados quando alta temperatura de extração e tempo estático elevado foram utilizados no processo.

Um segundo pico no conteúdo de β -sitosterol nos extratos também ocorreu na mesma condição onde o melhor rendimento foi obtido, tanto para temperatura quanto para tempo estático (Figura 14a e 14b). Embora o comportamento da variação do β -sitosterol tenha sido semelhante entre as duas variáveis do processo, as quantidades foram diferentes. Para valores de temperatura acima de 86 ° C, como a 90 ° C, houve uma diferença de 11,72 mg de β -sitosterol / 100g de amêndoa, o que não ocorreu com o aumento do tempo estático de 9 min por 10 min. Neste caso, a perda foi de 2,01 mg de β -sitosterol / 100g de amêndoa.

Figura 14 - Comportamento do rendimento da extração do óleo (X_0) e do teor de β -Sitosterol pela temperatura (a) e tempo estático (b).



Fonte: Própria autoria.

4. Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstraram que o IPA foi mais eficiente e seletivo que o EtOH no processo PLE para obtenção de óleo de amêndoa da castanha-do-brasil. Os solventes utilizados não influenciaram o perfil de FA.

O rendimento de extração de óleo foi influenciado por St e T, mas não pela quantidade de solvente representada pela relação S/F, mesmo quando aumentou para quase o triplo na condição ótima do PLE. Este parâmetro definitivamente não influenciou significativamente os resultados, o que indica que menores quantidades de solventes podem ser usadas e representam uma redução de custo no processo.

O FFA, o TPC e o β -sitosterol não foram influenciados estatisticamente pelas variáveis do processo estudado (St, relação S/F e T) no PLE. Além disso, o perfil de ácidos graxos dos óleos obtidos nas melhores condições de extração com IPA pressurizado foi semelhante ao obtido pelo Soxhlet, além de ser similar ao perfil de ácidos graxos do óleo obtido com EtOH pressurizado. Assim, isso sugere que o processo de PLE não modificou a composição do óleo da semente da castanha, dependendo do solvente ou das condições do processo. Os principais ácidos graxos identificados a partir dos óleos obtidos foram os ácidos oleico e linoleico.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Projeto nº 2016/13460-8, Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq), Processo: 306317 / 2016-8 e ao FONDECYT pela bolsa de estudo para HPCS.

Nomenclatura

IPA	Isopropílico
EtOH	Etílico
FA	Ácidos graxos
PLE	Extração com líquido pressurizado
FAME	Fatty acid methyl esters
DCCR	Delineamento composto central rotacional
ADD	Desvio médio absoluto.
X_0	Rendimento da extração de óleo (% , massa).
FFA	ácidos graxos livres.

5. Referências bibliográficas

- MORI, S.A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Advances in Economic Botany*, v. 8, p. 130-150, 1990.
- RIBEIRO, M.B.N.; JEROZOLIMSKI, A.; DE ROBERT, P; WILLIAM, E. MAGNUSSON, W.E. Brazil nut stock and harvesting at different spatial scales in southeastern Amazonia. *Forest Ecology and Management*. v. 319, p. 67–74, 2014.
- KAINER, K.A.; WADT, L.H.O.; STAUDHAMMER, C.L. Explaining variation in Brazil nut fruit production. *Forest Ecology and Management*. v. 250, p. 244-255, 2007.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Proposta de Preços mínimos Safra 2015-2016. *Produtos da Sociobiodiversidade v. 2*, Brasília, p. 1 -159, 2015.
- COTTA, J.N.; KAINER, K.A.; WADT, L.H.O.; STAUDHAMMER, C.L. Shifting cultivation effects on Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) regeneration. *Forest Ecology and Management*. v. 256, p. 28–35, 2008.
- VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 4705 – 4714, 2006.
- DESAI, ADITYA J.; DONG, MAOQING; MILLER, LAURENCE J. Beneficial effects of β -sitosterol on type 1 cholecystokinin receptor dysfunction induced by elevated membrane cholesterol. *Clinical Nutrition*, v. 35, n. 6, p. 1374-1379, 2016.

- DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v.112, p. 4 – 29, 2016.
- RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.57, n.3/4, p. 219 – 228, 2006.
- JOHN, J.A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of functional foods*, v. 2, p. 196 – 209, 2010.
- FREITAS, S.P.; FREITAS-SILVA, O.; De MIRANDA, L.C.; COELHO, M.A.Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 27, p. 14-17, 2007.
- RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.*, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996.
- KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 105–113, 2002.
- HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 26–38, 2015.
- OLIVEIRA, A.L.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, v. 145, p. 522 – 529, 2014.
- HU, J.; GUO, Z.; GLASIUS, M.; KRISTENSEN, K.; XIAO, L.; XU, X. Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with bioethanol: An efficient and sustainable approach. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 34, p. 5765–5773, 2011.
- POURALINAZAR, F.; YUNUS, M.A.C.; ZAHEDI, G. Pressurized liquid extraction of *Orthosiphon stamineus* oil: Experimental and modeling studies. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 62, p. 88–95, 2012.
- JABLONSKÝ, M.; VERNARECOVÁ, M.; HÁZ, A.; DUBINYOVÁ, L.; ŠKULCOVÁ, A.; SLADKOVÁ, A.; ŠURINA, I. Extraction of phenolic and lipophilic compounds from spruce (*picea abies*) bark using accelerated solvent extraction by ethanol. *WOOD RESEARCH*, v. 60, n.4, p. 583-590, 2015.

- COLIVET J.; OLIVEIRA, A.L.; CARVALHO, R.A. Influence of the bed height on the kinetics of watermelon seed oil extraction with pressurized ethanol. *Separation and Purification Technology*, v. 169, p. 187–195, 2016.
- CASTRO-PUYANA, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; VALDÉS, A.; IBRAHIM, O.H.M.; SUAREZ-ÁLVAREZ, S.; FERRAGUT, J.A.; MICOL, V.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; GARCÍA-CAÑAS, V. Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells, *Food Research International*, 2016.
- BELANDRIA, V.; DE OLIVEIRA, P. M. A.; CHARTIER, A.; RABI, J.A.; OLIVEIRA, A.L.; BOSTYN, S. Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 37, p. 145–152, 2016.
- CONTE, R.; GULLICH, L.M.D.; BILIBIO, D.; ZANELLA, O.; BENDER, J.P.; CARNIEL, N.; PRIAMO, W.L. Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. *Food Chemistry*, v. 213, p. 425–430, 2016.
- GILBERT-LÓPEZ, B. et al. Development of new green processes for the recovery of bioactives from *Phaeodactylum tricornutum*. *Food Research International*, v. 99, p. 1056-1065, 2017.
- HRON, R.J.; KOLTUN, S.P.; GRACI, A.V. 1982. Biorenewable Solvents for Vegetable Oil Extraction. *JAOCS*, v. 59, n. 9, p. 674A – 684A, 1982.
- JHONSON, L. A.; LUSAS, E.W. Comparison of Alternative Solvents for Oils Extraction. *JAOCS*, v. 60, n. 2, p. 229 - 242, 1983.
- TIR, R.; DUTTA, P.C.; BADJAH-HADJ-AHMED, A.Y. Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 114, p. 1427 – 1438, 2012.
- LI, Y.; FINE, F.; FABIANO-TIXIER, A-S.; ABERT-VIAN, M. CARRE, P.; PAGES, X.; CHEMAT, F. Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *C. R. Chimie*, v. 17, p. 242–251, 2014.
- BAÜMLER, E.R.; CARRÍN, M.E.; CARELLI, A.A. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, v. 178, p.190 – 197, 2016.
- NAVARRO, S.L.B.; CAPELLINI, M.C.; ARACAVA, K.K.; RODRIGUES, C.E.C. Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. *Food and Bioproducts Processing*, v. 100, p. 185 – 194, 2016.
- HRON, R.J.; SR.; KUK, M.S.; ABRAHAM, G.; WAN, P.J. Ethanol Extraction of Oil, Gossypol and Aflatoxin from Cottonseed. *JAOCS*, v. 71, n. 4, p. 417 - 421, 1994.

- ZHANG, F.; RHEE, K.C.; KOSEOGLU, S.S. ISOPROPYL ALCOHOL EXTRACTION OF COTTONSEED COLLETS: EFFICIENCY AND PERFORMANCE. *Journal of Food Lipids*, v.9, p. 147 – 160, 2002.
- F.D.A. Food and Drug Administration. Subchapter B – Food for Human Consumption: Isopropyl alcohol. Sec. 173.240. 2016.
- WYPYCH, G., *Handbook of Solvents*, ChemTec Publishing, Toronto, Canada 2001.
- BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v.78, p. 836 – 845, 2007.
- ASABE. Standards. Method of Determining and Expressing fineness of Feed Materials by Sieving. ANSI/ASAE, S319.4, 2012.
- A.O.A.C. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Ed., Gaithersburg, MD, USA, 2005.
- A.O.C.S. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. AOCS, Washington, DC, USA, 2009.
- CORNELIO-SANTIAGO, H.P.; GONÇALVES C.B.; DE OLIVEIRA, N.A.; OLIVEIRA, A.L. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 386 – 394, 2017.
- COLIVET, J.; OLIVEIRA, A.L.; CARVALHO, R.A. Influence of the bed height on the kinetics of watermelon seed oil extraction with pressurized ethanol. *Separation and Purification Technology*, v.169, p. 187 – 195, 2016.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, v. 299, p. 152–178, 1999.
- MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; MINIATI, E. Simple and hydrolyzable in virgin olive oil. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 40, p. 1571–1576, 1992.
- DOS SANTOS, S. B.; MARTINS, M. A.; CANESCHI, A.L.; AGUILAR, P. R. M.; COIMBRA, J. S. R. Kinetics and Thermodynamics of Oil Extraction from *Jatropha curcas* L. Using Ethanol as a Solvent. *International Journal of Chemical Engineering*, p. 1 – 9, 2015.
- FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização Físico-Química da Amêndoa, Torta e Composição dos Ácidos Graxos Majoritários do Óleo Bruto da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). *Alimentos e Nutrição*, v. 17, n. 2, p. 203 - 208, 2006.
- NETO, V. Q.; BAKKE, O. A.; RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S.; LETELIER, J. C.; CONCEIÇÃO, M. M. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil:

- Characterization and thermal stability. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 3, n. 1, p. 33–42, 2009.
- USDA Nutrient Database for Standard Reference. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. 2016.
- MOREAU, R.A.; POWELL, M.J.; SINGH, V. Pressurized Liquid Extraction of Polar and Nonpolar Lipids in Corn and Oats with Hexane, Methylene Chloride, Isopropanol, and Ethanol. *JAOCS*, v. 80, n. 11, p. 1063 - 1067, 2003.
- SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; LEMA, J.M. Ethanol Extraction of Polyphenols in an Immersion Extractor. Effect of Pulsing Flow. *JAOCS*, v. 73, n. 9, p. 1121 – 1125, 1996.
- BAÜMLER, E.R.; CARRÍN, M.E.; CARELLI, A.A. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, v. 178, p. 190 – 197, 2016.
- FREITAS, L.S.; DARIVA, C.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B. Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of brazilian grape seed oil. *Separation and Purification Technology*, v. 116, p. 313 – 318, 2013.
- BRASIL. Resolução RDC/ANVISA/MS nº 270 (22 setembro de 2005). Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1. [Retrieved in Aug 11th., 2017, from]. http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/resol_270_set_2005.pdf.
- HAYOUNI, E.A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDY, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1126 – 1134, 2007.
- SMALLWOOD, I. M. Handbook of organic solvent properties. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, v. 2, n. 17, p. 177, 1997.
- CHANDRASEKARA, A.; RASEK, O.A.; JOHN, J.A.; CHANDRASEKARA, N.; SHAHIDI, F. Solvent and Extraction Conditions Control the Assayable Phenolic Content and Antioxidant Activities of Seeds of Black Beans, Canola and Millet. *J Am Oil Chem Soc.*, v. 93, p. 275 – 283, 2016.
- SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E. THE CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN COLD-PRESSED PLANT OILS. *Journal of Food Lipids*, v. 15, p. 137 – 149, 2008.
- CERIANI, R.; PAIVA, F.R.; GONÇALVES, C.B.; BATISTA, E.A.C.; MEIRELLES, A.J.A. Densities and Viscosities of Vegetable Oils of Nutritional Value. *J. Chem. Eng. Data*, v. 53, p. 1846 – 1853, 2008.

- CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed Study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids, Tocopherols and Sterols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 7, p. 1374 – 1380, 2008.
- MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. LIPID CLASS COMPOSITIONS, TOCOPHEROLS AND STEROLS OF TREE NUT OILS EXTRACTED WITH DIFFERENT SOLVENTS. *Journal of Food Lipids*, v. 15, p. 81 – 96, 2008.
- RODRIGUES, C.E.C; SILVA, F.S.; MARSAIOLI, JR. A.; MEIRELLES, A.J.A. Deacidification of Brazil Nut and Macadamia Nut Oils by Solvent Extraction: Liquid-Liquid Equilibrium Data at 298.2 K. *J. Chem. Eng. Data*, v. 50, p. 517 – 523, 2005.
- SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; SOARES, F. A. S. M.; GIOIELLI, L. A.; COSTA, C. E. F.; LANNES, S. C. S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. *Food Research International*. v. 47, p. 253–258, 2012.
- ARANCETA, J.; PÉREZ-RODRIGO, C. Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, v. 107, S8 - S22, 2012.
- QIAN, F.; KORAT, A. A.; MALIK, V.; HU, F. B. Metabolic Effects of Monounsaturated Fatty Acid–Enriched Diets Compared With Carbohydrate or Polyunsaturated Fatty Acid–Enriched Diets in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes Care*. v. 39, n. 8, p. 1448 -1457, 2016.
- IMAMURA, F.; MICHA, R.; WU, J. H. Y.; DE OLIVEIRA OTTO, M. C.; OTITE, F. O.; ABIOYE, A. I.; MOZAFFARIAN, D. Effects of Saturated Fat, Polyunsaturated Fat, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomised Controlled Feeding Trials. *Journal PLoS Medicine*. v. 13, n.7, p. 1 - 18, 2016.
- FARVID, M.S., DING, M., PAN, A., SUN, Q., CHIUVE, S.E., STEFFEN, L.M., WILLETT, W.C., HU, F.B. Dietary Linoleic Acid and Risk of Coronary Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Circulation*. 130, 1568-1578, 2014.
- SHAHZAD, N. et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 88, p. 786-794, 2017.

CAPÍTULO 3: Efeito do processo de extração no rendimento e composição de óleo de amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliensis*) utilizando álcool pressurizado como solvente

CAPÍTULO 3: Efeito do processo de extração no rendimento e composição de óleo de amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliensis*) utilizando álcool pressurizado como solvente

Resumo

O óleo de amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense*) (PKO) é rico em ômega-9 e altamente valorizado por suas características nutricionais, funcionais e sensoriais. A extração com líquido pressurizado (PLE) foi usada para obter PKO usando isopropanol a temperaturas moderadas. Os efeitos das variáveis do processo PLE, principalmente tempo estático (St, 2-10 min) e temperatura (T, 60-90 °C), no rendimento de extração de óleo (X_0), ácidos graxos livres (FFA), conteúdo de fenólicos totais (TPC) e conteúdo de β -sitosterol foram avaliados, e os perfis dos ácidos graxos e triacilgliceróis foram determinados. O St e T influenciaram o X_0 e o TPC, mas não afetaram significativamente os FFA e β -sitosterol. PLE com isopropanol, por 27 min, recuperou 92,99% de PKO ou 39,66% de X_0 . Os principais ácidos graxos da PKO foram ácido oleico (18:1n-9; 48,28-50,77%), ácido palmítico (16: 0; 35,49-38,74%) e ácido linoléico (18: 2n-6; 8,22-10,92%), e os principais triacilgliceróis foram dioleil palmitoil glicerol (OOP) (31,55%) e dipalmitoil oleil glicerol (POO) (29,66%). O teor de β -sitosterol, de 3,96 a 6,33 mg/100 g de óleo, foi relativamente baixo quando comparado à castanha do Brasil.

Palavras-chaves: óleo de amêndoa, ômega-9, composto bioativos, ácido graxo, amêndoa de pequi

1. Introdução

O Pequi (*Caryocar brasiliense*) é uma planta nativa do Cerrado brasileiro com significativa relevância econômica para as associações e cooperativas envolvidas com este cultivo (Araujo, 1995), a sua fruta tem uma polpa laranja-amarelada que envolve uma fina camada de espinhos que por sua vez envolve a semente, e a parte interna da sua semente contém uma amêndoa branca coberta de um tegumento marrom (LEÃO et al., 2017).

As amêndoas do pequi são um subproduto do processamento da fruta (*Caryocar brasiliense*) que geralmente são descartadas pelas cooperativas e associações que a processam pequi. No entanto, é uma matéria-prima rica em óleo especial (34,4 a 56,41%) e proteína (27,65%) (FARIA-MACHADO et al., 2015; Lima, Silva, Trinidad, Torres & Mancini-Filho, 2007) e compostos bioativos como fenólicos (113,01 a 252 mg GAE/100g de óleo), carotenoides (89,82 a 118,42 µg/100g de óleo), tocoferóis (154,27 a 155,31 mg/kg de óleo) e fitosteróis totais (793,32 a 808,62 mg/kg de óleo) (Torres et al., 2016b) de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética. Assim o óleo da amêndoa de pequi é valorizado por apresentar propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Torres et al., 2016a).

As técnicas convencionais comumente empregadas para a extração do óleo de amêndoa de pequi utilizam tempos prolongados e baixos rendimentos como a prensagem a frio ou são termicamente instáveis quando empregam uma técnica rústica de extração com água em alta temperatura (Torres et al., 2016b). No entanto, não há referências que reportam a produção de óleo de amêndoa de pequi por técnicas de extração recentes, como por exemplo a extração com líquido pressurizado (PLE). A PLE é ecologicamente correta já que reduzem o tempo de extração e conseqüentemente reduzem a energia e os custos, além disso pode ser feita com emprego de solventes verdes como é o caso do álcool isopropílico.

O uso da PLE tem mostrado grande potencial para extração de óleo (Castejón, Luna, Señoráns, 2018, Conte et al., 2016). Esta técnica consiste de um processo de extração sólido-líquido intermitente, utilizado para matrizes sólidas e semissólidas, que aplica temperaturas de moderadas a altas (de 50 a 200 °C) com altas pressões (10,34 a 20,68 MPa) e geralmente durante tempos curtos (2 a 20 min). Assim, sob estas condições de pressão o solvente é mantido líquido durante todo o processo de extração mesmo com emprego de altas temperaturas. Esta condição do solvente aumenta as taxas de transferência de massa, já que há um aumento na solubilidade dos solutos em decorrência da diminuição na viscosidade e tensão superficial do solvente. Isso permite que o solvente

difunde-se com maior facilidade atingindo áreas mais profundas da matriz sólida (Sánchez-Camargo, Ibáñez, Cifuentes & Herrero, 2017).

As informações sobre o efeito do processo de PLE no rendimento de extração de óleo e na composição do óleo após o pré-tratamento da amêndoa de pequi são escassas. Assim, o estudo dos efeitos das principais variáveis da PLE pode fornecer informações valiosas que permitirão propor esta técnica de extração como uma alternativa às técnicas de extração convencionais usadas para a recuperação de óleo especial de amêndoa de pequi.

Nesta pesquisa, a PLE foi utilizada para realizar uma extração rápida do óleo de pequi com intuito de obter um maior rendimento de óleo sob temperaturas moderadas (60 a 90°C) de extração. A eficácia da extração foi avaliada para cada condição empregada. Os efeitos das variáveis do processo, principalmente tempo estático e temperatura, foram avaliados no rendimento de extração de óleo, na composição em ácidos graxos livres, no conteúdo de fenólicos totais e no conteúdo de β -sitosterol empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR) e a metodologia de superfície de resposta (Response Surface Analysis – RSA). Também foi determinado o perfil dos ácidos graxos, a composição em triacilgliceróis e em β -sitosterol.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Os frutos de Pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) (Figura 15a) do Cerrado Brasileiro (Região do estado de Goiás), da safra de 2016, foram adquiridos pela Comercio e Distribuidora de Frutas Nativas e Exóticas Ltda - CEAGESP e processados na Planta Piloto do ZEA na FZEA-USP. O exocarpo (casca externa verde), mesocarpo (parte interna amarelada da casca) e endocarpo (polpa laranja-amarelada) (Figura 15b) foram manualmente separados, e a camada de espinhos finos que penetra no endocarpo foi removida por lavagem constante com água e abrasão mecânica (METVISA, Brusque, BR). No Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN), as sementes (Figura 15c) foram secas em estufa com circulação e renovação de ar forçado (MARCONI MA035/5, Piracicaba, BR) a 50 °C por 48 h e as cascas das sementes (Figura 15d) foram separadas manualmente. As amêndoas (Figura 15e) foram trituradas com o uso de um liquidificador doméstico (Walita, Varginha, MG), e as amêndoas trituradas foram utilizadas no processo de extração.

Figura 15 - Frutos de pequi (*C. brasiliensis*) (a), endocarpo (polpa amarelo-alaranjada) (b), sementes (c), casca da semente (marrom e duro) (d) e amêndoa (incluindo embrião, endosperma e tegumento) (e).



Fonte: Própria autoria.

O álcool isopropílico (IPA) com pureza de 99,5% e hexano com pureza de 98,5% foram da LABSYNTH (São Paulo, BR). Reagente Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, ácido gálico, hidróxido de potássio e metanol foram comprados da Êxodo Científica (Sumaré, BR). Metanol, etanol, isopropanol, acetonitrile, hexano de grado HLPC/CG foram comprados de JT Baker (Nova Iorque, EUA).

2.2. Planejamento experimental

O delineamento composto central rotacional (CCRD) foi escolhido para avaliar as variáveis do processo da PLE de óleo da amêndoa de pequi, devido a suas vantagens (Rodrigues & Iemma, 2005). Apenas duas variáveis de processo foram escolhidas no planejamento experimental, o período de contato entre a matriz e o solvente em cada batch ou ciclo, denominado tempo estático (St) e a temperatura (T). A escolha destas variáveis baseou-se teste preliminar e também em outros resultados de pesquisa deste grupo de pesquisa (De Oliveira, Cornelio-Santiago, Fukumasu & Oliveira, 2018). Um CCRD 2² incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central foi usado para avaliar a influência das variáveis independentes, o St (2 a 10 min) e a T (60 a 90 °C) (Tabela 9) nas variáveis dependentes consideradas como respostas na avaliação da PLE. Foram

consideradas o rendimento de extração de óleo (X_0), os ácidos graxos livres (FFA) e o conteúdo de fenólicos totais (TPC). O modelo polinomial completo envolvendo os principais efeitos (termos de primeira ordem), os termos de interação entre as variáveis e termos de segunda ordem foram utilizados (Equação 6) para ajustar as respostas.

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3AB + b_4A^2 + b_5B^2 \quad (6)$$

onde: Y é variável dependente ou resposta (X_0 , FFA e TPC), b_0 é um coeficiente constante dos modelos, A e B representam as variáveis codificadas independentes; A = St, B = T variando de -1,41 a +1,41 (Tabela 9), b_0 a b_5 são os coeficientes de regressão a serem determinados, b_1 a b_3 são os coeficiente de primeira ordem, b_3 é o coeficiente de interação e b_4 a b_5 são os coeficientes de segunda ordem do modelo de regressão.

Os resultados experimentais foram analisados utilizando o programa Statistica (StatSoft, Inc., v.12.0, EUA) para identificar os efeitos das variáveis de processo nas respostas de interesse. Para verificar a qualidade de ajuste do modelo estatístico foi realizado a análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% para avaliar o efeito de cada variável. E calculou-se o desvio médio absoluto (AAD) usando a Equação 7. Os efeitos das variáveis são observadas nas superfícies de resposta e nos gráficos de contorno.

$$AAD(\%) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (|Y_{i,exp} - Y_{i,pred}| / Y_{i,exp}) \times 100 \quad (7)$$

onde n é o número total de dados experimentais, pred é o valor predito pelo modelo e exp é o valor experimental determinado em cada condição do processo de extração (i).

Tabela 9 - Matriz de DCCR com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol do óleo de amêndoa de pequi obtido por álcool isopropílico pressurizado.

Ensaio	St (min)	T (°C)	X_0 (% massa)			Óleo recuperado (%)	TPC (mg EAG/kg óleo)			FFA (%)	β -sitosterol (mg/100 g óleo)	
			Exp ^a	Pred	ARD (%)		Exp	Pred	AAD (%)		Exp	Exp ^a
1	3 (-1)	64 (-1)	35,74	35,79	0,15	83,79	97,12	91,55	5,73	0,24	4,06	1,45
2	9 (1)	64 (-1)	37,50	37,41	0,24	87,92	113,33	107,77	4,91	0,21	5,47	2,05
3	3 (-1)	86 (1)	38,17	38,09	0,21	89,49	326,40	320,83	1,71	0,24	4,58	1,75
4	9 (1)	86 (1)	39,66	39,71	0,12	92,99	589,46	583,89	0,94	0,24	4,48	1,78
5*	6 (0)	75 (0)	37,73	37,75	0,07	88,45	256,58	276,01	7,57	0,21	3,98	1,50
6*	6 (0)	75 (0)	37,65	37,75	0,26	88,28	266,49	276,01	3,57	0,21	3,96	1,49
7*	6 (0)	75 (0)	37,81	37,75	0,17	88,66	282,70	276,01	2,37	0,21	5,01	1,89
8	2 (-1,41)	75 (0)	36,90	36,61	0,78	86,51	393,06	177,56	54,83	0,25	4,28	1,58
9	10 (1,41)	75 (0)	38,88	38,89	0,03	91,16	64,23	374,46	38,64	0,21	5,25	2,04
10	6 (0)	60 (-1,41)	36,25	36,13	0,33	84,99	322,79	27,36	91,53	0,21	6,33	2,29
11	6 (0)	90 (1,41)	39,37	39,37	0,01	92,30	534,05	524,66	1,76	0,25	4,13	1,63

*Ponto central; C: codificado; ^abase seca; St: tempo estático; T: temperatura; Exp: valor experimental; Pred: valor previsto por modelo; AAD: desvio médio absoluto; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA (%): Ácidos graxos livres expressos em percentagem de ácido oleico.

2.3. Caracterização da matéria-prima

A umidade das amêndoas trituradas de Pequi foi determinado de acordo com o método 931.04 (AOAC, 2005), os lipídios totais segundo o método 963.15 (AOAC, 2005), as proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl (método 970.22), utilizando fator de 6,25 para conversão do nitrogênio total em proteína (AOAC, 2005), a determinação de cinzas foi realizada de acordo ao método 972.15 (AOAC, 2005) e os carboidratos totais foram determinados por diferença. As análises descritas nesta seção foram realizadas em triplicata.

A caracterização física das amêndoas trituradas foi realizado em termos de diâmetro médio da partícula de acordo com o método S319.4 (ASABE, 2012). A densidade real (ρ_r) foi medida em picnômetro de gás hélio (Quantachrome Ultrapyc 1200e, Boynton Beach, USA) pela Central Analítica-IQ/UNICAMP. A densidade aparente (ρ_a) e a porosidade do extrator (34 cm^3) de leito fixo (ϵ) foram realizados de acordo aos procedimentos descritos por Cornelio-Santiago, De Oliveira, Gonçalves & Oliveira (2017).

2.4. Métodos de extração de óleo

2.4.1. Extração por Soxhlet

Os lipídios totais também foram extraídos pelo método Soxhlet usando hexano como solvente de acordo com o procedimento descrito por Cornelio-Santiago, De Oliveira, Gonçalves & Oliveira (2017), com a finalidade de comparação. Aproximadamente 10 g de amêndoa triturada e 200 mL de hexano foram utilizados. O óleo recuperado foi seco até peso constante e armazenado sob congelamento ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) para análises posterior.

2.4.2. Extração com líquido pressurizado (PLE)

A extração do óleo para os 11 ensaios foram realizados em um sistema Dionex ASE 150 (Thermo Fisher Scientific, Newington, EUA) usando álcool isopropílico (IPA) como solvente. Os parâmetros do processo intermitente de extração, mantidos constantes, foram a razão entre o volume de solvente e a massa da amêndoa triturada ($S/F = 5,8 \text{ mL/g}$), pressão ($P = 10,35 \text{ MP}$), número de bateladas ou ciclos ($C = 3$) e tempo de purga ($tP = 100 \text{ s}$). A entrada dos parâmetros foi programada no painel de controle do sistema Dionex ASE 150. Aproximadamente 10 g de amêndoa triturada de pequi foram empacotadas no extrator de leito fixo com 34 cm^3 e dimensões de 2,9 cm de diâmetro interno e 5,19 cm de altura interna. Em uma das saídas da célula fechada foi acondicionado um filtro de papel, a célula

foi acondicionada no forno e iniciou-se o bombeamento do solvente para dentro do extrator. Com o aquecimento do forno até a temperatura desejada (Tabela 9) iniciou-se o aumento da pressão (até 10,35 MPa). Após atingir o equilíbrio da T e da P o solvente permaneceu em contato com a matriz na primeira batelada ou ciclo (C) durante o tempo de contato estabelecido (St) (Tabela 9). Após este tempo, o extrato foi coletado, uma nova corrente de solvente puro entrou na célula de extração sendo o extrato coletado novamente após o St programado, mantendo sequencialmente as condições do processo até completar-se o número de bateladas ou ciclos (C) que foi fixo em 3. Ao final o gás N₂ foi utilizado para remover o extrato remanescente na célula com um tempo de purga fixo em 100 s.

