



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE GÉRMEN DE MILHO COM O USO DE CO₂
EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS E COSSOLVENTES

Carolina Messias Marinho

Uberlândia - MG

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE GÉRMEN DE MILHO COM O USO DE CO₂ EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS E COSSOLVENTES

Carolina Messias Marinho

Orientadora: Érika Ohta Watanabe

Coorientadora: Carla Eponina Hori

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia - MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M338e Marinho, Carolina Messias, 1992-
2017 Extração de óleo de gérmen de milho com o uso de Co₂ em
condições supercríticas e cossolventes [recurso eletrônico] / Carolina
Messias Marinho. - 2017.

Orientadora: Érika Ohta Watanabe.

Coorientadora: Carla Eponina Hori.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.343>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. 2. Óleo de milho. 3. Extração (Química). 4.
Separação (Tecnologia). I. Watanabe, Érika Ohta, 1978- (Orient.). II.
Hori, Carla Eponina, 1965- (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

CDU: 66.0

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 20 DE JULHO DE 2017.

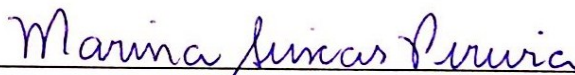
BANCA EXAMINADORA



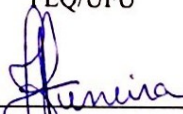
Prof^ª. Dr^ª. Érika Ohta Watanabe
Orientadora (PPGEQ/UFU)



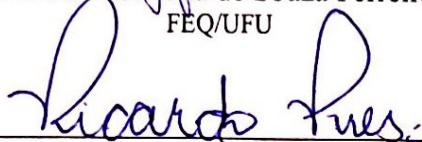
Prof^ª. Dr^ª. Carla Eponina Hori
Coorientadora (PPGEQ/UFU)



Prof^ª. Dr^ª. Marina Seixas Pereira
FEQ/UFU



Prof^ª. Dr^ª. Juliana de Souza Ferreira
FEQ/UFU



Prof. Dr. Ricardo Francisco Pires
DEQ/UFTM

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por nunca soltar da minha mão, por sempre iluminar a minha vida, me ajudar a enfrentar todos os obstáculos no caminho e nunca me deixar desistir dos meus objetivos.

À professora-orientadora Érika Ohta Watanabe, pela oportunidade de crescimento, paciência, organização e dedicação durante todos esses anos em que esteve me orientando. Com toda certeza todos esses ensinamentos farão parte da minha conduta como docente e pesquisadora.

À professora-coorientadora Carla Eponina Hori, pelos ensinamentos, pela oportunidade de crescimento, pelo uso do laboratório, incentivos, rigor científico aplicado aos experimentos e à escrita e conselhos que dou muito valor.

Aos meus pais, José Humberto e Hélia, que estão incondicionalmente ao meu lado, torcendo pela minha felicidade e sempre me ensinando com muito amor e paciência que nenhum sonho é impossível de se alcançar quando se tem muita dedicação, estudo e fé. A minha irmã, Mariana, que é a melhor amiga e irmã que eu poderia ter na vida. E ao meu cachorrinho, Theo, que está sempre me fazendo rir e me dando tanto carinho, sempre tão lindo. Tenho tanta sorte em ter vocês comigo! Vocês são o meu porto seguro! Amo vocês!

Ao meu namorado, Thalles, por todo o companheirismo, paciência, risadas, ajuda incondicional, compartilhando de seu carinho, apoio e força para me ajudar a enfrentar os momentos de desânimo e dificuldades. Você é o meu melhor amigo! Amo você!

A todos os meus familiares que estão sempre me apoiando e torcendo por mim! Em especial à minha avó querida, Maria Lúcia, minha prima amada, Natália e a toda a família Messias, que sempre me fazem rir e me sentir tão amada! Amo vocês!

À minha amiga de laboratório, Caroline Lemos, que me ensinou com tanta paciência e dedicação, os procedimentos experimentais da extração supercrítica e a lidar com as dificuldades no laboratório, me deu tantos conselhos e ajuda em quaisquer dúvidas que surgiram.

Aos meus colegas do laboratório: Rondinele, Sarah, Dyovani, Letícia, Karen e Rafael, pelas risadas, conselhos e apoio, compartilhando experiências e alegrando o dia-a-dia no laboratório.

Ao professor Marquinhos, por estar sempre disposto a me ouvir e me ajudar, acreditando na minha capacidade e compartilhando seu conhecimento.

À professora Juliana, por ser tão atenciosa e receptiva, disposta a ajudar e tirar dúvidas (desde a época de TQ1), pelos conselhos e por ter a risada mais legal da FEQ.

Às minhas amigas da turma de mestrado, Larysse e Marina, pelas conversas, companheirismo, momentos de brincadeira e ajuda nos estudos.

Às minhas companheiras de experimentos, Ana Beatriz e Marina, pela ajuda com os experimentos, esforço, comprometimento, conversas e brincadeiras no laboratório.

À empresa Caramuru, pela doação do gérmen de milho.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado.

À Vale S.A. pelo apoio financeiro pela aquisição do equipamento de extração.

A todos que contribuíram de alguma forma com a realização desse projeto de mestrado.

**“Pense na única coisa que você sempre quis.
Agora, encontre-a no olho de sua mente e
sinta ela em seu coração”(A Bela e a Fera)**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Milho.....	3
2.1.1. Métodos para obtenção do óleo de milho em condições supercríticas.....	4
2.2. Processos de extração em condições supercríticas.....	6
2.2.1. Fluido supercrítico.....	8
2.2.2. Cinética da extração supercrítica.....	13
2.2.3. Fatores que influenciam na extração supercrítica.....	15
2.2.4. Estudos sobre a extração supercrítica de óleos vegetais.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Material.....	22
3.1.1. Gérmen de milho.....	22
3.1.2. Gases, reagentes e padrões.....	22
3.2. Métodos.....	23
3.2.1. Extração com CO ₂ supercrítico.....	23
3.2.2. Extração com CO ₂ supercrítico e cossolventes.....	26
3.2.3. Extração com solvente orgânico.....	29
3.2.4. Caracterização do extrato.....	30
3.2.4.1. Propriedades físicas.....	30
3.2.4.2. Perfil de ácidos graxos em cromatografia gasosa.....	31
3.2.4.3. Análise da atividade antioxidante - DPPH•.....	32
3.2.4.4. Índice de acidez.....	34
3.2.4.5. Índice de peróxido.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. Processos de extração do óleo.....	36
4.1.1. Curvas cinéticas da extração supercrítica.....	36
4.1.2. Extração com CO ₂ supercrítico, efeito da temperatura e pressão do processo.....	38