Após o término da extração, o solvente do extrato (óleo, outros compostos e solvente) foi evaporado no evaporador rotativo (MARCONI, MA-120, Piracicaba, BR) a 50 °C por 40 min, o material extraído recuperado foi seco até peso constante.

O material extraído foi fracionado, em óleo e outros compostos por centrifugação a 4500 g e 24 °C por 20 min. Após a separação, o óleo recuperado foi armazenado sob congelação (-20 °C) para análises posterior.

O rendimento de extração de óleo (X₀) foi calculado pela razão entre massa total do óleo (m_o) e massa da amêndoa triturada (fm_{db}) em base seca, de acordo com a Eq. (8).

$$X_0 = (m_o / fm_{db}) \times 100 \quad (8)$$

2.5. Ácidos graxos livres, perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis

Os óleos obtidos de amêndoa triturada de pequi por PLE e SE foram avaliados em termos de seu perfil de ácidos graxos (FA) e ácidos graxos livres (FFA). Determinou-se o valor de ácidos graxos livres (FFA), utilizando o método oficial AOCS Cd 3d-63 (AOCS, 2009).

Os óleos foram preparados em forma de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) de acordo como o método 991.39 (AOAC, 2005). Os FAME foram analisados por cromatografia gasosa (CG) acoplado ao espectro de massas para determinar o perfil dos FA, de acordo com uma forma adaptada por Cornelio-Santiago, De Oliveira, Gonçalves & Oliveira (2017) do método 996.06 (AOAC, 2005).

O perfil de triacilgliceróis (TAG) do óleo de amêndoa de pequi foi determinado de acordo ao procedimento descrito por Cornelio-Santiago, De Oliveira, Gonçalves & Oliveira (2017) usando o algoritmo estatístico sugerido por Antoniosi Filho, Mendes & Lanças (1995).

2.6. Conteúdo de fenólicos totais (TPC)

A extração metanólica dos compostos fitoquímicos a partir do óleo obtidos por PLE foram realizados empregando a metodologia descrita por Montedoro, Servili, Baldioli & Miniati (1992) com adaptação. O óleo (0,5 g) foi misturado com metanol (0,5 mL), agitado com Vortex a 6000 rpm por 20 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min e o sobrenadante recuperado. Este procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante recuperado foi misturado com água destilada (0,25 mL), agitado com Vortex 6000 rpm por 2 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min e o sobrenadante recuperado.

O conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos óleos foram avaliados empregando o método descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós (1999) com adaptação para um volume final de solução de 3 mL. Nesta análise, 0,3 mL de extrato metanólico foi misturado com 1,364 mL de água destilada em um tubo de ensaio de 10 mL, seguido pela adição de 0,136 mL de reagente F-C. Esta solução ficou em repouso durante 8 min à temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C). Em seguida foi adicionado 1,2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. Após os 120 min de reação à temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C), a absorbância foi lida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10S, EUA). A reação do padrão foi preparada da mesma forma usando 0,3 mL de metanol e água destilada (v/v, 80/20) em substituição do extrato metanólico. A TPC foi calculado usando a curva padrão de ácido gálico, nas concentrações de solução padrão de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L (Figura A2)

2.7. Determinação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras foram preparadas como base na metodologia descrito por Mazalli, Saldanha & Bragagnolo (2003) e Ortíz, Moya & Navarro (2006). Aproximadamente 0,25 g de óleo foi saponificada com 20 mL da solução etanólica de KOH à 15% a temperatura ambiente por 12 h, posteriormente adicionou-se 10 mL de solução saturada de NaCl e a extração da fase orgânica foram realizadas duas vezes usando 5 mL de n-hexano após a agitação com vortex por 5 minutos.

A quantificação do β -sitosterol foi realizado com base na metodologia descrita por Mazalli, Saldanha & Bragagnolo (2003) usando um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, JP) equipado com um detector de arranjo de diodo (SPD –M20A), uma coluna analítica C18 (100mm \times 4.6mm, 4.0 μ m de tamanho de partícula) (Chromolith, Merck, Darmstadt, GE), temperatura do forno de 40 °C, fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15), vazão 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 μ L, e os cromatogramas foram extraídos na leitura de 208 nm. O β -sitosterol foi identificado através da comparação do tempo de retenção de cada

amostra com o padrão de β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e quantificação através das áreas dos picos correspondentes, por padronização externa e os resultados foram expressos em mg por 100 g de óleo (Figura A3).

3. Resultados e discussões

3.1. Caracterização da matéria-prima

A análise centesimal das amêndoas trituradas de Pequi, assim como as características físicas do leito fixo de extração utilizados neste estudo são descritos a seguir, o diâmetro médio das partículas foi 1,18 mm ($\pm 0,01$), a densidade real e aparente foram 1,09 ($\pm 0,01$) e 0,36 ($\pm 0,01$) g/cm³, respectivamente. E a porosidade do leito fixo de extração foi 0,64. A matéria-prima apresentou baixa umidade (2,33 % $\pm 0,14$) em comparação ao reportado por Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, (2007) (8,68%). O conteúdo de lipídios totais foi de 42,65% ($\pm 0,06$), utilizando éter de petróleo como descrito na metodologia, resultado semelhante foi reportados por Faria-Machado et al., (2015) (34,4 a 48,5%) e maiores valores foi reportado por Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, (2007) (56,41%). Valor semelhante de teor de proteína (27,48 $\pm 0,05$ %) do presente estudo foi reportado por Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, (2007) (27,65%). O teor de cinza foi de 4,54% ($\pm 0,03$) e carboidratos totais foram de 25,33 ($\pm 0,02$). O valor de cinza é consistente com o resultado (4,39%) reportado na literatura (Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, 2007), no entanto, para carboidratos totais foram reportados valores muito baixos (11,53%) (Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, 2007).

3.2. Rendimento de extração de óleo

Extração por Soxhlet usando hexano como solvente também foi utilizado para determinar os lipídios totais das amêndoas trituradas de Pequi, para fins de comparação. Os lipídios totais das amêndoas trituradas de Pequi (46,47 $\pm 0,72$ %, em base seca) está entre os valores intermediários encontrados na literatura, sendo 56,41% os lipídios totais extraídos com hexano (Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, 2007) e de 34,4 a 48,5% de lipídios totais extraídos usando éter de petróleo (Faria-Machado et al., 2015). Essas variações no conteúdo de lipídios entre plantas da mesma espécie podem ser explicadas por diferenças no clima, no solo, nas práticas agrícolas, a qualidade física das amostras e

principalmente pelo método utilizado para obter a fração lipídica, o solvente usado e/ou o pré-tratamento empregado antes da extração.

3.1.1. Extração com líquido pressurizado (PLE)

De acordo com os resultados da extração do óleo de amêndoas de Pequi com isopropanol pressurizado (Tabela 9), o X_0 variou de 35,64 a 39,66% e os maiores valores de X_0 foram obtidos quando as extrações foram realizadas nas condições dos ensaios 4 (39,66%) e 11 (39,37%). Na análise estatística dos ensaios 1 a 7 (Tabela 9) constatou-se que o efeito de interação de $St \times T$ não teve influência significativa no X_0 , mas os efeitos das variáveis independentes St e T tiveram influência ($p < 0,05$) no X_0 , como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 16a). Na ANOVA foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 5% e estes resultados afirmam que o modelo de primeira ordem (Eq. (9)) ajustou-se bem aos dados experimentais do X_0 em função de St e T , com coeficiente de determinação (R^2) de 99,81% (Tabela 10).

Este modelo pode ser considerado adequado para descrever o processo de extração de solutos (Oliveira, Destandau, Fougère & Lafosse, 2014).

Com o resultados obtidos para o óleo das amêndoas de pequi, pode-se identificar que a influência das variáveis do processo tem o mesmo comportamento observado para a castanha do Brasil. Na comparação entre estas duas matérias-primas, nota-se que o empregos de isopropanol pressurizado no processo intermitente de extração tem influência da St e da T , mas não da interação entre eles.

Na ANOVA para os 11 ensaios (Tabela 10) verificou-se que o modelo de segunda ordem também foi significativo ($F_{\text{calc}} = 271,95 > F_{\text{tab}} = 5,05$ e $R^2 = 99,63\%$) para o X_0 , mas como o p-valor dos efeitos quadráticos de St^2 (0,67) e T^2 (0,24) foram maiores que 5%, então o modelo de primeira ordem se adequa melhor para prever os valores experimentais, o qual foi confirmado com os valores baixos de desvios relativos médios (AAD) obtidos com a predição dos valores do X_0 usando o modelo de primeira ordem (Tabela 9).

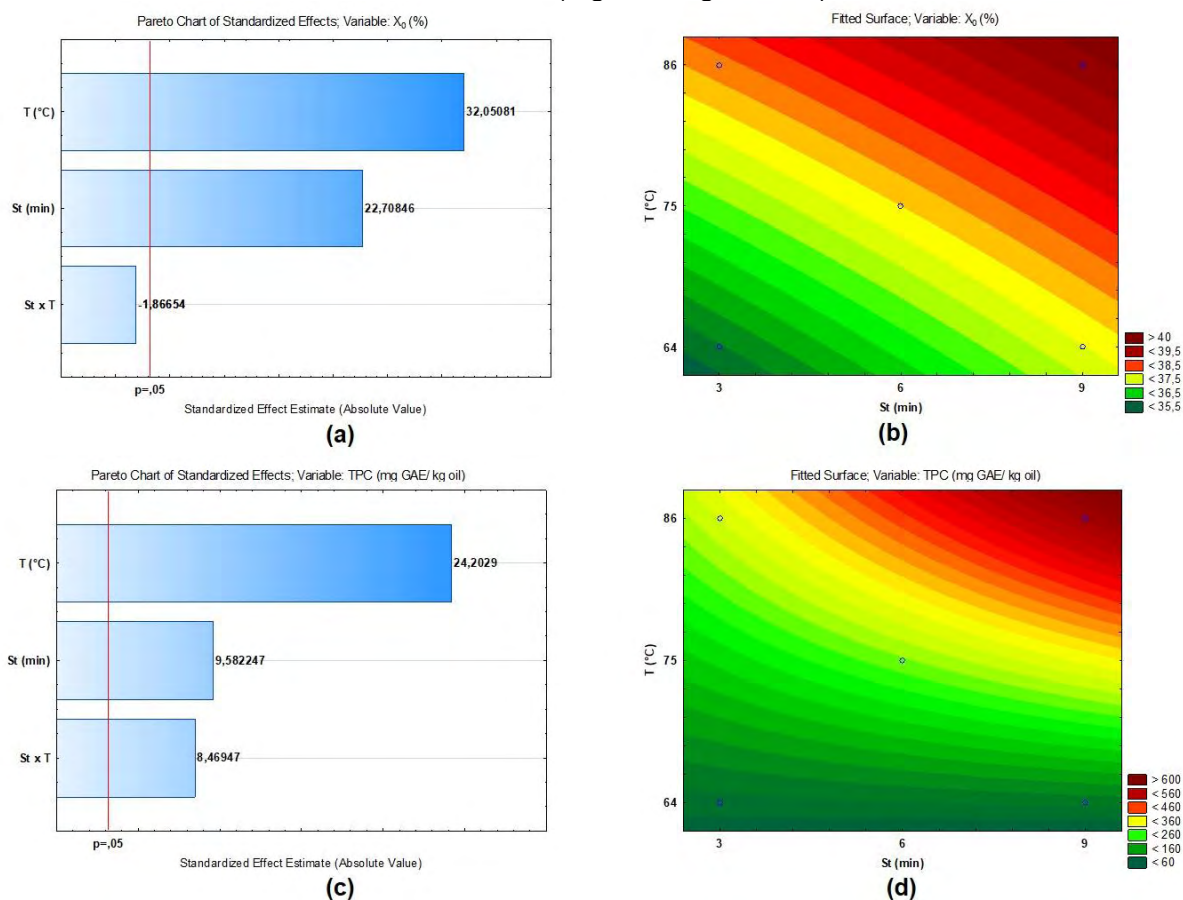
$$X_0 = 37,75 + 0,81(St) + 1,15(T) \quad (9)$$

Tabela 10 - Coeficientes de regressão, valor-p e análise de variância (ANOVA). Modelos de primeira ordem para rendimento de extração de óleo (X_0) e conteúdo de fenólicos totais (TPC) de óleo de amêndoa de pequi obtido por álcool isopropílico pressurizado.

Fontes	Coeficiente	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	Valor-F	Valor-p
Modelo	37,75082	7,944273	3	2,648091	515,4708	0,000000
A - <i>St</i> (min)	0,81381	2,649136	1	2,649136	515,674	0,000187
B - <i>T</i> (°C)	1,14861	5,277240	1	5,277240	1027,254	0,000067
AB - <i>St</i> x <i>T</i>	-0,06689	0,017898	1	0,017898	3,484	0,158797
Resíduo	-	0,015412	3	0,005137	-	-
Total	-	7,959685	6	-	-	-
R ² = 99,81%						
Modelo	276,0103	159131,77	3	53043,92	249,7773	0,000018
A - <i>St</i> (min)	69,8198	19499,2	1	19499,2	91,8195	0,002412
B - <i>T</i> (°C)	176,3514	124399,2	1	124399,2	585,7805	0,000155
AB - <i>St</i> x <i>T</i>	61,7117	15233,3	1	15233,3	71,7319	0,003456
Resíduo	-	637,1	3	212,3649	-	-
Total	-	159768,9	6	-	-	-
R ² = 99,63%						

Significância estatística $p < 0,05$; $F_{tab} = 9,28$.

Figura 16 - Diagrama de Pareto (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência de St e T no X_0 (% , massa); Diagrama de Pareto (c) e curva de contorno (d) mostrando a influência de St e T no TPC (mg EAG/kg de óleo).



Fonte: Própria autoria.

Também foi possível verificar através da curva de contorno (Figura 16b) que o maior rendimento de extração de óleo foi no St de 9 min e na T de 86 °C, o comportamento observado indica que o X_0 aumentou com o aumento do St e da T. Os efeitos de aumento do St e da T indicam que uma maior solubilidade do óleo pelo IPA ocorre em função da diminuição da viscosidade do óleo e aumentando a difusividade do solvente em função do aumento da temperatura, facilitando assim a difusão do óleo pela matriz sólida. O tempo de contato prolongado (St) possibilita a maior interação deste solvente com a matriz o que interfere positivamente na solubilidade do óleo, assim os dois efeitos em conjunto favoreceram a extração de óleo, o que acarreta em um maior rendimento X_0 . Estes dados indicam que as condições de extração otimizadas para as amêndoas de pequi são as mesmas para a castanha do Brasil.

O rendimento do óleo obtido via PLE variou de 35,74 a 39,66 % (Tabela 9) o que implica em uma recuperação de óleo de 83,79 a 92,98 % quando comparado à quantidade de lipídios presentes nas amêndoas. Na extração via Soxhlet a extração ocorre por um

período de 6 h, usando uma razão de solvente (S/F) de 200 mL de solvente/g de amostra de éter de petróleo ou hexano. Na extração com isopropanol pressurizado, um solvente polar, foram necessários apenas 27 min de extração e uma razão de solvente S/F de 5,8 mL de solvente/g de amostra para se obter uma alta porcentagem de recuperação de óleo. A alta pressão (10,35 MPa) é responsável pelo curto tempo de extração empregado na obtenção do óleo de amêndoa de Pequi porque induz o solvente a se difundir pela matriz sólida porosa.

Ensaio complementares foram realizados na condição de extração que propiciou o maior rendimento (Ensaio 4, Tabela 9) para verificar a influência do aumento do volume do solvente ou da razão S/F no resultado. Considerando que o aumento da razão S/F poderia aumentar a difusão pelo aumento da disponibilidade de solvente e consequentemente pelo seu maior poder de solvatação, outras razões foram empregadas, de 5,8, 7,5 e 15,5, no entanto, não foi observado um aumento considerável do X_0 , que resultaram em 39,66% ($\pm 0,15$), 39,90% ($\pm 0,12$) e 40,02% ($\pm 0,10$) respectivamente na condição de maior rendimento. O incremento no aumento do solvente não acarreta em considerável aumento da extração, portanto mais uma vez comprova-se a eficiência deste método na economia de solvente. Além de possibilitar altos rendimentos de extração de óleo pelo emprego de um solvente polar e seguro para a saúde (alcoól isopropílico).

3.3. Caracterização do óleo

3.3.1. Influência das variáveis do processo nos ácidos graxos livres

Os valores de ácidos graxos livre (FFA) determinados para o óleo de amêndoa de Pequi obtidos nas diferentes condições de processo (11 ensaios) são mostrados na Tabela 9. O efeito principal das variáveis do processo (St e T) na proporção de ácidos graxos livre presentes no óleo foram avaliados por análise estatística. Esta análise mostrou que St, T e a interação entre (St \times T) não tiveram influencia significativa ($p > 0,05$) sobre os ácidos graxos livres presentes nos óleos, indicando que as condições de processo empregadas (St e T) não tiveram influência na porcentagem destes ácidos graxos livres presentes no óleo. Pelo fato de ser empregado curto St, considera-se que não houve tempo para que a T empregada atuasse de uma forma desfavorável. Além disso a PLE é livre de oxigênio, o que evita oxidação do óleo. A porcentagem de ácidos graxos livres apresentados nos óleos obtidos (Tabela 9), provavelmente representam aos ácidos graxos livres provenientes nas próprias amêndoas trituradas ou gerados no pre-tratamento das mesmas. Estes valores de ácidos graxos livres presentes no óleo de amêndoa de Pequi, expressos em % de ácido

oleico, variram de 0,21 a 0,25 % (Tabela 9) e estão com valores inferiores aos óleos obtidos por Soxhlet ($0,30 \pm 0,01\%$), ou daqueles obtidos com água em altas temperaturas (0,51 KOH/g de óleo ou 0,26%) e por pressagem a frio (1,09 KOH/g de óleo ou 0,55%) (Torres et al., 2016b). Com os padrões fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os óleos prensados a frio e não refinados (4 mg KOH/g de óleo ou 2,01% expressos como ácido oleico) (Brasil, 2005) e pela Comissão do Codex Alimentarius para óleo refinado (0,6 mg KOH/g óleo ou 0,30% expressos como ácido oleico) (FAO, 1999) constata-se que o óleo da amêndoa de pequi obtido via extração com isopropanol pressurizado apresenta-se com valores conformes com os limites estabelecidos.

3.3.2. Influência das variáveis do processo no conteúdo de fenólicos totais (TPC)

Os resultados do TPC variaram de 64,23 a 589,46 mg EAG/kg de óleo para as diferentes condições de processo (11 ensaios). A análise estatística dos ensaios de 1 a 7 (Tabela 9) mostrou que o St, a T e a interação entre (St \times T) influenciaram ($p < 0,05$) na TPC, assim como pode ser observado no diagrama de pareto (Figura 16c). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 5% (Tabela 10). Esta análise indica que o modelo de primeira ordem (Eq. (10)) se ajustou bem aos dados experimentais do TPC em função das variáveis de processo (St e T). Também foi possível verificar através da curva de contorno (Figura 16d) que a maior TPC ocorreu quando o St foi de 9 min e a T de 86 °C.

Na análise estatística das variáveis do processo (St e T) para os 11 ensaios verificou-se na ANOVA que o modelo de segunda ordem não foi significativo ($F_{\text{calc}} = 2,43 < F_{\text{tab}} = 5,05$ e $R^2 = 70,85\%$) para o TPC, sendo considerado o modelo de primeira ordem como o modelo adotado para prever os valores experimentais.

$$\text{TPC} = 276,01 + 69,82(\text{St}) + 176,35(\text{T}) + 61,71(\text{St})(\text{T}) \quad (10)$$

Normalmente compostos fenólicos são extraído eficientemente usando solventes polares (Hayouni, Abedrabba, Bouix & Hamdi, 2007). Então é de esperar que o IPA usado neste estudo seria mais eficiente na extração de TPC quando comparado como a extração de óleo utilizando solventes apolares. Assim, foi possível obter valores de TPC superiores àqueles reportados por Delfan-Hosseini, Nayebzadeh, Mirmoghtadaie, Kavosi & Hosseini (2017) em óleo de semente de beldroega obtidos por extração com hexano (119,81 mg GAE/ kg de óleo), pressagem a frio (66,51 mg GAE/ kg de óleo) e pressagem a frio assistido por micro-ondas (155,65 mg GAE/ kg de óleo), e também àqueles reportados por Polari,

Garcí-Aguirre, Olmo-García, Carrasco-Pancorbo & Wang (2018) em azeite extra-virgem de oliva (228 a 273 mg Equivalente de ácido cafeico (CAE)/kg de óleo).

3.3.3. Influência das variáveis do processo no perfil de ácidos graxos (FA) e triacilgliceróis

Os resultados do perfil de ácidos graxos do óleo de amêndoa de pequi obtidos por PLE nas direntes condições de extração e por Soxhlet são mostrados na Tabela 11. Não foi observado diferença no perfil de ácidos graxos dos óleos obtidos por PLE (11 ensaios, Tabela 9). O perfil de ácidos graxos do óleo extraído por Soxhlet foi muito semelhante ao óleo obtido por PLE, o que indica que na comparação nestes dois processos não há diferenças na composição de ácidos graxos do óleo de amêndoa de pequi. A composição de FA encontrados nesta pesquisa (Tabela 11) é semelhante aos obtidos por Faria-Machado et al, (2015). Embora a porcentagem de ácido graxo oleico foi maior para composição de ácidos graxos obtidos por Torres et al, (2016a) e foi menor para a composição de ácidos graxos obtido por Lima, Silva, Trindade, Torres & Mancini-Filho, (2007), de forma geral o perfil de FA do óleo de amêndoa de pequi são similares aos encontrados nesta pesquisa. O ácido oleico (18:1 n-9, O) com 48,28 – 50,77%, o ácido palmítico (16:0, P) com 35,49 – 38,74% e ácido linoleico (18:2 n-6, L) com 8,22 – 10,92% são os ácidos graxos que estavam presentes em concentrações mais altas que os demais. A soma de FA monoinsaturados (MUFA \geq 49,30%) apresentou a maior concentração, seguida de FA saturados (SFA \geq 39,33%) e poliinsaturados (PUFA \leq 11,04%). Dietas ricas em MUFA tem demonstrado efeitos na saúde como por exemplo, melhorar os fatores de riscos metabólicos em pacientes com diabetes tipo 2 (Qian, Korat, Malik & Hu, 2016; Imamura et al., 2016).

O perfil de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de pequi são apresentados na Tabela 12. Os resultados mostraram que o óleo de amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliensis*) tem maior concentração de triacilgliceróis como OOP (31,55%), POP (29,66%), POL + PLO (12,06%), OOO (8,72%), PLP (6,13%) e OOL (4,74%) na sua composição e pequenas concentrações de outros triacilgliceróis como POS (3,30%), OOS (1,74%), LLP (1,19%) e LLO (0,91%).

Tabela 11 - Perfis de ácidos graxos (% , massa) do óleo de amêndoa de pequi obtido por extração com Soxhlet e álcool isopropílico pressurizado.

FA (Símbolo)	Soxhlet	Ensaio de extração com líquido pressurizado usando álcool isopropílico (DCCR)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
14:0 (M)	0,43	0,20	0,14	0,26	0,12	0,11	0,34	0,28	0,22	0,26	0,33	0,69
16:0 (P)	35,49	37,55	36,55	38,74	37,81	37,67	38,11	37,05	37,79	36,13	37,90	37,34
16:1(Po)	0,99	0,39	0,86	0,49	0,22	0,21	0,67	0,53	0,42	1,02	0,72	0,40
18:0 (S)	3,41	2,51	3,42	1,43	2,26	2,33	1,88	2,70	2,47	3,66	1,98	2,37
18:1n-9 (O)	48,64	49,40	48,80	50,77	49,96	49,59	49,62	49,10	49,12	48,28	50,34	50,41
18:2n-6 (L)	10,92	9,9	10,19	8,27	9,61	10,05	9,22	10,27	9,93	10,60	8,55	8,22
18:3n-3 (Ln)	0,12	0,04	0,03	0,04	0,02	0,05	0,15	0,06	0,05	0,06	0,19	0,56
SFA	39,33	40,26	40,11	40,44	40,19	40,10	40,33	40,04	40,48	40,04	40,21	40,40
MUFA	49,63	49,79	49,66	51,26	50,18	49,79	50,29	49,63	49,54	49,30	51,06	50,82
PUFA	11,04	9,95	10,23	8,31	9,63	10,11	9,37	10,33	9,98	10,66	8,74	8,78
UFA/SFA	1,54	1,48	1,49	1,47	1,49	1,49	1,48	1,50	1,47	1,50	1,49	1,48

Tabela 12 - Provável composição de triacilgliceróis do óleo de amêndoa de pequi.

Grupo (X:Y) ^a	Triacilgliceróis ^b	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Molar (%)	Massa (%)
C50:1	POP	833,37	30,37	29,66
C50:2	PLP	831,35	6,29	6,13
C52:1	POS	861,42	3,27	3,30
C52:2	OOP	859,41	31,34	31,55
C52:3	POL+ PLO	857,39	12,01	12,06
C52:4	LLP	855,38	1,19	1,19
C54:2	OOS	887,46	1,67	1,74
C54:3	OOO	885,44	8,40	8,72
C54:4	OOL	883,43	4,58	4,74
C54:5	LLO	881,41	0,88	0,91

^a X: número de carbonos (excluindo glicerol carbonos) e Y: número de duplas ligações.

^b Grupos com composição total de triacilgliceróis menor que 0,5% foram ignorados.

De forma geral a composição dos triacilgliceróis do óleo de amêndoa de pequi do presente trabalho foram semelhantes aos resultados analíticos reportados por Guedes et al, (2017) e Segall, Artz, Raslan, Ferraz & Takahashi, (2006) para o óleo de polpa de pequi (*Caryocar brasiliensis*), sendo OOP e POP os triacilgliceróis com maior concentração neste óleos. Facioli & Goncalvez, (1998) reportaram maior concentração de POP (27,6%) em relação a OOP (22,9%) para óleo de polpa de pequi. Também composição semelhante dos principais triacilgliceróis foram reportados por Dresen, Prasad and Gülz, (1989) para óleo de amêndoa de *Caryocar coriaceum*, mas com concentrações muito maiores de POP (52,8%) em relação a OOP (37,7%).

Em geral, o óleo da amêndoa de pequi pode ser considerado adequado para o consumo humano devido à proporção equilibrada de ácidos graxos saturados e insaturados e pela composição em ácidos graxos saturados e o odor agradável que esta possui, o que permite ser utilizado para a substituição parcial da manteiga do cacão na produção de chocolate.

3.3.4. Influência das variáveis do processo no conteúdo de β -sitosterol

Os resultados do conteúdo de β -sitosterol no óleo obtido nas diferentes condições foram utilizados na análise do efeito principal das variáveis do processo (St e T) através da análise estatística dos ensaios 1 a 7 (Tabela 9). Esta análise mostrou que St, T e a interação entre (St \times T) não tiveram influência ($p > 0,05$) sobre o conteúdo de β -sitosterol nos óleos. O conteúdo de β -sitosterol dos óleos analisados apresentou valores entre 3,96 a 6,33 mg/100g óleo. Matos (2007) e Torres et al, (2016a) relataram que o óleo de amêndoa de pequi obtido por presagem a frio continha conteúdo de β -sitosterol de 120 mg/100 de óleo e entre 22,09 a 27,32 mg/100g de óleo, respectivamente. Também valores de conteúdo de β -sitosterol entre 20,47 a 27,88 mg/100g de óleo obtido usando água em temperaturas próximos do ponto de ebulição foi reportado por Torres et al, (2016a). Esta diferença no conteúdo de β -sitosterol não deve ser atribuída somente ao processo empregado, mas também à influência do tipo de solo e as condições climáticas onde foi plantado o pequi.

4. Conclusões

Este estudo demonstrou que o St e a T influenciou significativamente o X_0 , o maior X_0 (39,66%, massa) ocorreu nas condições de St de 9 min e T de 86 °C, apenas um tempo de extração de 27 min foi suficiente para permitir recuperar 92,99% do óleo contido na amêndoa triturada de pequi. Também este estudo demonstrou que mesmo quando aumentou-se para quase o triplo a relação S/F ao aplicar a mesma condição de maior X_0 (St

de 9 min e T de 86 °C) na PLE. Este parâmetro (relação S/F) não causou impacto no X_0 , o que significa que menores quantidades de solventes podem ser usadas para obter o mesmo X_0 . Esses resultados confirmam que a extração exaustiva, em um processo intermitente com uma pequena quantidade de solvente, dividida em ciclos, pode ser usada como uma forma de extração, com uma economia substancial de solvente e energia no processo.

Também o St e a T influenciou significativamente o TPC, mas não influenciaram os FFA e o conteúdo de β -sitosterol. O perfil de ácidos graxos do óleo obtido com IPA pressurizado foi comparável ao obtido por Soxhlet, indicando que o processo de extração com IPA pressurizado não modificou o perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa de pequi. O principal ácido graxo e triacilglicerol no óleo de amêndoa de pequi foram o ácido oleico (ω -9) e OOP.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [projeto número 2016 / 13460-8]; o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [projeto número 306317 / 2016-8]; e o Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico e de Inovação Tecnológica (FONDECYT) [projeto número 0242-2015] para a bolsa de estudo do primeiro autor, H.P.C.S.