4.1.3.	Extração com CO ₂ supercrítico e cossolventes.....	41
4.2.	Propriedades físicas.....	42
4.2.1.	Densidade e índice de refração.....	42
4.2.2.	Índice de acidez.....	43
4.2.3.	Índice de peróxido.....	44
4.2.4.	Perfil de ácidos graxos em cromatografia gasosa.....	45
4.2.5.	Análise da atividade antioxidante - DPPH•.....	47
5.	CONCLUSÃO.....	51
5.1	Principais conclusões.....	51
5.2.	Sugestões para trabalhos futuros.....	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes básicos do grão de milho.....	3
Figura 2	Diagrama pressão <i>versus</i> temperatura para um componente puro.....	9
Figura 3	Diagrama pressão <i>versus</i> temperatura para o dióxido de carbono.....	11
Figura 4	Curva típica de extração supercrítica.....	14
Figura 5	Períodos da extração supercrítica.....	15
Figura 6	Aparato experimental utilizado para a extração com CO ₂ supercrítico.....	23
Figura 7	Aparato experimental utilizado para a extração com CO ₂ supercrítico e cossolventes.....	27
Figura 8	Aparato Soxhlet.....	29
Figura 9	Curvas massa de extrato <i>versus</i> tempo do processo de extração de óleo de gérmem de milho em diferentes condições de extração utilizando o CO ₂ supercrítico como solvente.....	36
Figura 10	Curvas rendimento <i>versus</i> tempo do processo de extração de óleo de gérmem de milho em diferentes condições de extração utilizando o CO ₂ supercrítico como solvente.....	37
Figura 11	Correlação linear entre rendimentos e densidades de CO ₂ na extração supercrítica com o uso de CO ₂	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Teor de ácidos graxos em óleos vegetais.....	4
Tabela 2.	Vantagens e desvantagens da extração supercrítica.....	8
Tabela 3.	Propriedades físicas do gás, líquido e fluido supercrítico.....	10
Tabela 4.	Propriedades críticas de alguns solventes usados em processos de extração supercrítica.....	11
Tabela 5.	Aditivos comumente usados para modificar o CO ₂ em extrações com fluidos supercríticos.....	13
Tabela 6.	Condições experimentais dos ensaios supercríticos de óleo de gérmen de milho com o uso de CO ₂	25
Tabela 7.	Padrões de ácidos graxos e tempos de retenção utilizados na análise quantitativa de óleo de gérmen de milho.....	32
Tabela 8.	Preparo das soluções para a curva do DPPH•.....	33
Tabela 9.	Rendimento da extração supercrítica com o uso de CO ₂ a diferentes condições de temperatura e pressão.....	39
Tabela 10.	Resultados dos ensaios realizados nas extrações de óleo de gérmen de milho com o uso de cossolventes a temperaturas de 40, 60 e 80 °C e vazões de CO ₂ de 0,01; 0,05 e 0,1 ml/min.....	42
Tabela 11.	Propriedades físicas do óleo de gérmen de milho.....	43
Tabela 12.	Resultados das análises de índice de peróxido obtidos nas extrações de óleo de gérmen de milho com CO ₂ em condições supercríticas, com o uso de solventes orgânicos e com o uso de cossolventes.....	45
Tabela 13.	Perfis de ácidos graxos obtidos nas extrações de óleo de gérmen de milho com CO ₂ em condições supercríticas, com o uso de solventes orgânicos e com o uso de cossolventes.....	46
Tabela 14.	Perfis de ácidos graxos para outros óleos vegetais extraídos com o uso de CO ₂ supercrítico como solvente.....	47
Tabela 15.	Potencial antioxidante das amostras de óleo de gérmen de milho usando o método DPPH• nas extrações com o uso de CO ₂ e cossolventes em condições supercríticas e com o uso de solventes orgânicos por soxhlet.....	48
Tabela 16.	Classificação do potencial antioxidante das amostras de óleo de gérmen	

de milho usando o método DPPH•.....	49
-------------------------------------	----

RESUMO

O óleo de gérmen de milho é tradicionalmente usado no cozimento de alimentos, saladas e margarinas devido ao sabor suave e poder nutricional existente em sua composição. Atualmente, o método mais utilizado na extração do óleo de gérmen envolve o uso de solventes orgânicos, que em sua maioria, apresentam altos custos, demandam longos tempos de extração, além de níveis de inflamabilidade e toxicidade consideráveis. Diante disso, buscando-se a obtenção do óleo com melhor qualidade, maior viabilidade técnica e econômica e, ainda sustentabilidade ambiental, destaca-se a extração supercrítica com o uso de CO₂ como uma tecnologia limpa, inovadora, eficiente, com extratos ambientalmente amigáveis. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o estudo da extração do óleo de gérmen de milho com o uso de dióxido de carbono e adição de cossolventes (hexano, acetona e etanol). Com o intuito de avaliar a influência da temperatura e pressão no rendimento do óleo de gérmen de milho, experimentos foram conduzidos em temperaturas de 45-85 °C, pressão de 150-250 bar e vazão de 3 mL CO₂/min, para os ensaios conduzidos apenas com CO₂ supercrítico. Para os ensaios com adição de cossolventes foram utilizadas faixas de temperatura de 40-80 °C, pressão de 250 bar e vazão de CO₂ de 4 mL/min, respectivamente e vazões de cossolventes de 0,01 a 0,1 mL/min. A extração convencional com o uso dos solventes orgânicos etanol, acetona e hexano também foi realizada para efeito de comparação. As amostras de óleo extraídas foram submetidas a análises de densidade, índice de refração, acidez, peróxido, quantificação de ácidos graxos e atividade antioxidante. Os resultados mostraram que a pressão teve efeito positivo e a temperatura efeito negativo sobre o rendimento da extração com o uso de CO₂ supercrítico. Os resultados de rendimento com a adição de cossolventes foram maiores do que com o uso de CO₂ puro, alcançando um rendimento máximo de 13,81% com o uso de etanol, o melhor cossolvente utilizado. Na extração convencional, o uso do etanol acarretou maior rendimento de 35,70%. Além disso, as análises realizadas de densidade, índice de refração, perfil de ácidos graxos e acidez não apresentaram diferenças significativas entre os óleos obtidos pelo método convencional, uso de CO₂ e adição de cossolventes.

Palavras-chave: óleo de gérmen de milho, extração, fluido supercrítico, cossolventes, processos de separação.

ABSTRACT

Corn germ oil is commonly used for cooking, salads, margarines and animal nutrition due to the mild flavor and nutritional power in its composition. Currently, the most widely used method of corn germ oil extraction involves the use of organic solvents, which are mostly expensive, require long extraction time, and they present considerable levels of flammability and toxicity. In order to obtain the oil with better quality, greater technical and economic viability, and environmental sustainability, the supercritical extraction with the use of CO₂ stands out as a clean, innovative, efficient technology with environmentally friendly extracts. The objective of the present work was the study of the extraction of corn germ oil with the use of carbon dioxide and addition of cosolvents (hexane, acetone and ethanol). In order to evaluate the influence of temperature and pressure on corn germ oil yield, experiments were carried out at temperatures of 45-85 °C, pressure of 150-250 bar and flow rate of 3 mLCO₂/min for the tests conducted with supercritical CO₂. For the tests with addition of cosolvents, temperature range of 40-80 °C, pressure of 250 bar, CO₂ flow rate of 4 mL/min, and cosolvents flow rates of 0.01 up to 0.1 mL/min were used. The conventional extraction with the use of organic solvents ethanol, acetone and hexane was also performed for comparison purposes. The extracted oil samples were submitted to density analysis, refraction index, acidity, peroxide index, fatty acids profile and antioxidant activity. The results showed that pressure had a positive effect and temperature had a negative effect on the yield of the extraction with the use of CO₂. The yield results with the addition of cosolvents were higher than the use of supercritical CO₂, reaching a maximum yield of 13.81% using ethanol. In addition, the analysis of density, refractive index, acidity, peroxide and fatty acids profile did not present significant differences between the oils obtained by the conventional method, with the use of CO₂ and cosolvents addition.

Key words: corn germ oil, extraction, supercritical fluids, cosolvents, separation processes.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O uso da extração com fluidos supercríticos tem aumentado significativamente nas últimas décadas como uma alternativa em potencial que apresenta diversas vantagens sobre as técnicas convencionais de extração de óleos. A tecnologia é relativamente simples e fundamenta-se na exploração das propriedades que os fluidos apresentam nas proximidades de seus pontos críticos. Deste modo, pequenas modificações em temperatura e/ou pressão acarretam enormes alterações no poder de solvatação, densidade e possibilitam a separação entre o solvente e o soluto próximo aos seus pontos críticos, o que torna desnecessário novas etapas de separação subsequentes (NIMET *et al.*, 2011). Diversos compostos podem ser usados como fluidos supercríticos, tais como, propano, dióxido de carbono e n-butano, mas o mais comumente utilizado é o CO₂ por suas propriedades de segurança à saúde humana e meio ambiente, evitar reações desnecessárias, ser reciclável em processos industriais e por possuir temperatura crítica de 31,2 °C, o que ajuda na preservação dos extratos, desde que ao final da extração, o CO₂ seja eliminado levando a um extrato livre de solvente (SILVA *et al.*, 2015).

A utilização de cossolventes em extração com fluidos supercríticos - que se refere a pequenas quantidades de solventes orgânicos combinadas com o fluido supercrítico usado como solvente - também tem sido empregada como alternativa para melhorar a eficiência da extração supercrítica, aumentando o rendimento e modificando a seletividade do processo. O cossolvente pode alterar características, como polaridade e interações específicas com o soluto, formando pontes de hidrogênio ou interagindo com os sítios ativos da matriz sólida (DALMOLIN *et al.*, 2010).

A extração supercrítica é afetada por vários parâmetros, tais como, temperatura, pressão, tempo de extração, vazão e tamanho da partícula (UQUICHE *et al.*, 2015). A compreensão dos efeitos dos diferentes parâmetros no processo e do rendimento da extração com fluidos supercríticos é essencial não apenas para avaliação econômica e otimização da extração, mas também para a habilidade de prever o processo, o que é útil em *scale-up* assim como no *design* e otimização de uma planta industrial (JOKIC *et al.*, 2012).