5. Referências bibliográfica

- ANTONIOSI, N. R. F.; LANCAS, M. F.; MENDES, O.L. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. *Chromatographia*, Heidelberg. v. 40, p. 557-562, 1995.
- ARAUJO, F. D. A Review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – An Economically Valuable Species of the Central Brazilian Cerrados. *Economic Botany*, New York, v. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International 16th Ed., Gaithersburg, MD, USA. 2005.
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 2009. AOCS, Washington, DC, USA.
- BRASIL. Resolução RDC/ANVISA/MS nº 270, 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1.

- CASTEJÓN, N.; LUNA, P.; SEÑORÁNS, F. J. Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 244, p. 75–82. 2018
- CONTE, R., et al. Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 213, p. 425–430. 2016.
- CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, Amsterdam, v. 128, p. 386 – 394, 2017
- DELFAN-HOSSEINI, S. et al. Effect of extraction process on composition, oxidative stability and rheological properties of purslane seed oil. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 222, p. 61 – 66, 2017.
- DE OLIVEIRA, N. A. et al. Green coffee extracts rich in diterpenes e Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, London, v. 224, p. 148 – 155, 2018.
- DRESEN, H.; PRASAD, R. B. N.; GÜLZ, P-G. Composition of Lipids of Piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.) Seed and Pulp Oil, *Zeitschrift für Naturforschung C*, Berlin, v. 44, n. 9-10, p. 739 – 742, 1989.
- FACIOLI, N. L., GONÇALVES, L. A. G. Modificação por Via Enzimática da Composição Triglicéridica do Óleo de Piqui (*Caryocar brasiliense* Camb), *Química Nova*, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 16-19, 1998.
- FAO. SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources, pp. 1-16. 1999. Accessed 13.11.18 <http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm>
- FARIA-MACHADO, A. F. et al. Discrimination of Pulp Oil and Kernel Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense*) by Fatty Acid Methyl Esters Fingerprinting, Using GC-FID and Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 63, p. 10064 –10069. 2015.
- GUEDES, A. M. M. et al. Length-scale Specific Crystalline Structural Changes Induced by Molecular Randomization of Pequi Oil. *Journal of Oleo Science*, Tokyo, v. 66, n. 5, p. 469-478, 2017.
- HAYOUNI, E. A. et al. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 105, p. 1126–1134, 2007.
- IMAMURA, F. et al. Effects of Saturated Fat, Polyunsaturated Fat, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: A Systematic Review and Meta-analysis

- of Randomised Controlled Feeding Trials. *PLoS Medicine*, San Francisco, v. 13, n. 7, p. 1 – 18, 2016.
- LEÃO, D. P. et al. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 225, p. 146 – 153, 2017.
- LIMA, A. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.
- MATOS, E. H. S. F. Cultivo do pequi e extração do óleo; dossiê técnico. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília - CDT/UNB: Brasília, DF (Brazil), 2007.
- MAZALLI, M. R.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, Sao Paulo, v. 62, n. 1, p. 49-54, 2003.
- MONTEDORO, G. et al. Simple and hydrolyzable in virgin olive oil. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 40, p. 1571–1576, 1992.
- OLIVEIRA, A.L. et al. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 145, p. 522 – 529, 2014.
- ORTÍZ, C. M. L.; MOYA, M. S. P.; NAVARRO, V. B. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, Maryland Heights, v. 19, p. 141 – 149, 2006.
- POLARI, J. J. et al. Impact of industrial hammer mill rotor speed on extraction efficiency and quality of extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, Amsterdam, 242, 362 – 368. 2018.
- QIAN, F. et al. Metabolic Effects of Monounsaturated Fatty Acid–Enriched Diets Compared with Carbohydrate or Polyunsaturated Fatty Acid–Enriched Diets in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes Care*, Arlington, v. 39, n. 8, p. 1448 -1457, 2016.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia Seqüencial de Experimentos. (1th ed.). Campinas: Casa do Pão, (Chapter 5), 2005.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. et al. Bioactives Obtained from Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. In E. IBÁÑEZ; A. CIFUENTES (Eds.), *Green Extraction Techniques Principles, Advances and Applications* (pp. 1 - 652) Barcelona: Elsevier B.V. 2017.

- SEGALL, S. D. et al. Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) oil by electrospray and tandem mass spectrometry, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, v. 86, p. 445 – 452, 2006.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Maryland Heights, v. 299, p. 152–178, 1999.
- TORRES, L. R. O. et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, Kidlington, v. 97, p. 205-216, 2016.
- TORRES, L.R.O. et al. Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. *International Food Research Journal*, Selangor, v. 23, n. 4, p. 1541-1551, 2016.

CAPÍTULO 4: Extração com líquido pressurizado de óleo rico em ω -3 da semente de Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. Nov.): Efeitos do processo de extração no rendimento e composição do óleo.

CAPÍTULO 4: Extração com líquido pressurizado de óleo rico em ω -3 da semente de Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. Nov.): Efeitos do processo de extração no rendimento e composição do óleo

Resumo

O óleo da amêndoa de sachá inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. Nov.), rico em ômega-3, é valorizado por sua importante atividade fisiológica benéfica para a saúde humana. O objetivo da pesquisa foi estudar os efeitos das variáveis do processo de extração com líquido pressurizado (PLE), principalmente tempo estático (St, 2-10 min) e temperatura (T, 60-90 °C), no rendimento de extração de óleo (X_0), ácidos graxos livres (FFA), conteúdo de fenólicos totais (TPC) e conteúdo de β -sitosterol, e os perfis dos ácidos graxos e triacilgliceróis foram determinados. O St e T influenciaram o X_0 e o TPC, mas não afetaram significativamente os FFA. PLE usando álcool isopropílico como solvente conseguiu recuperar 86,55% do óleo da amêndoa de sachá inchi ou 46,38% de X_0 . Os principais ácidos graxos do óleo da amêndoa de sachá inchi foram ácido linolênico (18:1n-3; 44,03 - 47,13%), ácido linoléico (18: 2n-6; 27,66 - 28,81%) e ácido oleico (18:1n-9; 13,41 - 15,43%), e os principais triacilgliceróis foram LLLn (20,20%) e LnLnL (18,64%). O conteúdo de β -sitosterol foi influenciado pela T, mas não foi influenciado pelo St e a T, este conteúdo variou de 31,71 a 57,22 mg/100 g de óleo e foi relativamente maior quando comparado à castanha do Brasil.

Palavras-chaves: sachá inchi, ômega-3, compostos fenólicos, triacilgliceróis.

Relevância industrial

O óleo de amêndoa de sachá inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) é um produto promissor para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética já que este óleo possui alto teor de ômega-3 (50 %, massa) e ômega-6 (34 %, massa), e atividade fisiológica benéfica para a saúde humana. Na América do Sul, principalmente no Peru, este óleo é processado pelas cooperativas e indústrias em pequena escala. No entanto, a técnica de extração é por prensagem (expeller). Esta técnica de extração de óleo tem alguns desvantagens como baixo rendimento de óleo, tempo de extração prolongado e contato direto com o oxigênio.

Neste trabalho, foram estudados os efeitos das condições operacionais para recuperar de forma eficientemente e rápida o óleo de amêndoa triturada de sachá inchi aplicando a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE) e usando álcool isopropílico como solvente. A PLE, aparece como uma técnica atrativa e interessante para substituir as técnicas convencionais de extração de óleo, pois esta técnica reduz o tempo de extração, evita a degradação de compostos termoláteis, utiliza quantidades menores de solventes do que as técnicas convencionais de extração de óleo. Além disso, opera com solventes em estado líquido bem acima do seu ponto de ebulição, condições que contribuem para obter um maior rendimento de óleo e um menor tempo de extração. Os conhecimentos gerados, a traves dos resultados da nossa pesquisa, fornecem uma base para futuros projetos racionais do processo de PLE e, pode ser útil para a interpretação do estudo aumento de escala do processo de extração de óleo de amêndoa de Sachá Inchi.

1. Introdução

Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) é espécie do gênero *Plukenetia* (Bussmann, Téllez & Glenn, 2009), possui características genéticas desejáveis como maior peso, tamanho (Figura 1) e teor de óleo (Chirinos, Pedreschi, Domínguez & Campos, 2015) do que a semente de *Plukenetia volubilis* (Figura 3), com um teor em torno de 52,11% (López, Cruz, & Gutiérrez, 2016). O óleo é composto principalmente por ácidos graxos insaturados, que representam 94% do total. Seus principais componentes são os ácidos α -linolênico e linoleico, que representam 84% dos ácidos graxos (Chasquibol, Del Aguila, Yacono, Guinda, Moreda, Gomez-Coca & Perez-Camino, 2014, Chirinos, Pedreschi, et al., 2015). Assim, como também o óleo possui componentes menores como fitosteróis (1,91 a 1,93 g/kg de óleo) (Chasquibol, Del Aguila, et al., 2014, Chirinos, Pedreschi, et al., 2015).

A semente de sachá inchi destaca-se com uma promissora matéria-prima para a indústria de alimentos e farmacêutica e tem grande interesse econômico na América Central e do Sul, assim como em alguns países do Sudeste Asiático, como China, Tailândia e Vietnã (Gutiérrez, Quiñones-Segura, Sanchez-Reinoso, Díaz & Abril, 2017), e pode ser processada para obter um óleo especial com importante atividade fisiológica benéfica para a saúde humana.

As matérias-primas que contêm óleo para extração podem ser divididas em oleaginosas com baixo teor de óleo (18 a 22%, base seca) ou oleaginosas com alto teor de óleo (> 22%) (Uquiche, Jeréz & Ortíz, 2008). A semente de sachá inchi (*P. huayllabambana*) pode ser classificada como oleaginosa de alto teor de óleo.

Na indústria, a extração de óleo a partir de sementes oleaginosas com alto teor de óleo, geralmente é realizada por prensagem mecânica com uma prensa hidráulica ou expeller simple, seguida de extração com n-hexano como solvente. No entanto, a prensagem mecânica apresenta alguns desvantagens como baixos rendimentos, tempo de extração prolongado e contato direto com oxigênio, e por outro lado o uso do hexano apresenta problemas de segurança na fábrica e emissões de poluentes voláteis à atmosfera (Hu et al., 2012). Além disso, o hexano não é obtido de uma fonte renovável.

Portanto, novas pesquisas envolvendo tecnologias de extração limpas que usam pressão e solvente teriam que ser propostas e estudadas para melhorar essas desvantagens. A técnica de extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico (IPA) como solvente seria uma delas. A PLE é uma das tecnologias emergentes que envolve temperaturas moderadas a altas e altas pressões o suficiente para manter o solvente no estado líquido. Estas condições favorecem a mudança nas propriedades físico-químicas dos solventes o que significa que as taxas de transferência de massa são

aumentadas, ao mesmo tempo a solubilidade dos solutos é aumentada e a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas, condição que permite que o solvente penetre com maior facilidade na matriz sólida e facilita a extração do soluto. Como consequência o processo de extração resulta mais rápido em comparação com os convencionais, além de requerer quantidades significativamente menores de solventes (Sánchez-Camargo, Ibáñez, Cifuentes, & Herrero, 2017). Por outro lado, o IPA é um solvente polar geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (FDA, 2016) para ser empregado na indústria de alimentos.

Pesquisas na PLE foram feitas usando solventes verdes como acetato de etilo (Castejón, Luna, & Señoráns, 2018, Freitas, Dariva, Jacques, & Caramão, 2013), álcool etílico (Castejón, Luna, et al., 2018, Conte et al., 2016) e água (Castejón, Luna, et al., 2018). No entanto, não são suficientes, devido a que a eficiência de extração também depende do pré-tratamento e da natureza da matriz vegetal, e da polaridade do solvente utilizado. Por exemplo alguns solvente são mais seletivos para obter óleo e alguns polifenóis e outros conseguem extrair uma mistura de compostos como carboidratos, fosfolipídios, polifenóis e óleo (Baümler, Carrín, & Carelli, 2016), e também é observado que muitas vezes os solutos de interes (óleo) não são facilmente separados por uma simples decantação em armazenamento após a evaporação do solvente a partir do extrato obtido.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi utilizar PLE com álcool isopropílico como solvente como uma técnica de extração rápida para obter o óleo rico em ômega-3 a partir da amêndoa triturada de sachá inchi (*P. huayllabambana*). O efeito das variáveis do processo, principalmente tempo de contato entre o solvente e a matriz vegetal ou tempo estático (St) e temperatura (T) no rendimento de extração de óleo (X_0), ácidos graxos livres, conteúdo de fenólicos totais e conteúdo de β -sitosterol foram estudados empregando um delinemanento composto central rotacional (DCCR), e os perfils dos ácidos graxos e triacilglicerois do óleo obtido também foram determinados.

2. Material e Métodos

2.1. Material

As amêndoas trituradas de sachá inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) foram utilizadas como matéria-prima no processo de extração de óleo. As sementes de sachá inchi (*P. huayllabambana* sp. nov.) de aproximadamente $1,94 \pm 0,8$ g foram colhidas em Janeiro de 2017 no Distrito Chirimoto, Provincia de Rodriguez de Mendoza, na Região de Amazonas, no Peru a 1.620 m sobre o nível do mar. Estas sementes foram secas em estufa

com circulação e renovação de ar forçado (MARCONI MA035/5, Piracicaba, BR) a 50 °C durante 48 h. Após este tratamento a casca ($36,08 \pm 3,89$ % em massa) da semente foi removida manualmente e a amêndoa ($63,92 \pm 3,89$ % em massa) foi triturada usando um liquidificador doméstico (Walita, Varginha, MG, BR).

O álcool isopropílico (IPA) com pureza de 99,5% e hexano com pureza de 98,5% foram da LABSYNTH (São Paulo, BR). Reagente Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, ácido gálico, hidróxido de potássio e metanol foram comprados da Êxodo Científica (Sumaré, BR). Solvente de grado HLPC/CG como metanol, etanol, isopropanol, acetonitrile e hexano foram comprados de JT Baker (Nova Iorque, EUA).

2.2. Métodos experimentais

2.2.1. Caracterização do sachá inchi

As amêndoas trituradas de sachá inchi (*P. huayllabambana* sp. nov.) foram caracterizados de acordo com os métodos padrões da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005) para umidade (método 931.04), lipídios totais (método 963.15), proteína (método 970.22), usando o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25 e cinza (método 972,15). Os carboidratos totais foram determinados por diferença. Todos os procedimentos descritos nesta seção foram realizados em duplicata.

Para caracterização física das amêndoas trituradas, o diâmetro médio das partículas foi obtido de acordo com o método S319.4 da *American Society of Agricultural and Biological Engineers* (ASABE, 2012). A densidade real (ρ_r) foi medida pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP), em São Paulo, Brasil, utilizando um picnômetro a gás hélio (Ultrapyc 1200e, Quantachrome, Boynton Beach, FL, EUA). A densidade aparente (ρ_a) e a porosidade do extrator de leite fixo (34 cm^3) foram realizadas, conforme descrito por Cornelio-Santiago, De Oliveira, Gonçalves e Oliveira (2017).

2.2.2. Planejamento experimental

O CCRD foi escolhido para avaliar as variáveis do processo PLE do óleo de pequi, devido às suas vantagens (Rodrigues & Lemma, 2005). Apenas duas variáveis do processo foram selecionadas no planejamento experimental, o tempo de contato entre a amêndoa triturada de Sachá inchi e o solvente em cada lote ou ciclo (St), e a T. A escolha dessas variáveis foi baseada no ensaio preliminar e, também, em outros dados científicos

fornechos por este grupo de pesquisa (De Oliveira, Cornelio-Santiago, Fukumasu, & Oliveira, 2018).

Um CCRD 2^2 ($2^2 + 4$ ensaios realizados sob as condições do ponto axial + 3 réplicas no ponto central) foi utilizado para avaliar a influência das variáveis independentes, St (2 a 10 min) e T (60 a 90 °C) (Tabela 13) sobre as variáveis dependentes (X_0 , FFA, TPC, conteúdo de β -sitosterol) consideradas como respostas na avaliação da PLE. O modelo polinomial completo, apresentado na Equação 11, envolvendo os principais efeitos (termos de primeira ordem), termos de interação e termos de segunda ordem foi utilizado para ajustar as respostas.

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3AB + b_4A^2 + b_5B^2 \quad (11)$$

onde Y é a variável dependente ou resposta (X_0 , FFA, TPC, conteúdo de β -sitosterol); b_0 é um coeficiente constante dos modelos; A e B representam as variáveis codificadas independentes (St e T, respectivamente), variando de -1,41 a +1,41 (Tabela 13); b_0 a b_5 são os coeficientes de regressão a serem determinados; b_1 e b_2 são os coeficientes de primeira ordem; b_3 é o coeficiente de interação e b_4 e b_5 são os coeficientes de segunda ordem do modelo de regressão.

Os resultados experimentais foram analisados utilizando o software Statistica v.12.0, para identificar os efeitos das variáveis do processo nas respostas de interesse. Para verificar a qualidade do ajuste do modelo estatístico e avaliar o efeito de cada variável um análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% foi realizada. O desvio médio absoluto (AAD) foi calculado usando a Equação 12. As superfícies de resposta e os gráficos de contorno foram construídos para visualizar os impactos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes.

$$\text{Desvio médio absoluto (\%)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (|Y_{i,exp} - Y_{i,pred}| / Y_{i,exp}) \times 100 \quad (12)$$

onde n é o número total de dados experimentais; pred é o valor previsto do modelo e exp é o valor experimental determinado em cada condição do processo de extração (i).

Tabela 13 - Matriz de CCRD com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol do óleo de amêndoa de sachá inchi obtidos por álcool isopropílico pressurizado.

Ensaio	St (min)	T (°C)	X_0 (% , massa)			Óleo recuperado (%)	TPC (mg EAG/kg óleo)			FFA (%)	β -sitosterol (mg/100 g óleo)	β -sitosterol (mg/100 g amêndoa)
	Variavel real (C)	Exp ^a	Pred	ARD (%)	Exp		Pred	AAD (%)	Exp	Exp	Exp ^a	
1	3 (-1)	64 (-1)	36,68	36,55	0,35	68,45	43,86	44,52	1,50	0,25	31,71	11,63
2	9 (1)	64 (-1)	40,70	41,15	1,11	75,95	21,68	22,34	3,04	0,25	34,21	13,92
3	3 (-1)	86 (1)	41,21	41,65	1,07	76,90	25,94	26,60	2,54	0,28	49,48	20,39
4	9 (1)	86 (1)	46,38	46,25	0,28	86,55	23,27	29,10	25,05	0,28	56,92	26,40
5*	6 (0)	75 (0)	41,32	41,40	0,19	77,10	31,71	30,64	3,37	0,28	35,49	14,67
6*	6 (0)	75 (0)	41,80	41,40	0,96	78,00	31,94	30,64	4,07	0,28	34,91	14,59
7*	6 (0)	75 (0)	41,68	41,40	0,67	77,78	30,92	30,64	0,91	0,28	35,16	14,66
8	2 (-1,41)	75 (0)	39,11	38,16	2,44	72,98	36,97	37,58	1,64	0,30	37,86	14,81
9	10 (1,41)	75 (0)	43,93	44,64	1,62	81,97	25,74	23,70	7,91	0,27	44,36	19,49
10	6 (0)	60 (-1,41)	38,98	37,80	3,02	72,74	19,77	34,57	74,88	0,25	57,22	22,30
11	6 (0)	90 (1,41)	44,08	45,00	2,08	82,25	34,75	26,71	23,15	0,30	45,55	20,08

*Ponto central; C: codificado; ^abase seca; St: tempo estático; T: temperatura; Exp: valor experimental; Pred: valor previsto por modelo; AAD: desvio médio absoluto; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA (%): Ácidos graxos livres expressos em percentagem de ácido oleico.

2.2.3. Extração com soxhlet

Para fins de comparação, os lipídios totais também foram extraídos pelo método Soxhlet, utilizando hexano como solvente, de acordo com o procedimento publicado por Cornelio-Santiago et al. (2017), foram utilizados aproximadamente 10 g de amêndoa triturada de sacha inchi e 200 mL de hexano. O óleo recuperado foi seco até peso constante e armazenado a -20 ° C, para posterior análise.

2.2.4. Extração com líquido pressurizado (PLE)

A extração do óleo (11 experimentos) foi realizada em um sistema Dionex ASE 150 (Thermo Fisher Scientific, Newington, CT, EUA) utilizando IPA como solvente. Os parâmetros do processo, incluindo a razão entre o volume de solvente e a massa da amêndoa triturada (S/F = 5,8 mL/g), pressão (P = 10,35 MP), número de batelada ou ciclo (C = 3) e tempo de purga (tP = 100 s) foram mantidos constantes. A entrada de parâmetros foi programada no painel de controle do sistema Dionex ASE 150. Aproximadamente 10 g de amêndoa triturada de sacha inchi foram carregados em uma célula de extração (34 cm³, dimensões: 2,9 cm de diâmetro interno e 5,19 cm de altura interna). Em uma das saídas da célula fechada, um filtro e papel foi instalado. A célula foi colocada no forno e o solvente foi bombeado para o extrator. Quando a T (Tabela 13) desejada do forno foi alcançada, o P foi aumentado até 10,35 MPa. Após atingir o equilíbrio T e P, o solvente permaneceu em contato com a amêndoa triturada de Sacha inchi no primeiro lote ou C, durante o tempo de contato estabelecido (St) (Tabela 13). Após esse tempo, o extrato foi coletado. Uma nova corrente de solvente puro entrou na célula de extração e o extrato foi coletado novamente após o St programado, mantendo sequencialmente as condições do processo até que o número de lotes (C = 3) fosse completado. Qualquer extrato remanescente na célula foi purgado com gás N₂ por 100 s.

Após o processo de extração, o extrato (óleo, outros compostos e solvente) foi evaporado no evaporador rotativo (MARCONI, MA-120, Piracicaba, BR) a 50 °C por 40 min. O material extraído recuperado foi seco até peso constante. O óleo foi separado do extrato por centrifugação a 4500 g e 25 °C por 20. Após a separação, o óleo recuperado foi armazenado sob congelação (-20 °C) para análises posteriores.

O rendimento de extração de óleo (X₀) foi calculado pela razão entre massa total do óleo (m_o) e massa da amêndoa triturada (fm_{db}) em base seca, de acordo com a Equação 13.

$$X_0 = (m_o / fm_{db}) \times 100 \quad (13)$$

2.2.5. Ácidos graxos livres, ácidos graxos e triacilgliceróis

Os FFA dos óleos obtidos de amêndoa de sacha inchi por PLE e Soxhlet foram determinados pelo método oficial Cd 3d-63 da American Oil Chemists 'Society (AOCS, 2009). Para determinar o perfil de FA, os óleos foram preparados como ésteres metílicos de ácidos graxos (método 991.39; AOAC, 2005) e analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (QP 2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão) baseado na adaptação do método 996.06 (AOAC, 2005) por Cornelio-Santiago et al. (2017).

O perfil de TAG do óleo de amêndoa de Sacha inchi foi determinado seguindo o procedimento descrito por Cornelio-Santiago et al. (2017) e utilizando o algoritmo estatístico sugerido por Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995).

2.2.6. Conteúdo de fenólicos totais (TPC)

A extração metanólica dos compostos fitoquímicos do óleo obtido por PLE foi realizada utilizando o procedimento detalhado por Montedoro, Servili, Baldioli e Miniati (1992) com adaptação. O óleo (0,5 g) foi misturado com metanol (0,5 mL), submetido a Vortex a 6000 rpm por 20 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min, e o sobrenadante foi recuperado. Este procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante recuperado foi misturado com água destilada (0,25 mL), submetido a Vortex a 6000 rpm por 2 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min, e o sobrenadante foi recuperado.

O TPC dos óleos foi medido pelo método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com adaptação para um volume final de solução de 3 mL. Nesta análise, 0,3 mL de extrato metanólico foi misturado com 1,364 mL de água destilada em um tubo de ensaio de 10 mL, seguido pela adição de 0,136 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Esta solução foi deixada em repouso durante 8 min à temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C). Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de solução de Na_2CO_3 a 7,5%. Após 120 min de reação à temperatura ambiente ($24 \pm 0,5$ °C), a absorbância foi lida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA). A reação do branco e o padrão foram preparadas da mesma maneira, usando 0,3 mL de metanol e água destilada (80/20, v/v) e 0,3 mL de cada concentração do padrão de ácido gálico, respectivamente, para substituir o extrato metanólico. A TPC foi calculada usando uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L (Figura A2).

2.2.7. Determinação de β -sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras foram preparadas como detalhado em outros lugares (Mazalli, Saldanha, & Bragagnolo, 2003, Ortíz, Moya, & Navarro, 2006). Aproximadamente 0,25 g de óleo foram saponificados com 20 mL de solução etanólica de KOH à 15% a temperatura ambiente por 12 h. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de solução saturada de NaCl, e a extração da fase orgânica foi realizada duas vezes usando 5 mL de n-hexano após a agitação com vortex por 5 min.

O β -Sitosterol foi quantificado, conforme descrito por Mazalli et al. (2003) usando um sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de arranjo de diodo (SPD-M20A) e uma coluna C18 (100 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 4,0 μ m) (Chromolith, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os parâmetros de condição foram ajustados como segue: temperatura do forno, 40 °C; fase móvel, acetonitrilo: isopropanol (85/15, v/v); vazão, 1,0 mL/min e um volume de injeção de 20 μ L. Os cromatogramas foram extraídos na leitura de 208 nm. O β -Sitosterol foi identificado comparando o tempo de retenção de cada amostra com o padrão de β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação feita pela correlação entre as diferentes concentrações e as áreas dos picos correspondentes foi alcançada por padronização externa, e os resultados foram expressos como mg por 100 g de óleo (Figura A3).

3. Resultados e discussões

3.1. Matéria-prima

As amêndoas trituradas de *sacha inchi* foram inicialmente caracterizadas em relação à análise centesimal e às características físicas do leito fixo de extração utilizado neste estudo. O diâmetro médio das partículas foi $0,93 \pm 0,01$ mm, e ρ_r e ρ_a foram $1,10 \pm 0,01$ e $0,41 \pm 0,01$ g/cm³, respectivamente. A porosidade do leito fixo de extração foi de 0,63. A matéria-prima apresentou um baixo teor de umidade ($1,1 \pm 0,01\%$) em relação ao relatado por Muñoz et al, (2013) (4,82 a 7,84%) e López, Cruz et al, (2016) (2,91%). O conteúdo lipídico total (extraído com éter de petróleo) foi de $53,59 \pm 0,01$ dentro da faixa encontrada por Chirinos, Pedreschi, et al, (2015), Chirinos, Zorrilla, Aguilar-Galvez, Pedreschi & Campos (2016), Muñoz et al, (2013), López, Cruz et al, (2016) e Ruiz, Díaz, Anaya & Rojas (2013) de 44,1 a 62,40%, que também usaram éter de petróleo como solvente. O teor de proteína ($28,16 \pm 0,12\%$) e o teor de cinzas ($2,60 \pm 0,12\%$) foram consistentes com os dados

fornecidos por López, Cruz et al, (2016) de 27,91% e 2,64%, respectivamente, mas baixos valores de teor de proteína (20,33 a 21,13%) foram reportados por Muñoz et al, (2013), e o carboidrato total ($15,65 \pm 0,12\%$) foi comparativamente baixo, considerando Muñoz et al, (2013) registrou um valor correspondente de 23,33 a 28,46%. Estas variações na composição entre plantas da mesma espécie podem ser explicadas por diferenças no clima, solo, práticas agrícolas, qualidade física das amostras e, principalmente, pelos métodos utilizados, bem como diferenças em quaisquer pré-tratamentos aplicados às amostras.

3.2. Rendimento de extração de óleo

A extração com soxhlet utilizando hexano como solvente também foi utilizada para determinar os lipídios totais das amêndoas trituradas de *sacha inchi*, para fins de comparação, como já mencionado na seção 2.4.1. O uso de hexano levou a um conteúdo lipídico total ligeiramente maior ($55,01 \pm 0,94\%$, base seca) do que quando se usou éter de petróleo (seção 3.1).

3.2.1. Influência das variáveis do processo na extração com líquido pressurizado (PLE)

O processo de extração com IPA pressurizado foi empregado para obter óleo das amêndoas trituradas de *sacha inchi* (*P. huayllabambana*). Na Tabela 13 são apresentados os níveis das variáveis reais (codificadas), os resultados experimentais, os valores previstos pelo modelo e os desvios relativos médios para o X_0 . De acordo com os resultados, o X_0 variou de 36,68 a 46,38 % e os maiores valores de X_0 foram obtidos quando as extrações foram realizadas nas condições dos ensaios 4 (46,38%) e 11 (44,08%) (Tabela 13).

Ao avaliar-se a influência das variáveis do processo St e T no X_0 , constatou-se na análise estatística dos efeitos principais (ensaios de 1 a 7, Tabela 13) que o efeito de interação de $St \times T$ não teve influência significativa no X_0 , mas os efeitos das variáveis independentes St e T tiveram influencia significativa ($p < 0,05$) no X_0 , como pode ser observado no diagrama de pareto (Figura 17a). Os resultados foram submetidos a ANOVA e foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 5% (Tabela 14). Assim o teste F ($F_{calc} = 138,14 > F_{tab} = 9,28$) para a modelo foi significativo ($p < 0,05$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi 99,28% (Tabela 14). Estes resultados mostram que o modelo de primeira ordem (Eq. 14) se ajustou bem aos dados experimentais do X_0 em função de St e T . Também foi possível verificar através da curva de contorno (Figura 17b) que o maior rendimento de extração de óleo foi no St de 9 min e na T de 86 °C.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão, valor-p e análise de variância (ANOVA). Modelos de primeira ordem para rendimento de extração de óleo (X_0) e conteúdo de fenólicos totais (TPC) de óleo de amêndoa de sachá inchi obtido por álcool isopropílico pressurizado.

Fontes	Coeficiente	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	Valor-F	Valor-p
Modelo	41,39571	47,50568	3	15,83523	138,1395	0,000000
A - St (min)	2,29750	21,11403	1	21,11403	184,1894	0,000865
B - T (°C)	2,55250	26,06103	1	26,06103	227,3448	0,000633
AB - $St \times T$	0,28750	0,33062	1	0,33062	2,8842	0,188015
Resíduo	-	0,34390	3	0,11463	-	-
Total	-	47,84957	6	-	-	-
$R^2 = 99.81\%$						
Modelo	30,64187	280,1605	3	93,3868	60,2224	0,000008
A - St (min)	-4,91918	96,7934	1	96,7934	62,42033	0,004227
B - T (°C)	-2,78601	31,0474	1	31,0474	20,02193	0,020805
AB - $St \times T$	6,17089	152,3196	1	152,3196	98,22819	0,002185
Resíduo	-	4,6520	3	1,5507	-	-
Total	-	284,8125	6	-	-	-
$R^2 = 98.37\%$						

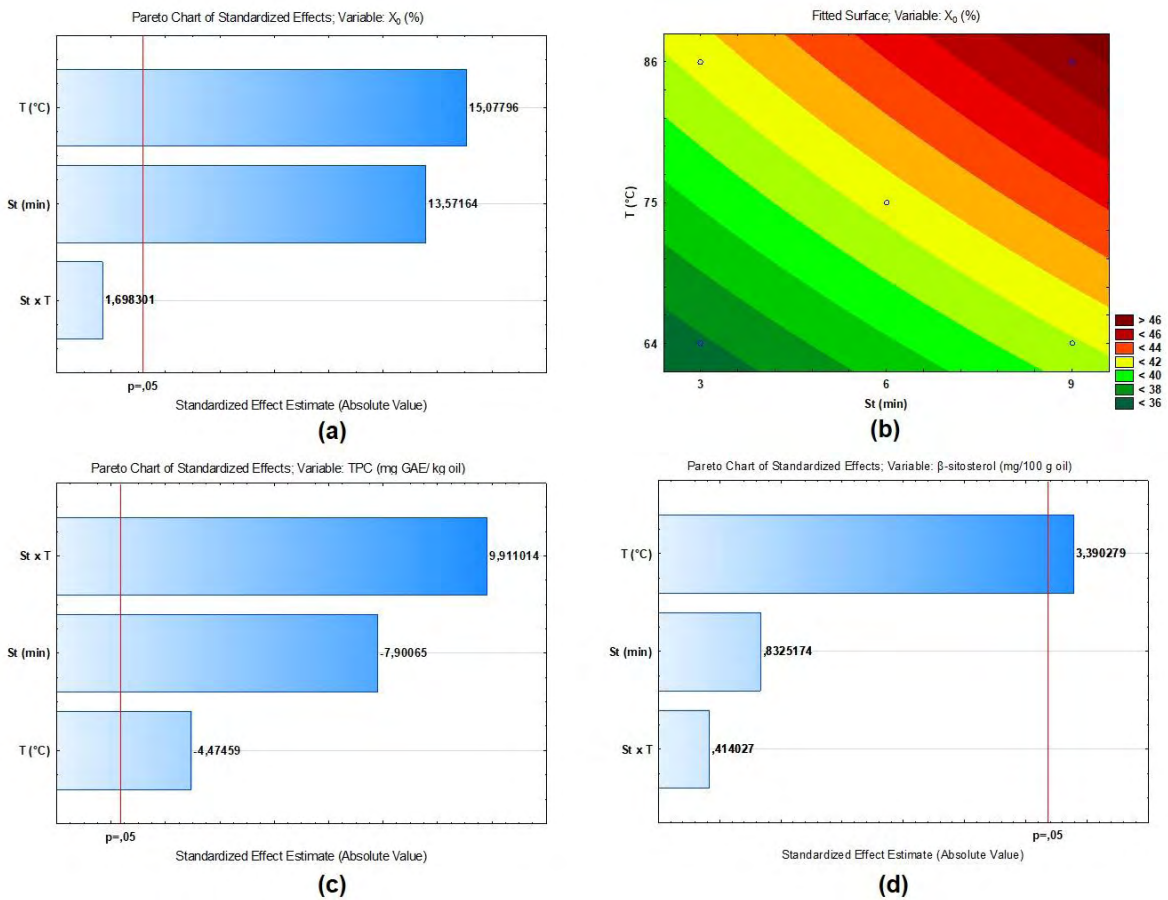
Significância estatística $p < 0,05$; $F_{tab} = 9,28$.

Na análise estatística das variáveis do processo (St e T) para os 11 ensaios (Tabela 13) verificou-se na ANOVA que o modelo de segunda ordem foi significativo ($F_{\text{calc}} = 33,92 > F_{\text{tab}} = 5,05$) e R^2 foi 97,14% para o X_0 , mas o p-valor dos efeitos quadráticos de St^2 e T^2 foram maiores que 5%, sendo considerado o modelo de primeira ordem como o modelo adequado para prever melhor os valores experimentais.

$$X_0 = 41,40 + 2,30(St) + 2,55(T) \tag{14}$$

Os rendimentos (X_0) calculados por este modelo apresentaram valores baixos de desvios relativos médios (ARD) com nível de confiança de 95%, além de um coeficiente de determinação (R^2) de 99,28%, que pode ser considerado adequado para sistemas de extração de óleo (Oliveira, Destandau, Fougère, & Lafosse, 2014).

Figura 17 – Diagrama de Pareto (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência de St e T no X_0 (% massa); Diagrama de Pareto (c) e (d) mostrando a influência de St e T no TPC (mg EAG/kg de óleo) e conteúdo de β -sitosterol (mg/100 g óleo).



Fonte: Própria autoria.

Também foi possível verificar através da curva de contorno (Figura 17b) que o X_0 mais

alto foi obtido usando um St de 9 min e T de 86 ° C. O comportamento observado enfatizou que o X_0 aumentou com o aumento de St e T. Os efeitos do aumento de St e T indicam que uma maior solubilidade do óleo pelo IPA ocorre quando há uma diminuição da viscosidade do óleo e aumento da difusividade do solvente em função do aumento da temperatura, por sua vez, facilitando a difusão do óleo através da matriz sólida. O tempo de contato prolongado (St) permite uma maior interação deste solvente com a matriz, o que interfere positivamente na solubilidade do óleo. Assim, juntos, os dois efeitos favorecem a extração do óleo, o que resulta em um X_0 maior.

O X_0 obtido via PLE variou de 36,68 a 46,38% (Tabela 13), o que implicou uma recuperação de óleo de 68,45-86,55% quando comparado com o conteúdo lipídico da amêndoa triturada de sacha inchi ($53,59 \pm 0,01$). A extração com Soxhlet levou 6 horas quando se utilizou uma relação S/F de 200 mL de solvente (éter de petróleo ou hexano) /10 g de amêndoa triturada de sacha inchi. Em comparação, apenas 27 minutos de extração foram necessários para a extração com IPA pressurizado (um solvente polar), e uma relação S/F de 5,8 mL de solvente/g de de amêndoa triturada de sacha inchi permitiu obter uma alta porcentagem de recuperação de óleo. A alta pressão (10,35 MPa) é responsável pelo curto tempo de extração utilizado para obtenção do óleo da amêndoa triturada de sacha inchi, pois induz o solvente a se difundir através da matriz sólida porosa.

Testes complementares foram conduzidos sob a condição de extração que proporcionou o maior rendimento (ensaio 4, Tabela 13), para verificar a influência do aumento do volume de solvente ou relação S/F no X_0 . Considerando que o aumento da relação S/F poderia aumentar a difusão, devido ao aumento da disponibilidade de solventes e, conseqüentemente, seu maior poder de solvatação, foram utilizadas várias relações S/F (5,8, 7,5 e 15,5). No entanto, os valores X_0 resultantes de $46,25 \pm 0,25\%$, $46,64 \pm 0,28\%$ e $46,95 \pm 0,31\%$ para S/F 5,8, 7,5 e 15,5, respectivamente, não confirmaram um aumento considerável em X_0 sob a condição de extração examinada. Uma vez que o aumento da quantidade do solvente não leva a um aumento acentuado na extração de óleo para esta condição de processo, ele afirma a eficiência da economia de solvente durante a extração usando este método. Além disso, permite um alto X_0 pelo uso de um solvente polar, não tóxico (IPA).

3.3. Caracterização do óleo

3.3.1. Influência das variáveis do processo nos ácidos graxos livres

Os valores de ácidos graxos livres expressos como porcentagem de ácido oleico foram determinados para os óleos obtidos nas condições de processo dos 11 ensaios (DCCR) e são mostrados na Tabela 13. A porcentagem de ácidos graxos livres variou de 0,25 a 0,30% (expressos como ácido oleico) para os 11 ensaios. A análise estatística aplicada para avaliar os principais efeitos das variáveis do processo (St e T) na quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo (ensaios 1 a 7, Tabela 13) mostrou que St, T e a interação entre (St × T) não tiveram influência significativa ($p > 0,05$) nos ácidos graxos livres presentes no óleo. Para estas condições de processo empregadas, o St e a T não tiveram influência direta na porcentagem de ácidos graxos livres, provavelmente devido ao curto St, não dando tempo da T empregada atuar de uma forma desfavorável. Além disso, o sistema PLE fica livre de oxigênio. O que dá para afirmar que a porcentagem de ácidos graxos apresentados nos óleos obtidos (Tabela 13), representam aos ácidos graxos livres provenientes das amêndoas trituradas ou gerados no pre-tratamento das mesmas. Os valores de porcentagem de ácidos graxos livres nos óleos de amêndoa de sachá inchi obtidos nesta pesquisa estão dentro do limite (4 mg KOH/g óleo ou 2,01% expressado como ácido oleico) estabelecido pela Comissão do Codex Alimentarius para óleo prensado a frio e óleo virgem e também dentro dos limites estabelecidos para óleo refinado (0,6 mg KOH/g óleo ou 0,30% expressado como ácido oleico) (FAO, 1999). Também valores semelhantes de ácidos graxos livres foram determinados por Chirinos, Pedreschi, et al. (2015) (0,15 % expressado como ácido oleico) e Chirinos, Zorrilla, et al. (2016) (0,33% expressado como ácido oleico) para óleo de *P. huayllabambana* extraídos por Soxhlet usando éter de petróleo como solvente.

3.3.2. Influência das variáveis do processo no conteúdo de fenólicos totais (TPC)

Os resultados do TPC (Tabela 13) mostraram uma variação de 21,68 a 43,86 mg EGA/kg de óleo. A análise estatística dos efeitos principais das variáveis St e T para os ensaios de 1 a 7 (Tabela 13) mostrou que o St, a T e a interação entre St e T influenciaram significativamente ($p < 0,05$) no TPC, assim como é mostrado no diagrama de Pareto (Figura 17c). Também a ANOVA para os ensaios 1 a 7 mostrou que o teste F ($F_{\text{calc}} = 60,22 > F_{\text{tab}} = 9,28$) indicou que o modelo de primeira ordem foi significativo ($p < 0,05$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi 98,37% (Tabela 14). Estes resultados afirmam que este modelo (Eq. 15) se ajustou bem aos dados experimentais do TPC em função de St e T.

$$\text{TPC (mg EAG/kg de óleo)} = 30,64 - 4,92(\text{St}) - 2,79(\text{T}) + 6,17(\text{St})(\text{T}) \quad (15)$$

O TPC obtido neste estudo foi semelhante ao valor de 62,0 mg EAG/kg de óleo encontrado no óleo prensado das amêndoas de *P. volubilis* (Fanali et al., 2011). Embora o solvente IPA utilizado neste estudo foi de baixa polaridade comparado com a água, acetona ou o metanol as condições de extração utilizadas para obter o óleo ajudaram obter valores de TPC semelhantes ao encontrado no óleo prensado das amêndoas de *P. volubilis*. De uma forma geral, é esperado ter baixas concentrações de compostos fenólicos na maioria dos óleos vegetais, mas no óleo de amêndoa de sacha inchi obtidos usando IPA pressurizado foi possível obter valores de TPC superiores àquelas obtidas por Siger, Nogala-Kalucka e Lampart-Szczapa (2008) em óleo prensado de sementes de abóbora (24,6 mg equivalente de ácido cafeico (EAC)/kg de óleo), cânhamo (24,5 mg EAC/kg de óleo), soja (14,8 mg EAC/kg de óleo), farelo de arroz (14,4 mg EAC/kg de óleo), colza (13,1 mg EAC/kg de óleo), milho (12,6 mg EAC/kg de óleo), girassol (12,0 mg EAC/kg de óleo), linho (11,4 mg EAC/kg de óleo) e semente de uva (14,8 mg EAC/kg de óleo).

3.3.3. Influência das variáveis do processo no perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis

O perfil dos FA do óleo de amêndoa de sacha inchi obtidos por PLE usando IPA como solvente nas 11 condições do DCCR (Tabela 13) e Soxhlet são mostrados na Tabela 15. Estes resultados mostraram que o perfil dos FA para o óleo extraído por PLE é muito semelhante ao do óleo extraído por Soxhlet, indicando que o processo de PLE não interfere na composição dos ácidos graxos (ácido linolênico (18:3 n-3) (Ln) com 44,03 – 47,13%, ácido linoleico (18:2 n-6) (L) com 27,66 - 28,81%, ácido oleico (O) com 13,41 – 15,07%, palmítico (16:0) (P) com 7,61 – 9,48% e ácido esteárico (18:0) (S) com 3,04 – 3,69%) presente neste óleo. Esta composição de FA é similar aos obtidos por Chasquibol, Del Aguila, et al, (2014), Chirinos, Pedreschi, et al, (2015) e Muñoz et al, 2013. Embora a porcentagem de ácido palmítico foi maior no óleo estudo, de forma geral o óleo de amêndoa de sacha inchi apresentou maior porcentagem dos FA poliinsaturados (PUFA \leq 75,68%), seguida de FA monoinsaturados (MUFA \leq 15,43%) e saturados (SFA \leq 12,89%). Em geral, o óleo de amêndoa de sacha inchi pode ser considerado adequado para consumo humano devido à alto porcentagem de ácido linolênico presente no óleo o que faz dele um óleo recomendado para a prevenção primária da doença cardíaca coronária (Aranceta; Pérez-Rodrigo, 2012) e pode também melhorar os fatores de riscos metabólicos em pacientes com diabetes tipo 2 (Imamura et al., 2016; Qian, Korat, Malik & Hu, 2016).

O perfil dos triacilglireóis do óleo de sacha inchi são apresentados na Tabela 16. Os principais triacilgliceróis presentes no óleo de amêndoa de sacha inchi são o LLLn (20,20%), LnLnL (18,64), OLLn + OLnL + LnOL (15,16) e LnLnLn (10,42%). Composição de

triacilgliceróis, determinados por métodos analíticos, semelhantes ao óleo de amêndoa de saccha inchi (*P. huayllabambana* sp. Nov.) do presente estudo foram relatado por Chasquibol, Del Aguila, et al, (2014), no entanto o triacilglicerol LnLnLn foi menor neste estudo. Outros estudos onde determinarm a composição de triacilgliceróis, por métodos analíticos, para óleo de amêndoa de saccha inchi (*P. volubilis*) também foram muitos semelhantes na composição e na porcentagem dos triacilgliceróis principais (LnLLn: 22,2%; LLnL: 18,2%; LnLnLn: 12,3%) (Fanali et al., 2011) presentes no óleo deste estudo.

3.3.4. Influência das variáveis do processo no conteúdo de β -sitosterol

Os valores da concentração de β -sitosterol no óleo de saccha inchi obtido via PLE nas diferentes condições do DCCR são mostrados na Tabela 13. Estes valores variaram entre 31,71 a 57,22 mg/100g de óleo. A análise estatística mostrou que a T teve uma influencia signitificativa ($p < 0,05$) sobre a concentração de β -sitosterol presente no óleo quando foram avaliados os efeitos principais das variáveis St e T para os ensaios 1 a 7 (Tabela 13). Esta influência também pode ser observada no diagrama de pareto (Figura 17d). Embora tenha ocorrido uma influencia da T na concentração de β -sitosterol presente no óleo, a ANOVA para os ensaios 1 a 7 (Tabela 13) mostrou que o teste F ($F_{\text{calc}} = 4,12 < F_{\text{tab}} = 9,28$) foi não significativo e o coeficiente de determinação (R^2) foi 80,47%. Estes resultados indicam que o modelo de primeira ordem não se ajustam bem aos dados experimentais da concentração de β -sitosterol. Teores maiores de β -sitosterol (111,16 a 116,07 mg/ 100 g de óleo) foram encontrados para óleo de saccha inchi obtido por prensagem a frio (Chasquibol, Del Aguila, et al., 2014), e para óleo extraído por sohxlet usando Hexano como solvente foi 127,2 mg/100g de óleo (Chirinos, Pedreschi, et al., 2015) analisado por GC e de 208,5 a 237,5 mg/100g de amêndoa seca (Muñoz et al., 2013) analisados por HPLC.

Tabela 15 - Perfis de ácidos graxos (% massa) do óleo de amêndoa de sachá inchi obtido por extração com Soxhlet e álcool isopropílico pressurizado.

FA (Símbolo)	Soxhlet	Ensaio de extração com líquido pressurizado usando álcool isopropílico (DCCR)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
16:0 (P)	7,61	8,89	8,48	9,48	7,77	8,17	7,96	8,15	7,82	7,91	8,08	8,48
18:0 (S)	3,37	3,45	3,69	3,41	3,04	3,44	3,08	3,50	3,08	3,19	3,44	3,53
18:1n-9 (O)	14,22	15,07	14,70	15,43	13,82	14,19	13,67	13,42	13,43	13,58	13,41	14,31
18:2n-6 (L)	28,64	28,00	28,21	27,66	28,25	28,30	28,72	28,48	28,78	28,81	28,60	28,17
18:3n-3 (Ln)	46,16	44,59	44,91	44,03	47,13	45,91	46,57	46,46	46,89	46,51	46,47	45,50
SFA	10,98	12,34	12,18	12,89	10,80	11,61	11,04	11,64	10,90	11,10	11,52	12,01
MUFA	14,22	15,07	14,70	15,43	13,82	14,19	13,67	13,42	13,43	13,58	13,41	14,31
PUFA	74,80	72,59	73,12	71,68	75,38	74,20	75,29	74,94	75,68	75,32	75,07	73,67
UFA/SFA	8,11	7,10	7,21	6,76	8,26	7,61	8,06	7,59	8,18	8,01	7,68	7,32

Tabela 16 - Provável composição de triacilgliceróis do óleo de amêndoa de sachá inchi.

Grupo (X:Y) ^a	Triacilgliceróis ^b	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Molar (%)	Massa (%)
50:3	PLnP	829,34	0,86	0,82
52:2	OOP	859,41	0,86	0,85
52:3	PLO + POL	857,39	2,66	2,61
52:4	LLP	855,38	5,57	5,46
52:5	PLLn + PLnL	853,36	7,11	6,95
52:6	LnLnP	851,34	5,97	5,83
54:3	SLO + SOL	885,44	1,08	1,10
54:4	OOL	883,43	3,51	3,56
54:5	LLO	881,41	8,31	8,40
54:6	OLLn + OLnL + LnOL	879,40	15,03	15,16
54:7	LLLn	877,38	20,07	20,20
54:8	LnLnL	875,37	18,57	18,64
54:9	LnLnLn	873,35	10,40	10,42

^a X: número de carbonos (excluindo glicerol carbonos) e Y: número de duplas ligações.

^b Grupos com composição total de triacilgliceróis menor que 0,5% foram ignorados.

4. Conclusões

Este estudo demonstrou que o St e a T influenciou significativamente o X_0 e o TPC, o maior X_0 (46,38%, massa) ocorreu nas condições de St de 9 min e T de 86 °C, apenas um tempo de extração de 27 min foi suficiente para permitir recuperar 86,55% do óleo contido na amêndoa triturada de pequi. Também este estudo demonstrou que mesmo quando aumentou-se para quase o triplo a relação S/F ao aplicar a mesma condição de maior X_0 (St de 9 min e T de 86 °C) na PLE. Este parâmetro (relação S/F) não causou impacto no X_0 , o que significa que menores quantidades de solventes podem ser usadas para obter o mesmo X_0 . Esses resultados confirmam que a extração exaustiva, em um processo intermitente com uma pequena quantidade de solvente, dividida em ciclos, pode ser usada como uma forma de extração, com uma economia substancial de solvente e energia no processo.

Também a T influenciou significativamente o conteúdo de β -sitosterol, mas o St e a T não influenciou os FFA. O perfil de ácidos graxos do óleo obtido com IPA pressurizado foi comparável ao obtido por Soxhlet, indicando que o processo de extração com IPA pressurizado não modificou o perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa de sacha inchi. O principal ácido graxo e triacilglicerol no óleo de amêndoa de pequi foram o ácido linolênico (ω -3) e LLLn.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [projeto número 2016 / 13460-8]; o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [projeto número 306317 / 2016-8]; e o Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico e de Inovação Tecnológica (FONDECYT) [projeto número 0242-2015] para a bolsa de estudo do primeiro autor, H.P.C.S.

5. Referências bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Washington, DC, USA, 2009.

AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL ENGINEERS. Method of Determining and Expressing fineness of Feed Materials by Sievieng. ANSI/ASAE, method S319.4, 2012.

- ANTONIOSI, N. R. F.; LANCAS, M. F.; MENDES, O. L. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. *Chromatographia*, Heidelberg, v. 40, p. 557-562, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Ed., Gaithersburg, MD, USA. 2005.
- BAÜMLER, E. R.; CARRÍN, M. E.; CARELLI, A. A. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, London, 178, 190-197, 2016.
- BUSSMANN, R. W.; TÉLLEZ, C.; GLENN, A. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany*, West Sussex, 27, 313-315, 2009.
- CASTEJÓN, N.; LUNA, P.; SEÑORÁNS, F. J. Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents, *Food Chemistry*, Amsterdam, 244, 75–82, 2018.
- CHASQUIBOL, N. A. et al. Characterization of Glyceridic and Unsaponifiable Compounds of Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana* L.) Oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 62, p. 10162–10169, 2014.
- CHIRINOS, R. et al. Comparison of the physico-chemical and phytochemical characteristics of the oil of two *Plukenetia* species. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 173, p. 1203 – 1206, 2015.
- CHIRINOS, R. et al. Impact of Roasting on Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols, and Phenolic Compounds Present in *Plukenetia huayllabambana* Seed. *Journal of Chemistry*, Nottingham, v. 1, p. 1-10, 2016.
- CONTE, R. et al. Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 213, p. 425–430, 2016.
- CORNELIO-SANTIAGO, H.P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, Amsterdam, v. 128, p. 386 – 394. (2017).
- DE OLIVEIRA, N. A. et al. Green coffee extracts rich in diterpenes e Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, London, v. 224, p. 148 – 155, 2018.
- FANALI, C. Et al. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 59, p. 13043–13049, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS. (1999). SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources, pp. 1-16. Accessed 13.11.18 <http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm>

- FDA. Food and Drug Administration, 2016. Subchapter B – Food for Human Consumption: Isopropyl alcohol. Sec. 173.240.
- FREITAS, L.S. et al. Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of brazilian grape seed oil. *Separation and Purification Technology*, Kidlington, v. 116, p. 313 – 318, 2013
- GUTIÉRREZ, L. F. et al. Physicochemical properties of oils extracted from γ -irradiated sachachi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *Food chemistry*, Amsterdam, v. 237, p. 581-587, 2017.
- HU, A. et al. Optimizations and comparison of two supercritical extractions of adlay oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Amsterdam, v. 13, p. 128-133, 2012.
- IMAMURA, F. et al. Effects of Saturated Fat, Polyunsaturated Fat, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomised Controlled Feeding Trials. *PLoS Medicine*, San Francisco, v. 13, n. 7, p. 1 – 18, 2016.
- LÓPEZ, K.; CRUZ, C. S.; GUTIÉRREZ, A. Protein profile of “Sacha Inchi” seeds (*Plukenetia volubilis* L. and *Plukenetia huayllabambana* Bussmann, Téllez & Glenn). *The Biologist*, Lima, v. 14, n. 1, p. 11-20, 2016
- MAZALLI, M. R.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, Sao Paulo, v. 62, n. 1, p. 49-54, 2003.
- MONTEDORO, G. et al. Simple and hydrolyzable in virgin olive oil. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 40, p. 1571–1576, 1992.
- MUÑOZ, J. A. M. et al. Estudio Nutricional de *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, Lima, v. 79, n. 1, p. 47-56, 2013.
- OLIVEIRA, A.L. et al. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 145, p. 522 – 529, 2014
- ORTÍZ, C. M. L.; MOYA, M. S. P.; NAVARRO, V. B. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, Maryland Heights, v. 19, p. 141 – 149, 2006.
- QIAN, F. et al. Metabolic Effects of Monounsaturated Fatty Acid–Enriched Diets Compared with Carbohydrate or Polyunsaturated Fatty Acid–Enriched Diets in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes Care*, Arlington, v. 39, n. 8, p. 1448 -1457, 2016.

- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. 2005. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia Seqüencial de Experimentos. (1th ed.). Campinas: Casa do Pão, (Chapter 5).
- RUIZ, C. et al. Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). Revista Sociedad Química del Perú, Lima, v. 79, n. 1, p. 29-36, 2013.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. et al. Bioactives Obtained from Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. In E. IBÁÑEZ; A. CIFUENTES (Eds.), Green Extraction Techniques Principles, Advances and Applications (pp. 1 - 652) Barcelona: Elsevier B.V. 2017
- SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. Journal of Food Lipids, Malden, v. 15, n. 137 – 149, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, Maryland Heights, v. 299, n. 152–178, 1999.
- UQUICHE, E.; JERÉZ, M.; ORTÍZ, J. Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol). Innovative Food Science & Emerging Technologies, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 495-500, 2008.

CAPÍTULO 5: Extração com CO₂ supercrítico de óleo de amêndoa de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.): Efeito das variáveis do processo e composição do óleo

CAPÍTULO 5: Extração com CO₂ supercrítico de óleo de amêndoa de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e sachá inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.): Efeito das variáveis do processo e composição do óleo

Resumo

O óleo da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi atualmente são os principais produtos de interesse comercial de diversos setores da indústria, principalmente pelo seu importante benefício para a saúde humana. O objetivo da pesquisa foi estudar os efeitos das variáveis do processo de extração com CO₂ supercrítico: T (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e pressão (P, 25 e 35 MPa) no rendimento da extração do óleo (X_0) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, e nos ácidos graxos livres (FFA), conteúdo de fenólicos totais (TPC) e conteúdo de β -sitosterol. O maior X_0 (% massa) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi foram $67,51 \pm 0,16\%$, $40,47\%$ e $48,84\%$ sob as condições de 70 °C e 35 MPa, 60 °C e 35 MPa e 80°C a 35 MPa, respectivamente; e a T e a P não influenciaram o FFA ($0,27 \pm 0,01$ a $0,32 \pm 0,01$; 0,21 a 0,25 e 0,25 a 0,31), mas a T e a P teve influência sobre o TPC ($6,37 \pm 0,23$ a $43,83 \pm 0,35$; 85,21 a 154,35 e 6,37 a 48,35 mg EAG/kg de óleo) e o conteúdo de β -sitosterol ($15,52 \pm 1,67$ a $23,63 \pm 3,12$; 3,91 a 6,44 e 46,58 a 253,67 mg/100 g de óleo) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, respectivamente.

Palavras-chaves: CO₂ supercrítico; castanha do Brasil; pequi; sachá inchi; óleo; β -sitosterol.

1. Introdução

O óleo da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sacha inchi atualmente são os principais produtos de interesse comercial de diversos setores da indústria, principalmente pelo seu importante benefício para a saúde humana.

Os gêneros *Bertholletia*, *Plukenetia* e *Caryocar* são consideradas uma boa fonte de lipídios, proteínas, minerais e vitaminas, e de outros compostos bioativos como os ácidos graxos essenciais (Omega-3 e -6), os polifenóis e os fitoesteróis. Estes compostos são frequentemente associados às atividades fisiológicas benéficas para a saúde humana, como antioxidantes, antiinflamatórios, anti-câncer, controle de glicemia e peso, cardio-protetores e redutores do risco de diabetes tipo 2 (ARANCETA; PÉREZ-RODRIGO, 2012; CARDOSO et al., 2017; DESAI; DONG; MILLER, 2016; DUTRA et al., 2016; IMAMURA et al., 2016; QIAN et al., 2016; SHAHZAD et al., 2017; YANG, 2009).