Baseado nestes aspectos, o objetivo do presente trabalho foi o estudo da extração de óleo de milho com o uso de dióxido de carbono em condições supercríticas e adição de cossolventes. Neste estudo foi feita a comparação entre os métodos de extração com uso de

solvente orgânico, de CO₂ em condições supercríticas e de CO₂ supercrítico com acréscimo de cossolventes. Além disso, teve-se como objetivos específicos:

- ✓ Avaliação o efeito dos parâmetros T e P na extração em condições supercríticas;
- ✓ Comparação dos métodos de extração supercrítica com o uso de CO₂, supercrítico com adição de cossolventes e extração convencional (Soxhlet) do óleo de milho;
- ✓ Realização de análises das propriedades físico-químicas e composição do óleo: densidade, índice de refração, acidez, peróxido, atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos nas amostras de óleo obtidas pelos métodos utilizados.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MILHO

O milho é um cereal altamente versátil, sendo usado para o consumo humano e animal (rações) e largamente utilizado na produção de elementos espessantes, colantes, etanol e óleos. O cereal apresenta grandes propriedades nutricionais, tais como, fibras, vitaminas, gorduras, açúcares e celulose, sendo considerado um dos alimentos mais nutritivos e uma importante fonte energética para o homem (SINDMILHO & SOJA, 2017). O grão é formado de aproximadamente 73% de amido, 10% de proteína, 5% de óleo e o restante 12%, composto por fibra, vitaminas e minerais. Seus componentes básicos são o endosperma, o pericarpo e o gérmen, como pode ser observado na Figura 1. O endosperma corresponde à maior porção do grão, sendo composto basicamente de amido, glúten e pequena porcentagem de gordura e outros componentes. O pericarpo compõe a camada mais externa, composta principalmente de celulose e hemicelulose e, por fim, o gérmen, compõe a parte vegetativa e fonte de óleo do milho (cerca de 82,6% do óleo presente no grão), contendo a informação genética para a propagação da planta de milho (WATSON, 1994).

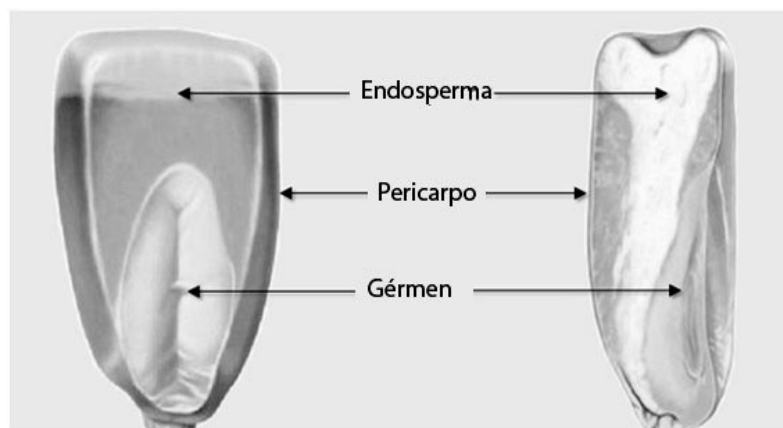


Figura 1. Componentes básicos do grão de milho.

Fonte: (Adaptada de Watson, 1994).

O gérmen de milho é a parte do grão com elevada quantidade de óleo em sua composição e, portanto, a matéria-prima de todo o óleo de milho produzido e comercializado, o que justifica a nomenclatura mais precisa e comumente utilizada de “óleo de gérmen de milho”.

Sua obtenção ocorre durante o processo para retirada do amido por via úmida, no qual, o milho é umedecido para amaciar a semente e facilitar a separação do glúten, proteína e gérmen. A qualidade nutricional de um óleo está relacionada à quantidade de ácidos graxos presente em sua composição, em que, um alto teor de ácidos graxos poli-insaturados significa que o óleo apresenta um alto valor nutricional e o gérmen de milho é rico em triacilgliceróis. A Tabela 1 apresenta o teor de ácidos graxos comumente presente em óleos vegetais. O óleo de milho possui em sua composição alto teor de ácido linoléico, que é um ácido graxo essencial, ou seja, requerido pelo corpo humano, mas que não pode ser biossintetizado e necessita ser obtido através da dieta alimentar. Uma outra característica vantajosa do gérmen é o baixo nível de ácidos graxos saturados e baixo teor de ácido linolênico que apresenta. Este último é suscetível à oxidação, levando à rancificação (GUNSTONE, 2002). A rancificação oxidativa pode ocasionar alteração na qualidade do sabor, cor, aroma, propriedades nutricionais e diversos outros parâmetros do óleo, inviabilizando o consumo.

Tabela 1. Teor de ácidos graxos em óleos vegetais

Óleos	Ácido graxo saturado	Ácido graxo monoinsaturado	Ácido graxo poli-insaturado	
			Linoléico	Linolênico
Canola	6%	58%	26%	10%
Girassol	11%	2%	69%	...
Milho	13%	25%	61%	1%
Oliva	14%	77%	8%	<1%
Soja	15%	24,5%	54%	7%

Fonte: *Food Ingredients* Brasil (2014)

2.1.1 Métodos para obtenção do óleo de milho em condições supercríticas

O óleo de milho têm sido extensivamente objeto de pesquisas e estudos da relação da gordura dietética nos níveis de colesterol no sangue, pois ele é o melhor para reduzir os níveis de colesterol no sangue. Estudos mostraram também que as dietas enriquecidas com ácidos graxos poli-insaturados do óleo de milho podem diminuir significativamente a pressão sanguínea com a redução de cerca de 12% na pressão arterial de homens e 5% em mulheres que manifestavam hipertensão leve (CORN REFINERS ASSOCIATION, 2006).

Reconhecido como uma rica fonte de tocoferóis que são antioxidantes naturais, o gérmen de milho é responsável por inibir reações de oxidação biológica prejudiciais ao organismo humano, auxiliando na manutenção da qualidade de óleos vegetais também devido à inibição de processos oxidativos e apresentam ainda efeitos anticarcinogênicos (YU *et al.* 2002).

Dentre os tocoferóis presentes no óleo de milho, o α -tocoferol recebe o maior destaque devido a sua elevada composição de vitamina E, no entanto, os outros isômeros, γ , β e δ -tocoferóis, também são conhecidos por valiosas propriedades antioxidantes (GUNSTONE, 2002). A vitamina E é um importante antioxidante natural dos alimentos, especialmente aqueles ricos em ácidos graxos insaturados. Acredita-se que a vitamina E protege o organismo humano contra efeitos degenerativos, principalmente contra cânceres e doenças cardiovasculares (CARLUCCI, 2001).

Os processos tradicionais para extração do óleo de gérmen de milho são os métodos de prensagem mecânica e de extração com solventes orgânicos (em aparato Soxhlet), podendo-se ainda combinar os dois processos, em etapas de condicionamento (aquecimento), seguido por prensagem mecânica (pré-prensagem) e, por fim, extração (GUNSTONE, 2002). As técnicas de extração influenciam de forma direta na composição e qualidade do óleo, sendo necessária a escolha do solvente e/ou cossolvente a ser utilizado, com afinidade química e polaridade compatíveis com os compostos a serem extraídos.

O processo de extração por prensa mecânica é conduzido em prensas contínuas tipo parafuso, em que o eixo helicoidal gira num cesto composto por barras de aço retangulares espaçadas por meio de lâminas. As barras tem seu espaçamento regulado para permitir a saída do óleo e ao mesmo tempo agir como filtro para as partículas da torta (resíduo de prensagem). O gérmen entra na prensa, por meio de um eixo alimentador que movimenta o material para frente, comprimindo-o ao mesmo tempo. Este procedimento pode ser precedido de um aquecimento controlado do gérmen, com o objetivo de aumentar o rendimento da extração, que varia de acordo com o tipo de matéria-prima (JORGE, 2009).