A prensagem ao frio é a técnica de extração que tradicionalmente utiliza as pequenas indústrias no Brasil, no Peru e na Colômbia para obter o óleo, a preocupação nos últimos anos dos empresários vinculados com esta atividade está relacionado com a desvantagem que possui esta técnica de extração como por exemplo o baixo rendimento do óleo e a qualidade do produto obtido.

A extração com dióxido de carbono supercrítico é uma técnica que está sendo utilizada industrialmente para a extração de óleo de gergelim na Korea, por exemplo (NATEX, 2018). O dióxido de carbono é frequentemente promovido como um solvente sustentável devido às suas propriedades únicas e numerosas vantagens incluindo ser não explosivo, não inflamável, ter baixa toxicidade relativa, baixo custo, abundância natural, fácil remoção dos materiais extraídos, além de ter baixa polaridade e geralmente reconhecido como seguro (GRAS) para uso em produtos alimentícios (CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

Estudo de extração do óleo da amêndoa de *Plukenetia volubilis* usando dióxido de carbono supercrítico como solvente foram realizados por Follegatti-Romero et al. (2009). Neste estudo eles usaram 5 g de amostra nas condições de temperatura de 40, 50 e 60 °C e pressão de 30 e 40 MPa, e nas condições constante de vazão de $0,4 \times 10^{-4}$ kg CO₂/s e o tamanho de partícula de 0,84 mm durante 270,83 min.

Santos et al. (2013) estudaram a extração do óleo de amêndoa de castanha do Brasil usando dióxido de carbono supercrítico como solvente sob as condições de temperatura de 40, 50 e 60 °C e pressão de 20, 25 e 30 MPa, e uma vazão constante de 7,04 g/min ($1,173 \times 10^{-4}$ kg CO₂/s) durante 120 min, e tiveram como resultado o maior rendimento do óleo na condição de 60 °C e 30 MPa. No entanto, a utilização de maior vazão de solvente pode

reduzir o tempo de extração do óleo de matérias-primas com teor de óleo maior de 50% quando é empregado um mesmo ou maior tamanho de partícula em condições de temperatura e pressão semelhantes.

Estudos de extração do óleo de amêndoa de pequi usando CO₂ supercrítico como solvente é escasso na literatura científica.

Neste contexto, o objetivo da pesquisa foi estudar o efeito da temperatura (T, 40, 50, 60, 70 e 80 °C) e pressão (P, 25 e 35 MPa) no rendimento da extração de óleo (X₀) da amêndoa triturada de castanha do Brasil, pequi e sacha inchi, e caracterizar óleo obtido em termos de FFA, CPT e conteúdo de b-sitosterol.

2. Material e métodos

2.1. Matéria-prima e solvente

As amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) de qualidade de exportação (20 kg), fornecido pela Indústria Comércio Importações e Exportações de Cereais RR Ltda. proveniente de Humaitá, região Amazônia, da safra 2016 foram usadas neste estudo. As amêndoas (aproximadamente 500 g) foram trituradas em liquidificador doméstico Walita (Philips), passadas por peneira Tyler (mesh 10; Ø = 1,7 mm), envasadas em sacos plásticos de polietileno de alta densidade (partículas com tamanho < 1,7 mm e > 1,7 mm) e armazenadas no congelador “frost free” (BVR28GGBNA BRASTEMP, Joinville, Brasil) à - 20 °C até ser utilizadas.

Os frutos de Pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) do Cerrado Brasileiro (Região do estado de Goiás), da safra de 2016, foram adquiridos pela Comercio e Distribuidora de Frutas Nativas e Exóticas Ltda - CEAGESP e processados na Planta Piloto do ZEA na FZEA-USP. O exocarpo (casca externa verde), mesocarpo (parte interna amarelada da casca) e endocarpo (polpa laranja-amarelada) foram manualmente separados, e a camada de espinhos finos que penetra no endocarpo foi removida por lavagem constante com água e abrasão mecânica (METVISA, Brusque, BR). No Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN), as sementes foram secas em estufa com circulação e renovação de ar forçado (MARCONI MA035/5, Piracicaba, BR) a 50 °C por 48 h e as cascas das sementes foram separadas manualmente. As amêndoas foram trituradas com o uso de um liquidificador doméstico (Walita, Varginha, MG), e as amêndoas trituradas foram utilizados no processo de extração.

As sementes de sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) de aproximadamente 1,94 ± 0,8 g foram colhidas em Janeiro de 2017 no Distrito Chirimoto,

Provincia de Rodriguez de Mendoza, na Região de Amazonas, no Peru a 1620 m sobre o nível do mar. Estas sementes foram secas em estufa com circulação de ar forçada (MARCONI MA035/5, Piracicaba, BR) a 50 °C durante 48 h. Após este tratamento a casca ($33,83 \pm 0,80\%$ em massa) da semente foi removida e a amêndoa ($66,17 \pm 0,80\%$ em massa) foi triturada usando um liquificador doméstico (Walita, São Paulo, BR). As amêndoas trituradas foram utilizadas no processo de extração.

O solvente utilizado na extração com fluido supercrítico foi o dióxido de carbono (Linde, Sertãozinho, BR), com 99,0% de pureza e nas extrações à pressão atmosférica usou-se hexano e éter de petróleo (Synth, São Paulo, BR) com 98,5 % e 98 % de pureza, respectivamente. Os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2. Extração com dióxido de carbono supercrítico

Os experimentos foram realizados na unidade SFE-2, um sistema SFE-500 (Thar SCF Waters, Milford, EUA), descrito por Cornelio-Santiago et al. 2017 (Figura 18). A unidade SFE-2, consiste basicamente de um cilindro com CO₂ (1), um banho de resfriamento (Thermo Fisher Scientific, Newington, EUA) (2), um medidor de vazão (3), uma bomba de alta pressão (4), uma bomba de co-solvente (5), uma frasco de vidro de co-solvente (6), válvulas de regulagem tipo agulha (a) e (b), um misturador de solvente (7), um trocador de calor (8), um cesto de extração de 290 cm³ (dimensões: 4,43 cm de diâmetro interno e 18,8 cm de altura interna) (9), um termóstato (c), um manómetro de tipo Bourdon (d), um regulador de contrapressão automatizado (ABPR), um frasco coletor de vidro (25 mL) (11) e um software Thar SFC (12). Embora esta unidade seja capaz de usar co-solvente no processo de extração, este estudo apenas usou CO₂ como solvente.

As sementes secas e trituradas foram acondicionadas entre esferas de vidro inertes da forma como se visualiza na Figura 18B. Em cada extração, acondicionou-se 10 g de sementes.

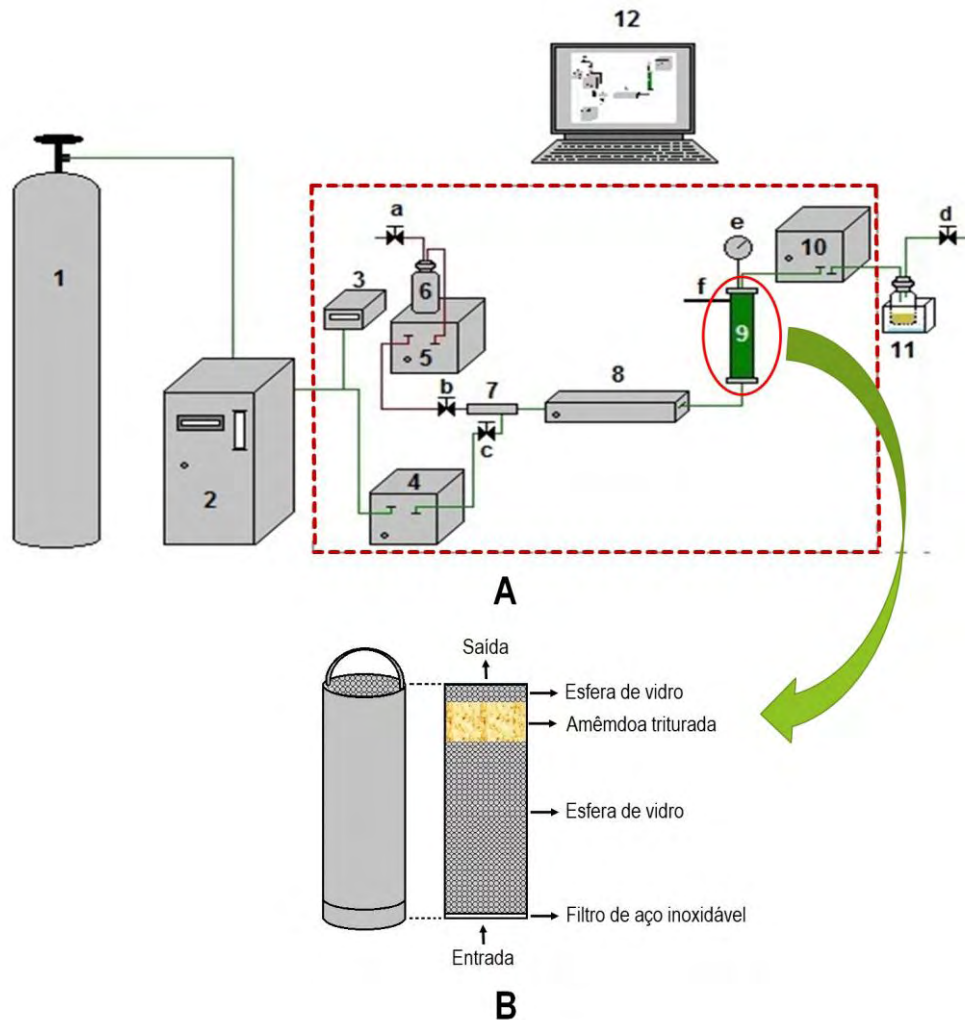
2.2.1. Rendimento de extração de óleo

As condições experimentais de extração supercrítica para todas as matérias-primas foram realizadas sob diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e pressões (25 e 35 MPa) para avaliar o rendimento da extração de óleo (X_0). Estas condições operacionais de T e P foram escolhidas de acordo com testes preliminares e estudos realizados com castanha do Brasil (SANTOS et al., 2013), Sacha Inchi (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009) e outras matérias-primas (LASEKAN; ABDULKARIMB, 2012; JAHURUL et al., 2014; BELAYNEH et

al., 2015; ÇELIK; GÜRÜ, 2015; KOU BAA et al., 2016; RAI; MOHANTY; BHARGAVA, 2016; ÖZKAL; YENER, 2016; CRUZ et al., 2017).

As determinações do X_0 foram realizadas na unidade SFE-2 (Figura 18A). O tempo de extração estática (tE), a vazão de CO_2 (Q_{CO_2}) e a razão (S/F) entre a massa de CO_2 (S) e a massa de matéria-prima triturada (F) acondicionado na célula de extração foram mantidos constantes (Tabela 17). E o tempo de extração dinâmica (tD) foram de 240 min para a amêndoa triturada de castanha do Brasil e de Sacha inchi, e 90 min para a amêndoa de Pequi (Tabela 17).

Figura 18 - Sistema de extração supercrítica SFE-500 (Thar SFC Waters, Milford, EUA) (A) e acondicionamento do leito fixo (B).



Nos experimentos, o banho de resfriamento (2) foi ligado, após atingir a temperatura de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, o cilindro (2) foi aberto deixando fluir o CO_2 através do banho de resfriamento (2) até a entrada da bomba de alta pressão (4), em sequência o cesto de extração (290 cm³) acondicionado com a matéria-prima triturada foi colocado no extrator cilíndrico (9) (Figura

18B). E no software Thar SFC (12) foi programado a pressão de trabalho no controlador de pressão (*backpressure*) ABRP (10) a temperatura de operação no trocador de calor (8) e no extrator cilíndrico (9). Na bomba de alta pressão (4) a vazão (15 g/min) foi regulada para operação constante e o ABRP (10) só foi aberto quando a temperatura do sistema atingiu 10 °C abaixo da temperatura de operação e a pressão de trabalho. Após um período estático de 20 min, o backpressure ABRP (10) foi aberto, e a vazão constante de CO₂ de 15 g/min foi mantida. O extrato foi expandido sob condições de temperatura e pressão ambientes e separado continuamente do gás no frasco coletor de vidro (11) (Figura 18A) e a coleta do extrato foi realizada durante 240 min. O frasco contendo o extrato foi pesado em uma balança analítica (Shimadzu AUY220, Tóquio, JP). Após do término da extração a tubulação foi lavada internamente com álcool etílico anidro (Ciclo Farma, São Paulo, BR) para recuperar o extrato aderidos nas paredes do extrator e da tubulação. E a mistura de álcool etílico anidro e extrato recuperado foi evaporada em estufa (FANEM, São Paulo, BR) a 60°C. A massa do extrato remanescente no frasco também foi pesada.

Tabela 17 - Parâmetros operacionais constantes adotados na extração com CO₂ supercrítico para a determinação do rendimento de extração de óleo.

Parâmetros	Valores
Massa da matéria-prima (m_{mp})	10 g = 0,01 kg
Vazão mássica do CO ₂ (Q_{CO_2})	15 g/min = $2,5 \times 10^{-4}$ kg/s
Tempo estático (tE)	20 min
Tempo de extração dinâmica (tD)	
tD - castanha do Brasil e Amêndoa de Sacha inchi	240 min
tD - Amêndoa de Pequi	90 min
Relação massa/massa solvente (S/F)	
S/F - castanha do Brasil e Amêndoa de Sacha inchi	360 kg/kg
S/F - Amêndoa de Pequi	135 kg/kg

O equipamento SFE-2 opera automaticamente, controlando via *software*, além da vazão e a pressão (*backpressure* - ABRP), controla também a temperatura no extrator, e no trocador de calor (8), que pré-aquecerá o CO₂ pressurizado para a temperatura de extração desejada antes da entrada no extrator.

O rendimento de extração de óleo (X_0) foi calculado pela relação entre massa total do extrato (M_e) e massa da matéria-prima triturada (fm_{bs}) em base seca, de acordo com a Equação (16).

$$X_0 = (m_e / fm_{bs}) \times 100 \quad (16)$$

2.3. Caracterização de óleo

2.3.1. Ácidos graxos livres.

Os FFA dos óleos obtidos de amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi por extração com CO₂ supercrítico foram determinados pelo método oficial Cd 3d-63 da American Oil Chemists Society (AOCS, 2009).

2.3.2. Conteúdo de fenólicos totais (TPC)

A extração metanólica dos compostos fitoquímicos dos óleos obtido por extração com CO₂ supercrítico foram realizadas utilizando o procedimento detalhado por Montedoro, Servili, Baldioli e Miniati (1992) com adaptação. O óleo (0,5 g) foi misturado com metanol (0,5 mL), submetido a Vortex a 6000 rpm por 20 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min, e o sobrenadante foi recuperado. Este procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante recuperado foi misturado com água destilada (0,25 mL), submetido a Vortex a 6000 rpm por 2 min, centrifugado a 4500 g e 4 °C por 10 min, e o sobrenadante foi recuperado.

O TPC dos óleos foram medidos pelo método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com adaptação para um volume final de solução de 3 mL. Nesta análise, 0,3 mL de extrato metanólico foi misturado com 1,364 mL de água destilada em um tubo de ensaio de 10 mL, seguido pela adição de 0,136 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Esta solução foi deixada em repouso durante 8 min à temperatura ambiente (24 ± 0,5 ° C). Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de solução de Na₂CO₃ a 7,5%. Após 120 min de reação à temperatura ambiente (24 ± 0,5 ° C), a absorbância foi lida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA). A reação do branco e o padrão foram preparadas da mesma maneira, usando 0,3 mL de metanol e água destilada (80/20, v/v) e 0,3 mL de cada concentração do padrão de ácido gálico, respectivamente, para substituir o extrato metanólico. A TPC foi calculada usando uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L (Figura A2).

2.3.3. Determinação de β-sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras foram preparadas como detalhado em outros lugares (Mazalli, Saldanha, & Bragagnolo, 2003, Ortíz, Moya, & Navarro, 2006). Aproximadamente 0,25 g de óleo foram

saponificados com 20 mL de solução etanólica de KOH à 15% a temperatura ambiente por 12 h. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de solução saturada de NaCl, e a extração da fase orgânica foi realizada duas vezes usando 5 mL de n-hexano após a agitação com vortex por 5 min.

O β -Sitosterol foi quantificado, conforme descrito por Mazalli et al. (2003) usando um sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de arranjo de diodo (SPD-M20A) e uma coluna C18 (100 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 4,0 μ m) (Chromolith, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os parâmetros de condição foram ajustados como segue: temperatura do forno, 40 °C; fase móvel, acetonitrilo: isopropanol (85/15, v/v); vazão, 1,0 mL/min e um volume de injeção de 20 μ L. Os cromatogramas foram extraídos na leitura de 208 nm. O β -Sitosterol foi identificado comparando o tempo de retenção de cada amostra com o padrão de β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação através das áreas de pico correspondentes foi alcançada por padronização externa, e os resultados foram expressos como mg por 100 g de óleo (Figura A3).

3. Resultados e discussão

3.1. Extração com dióxido de carbono supercrítico

As curvas de extração global (OEC) foram elaborados para auxiliar a escolha dos parâmetros de processo mais adequados para obter-se um maior rendimento de extração de óleo (X_0). As OEC são úteis para comparar o comportamento das extrações em uma série de experiências quando se utiliza a mesma matriz vegetal (BRUNNER, 1994; BRUNNER 2005). Como um meio de comparação, também foi considerado o estudo elaborado por SANTOS *et al.*, 2013.

Nestes experimentos preliminares, para uma mesma condição de pressão (P) e temperatura (T), três curvas cinéticas em duplicada, C1, C2 e C3 (Figura 19) foram determinadas variando a vazão de CO₂. As amêndoas de castanha do Brasil trituradas foram empacotadas no extrator de leito fixo de 290 cm³. As condições de extração e o rendimento são apresentados na Tabela 18.

O menor X_0 foi de 40,09% nas condições C1, e quando comparado com o extrato etéreo só foi recuperado 60,12% do óleo contido na matriz vegetal (Tabela 18). Para condições iguais de T, P, tempo (t), porosidade (ϵ) e massa (F), as extrações representadas pelas cinéticas C2 e C3 apresentaram aumento do X_0 quando a vazão de CO₂ foi de 10 g/min e 15 g/min, respectivamente. Sendo que quando a vazão de CO₂ foi de 15 g/min o X_0

(62,58%) foi o maior. No entanto, quando comparado com o extrato etéreo ($66,68 \pm 0,01$) a recuperação do óleo da matriz na extração supercrítica foi de 93,84% (Tabela 18).

Tabela 18 - Rendimento de extração de óleo e porcentagem de recuperação de óleo da amêndoa triturada de castanha do Brasil nas condições C1, C2 e C3.

Amêndoa triturada de castanha do Brasil			
d_{mg} (mm)	$1,09 \pm 0,01$		
ρ_r (g/cm ³)	$1,01 \pm 0,01$		
Dados experimentais	C1	C2	C3
T (°C)	60	60	60
P (MPa)	30	30	30
tempo (min)	120	230	230
Q_{CO_2} (g/min)	7	10	15
S/F	84	230	345
F (g)	10	10	10
X_0 (% base seca) ^a	$40,09 \pm 0,79$	$58,88 \pm 0,26$	$62,58 \pm 0,50$
Recuperação de óleo (%) ^b	$60,12 \pm 1,19$	$88,29 \pm 0,39$	$93,84 \pm 0,75$
ρ_a (g/cm ³)	$0,43 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,01$
Porosidade	0,57	0,57	0,57

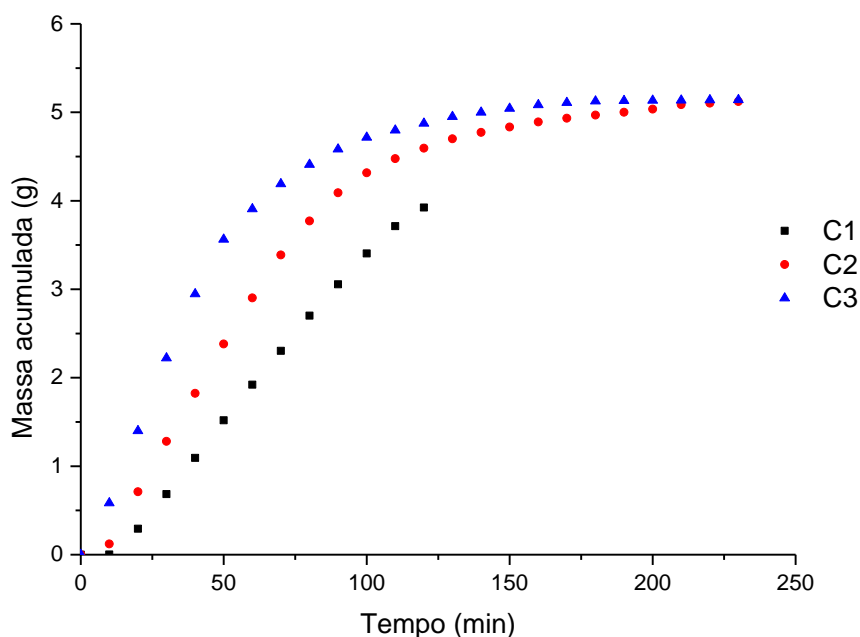
^a Dados são reportados como a média \pm desvio padrão ($n = 2$). ^b Dados expressados considerando extrato etéreo em base seca.

As curvas C2 e C3 apresentaram comportamentos semelhantes, ou seja, a curva não linear apresenta características típicas com três regiões distintas. No tempo inicial têm-se o período CER com inclinação constante que caracteriza o mecanismo dominante de transferência de massa por convecção do soluto na superfície das partículas para o solvente CO₂ supercrítico. No período FER ou inclinação da curva não há mais solutos livres na superfície das partículas suficiente. Desta forma começa haver as restrições à transferência de massa do interior da matriz para a liberação dos solutos para a fase do CO₂ supercrítico. Neste período começa a difusão dos solutos de dentro da matriz e a convecção do soluto na superfície em contato com a fase do CO₂ supercrítico. No final visualiza-se uma parte do período DC onde a transferência de massa ocorre principalmente pela difusão controlada no interior da matriz. E na curva C1 apenas o período CER foi observado no tempo de 120 min.

Em todas as OEC (Figura 19), observou-se a diminuição do soluto por tempo, indicando estar facilmente acessível na superfície das partículas. A extração propriamente dita (período FER) ocorreu com maior facilidade, ou em menor tempo, quando foi utilizada a vazão de 15 g/min seguida da vazão de 10 g/min e 7 g/min. O aumento da vazão de CO₂ resultou em X_0 semelhantes para C2 e C3, mas vazões maiores reduziram o tempo do período CER e FER no processo (Figura 19). Apesar da razão entre a massa de CO₂ e a

massa da matriz ($S/F = 345$) ter sido alta para C3, ainda observou-se que na última fase da curva, o período DC, a matéria-prima poderia não ter sido totalmente esgotada o que indica que condições operacionais de processo como T e P ainda têm que ser estudadas (Figura 19).

Figura 19 – As curvas de extração global obtido à 60 °C e 30 MPa usando um extrator de leito fixo com 290 cm³ com 10 g de amêndoa triturada de castanha do Brasil; C1: 7 g/min e 120 min; C2: 10 g/min e 230 min; e C3: 15 g/min e 230 min.



Comparando o X_0 obtido pelo processo de extração com CO₂ supercrítico com o teor de extrato obtido via Soxhlet usando hexano como solvente, a recuperação do óleo no processo de extração com CO₂ supercrítico foi de 57,85% para as condições da curva C1, 84,96% para a curva C2 e 90,30% de óleo recuperado na curva C3.

A partir dos testes preliminares, outros ensaios, em diferentes condições experimentais foram feitos, com intuito de aumentar a recuperação do óleo presente na amêndoa triturada de castanha do Brasil. Na Tabela 19 são apresentados os rendimentos globais e a porcentagem de recuperação do óleo para estas condições. Os resultados indicam que, o maior X_0 foi de 67,51 %, obtido à T de 70 °C e P de 35 MPa, com recuperação de óleo de 101,22% e 97,42 % quando comparado ao extrato etéreo e ao óleo obtido com hexano, respectivamente.

Para a pressão de 25 MPa o maior X_0 foi obtido a 50 °C e quando empregou-se 35 MPa maiores X_0 foram obtidos à 70 °C. Observou-se uma relação inversa com a densidade

do CO₂ supercrítico para a P de 35 MPa, ou seja, o X₀ foi maior quando a densidade decresceu para a faixa de T de 40 °C a 70°C, indicando uma influência positiva da temperatura (Tabela 19). E para a pressão de 25 MPa o comportamento do X₀ foi diretamente proporcional à densidade do CO₂ supercrítico para a faixa de T de 50 °C a 80 °C, ou seja, o X₀ diminuiu quando a densidade decresceu ou com o aumento da temperatura. No entanto, para as condições de 80 °C a 35 MPa e 40 °C a 25 MPa esta relação não se manteve. Estes dois comportamentos diferentes se deve ao efeito do fenômeno conhecido como retrogradação, que consiste na diminuição da solubilidade com aumento da temperatura a uma determinada pressão (25 MPa) e por outro lado, a pressão mais elevada (35 MPa), o efeito do aumento da pressão de vapor dos solutos (óleo) é mais importante do que o efeito da densidade do solvente.

Na comparação dos rendimentos globais com o extrato etéreo, constata-se que três condições de P e T possibilitaram a extração total do óleo presente na amêndoa triturada de castanha do Brasil (Tabela 19).

Nas curvas cinéticas apresentados na Figura 20a, observou-se que um aumento na pressão de 30 MPa para 35 MPa às mesmas condições de T de 60 °C, com t = 240 min, F= 10 g, Q_{co₂}= 15 g/min e ε = 0,57, o tempo dos períodos CER e FER foram reduzidas no processo com o aumento da P. Além disso, o rendimento do extrato foi maior com o aumento da pressão (35 MPa) pelo efeito de aumento da densidade do CO₂ supercrítico.

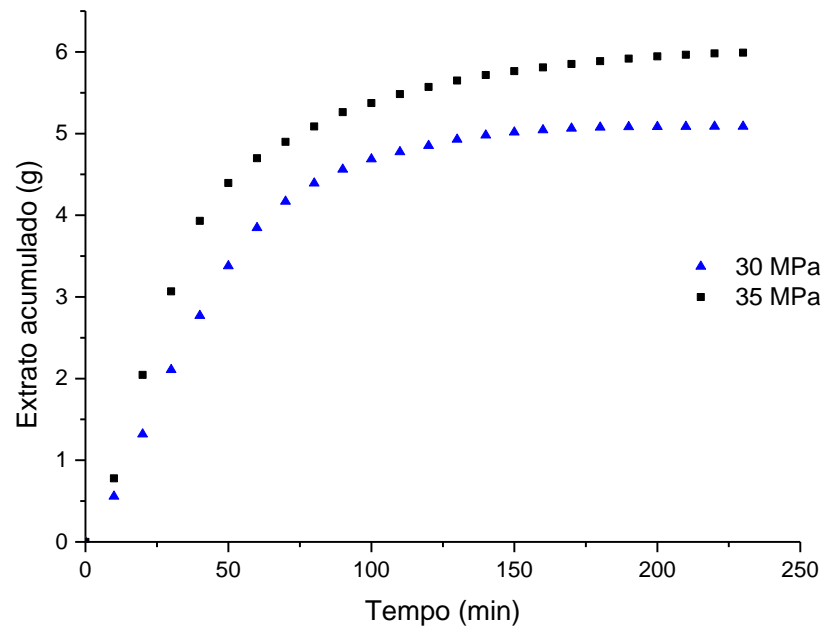
Na Figura 20b, mostram-se curvas cinéticas com comportamentos semelhantes nos três períodos CER, FER e DC para as temperaturas de 60 °C e 70 °C obtidas na mesma P de 35 MPa, considerando constante o tempo (t = 240 min), a massa da matriz (F = 10 g), a vazão do CO₂ supercrítico (Q_{co₂} = 15 g/min) e a porosidade do leito (ε = 0,57). Estas cinéticas indicam que, para esta condição de P, o aumento de 10 °C no processo não tem efeito considerável sobre a solubilidade e a transferência de massa nos períodos CER, FER e DF.

Tabela 19 - Planejamento experimental não aleatorizado com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), óleo recuperado, conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol de óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido por extração com CO_2 supercrítico.