A extração com solventes é altamente utilizada em escala laboratorial, especialmente em extrações de matrizes sólidas, como é o caso das extrações em gérmen de milho. A extração em Soxhlet, geralmente, é realizada com solventes apolares, como o hexano (como no caso do gérmen de milho) e o éter de petróleo como solventes, por 8 a 20 horas ininterruptas com a extração ocorrendo de forma contínua. O processo ocorre com a inserção do gérmen em envelopes de filtro que são lacrados e do solvente no interior de um balão volumétrico. A manta de aquecimento fornece calor para o sistema até que o solvente atinja o ponto de ebulição

à pressão atmosférica. Dessa forma, o solvente consegue extrair os compostos de acordo com a sua afinidade química e polaridade. O extrato, no entanto, é separado do solvente que é evaporado e mais uma vez colocado em contato com o germen, o que ocorre repetidas vezes até o término da extração (Métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz, 2004).

A extração Soxhlet é uma metodologia de entendimento e execução simples, que apresenta alto rendimento pela constante renovação do solvente utilizado, já que o extrato permanece no Soxhlet, o que favorece a transferência de massa. O processo necessita de etapas posteriores para eliminação do solvente, pois parte residual do solvente é indesejável no produto alvo devido à toxicidade. As altas temperaturas utilizadas também alteram as características físicas e químicas do germen e o processo é pouco seletivo, extraindo todos os compostos possíveis (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Estas características indesejadas justificam a necessidade de encontrar métodos alternativos de extração, para obtenção de produtos com melhor qualidade em termos de propriedades físicas, químicas e composição e, ainda com sustentabilidade econômica e ambiental.

2.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS

Desde os primórdios históricos, a extração de substâncias a partir de vegetais vêm sendo praticada com finalidades alimentícias, aromáticas e medicinais. A finalidade é de se obter um produto puro e padronizado. Dessa forma, as técnicas para a extração de componentes ativos de insumos naturais evoluíram significativamente no decorrer dos tempos (MAUL *et al.*, 1986). As tecnologias de extração convencionais envolvem o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, que não são amigáveis ao meio ambiente, exigem pré-purificação adicional, etapas de concentração podem resultar em perda ou degradação dos extratos e métodos de separação que exigem longo tempo. Diante disso, as tecnologias com fluidos supercríticos têm-se desenvolvido consideravelmente em um grande número de setores industriais. Fluidos supercríticos são empregados na extração de diversas substâncias, tais como, cafeína do café, nicotina do tabaco, óleos de alimentos, etc., em corantes de tecidos fabris ou como fase móvel em cromatografia de fluidos supercríticos (CASAS *et al.*, 2009; MARSAL *et al.*, 2000; ROSTAGNO *et al.*, 2002). A primeira observação da ocorrência de uma fase supercrítica foi feita pelo Barão Cagniard de la Tour em 1822. Ele observou visualmente que os limites entre gás e líquido desapareciam quando a temperatura de certos materiais era

elevada e cada um era aquecido em um frasco fechado. Com estes primeiros experimentos, o ponto crítico de uma substância foi descoberto (SAIRAM *et al.*, 2012).

Os primeiros pesquisadores a demonstrar o poder de solvatação dos fluidos supercríticos em sólidos foram Hannay e Hogarth, em 1879. Eles estudaram as solubilidades do cloreto de cobalto II, do cloreto de ferro III, do brometo de potássio e do iodeto de potássio em etanol no estado supercrítico e observaram que as concentrações desses haletos em etanol, no estado supercrítico, eram maiores do que àquelas previstas por suas pressões de vapor. Os autores observaram que uma elevação na pressão causava um aumento na solubilidade, enquanto que um decréscimo na pressão acarretava em uma precipitação. No entanto, mesmo com o conhecimento da alta capacidade de solvatação de um fluido supercrítico, a extração com o uso de fluidos supercríticos despertaram pouco interesse durante a primeira metade do século XX (TAYLOR, 1996). Em 1970, um significativo desenvolvimento na extração com fluido supercrítico incentivou os trabalhos extensivos de remoção de cafeína do café com o uso de CO₂ na Alemanha (SAIRAM *et al.*, 2012).

A extração com fluidos supercríticos têm despertado grande interesse de pesquisa devido às suas vantagens na qualidade dos produtos extraídos quando comparados com aqueles extraídos por técnicas tradicionais na tecnologia de extração e fracionamento (JUSTO *et al.*, 2005; SAHENA *et al.*, 2009). A Tabela 2 apresenta algumas das vantagens e desvantagens do processo de extração supercrítica com o uso de CO₂.

As aplicações industriais da extração supercrítica encontram-se nas mais diversas áreas: farmacêutica, cosméticos, alimentos, perfumaria e processamento químico, com diversas finalidades e continuam a crescer em todo o mundo, em parte, impulsionada pela demanda crescente de produtos de alta qualidade e da globalização da economia (MAUL, 1986).

Nas indústrias de alimentos, pode-se citar a extração e refino de óleos comestíveis; a extração de lúpulo para a indústria de cerveja; a descafeinização do café e do mate; a concentração de óleos cítricos; a produção de condimentos de alta qualidade; entre outros (FILIPPIS, 2001). Nas indústrias de processamento químico, a extração supercrítica é utilizada para isolamento, remoção, e ou, concentração de princípios ativos naturais, antioxidantes, corantes, constituintes organolepticamente característicos e produtos indesejáveis, como a remoção da nicotina do tabaco para a produção de cigarros “*light*”; separação de aromáticos de produtos do petróleo; purificação de polímeros; extração de hidrocarbonetos líquidos do carvão de pedra e da hulha; etc. (FILIPPIS, 2001; MAUL, 1986).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da extração supercrítica com CO₂

Vantagens	Desvantagens
✓ Os solventes utilizados são gasosos à pressão normal e temperatura ambiente, portanto, podem ser facilmente eliminados dos resíduos de extração e dos produtos extraídos e recuperados (MAUL, 1986);	✓ Compostos polares dificilmente são extraídos sem a adição de um cossolvente adequado (FILIPPIS, 2001; MAUL, 1986);
✓ O uso de CO ₂ permite a extração diferencial de solutos não polares até solutos de polaridade média, livres de umidade, além de ser um material inerte, não inflamável e baixo custo (MAUL, 1986);	✓ O processo torna-se caro, devido ao alto investimento inicial, tal como o custo dos equipamentos e construção de uma unidade industrial, o que inviabiliza economicamente a extração de produtos de baixo valor agregado e de baixo rendimento (MAUL, 1986);
✓ A extração supercrítica é um método rápido, eficiente e limpo para a extração de produtos naturais de matrizes vegetais (PEREIRA; MEIRELES, 2010);	✓ Periculosidade ao operar com altas pressões (FILIPPIS, 2001);
✓ As condições de operação e/ou a adição de cossolventes podem ser modificadas facilmente para aumentar o poder de solvatação (PEREIRA; MEIRELES, 2010).	✓ Não há um modelo matemático geral que representa a extração de produtos naturais, visto que cada matriz se comporta de forma particular perante o processo e suas condições de operação (SOVOVÁ, 1994).

2.2.1 Fluido Supercrítico

Quando se percorre a linha de coexistência líquido-vapor de uma substância pura em direção a altas pressões e altas temperaturas, como mostrado na Figura 2, a densidade do líquido decresce e a do vapor cresce até um ponto em que se tornam iguais. Esse ponto corresponde ao estado em que se tem líquido e vapor saturados e as duas fases se tornam idênticas. A temperatura em que isso ocorre é chamada de temperatura crítica e a pressão de vapor correspondente é chamada de pressão crítica. Estes valores de temperatura e pressão definem um ponto crítico que é único para cada substância. O estado da substância é chamado de fluido supercrítico quando a temperatura e a pressão excedem os valores do ponto crítico (MUKHOPADHYAY, 2000).

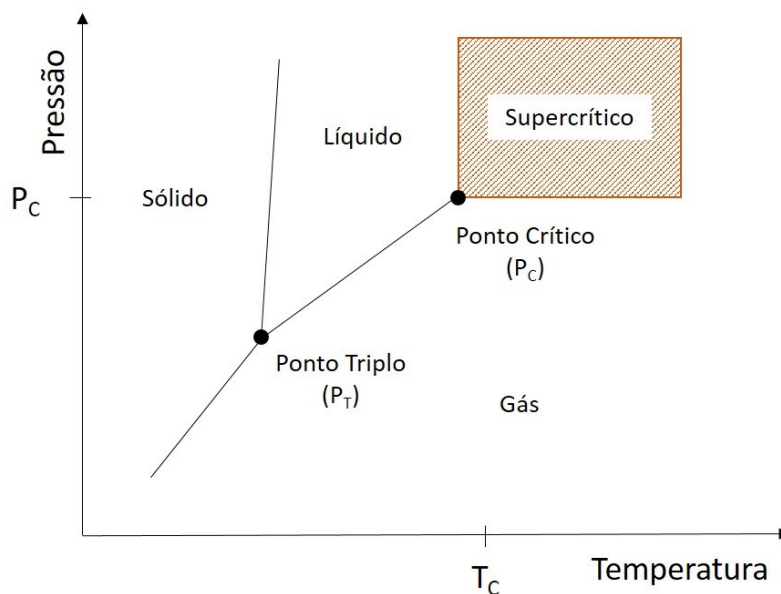


Figura 2. Diagrama pressão *versus* temperatura para um componente puro

Fonte: (Adaptada de BRUNNER, 2005).

As propriedades físicas de um fluido supercrítico, intermediárias entre um gás e líquido, facilitam a extração de componentes. A compressibilidade semelhante a um gás, a dissolução de solutos como um líquido (quando suficientemente comprimido), a baixa viscosidade e a tensão superficial como um gás possibilitam a fácil penetração do fluido na matriz sólida da qual o componente ativo será extraído. A difusividade intermediária entre gases e líquidos, variando com a densidade, facilita a rápida transferência de massa e a extração em um período de tempo menor em comparação com o uso de solventes líquidos convencionais. Um fluido supercrítico mantido a densidade relativamente alta tem a capacidade de dissolver uma variedade de materiais, semelhante ao comportamento de líquidos convencionais (MAUL *et al.*, 1986; MUKHOPADHYAY, 2000).

Uma comparação de propriedades físicas do gás, líquido e fluido supercrítico é apresentada na Tabela 3. As propriedades dos fluidos supercríticos são expressas em termos de seus valores reduzidos, temperatura reduzida ($T_r = T/T_c$), pressão reduzida ($P_r = P/P_c$) e massa específica reduzida ($\rho_r = \rho/\rho_c$), sendo que quando T_r e P_r são maiores que a unidade, a substância está no seu estado supercrítico (BRUNNER, 2005).

Tabela 3. Propriedades físicas do gás, líquido e fluido supercrítico

Estado do fluido	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g/(cm s))
<u>Gás</u>			
P=1 atm, T=15-30°C	(0,6-2,0) x10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0) x10 ⁻⁴
<u>Líquido</u>			
P=1 atm, T=15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0) x10 ⁻⁵	(0,2-3,0) x10 ⁻²
<u>Fluido Supercrítico</u>			
P=P _c ; T≈T _c	0,2-0,5	0,7x10 ⁻³	(1-3) x10 ⁻⁴
P=4P _c ; T≈T _c	0,4-0,9	0,2x10 ⁻³	(3-9) x10 ⁻⁴

Fonte: BRUNNER, 2005

Diversos solventes são usados na extração com fluidos supercríticos. De fato, qualquer solvente pode ser usado como um solvente supercrítico; entretanto, a viabilidade técnica (propriedades críticas), toxicidade, custo e poder de solvatação determinam o solvente mais adequado para uma aplicação particular (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Alguns solventes utilizados em extrações supercríticas e suas propriedades críticas são listados na Tabela 4.

O CO₂ é o solvente mais comumente utilizado para extrair compostos bioativos de fontes naturais em extração supercrítica, apresentando a capacidade de extrair facilmente compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos e substâncias polares, como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídeos, glicosídeos e sais orgânicos não solúveis (MAUL *et al.*, 1986). O CO₂ possui condições críticas facilmente atingíveis (31,1 °C e 7,39 MPa) em que as extrações podem ser conduzidas a uma temperatura suficientemente baixa para não prejudicar as propriedades organolépticas e físicas dos extratos. O diagrama pressão *versus* temperatura do dióxido de carbono pode ser observado na Figura 3.

O CO₂ é inerte em extrações supercríticas, não oferece riscos de reações secundárias, como oxidações, reduções, hidrólises e explosões, é um solvente seguro, não poluente, não tóxico, de uso significativo na gaseificação de bebidas, e reconhecido como seguro (GRAS – Generally Recognized as Safe) para uso na indústria alimentícia. A polaridade do gás carbônico está próxima a do pentano e do hexano, solventes apolares, comumente usados em extrações tradicionais por solvente. Outra característica importante do uso de CO₂ é a possibilidade de se alcançar extratos livres de solventes. Uma vez que o procedimento de

extração é finalizado, a despressurização do sistema torna o CO₂ gás, enquanto os compostos extraídos da matriz sólida precipitam (HERRERO *et al.*, 2013; MAUL *et al.*, 1986).

Tabela 4. Propriedades críticas de alguns solventes usados em processos de extração supercrítica

Solvente	Temperatura crítica (K)	Pressão crítica (MPa)	Volume crítico (cm ³ /mol)
Amônia	405,4	11,35	72,5
CO ₂	304,1	7,37	94,1
Dimetil éter	400,1	5,27	171,0
Etano	305,3	4,87	145,5
Etileno	282,3	5,04	131,0
Metanol	512,6	8,09	118,0
n-hexano	507,5	3,02	368,0
Propano	369,8	4,25	200,0
Água	647,1	22,06	55,9
Xenônio	290,1	5,80	118,0

Fonte: Adaptada de PEREIRA; MEIRELES, 2010.

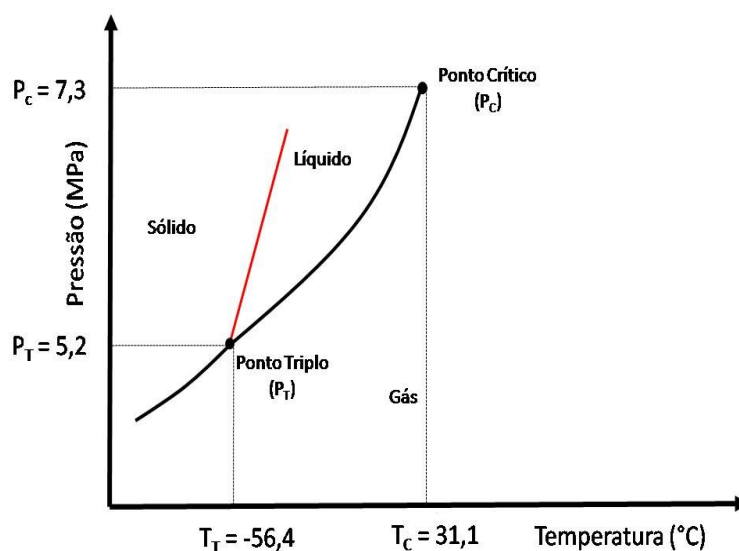


Figura 3. Diagrama pressão *versus* temperatura para o dióxido de carbono

Fonte: (Adaptada da internet: <http://slideplayer.com.br/slide/3153530/>)

Mesmo em altas densidades, o CO₂ possui uma habilidade limitada de dissolver compostos com alta polaridade. Desta maneira, a adição de cossolventes (ou modificadores, como também são conhecidos) pode aumentar a eficiência da extração elevando a solubilidade do soluto e modificando a seletividade do processo. Os efeitos da adição de cossolventes têm sido estudados por diversos pesquisadores e um grande número de mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos. Park *et al.* (2007) estudaram o efeito de cossolventes na descafeinação de chá verde por extração supercrítica com CO₂ e adição de água e etanol como cossolventes. As condições operacionais foram: pressão de 300 bar, temperatura de 70 °C, adição de 30% v/v de cossolventes e vazão de CO₂ de 8,5 g/min. Os resultados mostraram um rendimento máximo de 31,10 mg_{caféina}/g_{chá verde seco}, na extração com adição de água e 40,30 mg/g_{chá verde seco}, na extração em que etanol foi adicionado, enquanto a extração supercrítica com CO₂ resultou em um rendimento de cafeína de apenas 3,7 mg/g_{chá verde seco}.

A melhoria do processo deve-se às interações químicas soluto-cossolvente (ligações de hidrogênio e interações ácido-base) ou pelas interações físicas (dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido). Outra explicação é que o inchaço da matriz sólida facilita o contato do soluto pelo solvente. Um importante fator na melhoria da solubilidade é o aumento na polaridade do solvente quando o cossolvente é adicionado. O efeito predominante na extração dependerá do tipo de cossolvente, da matriz sólida e do soluto. Em geral, a quantidade de cossolvente a ser adicionada varia de 1% a 15% (v/v). Em alguns casos, acima de um certo valor, a adição de cossolvente passa a não ter efeito sobre o processo de extração (PEREIRA; MEIRELES, 2010; DALMOLIN *et al.*, 2010). A Tabela 5 apresenta alguns dos cossolventes mais utilizados em extrações com CO₂ supercrítico.