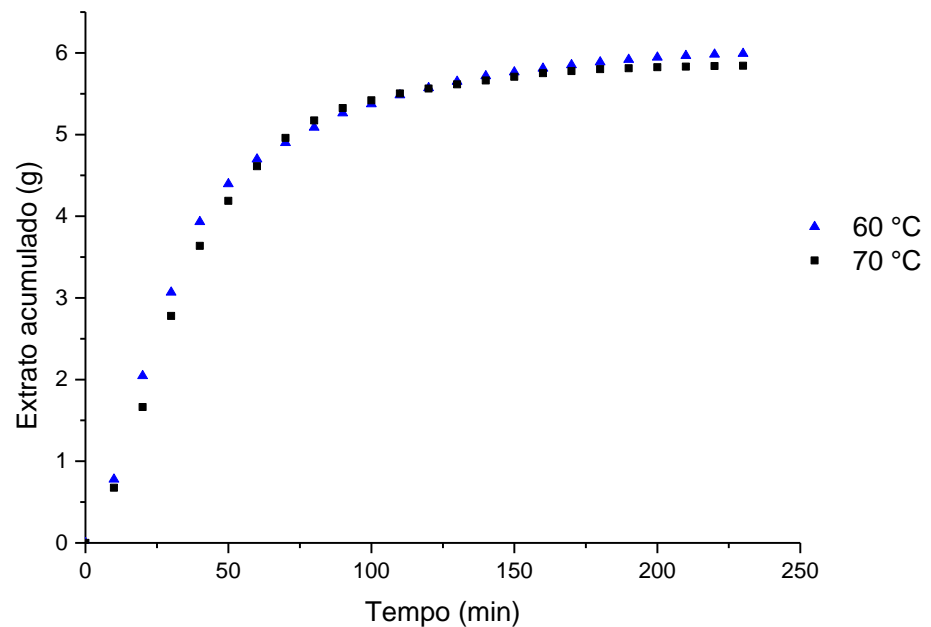
P (MPa)	T (°C)	$\rho \text{ CO}_2$ (Kg/m ³)	X_0 (%, massa) ^a	Óleo recuperado (%) ^b	TPC (mg EAG/kg óleo)	FFA (%)	β - sitosterol (mg/100g óleo)	β - sitosterol (mg/100g amêndoa)
25	40	880,16	61,19 ± 0,70	91,76 ± 1,04	6,37 ± 0,23	0,27 ± 0,01	21,83 ± 2,02	13,35 ± 1,02
	50	834,80	62,98 ± 0,09	94,43 ± 0,14	12,11 ± 0,33	0,27 ± 0,01	19,92 ± 0,08	12,54 ± 0,03
	60	787,00	62,15 ± 0,25	93,19 ± 0,37	22,35 ± 0,90	0,30 ± 0,01	22,28 ± 1,97	13,85 ± 1,30
	70	737,26	59,80 ± 0,40	89,66 ± 0,61	31,90 ± 0,8	0,30 ± 0,01	20,0 ± 2,76	11,95 ± 1,54
	80	686,65	52,20 ± 0,12	78,27 ± 0,18	27,75 ± 0,23	0,27 ± 0,01	19,92 ± 3,4	10,40 ± 1,8
35	40	935,04	64,30 ± 0,47	96,42 ± 0,71	43,83 ± 0,35	0,27 ± 0,01	19,93 ± 3,0	12,83 ± 2,06
	50	899,45	65,26 ± 0,17	97,85 ± 0,25	42,67 ± 0,64	0,27 ± 0,01	15,52 ± 1,67	10,13 ± 1,13
	60	863,04	66,75 ± 0,34	100,10 ± 0,50	40,22 ± 0,10	0,32 ± 0,01	21,73 ± 0,04	14,51 ± 0,07
	70	826,01	67,51 ± 0,16	101,22 ± 0,25	41,20 ± 0,28	0,32 ± 0,01	20,44 ± 3,71	13,80 ± 2,55
	80	788,66	67,39 ± 0,60	101,05 ± 0,90	39,35 ± 0,11	0,30 ± 0,01	23,63 ± 3,12	15,91 ± 1,90

Dados são reportados como a média ± desvio padrão (n=2). P: pressão; T: temperatura; ^a em base seca; ^bDados expressados considerando extrato etéreo em base seca; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA: ácidos graxos livres expressados como porcentagem de ácido oleico.

Figura 20 - Curvas cinéticas obtidos à 15 g/min durante 240 min usando um extrator de leito fixo com 290 cm³ com 10 g de castanha do Brasil triturada: (a) à 60 °C e (b) a 35 MPa.



(a)



(b)

No estudo da extração supercrítica do óleo da amêndoa triturada de Pequi, não foram realizados testes preliminares, já se iniciaram as extrações nas mesmas condições ajustadas para a castanha do Brasil porque o óleo contido na matriz da amêndoa triturada

de castanha do Brasil é maior comparado com as outras matérias-primas. Os X_0 das amêndoas trituradas de Pequi apresentados na Tabela 20, indicam que, o maior X_0 (40,47%) foi obtido quando empregou-se P de 35 MPa e T de 60 °C.

Nesta condição de pressão de 35 MPa, nota-se um comportamento contrário com a densidade, ou seja, o X_0 aumenta quando a densidade decresceu na faixa de T de 40 °C a 60 °C, indicando uma influência positiva da temperatura na extração, já que maiores temperaturas fazem com que os solutos presentes atinjam sua pressão de vapor, volatilizando-se para a fase solvente.

Para a pressão de 25 MPa, o X_0 foi menor quando a densidade decresceu na faixa de T de 50 °C a 80 °C, o que novamente indica a influência positiva da temperatura na extração. No entanto, para as condições de 40 °C a 25 MPa, e 70 °C e 80 °C a 35 MPa esta relação não se manteve. Na comparação dos X_0 , com o extrato etéreo constata-se que duas condições possibilitaram a extração de 92,68% e 90,21% de óleo presente na amêndoa triturada de Pequi. Os maiores X_0 com valores semelhantes foram observados nas temperaturas e pressões de 60 °C e 35 MPa e 50 °C e 25 MPa (Tabela 20).

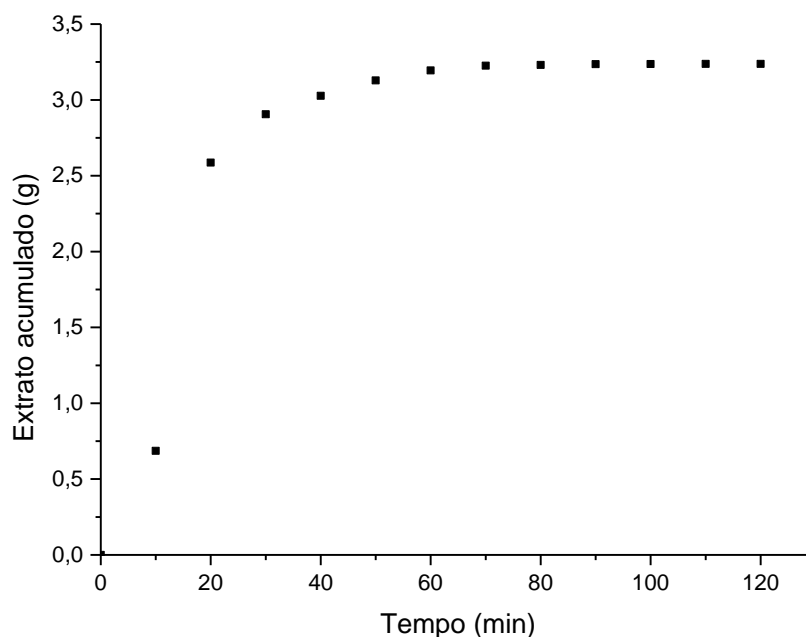
A cinética da extração apresentada na Figura 21 mostra o comportamento típico de uma curva de extração de matrizes vegetais com fluido supercrítico uma curva não linear com características típicas que compreendem os períodos CER, FER e DF. O tempo correspondente ao período CER foi muito curto quando comparado com as curvas cinéticas da amêndoa triturada de castanha de Brasil (Figura 20), este tempo curto do período CER provavelmente se deve além, do efeito do aumento da pressão de vapor dos solutos nos extratos, ao baixo peso molecular dos solutos e à presença de triacilgliceróis com maior porcentagem de ácidos graxos saturados facilmente disponíveis na superfície da matriz vegetal.

Tabela 20 - Planejamento experimental não aleatorizado com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), óleo recuperado, conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol de óleo de amêndoa de pequi obtido por extração com CO_2 supercrítico.

P (MPa)	T (°C)	$\rho \text{ CO}_2$ (Kg/m ³)	X_0 (%, massa) ^a	Óleo recuperado (%) ^b	TPC (mg GAE/kg óleo)	FFA (%)	β - sitosterol (mg/100g óleo)	β - sitosterol (mg/100g amêndoa)
25	40	880,16	38,51	88,18	114,73	0,21	3,91	1,51
	50	834,80	39,40	90,21	98,65	0,21	4,54	1,79
	60	787,00	37,73	86,39	105,25	0,23	4,90	1,85
	70	737,26	32,36	74,10	85,21	0,23	4,43	1,43
	80	686,65	18,07	41,39	154,35	0,23	6,44	1,16
35	40	935,04	34,30	78,55	104,71	0,23	4,39	1,51
	50	899,45	36,65	83,92	101,64	0,23	5,27	1,93
	60	863,04	40,47	92,68	120,64	0,25	4,55	1,84
	70	826,01	36,06	82,57	111,31	0,25	5,08	1,83
	80	788,66	38,53	88,23	128,06	0,25	4,55	1,75

P: pressão; T: temperatura; ^a em base seca; ^bDados expressados considerando extrato etéreo em base seca; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA: ácidos graxos livres expressados como porcentagem de ácido oleico.

Figura 21 - Curva cinética a 60 °C, 35 MPa e 15 g/min usando 10 g de amêndoa de Pequi triturada.



No estudo da extração supercrítica do óleo de sachá inshi, os resultados indicaram que o maior X_0 (48,84%) foi obtido a 80 °C e 35 MPa e quando o X_0 foi comparado com o extrato etéreo (53,59%), verificou-se que esta condição (80 °C e 35 MPa) permitiu a recuperação de 91,14% de óleo presente na amêndoa triturada de *P. huayllabambana*. Comportamentos diferentes foram observados devido ao efeito do fenômeno conhecido como retrogradação, que consistiu na diminuição da solubilidade com aumento da T quando a pressão foi de 25 MPa. Já para a P mais elevada (35 MPa), o efeito do aumento da pressão de vapor dos solutos (óleo) foi mais importante do que o efeito da densidade do CO₂ supercrítico (Tabela 21). Embora, o estudo tenha sido feito usando amêndoa triturada de *P. huayllabambana* o uso da vazão de $2,5 \times 10^{-4}$ kg CO₂/s ajudou reduzir o tempo de extração do processo em um 56% (240 min) quando comparado ao estudo feito por Folegatti-Romero et al., 2009 que usaram 5 g amêndoa triturada de *P. volubilis* e $0,4 \times 10^{-4}$ kg CO₂/s, este efeito provavelmente está influenciado pela saturação do leito fixo com dióxido de carbono, o que ajudou solubilizar facilmente o óleo disponível na superfície das partículas consequentemente reduziu o tempo de extração para o óleo de amêndoa triturada de *P. huayllabambana*.

Tabela 21 - Planejamento experimental não aleatorizado com resultados de rendimento de extração de óleo (X_0), óleo recuperado, conteúdo de fenólicos totais (TPC), ácidos graxos livres (FFA) e conteúdo de β -sitosterol de óleo de amêndoa de sacha inchi obtido por extração com CO_2 supercrítico.

P (MPa)	T (°C)	$\rho \text{ CO}_2$ (Kg/m ³)	X_0 (%, massa) ^a	Óleo recuperado (%) ^b	TPC (mg EAG/kg óleo)	FFA (%)	β - sitosterol (mg/100g óleo)	β - sitosterol (mg/100g amêndoa)
25	40	880,16	30,68	57,24	6,37	0,25	166,17	50,98
	50	834,80	35,74	66,70	12,11	0,25	206,28	73,72
	60	787,00	43,21	80,63	15,59	0,28	253,67	109,61
	70	737,26	45,55	85,00	31,89	0,28	46,58	21,22
	80	686,65	40,10	74,83	25,50	0,25	104,52	41,91
35	40	935,04	43,66	81,47	43,83	0,28	208,84	91,18
	50	899,45	45,16	84,27	45,92	0,28	95,13	42,96
	60	863,04	45,67	85,22	46,09	0,31	267,44	122,14
	70	826,01	46,42	86,62	47,63	0,31	101,70	47,21
	80	788,66	48,84	91,14	48,35	0,30	117,55	57,41

P: pressão; T: temperatura; ^a em base seca; ^bDados expressados considerando extrato etéreo em base seca; EAG: equivalente de ácido gálico; FFA: ácidos graxos livres expressados como porcentagem de ácido oleico.

4. Conclusões

Este estudo demonstrou que o maior X_0 (% massa) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sacha inchi foram $67,51 \pm 0,16\%$, $40,47\%$ e $48,84\%$ sob as condições de $70\text{ }^\circ\text{C}$ e 35 MPa , $60\text{ }^\circ\text{C}$ e 35 MPa e $80\text{ }^\circ\text{C}$ a 35 MPa , respectivamente; e que as variáveis do processo, a T e a P não influenciaram o FFA ($0,27 \pm 0,01$ a $0,32 \pm 0,01$; $0,21$ a $0,25$ e $0,25$ a $0,31$), mas estas variáveis tiveram influência sobre o TPC ($6,37 \pm 0,23$ a $43,83 \pm 0,35$; $85,21$ a $154,35$ e $6,37$ a $48,35$ mg EAG/kg de óleo) e o conteúdo de β -sitosterol ($15,52 \pm 1,67$ a $23,63 \pm 3,12$; $3,91$ a $6,44$ e $46,58$ a $253,67$ mg/100 g de óleo) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sacha inchi, respectivamente.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [projeto número 2016 / 13460-8]; o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [projeto número 306317 / 2016-8]; e o Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico e de Inovação Tecnológica (FONDECYT) [projeto número 0242-2015] para a bolsa de estudo do primeiro autor, H.P.C.S.

5. Referências

- A.O.A.C. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Ed., Gaithersburg, MD, USA, 2005.
- BUSSMANN, R. W.; TÉLLEZ, C.; GLENN, A. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany*, 27(4), 313-315, 2009.
- BRUNNER, G. *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process*. v. 4. Darmstadt: Steinkopff, 1994. 59-144p.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 21–33, 2005.
- CARDOSO, B. R. et al. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food research international*, v. 100, p. 9-18, 2017.
- CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food*

- chemistry, 141(3), 1732-1739, 2013.
- CORNELIO-SANTIAGO, H.P., GONÇALVES, B.C., DE OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, A.L. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 386–394, 2017.
- DESAI, ADITYA J.; DONG, MAOQING; MILLER, LAURENCE J. Beneficial effects of β -sitosterol on type 1 cholecystokinin receptor dysfunction induced by elevated membrane cholesterol. *Clinical Nutrition*, v. 35, n. 6, p. 1374-1379, 2016.
- FANALI, C., DUGO, L., CACCIOLA, F., BECCARIA, M., GRASSO, S., DACHA, M.; MONDELLO, L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13043-13049, 2011.
- FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; PIANTINO, C. R., GRIMALDI, R.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 323-329, 2009.
- HAMAKER, B. R.; VALLES, C., GILMAN, R., HARDMEIER, R. M., CLARK, D., GARCIA, H. H.; RODRIGUEZ, T. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chem*, 69(4), 461-463, 1992.
- NATEX Prozesstechnologie GesmbH: Acesso 08/04/2018
https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/edible_oil_extraction.pdf.
- SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; CARVALHO Jr. R.N.; COSTA, C. E. F.; LANNES, S. C. Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* H.B.K) obtained by supercritical extraction. *Journal of Food Engineering*. v. 117, p. 499–504, 2013.
- SHAHZAD, NAIYER et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 88, p. 786-794, 2017.
- YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1573–1580, 2009.

CAPÍTULO 6: Propriedades físicas do óleo da amêndoa de castanha do Brasil, Sacha inchi e pequi extraídos com CO₂ supercrítico e isopropanol pressurizado

CAPÍTULO 6: Propriedades físicas do óleo da amêndoa de castanha do Brasil, Sacha inchi e pequi extraídos com CO₂ supercrítico e isopropanol pressurizado

Resumo

O conhecimento de dados termodinâmicos como a solubilidade do óleo em CO₂ supercrítico, e os dados de pressão de vapor, densidade e viscosidade são importantes para várias etapas do desenvolvimento do processo SFE. O objetivo da pesquisa foi medir a solubilidade experimental dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi em dióxido de carbono supercrítico pelo método estático sob as condições de pressão (P, 35 MPa) e temperatura (T, 40, 50, 60, 70 e 80°C), determinar a viscosidade e a densidade destes óleos por métodos experimentais e estimar a pressão de vapor destes óleos utilizando a equação de Clausius-Clapeyron e os dados obtidos nas análises termogravimétricas (TGA). As medidas de viscosidade e densidade foram feitas para os óleos obtidos usando CO₂ supercrítico e álcool isopropílico pressurizado. A solubilidade do óleo da amêndoa de castanha do Brasil ($10,45 \pm 0,01$ a $11,82 \pm 0,31$ g óleo/kg CO₂) variou pela influência direta da pressão de vapor do óleo, mas a solubilidade dos óleos da amêndoa de pequi ($8,98 \pm 0,99$ a $12,46 \pm 0,38$ g óleo/kg CO₂) e sachá inchi ($8,80 \pm 1,47$ a $12,71 \pm 0,49$ g óleo/kg CO₂) variaram pela influência direta da densidade do CO₂ supercrítico. A densidade e viscosidade não foi influenciado pelo método de extração, para os dois métodos de extração obtiveram-se valores semelhantes. Todas as curvas de análises termogravimétricas dos óleos tiveram perfis semelhantes e o processo de decomposição térmica ocorreu em uma única etapa para os três óleos. Na predição da pressão de vapor foi possível perceber que o método utilizando análises termogravimétricas em cadinhos com tampas não fixas não foi um método de medida adequada, já que a pressão dentro e fora do recipiente de medida foi a mesma.

Palavras-chaves: pressão de vapor, solubilidade, óleos vegetais, CO₂ supercrítica.

1. Introdução

Oleaginosas como as amêndoa de castanha do Brasil, Pequi e Sacha inchi são atrativas matérias-primas para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética pelo alto conteúdo de óleo (>40 % a 60%) (RIBEIRO et al., 2014; CHIRINOS et al., 2013; TORRES et al., 2016) e proteína (>15% a 27%) (VENKATACHALAM; SATHE, 2006; HAMAKER et al., 1992) que possuem na sua matriz. Os óleos destas matérias-primas são ricos em ácidos graxos insaturados, tais como linoleico, linolênico e oleico (>70% a 90%) (RIBEIRO et al., 2014; FANALI et al., 2011; TORRES et al., 2016) o que aumenta o seu valor agregado e interesse devido a sua atividade fisiológica benéfica e importante para a saúde. Portanto, alguns pesquisadores estudaram estas oleaginosas para extrair e/ou isolar seus principais compostos funcionais (óleo) usando a prensagem mecânica ao frio (FERREIRA et al., 2006; TORRES et al., 2016), a extração com solvente (FREITAS et al., 2007), extração com dióxido de carbono supercrítico (SANTOS et al., 2013; FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009) e por uma técnica rústica (processo artesanal) em pequena escala usando água a altas temperaturas (TORRES et al., 2016).

A extração com fluido supercrítico, em termos de processo, consiste basicamente na extração e a separação dos componentes extraíveis (soluto ou mistura de solutos) do solvente (CO₂). Na extração, o solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo, logo que o sistema atingiu as condições operacionais o solvente escoia continuamente através do leito fixo e solubiliza os solutos. Na separação, o extrato (mistura de solutos e solvente) que sai do extrator é recepcionado no precipitador, onde ocorre a separação do soluto e o solvente pela queda da pressão e aumento da temperatura (CORNELIO-SANTIAGO, 2015).

As técnicas de extração com dióxido de carbono supercrítico têm sido utilizadas durante as últimas décadas, especialmente pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética para a obtenção de compostos de alto valor comercial. Além de ser frequentemente promovido como um solvente sustentável de abundância natural, o CO₂ apresenta características importantes que o atribui numerosas vantagens, dentre elas ser não explosivo, não inflamável, apresentar baixa toxicidade relativa e baixo custo. O CO₂ por apresentar-se no estado gasoso em condições de baixa pressão é facilmente separado do produto no final do processo de extração. Para óleos o CO₂ supercrítico é um solvente ideal por ser apolar, além disso é reconhecido como seguro para a saúde (GRAS – Generally Recognized as Safe) e pode ser empregado na obtenção de extratos para uso em produtos alimentícios e farmacêuticos CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017; SOLTANI; MAZLOUMI, 2017).

Conhecer as propriedades físicas dos óleos vegetais se faz relevante tanto no processo de obtenção quanto posteriormente na aplicação do produto final. Por exemplo, a solubilidade e os valores implícitos no equilíbrio líquido-fluido supercrítico dos óleos são realmente importantes quando se trata dos processos de modelagem e de simulação, por isso é necessário que se conheça essa propriedade. A solubilidade dos compostos no CO₂ supercrítico depende de dois fatores, um refere-se à pressão, que aumenta a densidade do fluido supercrítico, aumentando assim o seu poder solvente ou a sua capacidade de solubilização; o outro diz respeito à temperatura, que influencia as propriedades do solvente, a densidade e também as propriedades do soluto, especialmente a pressão de vapor. O aumento da temperatura diminui a densidade do solvente (baixo poder de solubilização) e aumenta a pressão de vapor do soluto (maior solubilidade). Encontrar essa influência dupla na solubilidade requer compensação desses dois efeitos opostos (CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017). Além disso a natureza do material também influencia a extração. Brunner (2005) já demonstrou que a estrutura celulósica influencia na solubilidade para sistemas de material vegetal em CO₂ supercrítico.

Assim como a solubilidade a pressão de vapor (pv) dos extratos também é uma propriedade física que auxilia na compreensão do processo de extração. Visto à complexidade dos extratos, a pv é difícil de ser determinada. Existem vários métodos disponíveis para medir pressões de vapor de produtos (ou componentes), como os métodos estáticos (CASTELLANOS-DÍAZ et al., 2013), métodos ebuliométricos (FANG e LEI, 2003). Para óleos vegetais, nem todos esses métodos são adequados. Aplicações de métodos de medição pv para ácidos graxos puros ou misturas deles podem ser encontradas. Por exemplo, o método de contribuição de grupos (WANG et al., 2015; DAMACEDO et al., 2018) e usando técnicas calorimetria diferencial de varredura (DSC) (MATRICARDE FALLEIRO, MEIRELLES E KRÄHENBÜHL, 2010).

Para a caracterização físico-química dos extratos obtidos, algumas outras propriedades físicas foram determinadas como, sua densidade, sua viscosidade e sua estabilidade térmica. Informação sobre as propriedades de transporte como são os valores de viscosidade são requeridos para o desenho de equipamentos, bombas e outros acessórios envolvidos na indústria do óleo (FLORIDO et al., 2017). Assim, mesmo as informações das propriedades físicas em função da temperatura são importantes para conhecer o comportamento da estabilidade térmica dos materiais (por exemplo o óleo) (RASLAVIČIUS et al, 2018). E as medições de pressão de vapor de óleo fornecem informações que podem ser úteis para projeto, operações de refinaria, segurança e transporte (SIITSMAN e OJA, 2015).

O objetivo da pesquisa foi medir a solubilidade dos óleos da castanha do Brasil, e das amêndoas do Pequi e Sacha Inchi em dióxido de carbono supercrítico pelo método estático, determinar a viscosidade e a densidade destes óleos por métodos experimentais e estimar a pressão de vapor destes óleos vegetais utilizando análises termogravimétricas (TGA). As medidas de viscosidade e densidade foram feitas para os óleos obtidos usando CO₂ supercrítico e álcool isopropílico pressurizado.

2. Material e Métodos

2.1. Materias- primas

As amêndoas trituradas de castanha do Brasil, Sacha inchi e Pequi com diâmetro médio da partícula de $1,09 \pm 0,01$, $1,18 \pm 0,01$ e $0,93 \pm 0,01$, respectivamente foram utilizadas como as matérias-primas para estudar a solubilidade do óleo em CO₂ supercrítico. A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e a Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana* sp. nov.) foram provenientes da Amazônia brasileira e peruana, respectivamente e o Pequi (*Caryocar brasiliense*) do cerrado brasileiro.

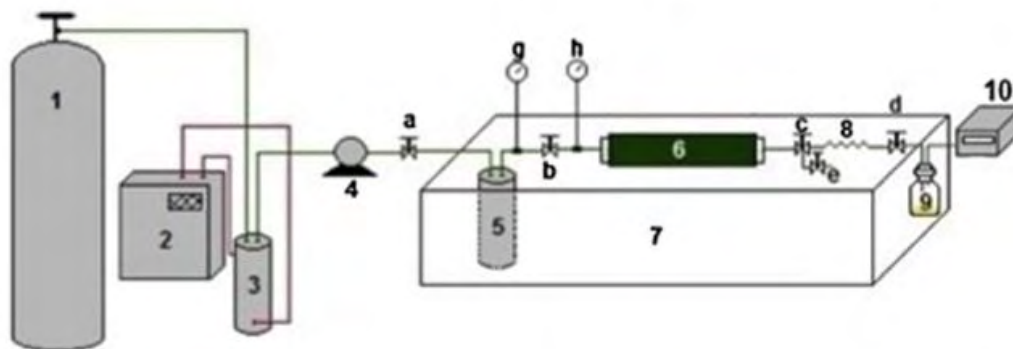
Os óleos obtidos por extração com CO₂ supercrítico e líquido pressurizado foram a matéria-prima empregada na medida da densidade e viscosidade.

2.2. Determinação experimental da solubilidade dos óleos em CO₂ supercrítico

As solubilidades do óleo das amêndoas trituradas destas oleaginosas em CO₂ supercrítico foram obtidas nas condições de temperatura de 40, 50, 60, 70 e 80 °C e pressão de 35 MPa. Estudo da solubilidade do óleo nas condições de pressões maiores ou igual à 35 MPa são muito importantes porque nestas condições obtém-se maiores rendimentos.

Os experimentos foram conduzidos utilizando um sistema SFE-1 em escala laboratorial (Figura 22) descrito por Cornelio-Santiago et al. 2017 do LTAPPN-ZEA/FZEA-USP. Testes preliminares foram realizados usando 10 g de amêndoa triturada de castanha do Brasil, temperatura de 60 °C e pressão de 35 MPa para se conhecer o tempo de contato necessário (1, 2, 3 ou 4h) para atingir o equilíbrio.

Figura 22 - Sistemas de extração com fluido supercrítico, SFE-1, usado para medir a solubilidade pelo método estático



A medida experimental da solubilidade dos óleos das amêndoas trituradas de castanha do Brasil, Pequi e Sacha inchi em dióxido de carbono supercrítico, feitas pelo método estático, foram feitas por meio do contato entre as amêndoas trituradas (10 g) com o CO₂ supercrítico no extrator cilíndrico (6), considerando as pressões e temperaturas constantes. Para manter a mesma condição de pressão no sistema durante a coleta, o seguinte procedimento foi realizado: depois de atingido o tempo de equilíbrio no extrator cilíndrico (6), a bomba HPLC (4) foi acionada para pressurizar o tanque pulmão (5) aproximadamente, 35 MPa acima do valor da pressão no extrator cilíndrico (6); então as válvulas de regulação, localizadas na entrada (b) e saída (c) do extrator cilíndrico (6), foram abertas simultaneamente, evitando a queda de pressão no sistema, extrator cilíndrico (6) e coletor de volume conhecido (8). Esta prática promove o deslocamento do óleo solubilizado em dióxido de carbono supercrítico para o coletor de volume conhecido (8) sem que ocorra uma queda no valor da pressão. A temperatura na coleta também é mantida constante já que o sistema está imerso em um banho termostático (7) que garante a mesma temperatura em todo o sistema. Após este procedimento, a massa do óleo será coletado em um frasco (9) na saída do sistema, e para recuperar o material remanescente do coletor de volume conhecido (8), uma seringa foi usada para circular repetidas vezes álcool isopropílico (aproximadamente 45 mL) através do coletor de volume conhecido (8), e o solvente foi evaporado a 90°C para obter o óleo livre de solvente.

A solubilidade foi calculada como a razão entre a massa total do óleo e a massa de CO₂ no coletor de volume conhecido (8), de acordo com a Eq. (17). Nesta equação, a densidade da mistura de equilíbrio óleo e CO₂ supercrítico é representada pela densidade

de CO₂ porque se considera que a quantidade de solvente na mistura é mais significativa que a quantidade do óleo. Os valores para a densidade de CO₂ sob as diferentes condições de temperatura (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e pressão (35 MPa) foram calculados usando a equação empírica de Huang et al. 1985.

$$S = \frac{X}{V \times \rho_{CO_2}} \quad (17)$$

onde S é a solubilidade (g óleo/kg CO₂); X é a massa total de óleo recuperado no volume total (g); V é o volume do coletor (8,58 mL); ρ_{CO_2} é a densidade de CO₂ (kg/m³) em condições operacionais.

2.3. Extração do óleo utilizando CO₂ supercrítico e isopropanol pressurizado

As extrações foram feitas conforme descrito nos capítulos 2, 3, 4 e 5.

2.4. Determinação experimental da densidade e viscosidade

A densidade e a viscosidade foram determinadas nos óleos obtidos via extração com CO₂ supercrítico. A condição da extração do óleo da castanha do Brasil foi 70 °C, 35 MPa, vazão $2,5 \times 10^{-4}$ kg CO₂/s e tempo de 240 min. A condição para a extração do óleo de Sacha inchi foi a mesma com exceção da temperatura que foi de 80 °C. Na extração do óleo das amêndoas de Pequi a temperatura empregada também foi a de 80 °C com um tempo de extração de 120 min na mesma vazão e pressão.