Santos *et al.* (2013) estudaram a extração com CO₂ supercrítico do óleo de candeia com o uso de etanol e acetato de etila como cossolventes. Os ensaios foram realizados a 70 °C e 24 MPa e com variações de 1,3 e 5 % (v/v) de cossolventes. O rendimento nas mesmas condições com CO₂, foi de 1,55% (g/g), enquanto com o uso de 5% (v/v) de etanol e acetato de etila, o rendimento aumentou para 2,35% (g/g) e 1,86% (g/g), respectivamente.

Tabela 5. Aditivos comumente usados em extrações com CO₂ supercrítico

Cossolvente	T _c (°C)	P _c (atm)	Massa molecular (g/mol)	Constante dielétrica a 20°C (-)	Índice de polaridade (-)	T _{ebulição} (°C)
Metanol	239,40	79,90	32,04	32,70	5,10	64,70
Etanol	243,00	63,00	46,07	24,30	4,30	78,00
Acetona	234,45	48,00	86,18	20,00	4,80	56,00
Hexano	235,45	30,20	58,08	6,30	0,10	69,00
Acetonitrila	275,00	47,70	41,05	37,50	5,80	82,00
Clorofórmio	263,20	54,20	119,38	4,81	4,10	61,20
Água	374,10	217,60	18,01	80,10	10,20	100,00

Fonte: Adaptado de MODEY *et al.*, 1996

2.2.2 Cinética da extração supercrítica

A cinética da extração com fluidos supercríticos pode ser representada pela curva de extração global, como mostrada na Figura 4, que representa a curva típica de extração com as variáveis concentração e tempo.

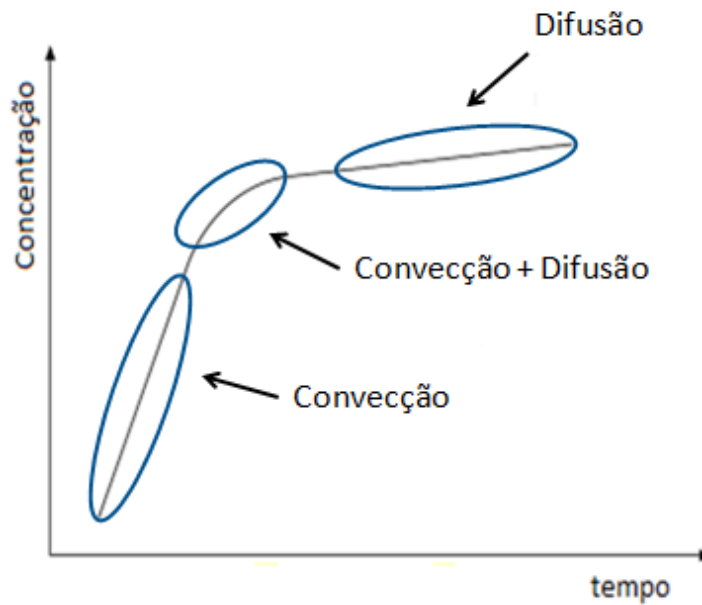


Figura 4. Curva típica de extração supercrítica

Fonte: (Adaptada de MEIRELES, 2009).

Ela é determinada levando em consideração a massa de soluto extraída e é uma função do tempo do processo ou solvente consumido, de acordo com a Equação 1:

$$m_{total} = Q \int_0^t Y(H, t) dt \quad (1)$$

Em que m_{total} é a massa do extrato, Q é a vazão do solvente supercrítico, e $Y(H, t)$ é a proporção da massa do soluto com a massa do solvente em um dado tempo (t) na saída do extrator ou leito (H). Geralmente, como mostra a Figura 5, as curvas de extração global são caracterizadas por três períodos de tempo (MEZZOMO *et al.*, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010):

- (a) Um período de taxa de extração constante: nesta etapa inicial a superfície externa das partículas é coberta com soluto de fácil acesso e a convecção é o mecanismo de transferência de massa dominante;

- (b) Em seguida, ocorre a taxa decrescente de extração: nesta fase as falhas do soluto na camada externa da superfície da matriz aparecem e, então, inicia-se o mecanismo de difusão, fenômeno que atua combinado com a convecção;
- (c) Finalmente, ocorre o período de difusão controlada: onde a camada de soluto na superfície externa praticamente desapareceu e a transferência de massa ocorre principalmente por difusão do interior das partículas da matriz sólida.

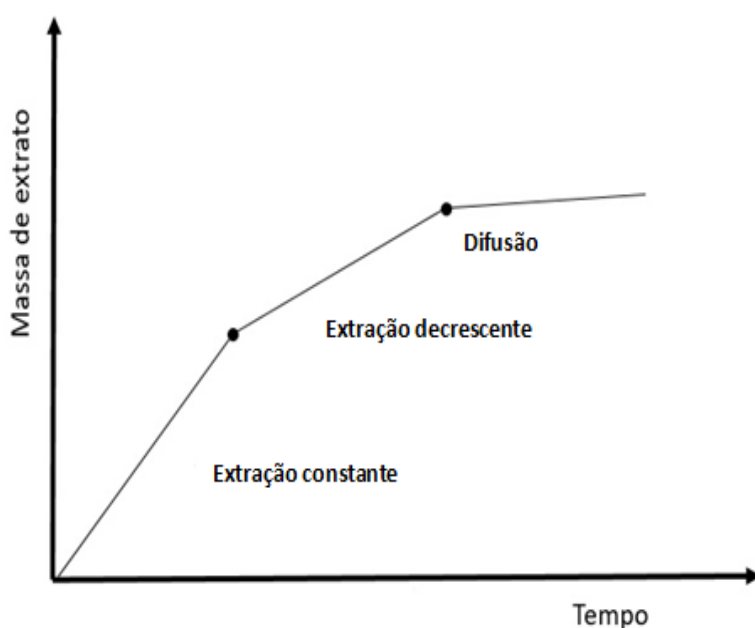


Figura 5. Períodos da extração supercrítica

Fonte: (Adaptada de SANTOS, 2013).

A curva de cinética da extração supercrítica depende dos parâmetros do processo extrativo e dos fenômenos que ocorrem no extrator durante o processo de extração e, frequentemente fornece informações relevantes para comparações em processos extrativos que façam uso do mesmo equipamento e amostras (SANTOS, 2013).

2.2.3 Fatores que influenciam na extração supercrítica

- a) Efeito da pressão e temperatura

Temperatura e pressão afetam o poder de solvatação devido as suas ações sobre a densidade do solvente. Consequentemente, o poder de solvatação pode ser modificado manipulando-se a pressão e temperatura de operação (PEREIRA; MEIRELES, 2010). O parâmetro de processo mais relevante é a pressão de extração que pode ser usada para modificar a seletividade da extração supercrítica. A regra geral é: quanto maior a pressão, maior o poder de solvatação e menor é a seletividade (REVERCHON; MARCO, 2006; TEMELLI, 2009). O efeito da pressão na extração supercrítica de óleo de girassol foi estudado por Nimet *et al.* (2011) com variação de pressão de 19,3 a 25 MPa e vazão constante de CO₂ de 3 cm³/min. Os autores obtiveram rendimentos de até 87% (g/g) a 25 MPa devido à elevação da solubilidade do óleo ocasionada pelo aumento da pressão, levando ao aumento do rendimento da extração.