Estas propriedades físicas também foram determinadas nos óleos obtidos via isopropanol pressurizado usando PLE. Neste processo, todos os três óleos foram obtidos na mesma condição otimizada com temperatura de 86 °C, tempo estático de 9 min, pressão de 10,35 MPa, com 3 ciclos ou batchs em cada processo. Neste processo, a razão entre o volume do solvente (S, mL) e a massa da amêndoa triturada (F, g) (S/F) foi de 5,8. Estas condições para as duas técnicas de extração foram escolhidas com base no maior rendimento de extração de óleo apresentados no capítulo 2, 3, 4 e 5.

A densidade e viscosidade dos óleos de amêndoa de castanha do Brasil, Sacha inchi e Pequi obtidos por SFE e PLE foram determinados nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C. As densidades foram determinadas empregando-se um Densímetro Digital de bancada (DMA 4500, Anton Paar, Áustria) que é capaz de fornecer dados de densidade com exatidão de 0,00005 g/cm³ e com repetibilidade do desvio padrão igual a 0,00001 g/cm³. Aproximadamente 3 mL de cada óleo foi injetado no equipamento com ajuda de uma seringa e as medidas foram realizadas.

As viscosidades foram determinadas em um micro-viscosímetro automático de queda de esfera (AMVn, Anton Paar, Áustria) equipado com controle de temperatura e com possibilidade de determinar a viscosidade em diferentes ângulos de inclinação para uma mesma amostra. As amostras foram colocadas em tubo capilar de vidro calibrado de 1,8 mm. Acoplou-se o tubo capilar no aparelho e procederam-se as leituras em quadruplicata a cada temperatura sob três ângulos diferentes de deslocamento (50, 60 e 70 °), totalizando 12 medidas por amostra.

2.5. Análise termogravimétrica (TGA) dos óleos obtidos por extração com CO₂ supercrítico

As análises termogravimétricas nos indicam o comportamento da degradação dos materiais com a temperatura. Estas análises foram feitas para os óleos das amêndoas trituradas de castanha do Brasil, Sacha inchi e Pequi obtidos via extração com CO₂ supercrítico. Os experimentos termogravimétricos foram conduzidos através de um analisador termogravimétrico (STA 449F3, NETZSCH, Alemanha). Aproximadamente 5 mg de cada óleo foram colocadas em um cadinho de alumínio de 85 µL com tampa perfurada. O cadinho foi colocado na microbalança do analisador termogravimétrico e aquecido de 25 a 900 °C a 5 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min).

Com algumas considerações e usando os dados da curva de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtidos através do analisador termogravimétrico foram calculados a pressão de vapor (pv) destes óleos vegetais.

2.6. Predição da pressão de vapor dos óleos vegetais utilizando análises termogravimétricas (TGA)

Estávamos procurando um método simples, robusto e conveniente para medir as pressões de vapor de óleo vegetais sem desgasificar e usando uma quantidade pequena de amostra (até 50 mg). Isso nos levou à idéia de testar a adequação da técnica de análise termogravimétrica. Por consideração de alguns vantagens da técnica como são a disponibilidade mundial de equipamentos comerciais, a quantidade da amostra necessário é muito pequena e o tempo de análise é curto. A quantidade pequena da amostra é importante, por exemplo, para laboratórios que estão interessados em medir as pressões de vapor de novos óleos, que muitas vezes são produzidos em pequenas quantidades por equipamentos em escala laboratorial.

A predição da pressão de vapor dos óleos vegetais de castanha do Brasil, Sacha Inchi e amêndoas de Pequi foram feitas com dados experimentais da análise termogravimétrica

(TGA). Para isso considerou-se os dados experimentais da variação da entalpia dos óleos vegetais submetidos à variação de temperatura de de 25 a 289,4 °C (298,15 a 562,55 K) para castanha do Brasil, 25 a 280 °C (298,15 a 553,15 K) para Amêndoa Sacha Inchi e 25 a 277,4 °C (298,15 a 550,55 K) para a Amêndoa do Pequi aplicados à equação de Clapeyron.

A equação de Clausius-Clapeyron descreve a linha de equilíbrio líquido-vapor em um diagrama de fases para propriedades termodinâmicas fundamentais. Na linha de equilíbrio de fases sabe-se que há igualdade térmica (T constante), equilíbrio mecânico (p constante) e de potencial químico. A igualdade de potencial químico é dada como a igualdade da variação da energia de Gibbs (dG) em ambas as fases, equação 18.

$$dG_{\alpha} = dG_{\beta} \quad (18)$$

α e β são fases do sistema.

A energia de Gibbs varia com p e T como descrito na equação 19.

$$dG = Vdp - SdT \quad (19)$$

No equilíbrio, a energia de Gibbs em ambas as fases pode ser escrita como mostra as equações 20 e 21.

$$V_{\alpha}dp - S_{\alpha}dT = V_{\beta}dp - S_{\beta}dT \quad (20)$$

$$(V_{\alpha} - V_{\beta})dp = (S_{\alpha} - S_{\beta})dT \quad (21)$$

A variação do volume em ambas as fases ($V_{\alpha} - V_{\beta}$) pode ser escrita como ΔV , assim como a diferença de entropia (ΔS). Neste caso a equação (21) pode ser expressa como as equações 22 e 23.

$$\Delta V dp = \Delta S dT \quad (22)$$

$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta S}{\Delta V} \quad (23)$$

No equilíbrio, sabe-se que o potencial químico ou a energia de Gibbs são iguais em ambas as fases (equação 24). E pela relação entre as propriedades termodinâmicas, a variação da energia livre de Gibbs pode ser expressa em termos da variação da entalpia e da entropia como mostra a equação 25.

$$\Delta G = G_{\alpha} - G_{\beta} = 0 \quad (24)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = 0 \quad (25)$$

Se a variação da energia de Gibbs no equilíbrio é nula, então a equação 25 se torna a equação 26.

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T} \quad (26)$$

Substituindo a equação (26) na equação (23) têm-se a equação 27.

$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta S}{\Delta V} = \frac{\Delta H}{T\Delta V} \quad (27)$$

A equação (27) é a equação de Clapeyron, aplicada a qualquer alteração de fase em um sistema de um componente puro. Ao se empregar a equação de Clapeyron na predição da variação da pressão de vapor (pv) de óleos vegetais, assume-se que a mistura de triacilgliceróis e outras moléculas lipídicas seja tratada como um pseudo componente puro. Com o intuito de avaliar a variação da pressão como uma estimativa da pv de óleos vegetais, o tratamento deverá ser feito na vaporização, equilíbrio L-V, desta forma a equação de Clapeyron deverá sofrer algumas modificações tornando-se a equação de Clausius-Clapeyron.

Reordenando a equação (27) tem-se a equação 28.

$$dp = \frac{\Delta H}{\Delta V} \frac{dT}{T} \quad (28)$$

Assumindo que a entalpia e o volume não variam tanto com a temperatura (T) e a pressão (p), a equação (28) integrada gera a equação 29.

$$p_2 - p_1 = \frac{\Delta H}{\Delta V} (\ln T_1 - \ln T_2) \quad (29)$$

No caso da vaporização (equilíbrio L-V) assume-se que o volume do gás formado é muito maior do que o volume líquido (equação 30).

$$\Delta V = V_2 - V_1 \cong V_v \quad (30)$$

Assumindo o vapor do óleo como ideal, o V_v pode ser reescrito como a seguir (equação 31).

$$V_v = \frac{RT}{p} \quad \text{ou} \quad \Delta V = \frac{RT}{p} \quad (31)$$

Substituindo na equação (27), tem-se a equação 32.

$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta H}{T\Delta V} \rightarrow \frac{dp}{dT} = \frac{\Delta H}{T} \frac{p}{RT} \rightarrow \frac{dp}{dT} = \frac{p\Delta H}{RT^2} \quad (32)$$

A equação (32) de Clausius-Clapeyron em sua forma diferencial fica sendo (equações 33 e 34):

$$\frac{dp}{p} = \frac{\Delta H}{R} \frac{dT}{T^2} \quad (33)$$

$$d \ln p = \frac{\Delta H}{R} \frac{d}{T} \quad (34)$$

Considerando que ΔH não variam T, a equação (34) fica sendo a equação 35.

$$d \ln p = \frac{\Delta H}{R} d \left(\frac{1}{T} \right) \quad (35)$$

A equação (35) na forma integrada se torna a equação 36.

$$\ln p_2 - \ln p_1 = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (36)$$

Utilizando os dados de análise termogravimétrica (TGA) na equação de Clausius-Clapeyron (equação 36) pretende-se estimar os valores da pressão de vapor dos óleos vegetais.

Para que as pressões de vapor destes óleos vegetais sejam determinadas pelo emprego da equação 36, serão considerados que:

- 1) O óleo seja tratado como pseudo componente puro. Isto só é possível se for considerado que as moléculas lipídicas que constituem os óleos vegetais, por serem da mesma classe, não interajam entre si na fase vapor.
- 2) O vapor do óleo seja considerado gás ideal.

Os dados de entalpia e de temperatura foram coletados dos resultados experimentais das análises termogravimétricas.

2.7. Estimativa da Massa molar (M) dos óleos

A massa molar dos óleos foi estimada com base na massa e proporção dos principais triacilgliceróis (TAG) presente no óleo (Tabelas 22, 23 e 24). O perfil de TAG do óleo da amêndoa de castanha do Brasil, Sacha Inchi e Pequi foi determinado seguindo o procedimento descrito por Cornelio-Santiago et al. (2017) e utilizando algoritmo estatístico sugerido por Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995).

Tabela 22 – Provável composição de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de castanha do Brasil.

Grupo(X:Y) _a	Triacilgliceról ^b	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Molar (%)	Massa (%)
50(1)	POP	833,37	4,39	4,20
50(2)	PLP	831,35	3,74	3,57
52(1)	POS	861,42	7,39	7,32
52(2)	OOP	859,41	14,15	13,99
52(3)	POL + PLO	857,39	13,40	13,21
52(4)	LLP	855,38	5,65	5,56
54(1)	SOS	889,48	3,19	3,26
54(2)	OOS	887,46	9,41	9,60
54(3)	SLO + SOL	885,44	14,92	15,19
54(4)	OOL	883,43	13,88	14,10
54(5)	LLO	881,41	7,69	7,80
54(6)	LLL	879,40	2,18	2,20

^a X: número de carbonos (excluindo carbonos de glicerol)

^a Y: número de ligações duplas

^b Grupos com composição total de triacilgliceróis inferiores a 0.5% que foram ignorados

Tabela 23 - Provavel composição de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de Sacha Inchi.

Grupo ^a (X:Y)	Triacilglicerol ^b	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Molar (%)	Massa (%)
50(2)	PLP	831,35	0,55	0,53
50(3)	PLnP	829,34	0,90	0,86
52(2)	OOP	859,41	0,88	0,87
52(3)	PLO + POL	857,39	2,74	2,69
52(4)	LLP	855,38	5,65	5,55
52(5)	PLLn + PLnL	853,36	7,35	7,20
52(6)	LnLnP	851,34	6,02	5,88
54(3)	SLO + SOL	885,44	1,10	1,12
54(4)	OOL	883,43	3,52	3,57
54(5)	LLO	881,41	8,25	8,35
54(6)	OLLn + OLnL + LnOL	879,40	14,87	15,00
54(7)	LLLn	877,38	19,73	19,87
54(8)	LnLnL	875,37	18,37	18,46
54(9)	LnLnLn	873,35	10,04	10,06

^a X: número de carbonos (excluindo carbonos de glicerol)

^a Y: número de ligações duplas

^b Grupos com composição total de triacilgliceróis inferiores a 05% que foram ignorados

Tabela 24 - Provavel composição de triacilgliceróis do óleo da amêndoa de Pequi.

Grupo ^a (X:Y)	Triacilglicerol ^b	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Molar (%)	Massa (%)
48(1)	MOP	805,32	1,06	1,00
50(1)	POP	833,37	26,60	25,96
50(2)	PLiP	831,35	7,49	7,29
52(1)	POS	861,42	5,29	5,34
52(2)	OOP	859,41	28,06	28,24
52(3)	POLi + PLiO	857,39	13,00	13,05
52(4)	LiLiP	855,38	1,62	1,63
54(2)	OOS	887,46	2,74	2,84
54(3)	OOO	885,44	8,03	8,33
54(4)	OOLi	883,43	4,95	5,12
54(5)	LiLiO	881,41	1,16	1,20

^a X: número de carbonos (excluindo carbonos de glicerol)

^a Y: número de ligações duplas

^b Grupos com composição total de triacilgliceróis inferiores a 05% que foram ignorados

Portanto, para a determinação da massa molar dos óleos de cada matéria prima foi utilizado a massa molar correspondente a cada triacilglicerol encontrado em sua composição (Tabelas 22, 23 e 24) e multiplicado por sua massa em porcentagem, posteriormente foi feita a soma dessas massas em proporção.

3. Resultados e discussões

3.1. Determinação experimental da solubilidade dos óleos em CO₂ supercrítico

Os testes preliminares para o cálculo de solubilidade dos óleos vegetais em CO₂ supercrítico indicaram que na escolha do tempo de equilíbrio, não houve diferença significativa entre as médias dos ensaios que compreendem o tempo de 1 a 4 horas (Tabela 25). No entanto optou-se por adotar 3h de equilíbrio entre o CO₂ e as sementes oleaginosas nos experimentos subsequentes.

As medidas experimentais da solubilidade dos óleos em CO₂ supercrítico das respectivas sementes foram feitas em triplicata. A solubilidade do óleo das sementes de castanha do Brasil, e das amêndoas Sacha inchi e do Pequi são apresentadas nas Tabelas 26, 27 e 28 respectivamente.

A solubilidade foi calculada de acordo com a Eq. (17), sendo uma relação direta entre a massa coletada do óleo da amêndoa de castanha do Brasil solubilizado em gás carbônico supercrítico. Apesar da solubilidade do óleo da castanha do Brasil não ter variado muito com a temperatura (Tabela 26), foi possível analisar que com seu aumento, a solubilidade também aumenta. Este mesmo comportamento foi observado por Cornelio-Santiago (2017) no estudo da solubilidade do óleo de grãos de café verde. Nesta condição de pressão a densidade do solvente diminui com o aumento da temperatura, no entanto o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor (p_v) do soluto o que faz com que migre para a fase leve (CO₂ supercrítico) e, neste caso a p_v do soluto influencia a solubilidade. Isto pode ser seguramente afirmado já que a pressão do processo (35 MPa) foi a mesma para todos os ensaios (Tabela 26).

Tabela 25 - Estudo do tempo de equilíbrio para determinar a solubilidade e média de Tukey experimental do óleo em CO₂ supercrítico.

T (°C)	P (MPa)	ρ CO ₂ (g/cm ³)	Tempo estático (h)	Solubilidade (g óleo /kg CO ₂)	CV	Massa CO ₂ (kg)
60	35	0,8636	2	10,96 ± 0,48 ^a	4,36	0,261±0,005
			3	11,24 ± 0,30 ^a	2,68	0,25±0,003
			4	11,31 ± 0,53 ^a	4,66	0,239±0,001

CV: Coeficiente de variação. ^a Média de Tukey. Letras minúsculas em uma mesma coluna não diferem entre si. ($P \leq 0,05$)

Tabela 26 - Média de Tukey da solubilidade de óleo de castanha do Brasil em CO₂ supercrítico à 35MPa após 3h de tempo de equilíbrio.

P (MPa)	T (°C)	ρ CO ₂ (g/cm ³)	Solubilidade (g óleo /kg CO ₂)	CV	Massa CO ₂ (kg)
35	40	0,9355	10,45 ± 0,01 ^a	0,08	0,271±0,005
	50	0,8999	11,03 ± 0,08 ^a	0,75	0,261±0,004
	60	0,8636	11,24 ± 0,30 ^a	2,68	0,251±0,003
	70	0,8265	11,51 ± 0,13 ^a	1,12	0,239±0,005
	80	0,7892	11,82 ± 0,31 ^a	2,62	0,228±0,004

CV: Coeficiente de variação. Letras minúsculas em uma mesma coluna não diferem entre si. ($P \leq 0,05$)

A solubilidade do óleo de sacha inchi em CO_2 supercrítico não variou significativamente com a temperatura de 40 a 70 °C, no entanto, quando atingiu a temperatura de 80°C a solubilidade diminuiu consideravelmente. O aumento da solubilidade com o aumento da temperatura é atribuído à influência que a temperatura tem na pressão de vapor dos solutos, que também influencia a pressão e a densidade do solvente que age sobre os solutos, neste caso no óleo da sacha inchi (Tabela 26).

A temperatura e principalmente a pressão agem na densidade do solvente, outro parâmetro que influencia na solubilidade, quanto maior a densidade do CO_2 maior será seu poder de solvatação (poder do solvente solubilizar solutos), o qual diminui na medida em que a densidade aumenta e, é nesta etapa que a pressão do vapor do soluto passa a influenciar positivamente, no entanto, quando o valor da densidade do solvente é muito baixo, a influência positiva da temperatura não é suficiente para aumentar a solubilidade e é isto que ocorre quando, na extração do óleo das sementes de sacha inchi a temperatura é de 80 °C (Tabela 27). No entanto, o tipo de soluto também interfere nesta relação T e P, pois para o óleo da castanha do Brasil (Tabela 26) este comportamento não foi observado.

Tabela 27 - Média de Tukey da solubilidade de óleo de sacha inchi em CO_2 supercrítico à 35MPa após 3h de tempo de equilíbrio.

P (MPa)	T (°C)	$\rho \text{ CO}_2$ (g/cm ³)	Solubilidade (g óleo /kg CO_2)	CV	Massa CO_2 (kg)
35	40	0,9355	11,74 ± 0,10 ^a	0,82	0,272±0,004
	50	0,8999	12,09 ± 0,82 ^a	6,77	0,261±0,004
	60	0,8636	12,71 ± 0,49 ^a	3,83	0,251±0,004
	70	0,8265	11,02 ± 1,67 ^{ab}	15,16	0,240±0,003
	80	0,7892	8,80 ± 1,47 ^b	16,75	0,229±0,003

CV: Coeficiente de variação. Letras minúsculas em uma mesma coluna não diferem entre si. ($P \leq 0,05$)

Para a amêndoa do Pequi (Tabela 28), o comportamento da solubilidade foi semelhante ao da castanha do Brasil. Observa-se um aumento da solubilidade com a temperatura, no entanto, para este óleo a solubilidade à 80°C diminui mas em uma intensidade muito inferior à solubilidade da Sacha Inchi (Tabela 27).

Tabela 28 - Média de Tukey da solubilidade de óleo de Pequi em CO₂ supercrítico à 35MPa após 3h de tempo de equilíbrio.

P (MPa)	T (°C)	ρ CO ₂ (g/cm ³)	Solubilidade (g óleo /kg CO ₂)	CV	Massa CO ₂ (kg)
35	40	0,9355	8,98 ± 0,99 ^c	11,03	0,2720±0,005
	50	0,8999	10,97 ±0,03 ^{abc}	0,23	0,2610±0,000
	60	0,8636	11,62 ± 0,12 ^{ab}	1,03	0,2510±0,005
	70	0,8265	12,46 ± 0,38 ^a	3,07	0,2404±0,003
	80	0,7892	9,97± 1,68 ^{bc}	16,90	0,2295±0,004

CV: Coeficiente de variação. Letras minúsculas em uma mesma coluna não diferem entre si. (P ≤ 0,05)

3.2. Determinação experimental da densidade e viscosidade

A Tabela 29 mostra os dados de densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtidos via extração com CO₂ supercrítico e extração com fluido pressurizado usando álcool isopropílico como solvente. Os valores de densidade do óleo obtidos pelos dois métodos de extração foram semelhantes e variam de 0,9 (± 0,00) a 0,88 (± 0,00) g/cm³ para as temperaturas de 20 a 70 °C, respectivamente. Estes resultados demonstram que a densidade do óleo não foi influenciado pelo método de extração, mas os valores da viscosidade dinâmica (73,71 ± 0,11 a 13,40 ± 0,00 mPa.s) e cinemática (80,65 ± 0,14 a 15,22 ± 0,00 mm²/s) do óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido via PLE usando álcool isopropílico como solvente foram maiores que os valores da viscosidade dinâmica (72,19 ± 0,06 a 13,20 ± 0,02 mPa.s) e cinemática (79,03 ± 0,07 a 15,00 ± 0,02 mm²/s) do óleo obtido via extração com CO₂ supercrítico, está pequena diferença entre os valores das viscosidades dos óleos obtidos pelos dois métodos de extração pode estar relacionado aos compostos minoritários (compostos fenólicos, por exemplo) presentes nas amêndoas trituradas que foram solubilizados em maior proporção pelo álcool isopropílico. Valores de densidade semelhantes com nossos resultados foram encontrados por Santos et al. (2013) (0,91 g/cm³) e Ferreira et al. (2006) (0,91 g/cm³).

Tabela 29 - Densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de castanha do Brasil obtido via extração com CO₂ supercrítico e extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico como solvente.

T °C	Extração com CO ₂ supercrítico			PLE		
	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade		Densidade (g/cm ³)	Viscosidade	
		Dinâmica (η , mPa.s)	Cinemática (ν , mm ² /s)		Dinâmica (η , mPa.s)	Cinemática (ν , mm ² /s)
20	0,91±0,00	72,19±0,06	79,03±0,07	0,91±0,00	73,71±0,11	80,65±0,14
30	0,91±0,00	47,18±0,28	52,04±0,32	0,91±0,00	48,00±0,03	52,92±0,03
40	0,90±0,00	32,32±0,17	35,91±0,19	0,90±0,00	32,87±0,10	36,51±0,11
50	0,89±0,00	23,14±0,09	25,91±0,11	0,89±0,00	23,50±0,01	26,30±0,02
60	0,89±0,00	17,20±0,06	19,41±0,05	0,89±0,00	17,47±0,00	19,68±1,73
70	0,88±0,00	13,20±0,02	15,00±0,02	0,88±0,00	13,40±0,00	15,22±0,00

Dados são expressados como a média \pm desvio padrão (n = 3). T: temperatura.

As análises da densidade destes óleos estudados apresentaram valores semelhantes para os dois métodos de extração variando de 0,93 (\pm 0,00) a 0,90 (\pm 0,00) g/cm³ para a temperatura de 20 a 70 °C, respectivamente, estes resultados indicam que o método de extração empregado na obtenção do óleo não teve influência sobre a densidade destes óleos (Tabela 30).

Assim, como também não teve influência sobre a viscosidade dinâmica e a cinemática dos óleos estudados. Como pode-se observar valores semelhantes de viscosidade dinâmica (43,75 \pm 0,03 a 10,25 \pm 0,04 mPa.s) e cinemática (46,98 \pm 0,18 a 11,42 \pm 0,04 mm²/s) foram obtidos para o óleo de amêndoa de sacha inchi obtido via PLE usando álcool isopropílico como solvente, quando comparado a os valores de viscosidade dinâmica (43,89 \pm 0,28 a 10,24 \pm 0,00 mPa.s) e cinemática (47,15 \pm 0,30 a 11,42 \pm 0,00 mm²/s) obtido via extração com CO₂ supercrítico.

Em termos de comparação dos resultados, valores semelhantes de densidade (0,92 g/cm³ a 25°C) e valores diferentes de viscosidade dinâmica (35,4 mPa.s a 20 °C) foram encontrados na literatura para o óleo de amêndoa de sacha inchi (GUTIÉRREZ, ROSADA e JIMÉNEZ, 2011), esta diferença na viscosidade provavelmente esteja sendo influenciada pelo solvente e/ou método de extração utilizado para obter o óleo de amêndoa de Sacha inchi.

Tabela 30 - Densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de Sacha inchi obtido via extração com CO₂ supercrítico e extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico como solvente.

T °C	Extração com CO ₂ supercrítico			PLE		
	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade		Densidade (g/cm ³)	Viscosidade	
		Dinâmica (η, mPa.s)	Cinemática (ν, mm ² /s)		Dinâmica (η, mPa.s)	Cinemática (ν, mm ² /s)
20	0,93 ± 0,00	43,89 ± 0,28	47,15±0,30	0,93±0,0	43,75±0,03	46,98±0,18
30	0,92±0,00	30,49±0,23	32,99±0,25	0,92±0,0	30,45±0,07	32,94±0,08
40	0,92±0,00	22,09±0,19	24,08±0,21	0,92±0,0	22,16±0,03	24,12±0,07
50	0,91±0,00	16,61±0,05	18,24±0,06	0,91±0,0	16,60±0,05	18,22±0,05
60	0,90±0,00	12,87±0,02	14,24±0,02	0,90±0,0	12,87±0,03	14,24±0,03
70	0,90±0,00	10,24±0,00	11,42±0,00	0,90±0,0	10,25±0,04	11,42±0,04

Dados são expressados como a média ± desvio padrão (n = 3). T: temperatura.

A Tabela 31 mostra os dados de densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de pequi obtidos via extração com CO₂ supercrítico e PLE usando álcool isopropílico como solvente. Densidades com valores semelhantes variando de 0,91 ± 0,00 a 0,88 ± 0,00 g/cm³ para a temperatura de 25 a 70 °C, respectivamente foram encontrados para os dois métodos extração de óleo utilizados neste estudo, o mesmo que confirmou mais uma vez que o os dois métodos de extração de óleo estudados não tiveram efeito sobre a densidade.

No caso da viscosidade dos óleos, existiu um pequena diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos de extração dos óleo estudados, sendo maior no óleo obtido via extração com CO₂ supercrítico variando de 83,27±0,24 a 14,05±0,00 para viscosidade dinâmica e variando de 91,48±0,26 a 16,03±0,00 para a viscosidade cinemática, quando comparado à viscosidade do óleo obtido via PLE que variou de 82,76±0,17 a 13,93±0,01 para a viscosidade dinâmica e variou de 90,89±0,20 a 15,90±0,01 pra a viscosidade cinemática. Esta pequena diferença na viscosidade dos óleos obtidos via extração com CO₂ supercrítico e PLE provavelmente está influenciada pelos compostos apolares que foram solubilizados em maior proporção pelo CO₂ supercrítico.

Tabela 31 - Densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de Pequi obtido via extração com CO₂ supercrítico e extração com líquido pressurizado (PLE) usando álcool isopropílico como solvente.

T °C	Extração com CO ₂ supercrítico			PLE		
	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade		Densidade (g/cm ³)	Viscosidade	
		Dinâmica (η , mPa.s)	Cinemática (ν , mm ² /s)		Dinâmica (η , mPa.s)	Cinemática (ν , mm ² /s)
20	0,91±0,00	83,27±0,24	91,48±0,26	0,91±0,00	82,76±0,17	90,89±0,20
30	0,90±0,00	53,21±0,03	58,91±0,03	0,90±0,00	52,74±0,06	58,40±0,07
40	0,90±0,00	35,79±0,02	39,92±0,02	0,90±0,00	35,47±0,04	39,58±0,04
50	0,89±0,00	25,23±0,01	28,36±0,01	0,89±0,00	25,01±0,03	28,12±0,03
60	0,88±0,00	18,52±0,00	20,97±0,00	0,88±0,00	18,36±0,02	20,79±0,03
70	0,88±0,00	14,05±0,00	16,03±0,00	0,88±0,00	13,93±0,01	15,90±0,01

Dados são expressados como a média \pm desvio padrão (n = 3). T: temperatura.