A temperatura também é um parâmetro que afeta a extração supercrítica e seu impacto sobre a solubilidade é complexo e dependente de parâmetros competitivos – densidade e pressão de vapor do soluto. Considerando-se uma extração com o uso de CO₂ como fluido supercrítico, a densidade de CO₂ diminui com a temperatura enquanto a pressão de vapor dos solutos aumenta, levando ao fenômeno bastante conhecido de “*cross-over*” para isotermas de solubilidade. Portanto, o impacto resultante da temperatura na solubilidade é ditado pelo parâmetro que tem efeito dominante a uma dada pressão. Além disso, a difusividade aumenta com a temperatura elevando a cinética da transferência de massa durante a extração (TEMELLI, 2009). Rebolleda *et al.* (2012) investigaram a extração de óleo de gérmen de milho em temperaturas entre 40 a 85 °C, a uma pressão constante de 45 MPa e vazão de CO₂ de 9 kg/h. Os autores observaram que quanto maior a temperatura, maior o rendimento da extração, o que pode indicar que o aumento da pressão de vapor do óleo com a temperatura foi mais relevante do que a diminuição da densidade de CO₂. No estudo da extração de óleo de gergelim, Corso *et al.* (2010), observaram que a 25 MPa, 3 cm³/min de vazão de CO₂ e temperaturas entre 40 e 60 °C, o aumento da temperatura induziu a um aumento do rendimento da extração, evidenciando que a solubilidade foi favorecida pelo incremento na temperatura.

b) Efeito do tempo de extração

O tempo de extração corresponde ao tempo total em que a extração é realizada e, é essencial para assegurar o contato entre o solvente supercrítico e a matriz sólida, levando à completa extração dos componentes desejados. O aumento do tempo de extração, geralmente leva a uma maior extração dos compostos da matriz. No entanto, períodos longos de extração podem ocasionar efeitos adversos, como a degradação de determinadas substâncias devido à temperatura. Baysal *et al.* (2000) estudaram o efeito do tempo de extração do licopeno a partir

da pasta de tomate com tempos de extração de 60, 120 e 180 min e verificaram que o maior rendimento foi obtido com tempo de extração de 120 min. De acordo com os autores, o tempo de 60 min foi insuficiente para uma completa extração e que para o tempo de 180 min, uma degradação térmica levou a menor rendimento de licopeno. Os autores concluíram que um estudo mais detalhado do tempo de extração é necessário para a redução de custos e aumento da eficiência energética do processo.

c) Efeito do fluxo do solvente

Segundo Reverchon e Marrone (2001), o fluxo de solvente é um parâmetro importante, seja o processo controlado pela resistência à transferência de massa externa ou pelo equilíbrio, já que a quantidade de solvente supercrítico alimentado ao tanque extrator, determina a taxa da extração. Em geral, a velocidade do fluxo do solvente supercrítico tem forte influência na eficiência da extração do óleo e um fluxo alto de solvente aumenta a capacidade de extração. Entretanto, em alguns casos, o uso de fluxos muito altos de solvente pode diminuir o rendimento devido a um tempo de contato insuficiente entre o soluto e o solvente. Este efeito foi estudado por Papamichail *et al.* (2000) através da extração do óleo de sementes de aipo moído utilizando o CO₂ como solvente com variação de fluxo de 1,1 a 3,0 kg CO₂/h. Os autores que a quantidade de óleo extraída por quilograma de solvente utilizado foi menor para o maior fluxo de solvente, de 3,0 kg CO₂/h. A diminuição do rendimento com o uso de um maior valor de fluxo de solvente pode ser atribuído ao efeito de canalização, pois com aumento do fluxo de solvente, este flui rapidamente através da amostra ao invés de difundir. O solvente flui através de canais preferenciais, que limitam o contato necessário para a extração do composto. Ressalta-se que uma alta taxa de solvente promove uma elevação dos custos operacionais e de capital e, esse fato deve ser considerado para aplicação do processo em escala industrial (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

d) Efeito do tamanho da partícula, forma e porosidade do material sólido

O tamanho da partícula, forma e porosidade do material sólido apresentam efeitos diretos sobre a transferência de massa do processo. Para aumentar a taxa de extração, a matriz sólida deve ser triturada para aumentar a área de transferência de massa. Por outro lado, partículas muito pequenas devem ser evitadas, pois seu uso pode compactar a matriz, aumentando a resistência à transferência de massa interna e causando canalização dentro do leito do extrator. Geralmente, para produtos naturais, o tamanho da partícula varia de 0,25 a 1,8mm. Entretanto, esse parâmetro deve ser avaliado para cada tipo de material. Outro fator que

deve ser considerado é a forma das partículas, já que devido aos processos de moagem, as partículas podem ter diferentes formas, como por exemplo, esféricas, flocos, planas, etc. Dependendo da forma, a difusão pode ser favorecida ou não, devido à porosidade do leito, que influencia a transferência de massa no processo de extração. Em geral, um aumento na porosidade da matriz promoverá uma extração mais eficiente e rápida e a porosidade está relacionada ao tamanho das partículas e sua distribuição no leito (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Papamichail *et al.* (2000) observaram que na extração supercrítica de óleo de sementes de aipo com CO₂, quando o tamanho das sementes de aipo foram reduzidas de 490 para 210 µm (condições de extração de: 150 bar, 45 °C e vazão de CO₂ de 1,1 kg CO₂/h), a taxa da extração aumentava de 0,11 para 0,20 % (kg_{extrato}/kg_{sementes}). Isso pode ser atribuído à quantidade de óleo liberada que aumenta à medida que o tamanho da partícula diminui devido ao maior contato do material com o solvente proporcionado pela redução do tamanho das sementes. Na extração supercrítica de óleo de soja, Fiori (2009) também observaram que a 280 bar e 40 °C, para um diâmetro médio de 1,20 mm das sementes moídas, a quantidade de óleo extraída era de 8% da quantidade de sementes alimentadas. Por outro lado, para partículas menores de 0,31 mm, o rendimento final do óleo foi de 23%, indicando que quanto melhor o grau de moagem ou menor o tamanho da partícula, maior a quantidade de óleo extraída e, portanto, maior o rendimento da extração.

2.2.4 Estudos sobre a extração supercrítica de óleos vegetais

Diversos autores têm estudado o processo de extração supercrítica para a produção de óleos vegetais. Salgin *et al.* (2006) estudaram a extração de óleo de girassol com CO₂ supercrítico. Os experimentos foram realizados com pressões de 200 a 600 bar, temperaturas de 40 °C, 60 °C e 80 °C, vazões volumétricas de 1 -4 e 6 mL CO₂/min e diâmetros de partícula de 0,23, 0,55, 1,09 e 2,18 mm. O processo de extração foi representado pelo modelo *Shrinking Core Model (SCM)*, em função do tempo, pressão, temperatura, diâmetro de partícula e vazão de extração. Os autores observaram que a 40 °C, 40 MPa e 4 mL CO₂/min, uma diminuição no tamanho da partícula proporcionou o aumento no rendimento total de óleo, pois para um tamanho de 0,55 mm foi obtido um rendimento de 57,2 % (g/g) foi obtido e com o uso de uma partícula de 2,18 mm alcançou-se um rendimento de apenas 26,9 % (g/g). Os autores também concluíram que o aumento da pressão, temperatura e vazão volumétrica causaram aumento na quantidade de óleo extraída e, que o modelo representou bem o processo de extração desenvolvido, permitindo o cálculo da solubilidade do óleo e da difusividade efetiva.

Pederssetti *et al.* (2011) estudaram a extração do óleo de sementes de canola usando CO₂ supercrítico e propano comprimido como solventes. As extrações foram realizadas em uma unidade em escala laboratorial em temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 200, 225 e 250 MPa para o CO₂; para o propano, temperaturas de 30, 45 e 60 °C e pressões de 80, 100 e 120 MPa. Os autores observaram que o propano como solvente apresentou maior poder de solvatação em comparação ao CO₂, em que, nos ensaios realizados o valor de rendimento máximo obtido com o uso de CO₂ e propano comprimido como fluidos supercríticos foram de 19,49 e 23,83 % ($\frac{g_{\text{extrato}}}{g_{\text{sementes}}}$), respectivamente. A temperatura foi o fator que mais influenciou na extração com propano e as extrações com esse fluido ocorreram mais rapidamente do que aquelas feitas com CO₂, indicando que o propano foi melhor solvente para a extração supercrítica do óleo de canola. Com relação à composição do óleo, a análise das distribuições de ácidos graxos foi similar independentemente das condições de temperatura e pressão investigadas e do uso de CO₂, propano ou extração convencional em Soxhlet com n-hexano.