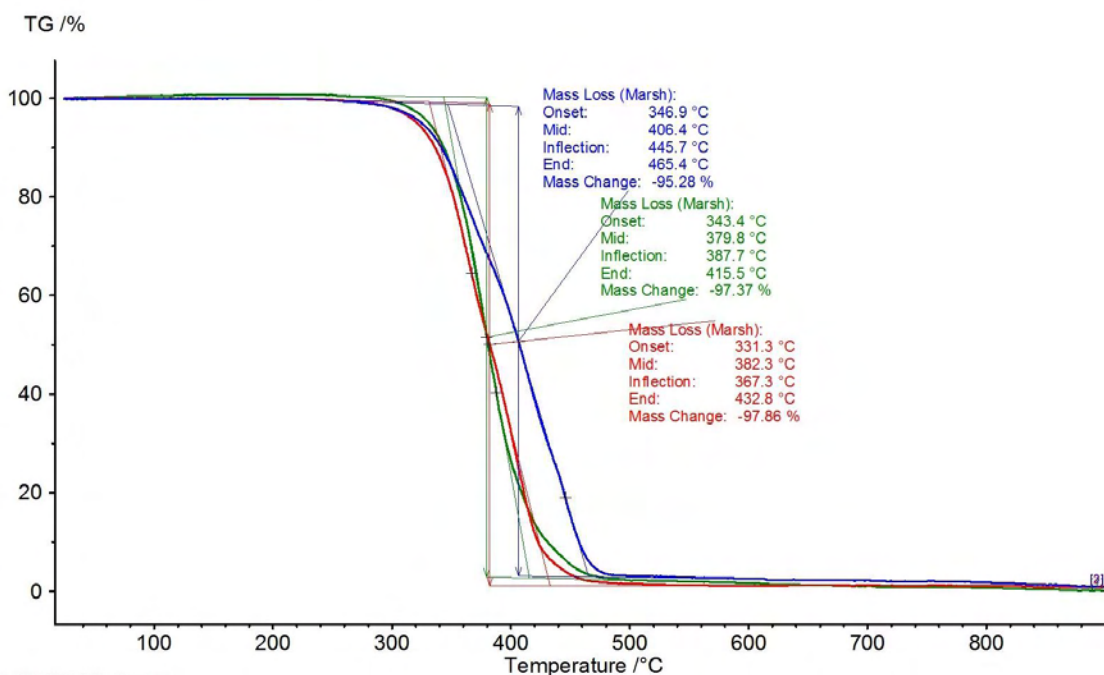
Na comparação da viscosidade dinâmica dos diferentes óleos estudados, a viscosidade dinâmica do óleo de amêndoa de pequi teve maiores valores comparado à do óleo de amêndoa de castanha do Brasil e sacha inchi. Provavelmente estes valores tenham sido afetados pela composição dos ácidos graxos de cada óleo, o óleo de amêndoa de pequi está constituído por uma mistura de sete ácidos graxos, aproximadamente o 40% (em massa) é composta de ácidos graxos saturados, sendo o principal o ácido palmítico. Estes ácidos graxos saturados não têm duplas ligações, então não provocam dobras nas cadeias carbônicas dos ácidos graxos, o que facilita a aproximação e aglomeração dessas moléculas e assim em conjunto contribuem para que o óleo de amêndoa de pequi seja mais viscoso. Por outro lado os óleos de amêndoa de castanha do Brasil (~ 67% de ácidos graxos insaturados) e sacha inchi (~ 89% de ácidos graxos insaturados) possuem maior porcentagem de ácidos graxos insaturados, cujo ácidos graxos principais são o ácido oleico (~ 38 % em massa) e o ácido alfa-linolénico (~ 47% em massa), respectivamente. Estes ácidos graxos insaturados possuem duplas ligações o que provocam dobras nas cadeias carbônicas dos ácidos graxos o que faz que estas moléculas dificultam sua aproximação e aglomeração, assim estes fatores contribuem para que o óleo de amêndoa de castanha do Brasil seja menos viscoso que óleo de de amêndoa de pequi e ainda muito menos viscoso seja o óleo de amêndoa de sacha inchi comparado ao óleo de castanha do Brasil.

3.3. Análise termogravimétrica (TGA) dos óleos obtidos por extração com CO₂ supercrítico

A Figura 23 mostra a curva termogravimétrica (TG) do óleo de amêndoa de castanha do Brasil, sacha inchi e pequi obtidos via extração com CO₂ supercrítico. Estas curvas permitiram identificar e comparar a estabilidade térmica destes óleos.

De acordo com a curva TG, todas mostraram perfis semelhantes e o processo de decomposição térmica ocorreu em uma única etapa para os três óleos estudados. As perdas de massa variaram em torno de 97,37% na faixa de temperatura de 343,4 a 415,5 °C para o óleo de amêndoa de castanha do Brasil, em torno de 95,28% na faixa de temperatura de 346,9 a 465,4 °C para o óleo de amêndoa de Sacha inchi e em torno de 97,86% na faixa de temperatura de 331,3 a 432,8 °C para o óleo de amêndoa de Pequi. Assim, os padrões de estabilidade térmica dos óleos foram determinados a partir do intervalo de temperatura em que a massa permaneceu inalterada e a diferença da variação da faixa de temperatura onde o óleo sofre a decomposição térmica provavelmente esta relacionado com a composição em ácidos graxos insaturados de cada óleo contém.

Figura 23 - Curvas termogravimétricas do óleo das amêndoas de castanha do Brasil —, sacha inchi — e pequi —



De forma geral as mudanças observadas nas curvas termogravimétricas dos óleos indicam que não teve evaporação de água livre nos três óleos estudados, o que foi confirmado pela não existência de picos na curva compreendida entre as temperaturas de 25 a 300 °C e, o único desvio em cada curva pode ser atribuído à decomposição das unidades de triacilglicerol e pequenas quantidades de componentes minoritários presentes nos óleos. E a completa carbonização dos óleos ocorreu entre 500 a 900 °C.

Comparando os resultados com o comportamento da curva termogravimétrica (TG) do óleo de castanha do Brasil obtido via extração com CO₂ supercrítico encontrados por Santos et al., 2012, constata-se uma diferença entre as faixas de temperatura (250 a 500 °C) onde

acontece a degradação do óleo. Além disso não existe uma única etapa nas curvas apresentados por estes autores, o que difere das medidas obtidas neste experimento (Figura 23).

As Figuras 24 e 25 indicam claramente as regiões de temperaturas nas quais a massa de óleo começa a se decompor, por isso são importantes na definição da região onde se possa considerar que esteja ocorrendo o equilíbrio L-V entre os óleos sem que ocorra a perda de massa. Assim, a temperatura (T) e a entalpia específica (ΔH) para o cálculo da pressão de vapor são valores obtidos nas regiões em que a estabilidade térmica do óleo permanece.

A Figura 24 indica que para cada pico há outros sobrepostos, o que caracteriza o óleo como uma mistura de componentes. Se o óleo fosse puro, como considerado para o cálculo da pressão de vapor (pv) os picos seriam mais bem definidos, não apresentariam ombros e, provavelmente teriam uma base mais estreita.

Figura 24 - Termogravimetriado com a linha de DSC para determinar a região onde serão medidas as entalpia do óleo das amêndoas de castanha do Brasil —, sacha inchi — e pequi

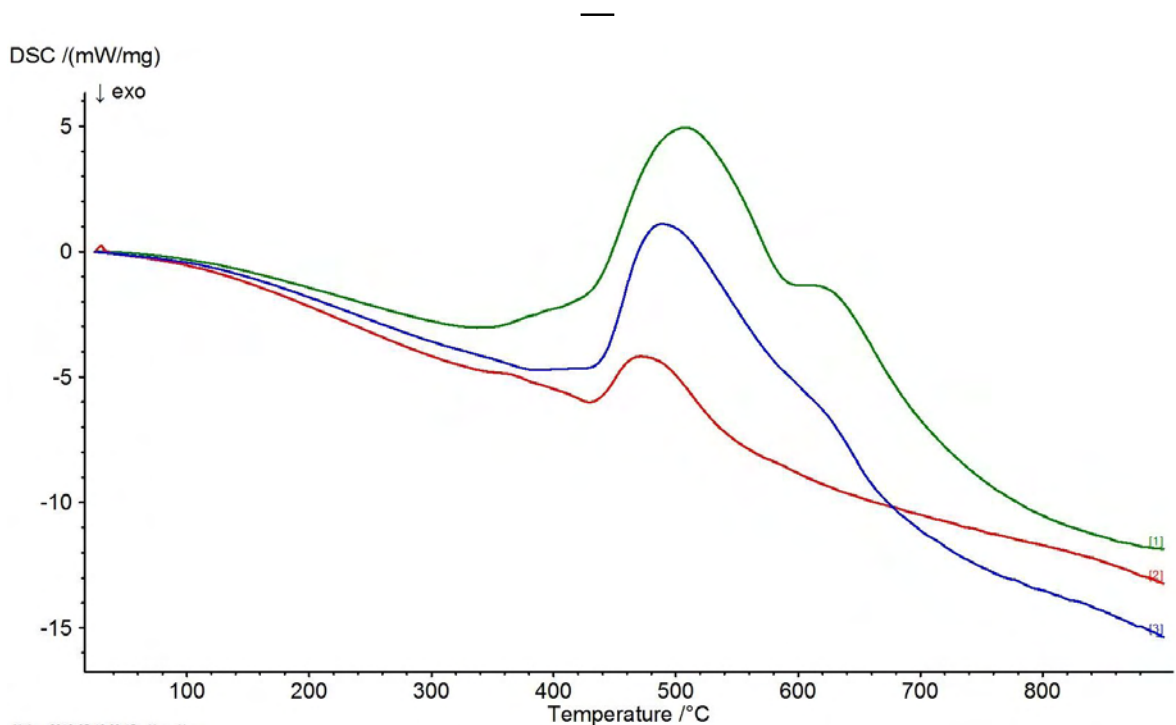
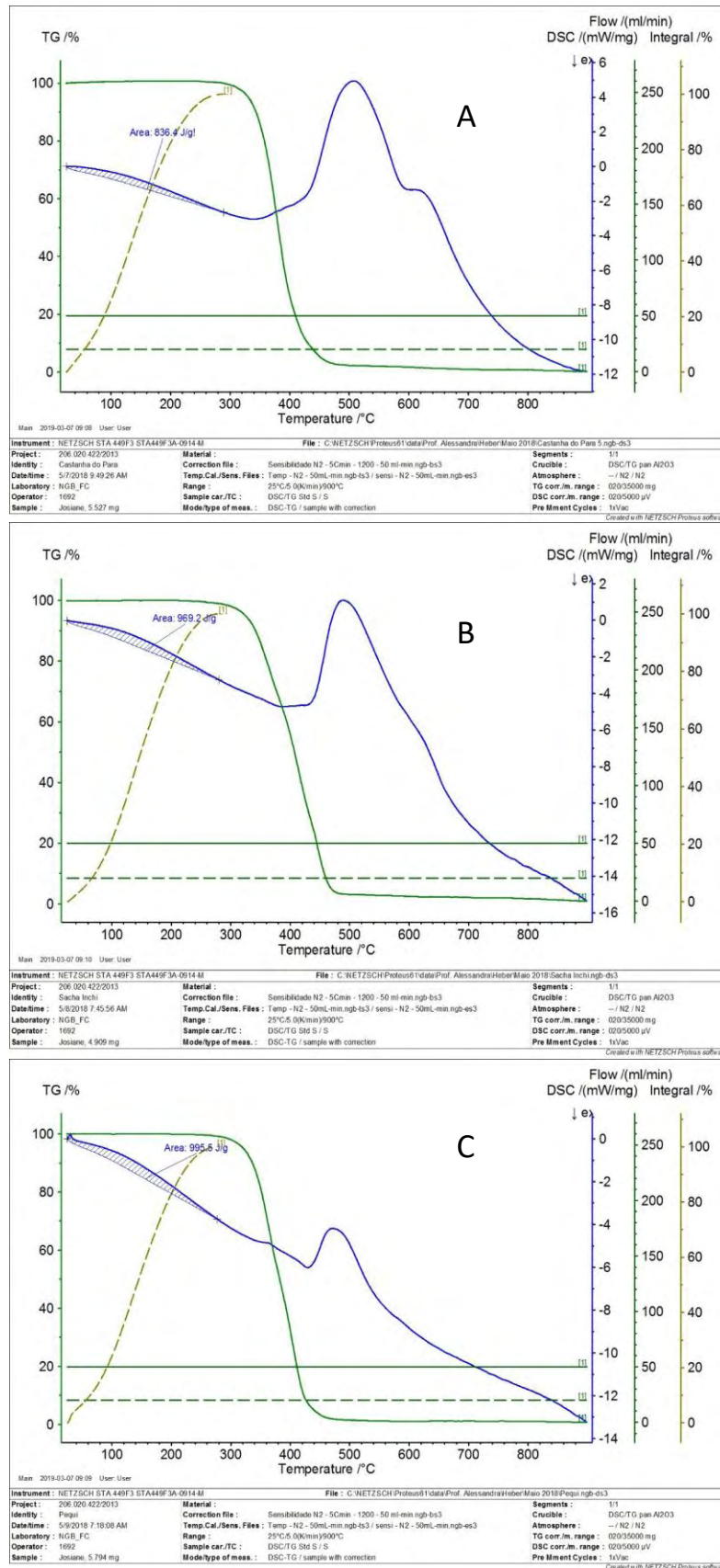


Figura 25 - Termogravimetriado com a linha de DSC para determinar a entalpia do óleo das amêndoas de castanha do Brasil (A), Pequi (B) e Sacha Inchi (C).



As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC - Differential Scanning Calorimetry) fornece a entalpia específica (ΔH) em J/g através da área calculada da curva desde onde se inicia o processo (25°C) até quando começa a perda de massa no cadinho. Esta foi a condição considerada como sendo aquela onde ocorre o equilíbrio L-V do óleo em um cadinho tampado, mas não lacrado. A Figura 25 mostra a região em que foi calculada (integrada) a área correspondente à variação de entalpia para a realização dos cálculos, nota-se que a área destas curvas nos fornece os valores da entalpia específica em J/g. Os valores da entalpia específica (ΔH) são apresentados na Tabela 8 assim como a faixa de temperatura onde se obteve a leitura e a massa molar predita por método de contribuição de grupos em outro trabalho realizado neste grupo de pesquisa.

3.4. Predição da pressão de vapor dos óleos vegetais utilizando análises termogravimétricas (TGA) e a equação de Clausius-Clapeyron

Utilizando os dados das análises termogravimétricas (Figura 25 e Tabela 32) e a equação de Clausius-Clapeyron (equação 36) calculou-se a pressão de vapor (p_v) dos óleos.

Tabela 32 - Dados termogravimétricos da variação de energia em função da temperatura utilizadas no cálculo da p_v e a massa molar estimada (M).

	ΔT (K)		ΔH (J/g)	Massa molar (M) (g/mol)
	T_i	T_f		
castanha do Brasil	298,15	562,55	836,4	869,718
Amêndoa Sacha Inchi	298,15	553,15	969,2	871,302
Amêndoa do Pequi	298,15	550,55	995,5	853,885

Pela Equação de Clausius-Clapeyron (equação 36) foi calculada a pressão de vapor dos óleos nas condições de entalpia específica (ΔH) apresentadas na Tabela 32.

A partir da constante dos gases ideais ($R = 8,3145 \text{ J/mol.K}$) e da massa molar (M) de cada óleo, determinou-se (equação 37) o valor de uma constante específica para cada óleo $R_{\text{óleo}}$ (Tabela 33).

Na equação de Clausius-Clapeyron a p_1 foi considerada a pressão atmosférica (barométrica local) sendo 94000 Pa à 25 °C, T_1 foi a temperatura ambiente já que o óleo dentro do cadinho com tampa estavam à temperatura ambiente e T_2 a temperatura até antes de iniciar a perda de massa de óleo. Os valores da pressão de vapor calculados são apresentados na Tabela 32.

$$\ln p_2 - \ln p_1 = \frac{\Delta H}{R_{\text{gás}}} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (36)$$

$$R_{\text{óleo}} = \frac{R}{M} \quad (37)$$

Tabela 33 - Valores de pv encontrados a partir da Equação de Clausius-Clapeyron

	M (g/mol)	$R_{\text{óleo}}$	p_2 (Pa)
castanha do Brasil	869,718	$9,55 \times 10^{-3}$	$1,067 \times 10^{-55}$
Sacha Inchi	871,302	$9,54 \times 10^{-3}$	$1,062 \times 10^{-63}$
Amêndoa do Pequi	853,885	$9,73 \times 10^{-3}$	$5,28 \times 10^{-64}$

Os resultados obtidos para a pressão de vapor apresentados, segundo a equação de Clausius-Clapeyron (p_2 da Equação 36) (Tabela 33), quando somada a pressão barométrica externa (94000 Pa) resultará na própria, já que p_2 é consideravelmente baixa, assim percebe-se que a medida da pressão de vapor (p_v) utilizando análises termogravimétricas em cadinhos com tampas não fixas não foi um método de medida adequada, pois o valor da pressão de vapor (p_v) foi igual à pressão externa o que é coerente com o furo na tampa do cadinho utilizado.

4. Conclusões

Este estudo demonstrou que a solubilidade do óleo da amêndoa de castanha do Brasil ($10,45 \pm 0,01$ a $11,82 \pm 0,31$ g óleo/kg CO_2) variou pela influência direta da pressão de vapor do óleo, mas a solubilidade dos óleos da amêndoa de pequi ($8,98 \pm 0,99$ a $12,46 \pm 0,38$ g óleo/kg CO_2) e sacha inchi ($8,80 \pm 1,47$ a $12,71 \pm 0,49$ g óleo/kg CO_2) variaram pela influência direta da densidade do CO_2 supercrítico. A densidade e viscosidade não foi influenciado pelo método de extração, para os dois métodos de extração obtiveram-se valores semelhantes. Todas as curvas de análises termogravimétricas dos óleos tiveram perfis semelhantes e o processo de decomposição térmica ocorreu em uma única etapa para os três óleos. Na predição da pressão de vapor foi possível perceber que o método utilizando análises termogravimétricas em cadinhos com tampas não fixas não foi um método de medida adequada, já que a pressão dentro e fora do recipiente de medida foi a mesma.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [projeto número 2016 / 13460-8]; o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [projeto número 306317 / 2016-8]; e o Fundo Nacional de

Desenvolvimento Científico, Tecnológico e de Inovação Tecnológica (FONDECYT) [projeto número 0242-2015] para a bolsa de estudo do primeiro autor, H.P.C.S.

5. Referências bibliográficas

- CASTELLANOS-DÍAZ, O.; SCHOEGGL, F. F.; YARRANTON, H. W.; SATYRO, M. A. Measurement of heavy oil and bitumen vapor pressure for fluid characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 52, n. 8, p. 3027-3035, 2013.
- CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food chemistry*, v. 141, n. 3, p. 1732-1739, 2013.
- CORNELIO-SANTIAGO, H.P.; GONÇALVES, B.C.; DE OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, A.L. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 386-394, 2017.
- DAMACENO, D. S.; PEREDERIC, O. A.; CERIANI, R.; KONTOGEORGIS, G.M.; GANI, R. Improvement of predictive tools for vapor-liquid equilibrium based on group contribution methods applied to lipid technology. *Fluid Phase Equilibria*, v. 470, p. 249-258, 2018.
- FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M.; GRASSO, S.; DACHA, M.; MONDELLO, L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 59, n. 24, p. 13043-13049, 2011.
- FANG, W.; LEI, Q. Continuous thermodynamic correlation and calculation of vapor pressure and vapor-liquid equilibrium constant of hydrocarbon fuel fractions. *Fluid phase equilibria*, v. 213, n. 1-2, p. 125-138, 2003.
- FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.
- FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; PIANTINO, C. R., GRIMALDI, R.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, n. 3, p. 323-329, 2009.
- FREITAS, S.P.; FREITAS-SILVA, O.; De MIRANDA, L.C.; COELHO, M.A.Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, v. 27, p. 14-17, 2007.

- GUTIÉRREZ, L. F.; ROSADA, L. M.; JIMÉNEZ, Á. Chemical composition of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites*, v. 62, n. 1, p. 76-83, 2011.
- HAMAKER, B. R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R. M.; CLARK, D.; GARCIA, H. H.; RODRIGUEZ, T. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chem*, v. 69, n. 4, p. 461-463, 1992.
- HUANG, F. H.; LI, M. H.; LEE, L. L.; STARLING, K. E.; CHUNG, F. T. An accurate equation of state for carbon dioxide. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 18, n. 6, p. 490-496, 1985.
- MATRICARDE FALLEIRO, R. M.; MEIRELLES, A. J. A.; KRÄHENBÜHL, M. A. Experimental determination of the (vapor+ liquid) equilibrium data of binary mixtures of fatty acids by differential scanning calorimetry. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 42, n. 1, p. 70-77, 2010.
- RASLAVIČIUS, L.; STRIŪGAS, N.; FELNERIS, M.; SKVORČINSKIENĖ, R.; MIKNIUS, L. Thermal characterization of *P. moriformis* oil and biodiesel. *Fuel*, v. 220, p. 140-150, 2018.
- RIBEIRO, M.B.N.; JEROZOLIMSKI, A.; DE ROBERT, P.; WILLIAM, E. MAGNUSSON, W.E. Brazil nut stock and harvesting at different spatial scales in southeastern Amazonia. *Forest Ecology and Management*. v. 319, p. 67–74, 2014.
- CORNELIO-SANTIAGO, H. P. Medida da solubilidade de óleo de café verde (*Coffea arábica* L.) em dióxido de carbono supercrítico e modelagem termodinâmica. 2015. 90p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; SOARES, F. A. S. M.; GIOIELLI, L. A.; COSTA, C. E. F.; LANNES, S. C. S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. *Food Research International*. v. 47, p. 253–258, 2012.
- SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; CARVALHO Jr., R.N.; COSTA, C.E.F.; FRANÇA, L.F.F.; LANNES, S.C.S. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. *Food research international*, v. 51, n. 2, p. 841-847, 2013.
- SOLTANI, S.; MAZLOUMI, S. H. A new empirical model to correlate solute solubility in supercritical carbon dioxide in presence of co-solvent. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 125, p. 79-87, 2017.
- TORRES, L.R.O.; SHINAGAWA, F.B.; SANTANA, F.C.; ARAÚJO, E.S.; OROPEZA, M.V.C.; MACEDO, L.F.L.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; LIMA, H.C.; MANCINI-FILHO, J.

Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. *International Food Research Journal*, v. 23, n 4, 1541-1551, 2016.

RASLAVIČIUS, L.; STRIŪGAS, N.; FELNERIS, M.; SKVORČINSKIENĖ, R.; MIKNIUS, L. Thermal characterization of *P. moriformis* oil and biodiesel. *Fuel*, v. 220, p. 140-150, 2018.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

WANG, T-Y.; MENG, X-Z.; JIA, M.; SONG, X-C. Predicting the vapor pressure of fatty acid esters in biodiesel by group contribution method. *Fuel Processing Technology*, v. 131, p. 223-229, 2015.

CAPÍTULO 7: Conclusão geral

CAPÍTULO 7: Conclusão geral

- A pesquisa demonstrou que no processo de PLE, a quantidade de solvente utilizada (S/F) não influenciou o X_0 , mas o St e a T influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o X_0 .
- O máximo X_0 (% massa) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi foram 60,40%, 39,66% e 46,38%, respectivamente e ocorreram quando o St foi de 9 min e a T de 86 °C. Também o St e T influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o TPC (64,23 a 589,46 e 19,77 a 43,86 mg EAG/kg de óleo) dos óleos da amêndoa de pequi e sachá inchi, respectivamente, mas não influenciaram os FFA (0,25 a 0,31; 0,21 a 0,25 e 0,25 a 0,30), conteúdo de β -sitosterol (9,51 a 40,32; 3,96 a 6,3 e 31,71 a 57,22 mg/100 g de óleo) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, respectivamente, e também não influenciou o TPC (39,58 a 108,41 mg EAG/kg de óleo) do óleo da amêndoa de castanha do Brasil.
- A pesquisa também demonstrou que no processo de extração com CO_2 supercrítico, o maior X_0 (% massa) da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi foram $67,51 \pm 0,16\%$, $40,47\%$ e $48,84\%$ sob as condições de 70 °C e 35 MPa, 60 °C e 35 MPa e 80°C a 35 MPa, respectivamente; e o FFA ($0,27 \pm 0,01$ a $0,32 \pm 0,01$; 0,21 a 0,25 e 0,25 a 0,31), o TPC ($6,37 \pm 0,23$ a $43,83 \pm 0,35$; 85,21 a 154,35 e 6,37 a 48,35 mg EAG/kg de óleo) e o conteúdo de β -sitosterol ($15,52 \pm 1,67$ a $23,63 \pm 3,12$; 3,91 a 6,44 e 46,58 a 253,67 mg/100 g de óleo) dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi, respectivamente foram determinados.
- A solubilidade do óleo da amêndoa de castanha do Brasil variou pela influência direta da pressão de vapor do óleo, mas a solubilidade dos óleos da amêndoa de pequi e sachá inchi variaram pela influência direta da densidade do CO_2 supercrítico.
- De forma geral, os processos de extração não influenciaram sobre o perfil dos ácidos graxos e triacilgliceróis, os principais ácidos graxos e triacilgliceróis do óleo da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi foram ácido linoleico (ω -6) e SLO + SOL, ácido oleico (ω -9) e OOP e ácido linolênico (ω -3) e LLLn, respectivamente, assim mesmo, a densidade e viscosidade dos óleos da amêndoa de castanha do Brasil, pequi e sachá inchi não foram influenciados pelos processos de extração empregados.

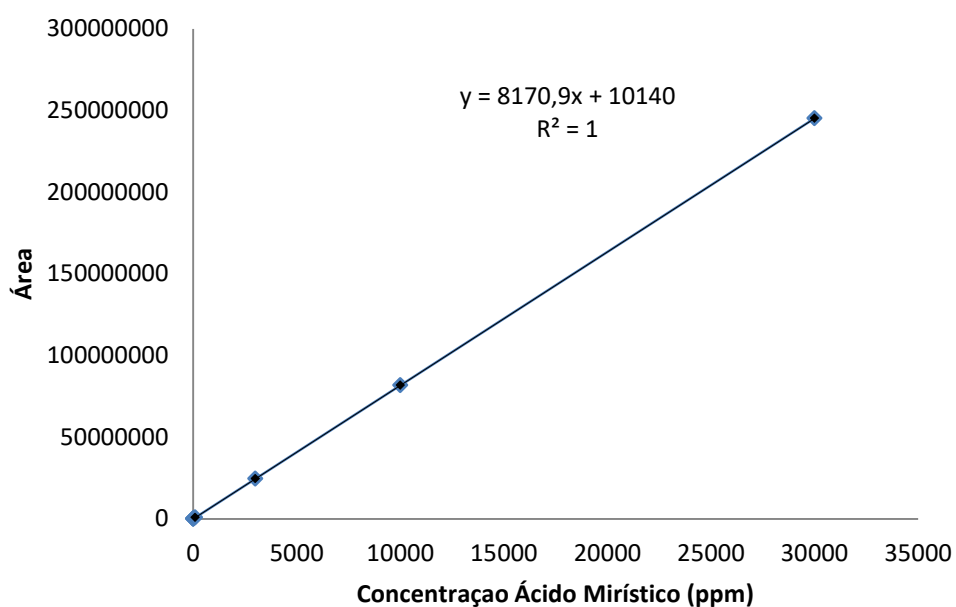
Sugestões para Trabalhos Futuros

- Avaliação da técnica de filtração e decantação nos extratos (óleo + solvente + outros compostos) obtidos por PLE para definir a melhor técnica de separação a baixo custo.
- Avaliação da pressão necessária para obter os mesmos ou melhores resultados no processo de PLE.
- Modelagem das cinéticas de extração, aumento de escala e avaliação econômica dos processos de PLE e SFE.
- Determinação da pressão de vapor usando análise termogravimétrica e cadinhos fechados que suportam altas pressões.

APENDICE 1

Curvas padrões obtidas a partir de diferentes concentrações de éster metílico de ácido mirístico para a quantificação de ácidos graxos (% , massa). Com o uso das equações das retas que correlacionam a % em área dos picos cromatográficos com a concentração do éster, foi possível determinar a concentração em equivalentes ao éster metílico de ácido mirístico.

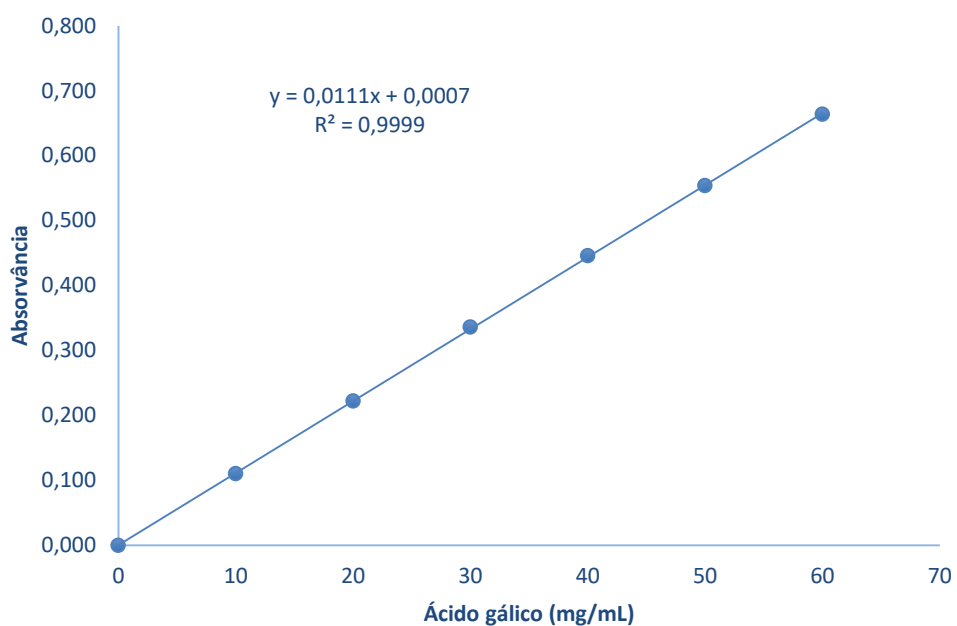
Figura A1. Curva padrão da relação entre a concentração e a % em área dos picos cromatográficos do éster metílico de ácido mirístico.



APENDICE 2

Curvas padrões obtidas a partir de diferentes concentrações de ácido gálico, nas concentrações de solução padrão de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L, utilizadas na quantificação do teor total de compostos fenólicos (TFC) nos óleos. A partir destas curvas, o TFC dos óleos foram expressos em equivalente ao ácido gálico.

Figura A2. Curva padrão de ácido gálico.



APENDICE 3

Curvas padrões do β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) estabelecida para diferentes concentrações do padrão e a % em área do pico correspondente. A partir das equações estabelecidas foi possível determinar a concentração de β -sitosterol nos óleos e os resultados foram expressos em mg por 100 g de óleo.

Figura A3. Curva padrão da relação entre a concentração e a % em área dos picos cromatográficos do β -sitosterol.