Os efeitos dos parâmetros, temperatura, pressão, vazão mássica e tamanho característico de partícula na extração de óleo de soja com CO₂ supercrítico foram investigados por Jokic *et al.* (2012). Dois extratores com volumes de 0,2 L e 5 L foram usados para mostrar a influência do tamanho do extrator no processo. Os resultados mostraram que as curvas de extração foram afetadas por todos os parâmetros avaliados: pressão (300 a 500 bar), temperatura (40 a 60 °C), vazão de solvente (0,194 a 6,41 kg/h), tamanho da partícula (0,383 a 1,06 mm) e tamanho do extrator. O rendimento da extração aumentou com o aumento da pressão e temperatura, sendo que em pressão constante de 400 bar e temperaturas de 40 e 50 °C, respectivamente, o rendimento aumentou de 17,6 para 18,5% (kg/kg). Para temperatura constante de 40 °C e pressões de 300 e 400 bar, respectivamente, o rendimento aumentou de 18,5 para 19,3%. A vazão influenciou no início do período de extração e quanto maior a vazão (6,41 kg/h), menor o tempo de extração requerido para se alcançar o mesmo rendimento das vazões menores usadas (0,194 kg/h). As partículas maiores causaram uma inclinação menor nas curvas de extração, demonstrando que o conteúdo de óleo não estava saturado em CO₂ como indica a literatura.

Salea *et al.* (2017) propuseram o estudo da otimização da extração supercrítica de óleo de gengibre em um aparato de escala laboratorial usando o método de matriz ortogonal de Taguchi. Os efeitos de pressão, temperatura e vazão de CO₂ no rendimento do processo foram avaliados em faixas entre 10-15 MPa, 35-45 °C e 10-20 g/min, respectivamente. Os autores concluíram que o aumento na pressão e a diminuição na temperatura e vazão de CO₂ elevaram o

rendimento da extração. A condição ótima de operação verificada foi de 15 MPa, temperatura de 35°C e vazão de 15 g/min com rendimento de 3,10% e o experimento em condições ótimas mostrou-se em boa concordância com o resultado previsto pelo modelo computacional.

Durante o período de realização do presente trabalho foram encontrados poucos estudos relacionando a extração de óleo de gérmen de milho em condições supercríticas com o uso de CO₂ e cossolventes. Christianson *et al.* (1984) investigaram a extração supercrítica de óleo de gérmen de milho em pressões de 34-55 MPa e temperatura constante de 50°C. Os ensaios experimentais resultaram em um óleo de melhor qualidade, com um rendimento máximo de 23,4 % (g/g) de óleo no maior valor de pressão avaliado (55 MPa) e características de armazenamento melhores do que o óleo obtido pela extração com hexano, devido a sua cor clara e sabor. Entretanto, Christianson *et al.* (1984) observaram que altas pressões desnaturavam as proteínas, incluindo enzimas oxidativas.

A extração de óleo de gérmen de milho, soja e algodão foi estudado por List e Friedrich (1989) em temperaturas variando de 70–90 °C e pressão constante de 83 MPa e compararam os resultados da extração supercrítica e convencional com solvente orgânico em prensa mecânica. O conteúdo de tocoferóis encontradona extração supercrítica foi similar àquele obtido pela extração convencional para os três óleos avaliados. Para o óleo de milho, o conteúdo de tocoferol encontrado variou de 1200 a 1800 µg/g nos ensaios da extração supercrítica com o uso de CO₂ e de 1500 a 1700 µg/g nos ensaios em prensa mecânica.

O estudo da qualidade das propriedades funcionais das proteínas de gérmen de milho foi avaliado por Rónyai *et al.* (1998) com a utilização de uma mistura etanol-água, como cossolvente, em extração supercrítica com CO₂. Os experimentos foram conduzidos a pressão constante de 300 bar e temperatura de 42 °C e com a mistura etanol-água variando de 0 a 10% em peso sobre a vazão de CO₂, fazendo-se uso de dois separadores. Os autores observaram que, usando CO₂ e adição de 7,5 % (% em peso) da mistura etanol-água, o rendimento obtido foi superior a 50% (g/g) e concluíram que as propriedades funcionais do gérmen de milho (propriedades sensoriais, emulsionantes e composição de ácidos graxos) apresentaram resultados satisfatórios para uso do óleo na indústria de alimentos.

Rebolleda *et al.* (2012) analisaram a influência da temperatura do processo (35-86 °C), pressão (20-53 MPa) e vazão mássica de CO₂ (4-9 kg/h), no rendimento e qualidade na extração de óleo de gérmen de milho. O óleo obtido exibiu baixos valores do índice de acidez: $1,6 \pm 0,1\%$ de ácido oléico na temperatura de extração de 84 °C e $1,3 \pm 0,1\%$ de ácido oléico para temperatura de 56 °C. Além disso, a capacidade antioxidante observada alcançou o valor máximo de 34 mol BHT/ kg, na temperatura de 84 °C, pressão de 44 MPa e vazão de CO₂ de 6

kg/h. O efeito da temperatura e pressão sobre a extração mostraram que altas temperaturas e pressões aumentaram o rendimento das extrações. Na pressão de 45,0 MPa, constante e temperaturas de 40 e 79 °C, obteve-se rendimentos de 0,65 e 0,80 % (kg/kg), respectivamente. E em temperatura fixa de 85 °C e pressões de 45 e 53 MPa, os valores de rendimento foram de 0,45 e 0,65, respectivamente. A vazão mássica do solvente apresentou-se como um parâmetro irrelevante no rendimento da extração sob as condições adotadas (4-9 kg/h).

Considerando a importância dos processos de extração com fluidos supercríticos e visando complementar as informações já contidas na literatura e avaliar novas condições de operação, solventes e qualidade das amostras extraídas, no presente trabalho optou-se por investigar a extração de óleo de gérmen de milho com o uso de CO₂ supercrítico e cossolventes. Na extração com CO₂ supercrítico avaliou-se a temperatura (45-85 °C) e pressão (150-250 bar), com vazão de CO₂ de 3 mL/min. Nas extrações com adição de cossolventes avaliou-se a temperatura (40-80 °C) e vazão dos cossolventes (0,01-0,1 mL/min) a uma pressão fixa de 250 bar. E ao final dos processos de extração analisou-se a qualidade e composição dos extratos e os resultados foram comparados com o método de extração convencional em Soxhlet.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Gérmen de milho

O gérmen de milho utilizado neste trabalho foi gentilmente fornecido pela companhia CARAMURU Alimentos S.A., Itumbiara – Goiás, Brasil, engordurado (sem nenhum tipo de remoção prévia do conteúdo de óleo) e úmido, já moído. Suas propriedades em peso: $11,26 \pm 0,09\%$ em umidade; $11,38 \pm 0,13\%$ em proteínas; $3,28 \pm 0,05\%$ em cinzas e $7,67 \pm 0,47\%$ em fibras. O mesmo gérmen foi utilizado para todas as extrações supercríticas com CO₂, com adição de cossolventes e extrações convencionais em Soxhlet.

3.1.2 Gases, Reagentes e Padrões

Nos ensaios de extração supercrítica com CO₂, adição de cossolventes e convencional foram utilizados: dióxido de carbono (Gama gases especiais – IBG, 99% de pureza), hexano (Sant, 98,5%), etanol (Anidrol, 99,5%) e acetona (Anidrol, 99,5%).

Na reação de derivatização, para as análises de quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa, os reagentes usados foram hidróxido de potássio (Vetec, 85%), metanol (Dinâmica, 99,8%) e heptano (Synth, 99%).

Nos ensaios da capacidade oxidativa utilizando o método de redução do radical livre DPPH• foram utilizados metanol (Dinâmica, 99,8%) e DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) (Sigma-Aldrich, 95%).

Os ensaios de índice de acidez foram realizados com etanol (Anidrol, 99,5%), biftalato de potássio (Synth), fenolftaleína (Synth) e hidróxido de sódio (Dinâmica) e, os ensaios de índice de peróxido foram realizados com ácido acético (Synth, 100%), clorofórmio (Dinâmica), tiosulfato de sódio (Synth) e amido solúvel (Dinâmica).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração com CO₂ supercrítico

Os experimentos de extração em condições supercríticas com o uso de CO₂ foram realizados em uma unidade de escala laboratorial, que constava de um cilindro de CO₂; dois banhos termostatizados, um dos banhos (THERMO SCIENTIFIC, A-10) utilizado para resfriar o solvente antes de entrar na bomba e o outro (TECNAL, TE-184) usado para manter o extrator aquecido na temperatura desejada; uma bomba do tipo seringa (ISCO, modelo 500D) e um extrator com volume interno de aproximadamente 63 mL (diâmetro de 1,98 cm e altura 20,5 cm). A Figura 6 mostra a unidade de extração supercrítica utilizada.

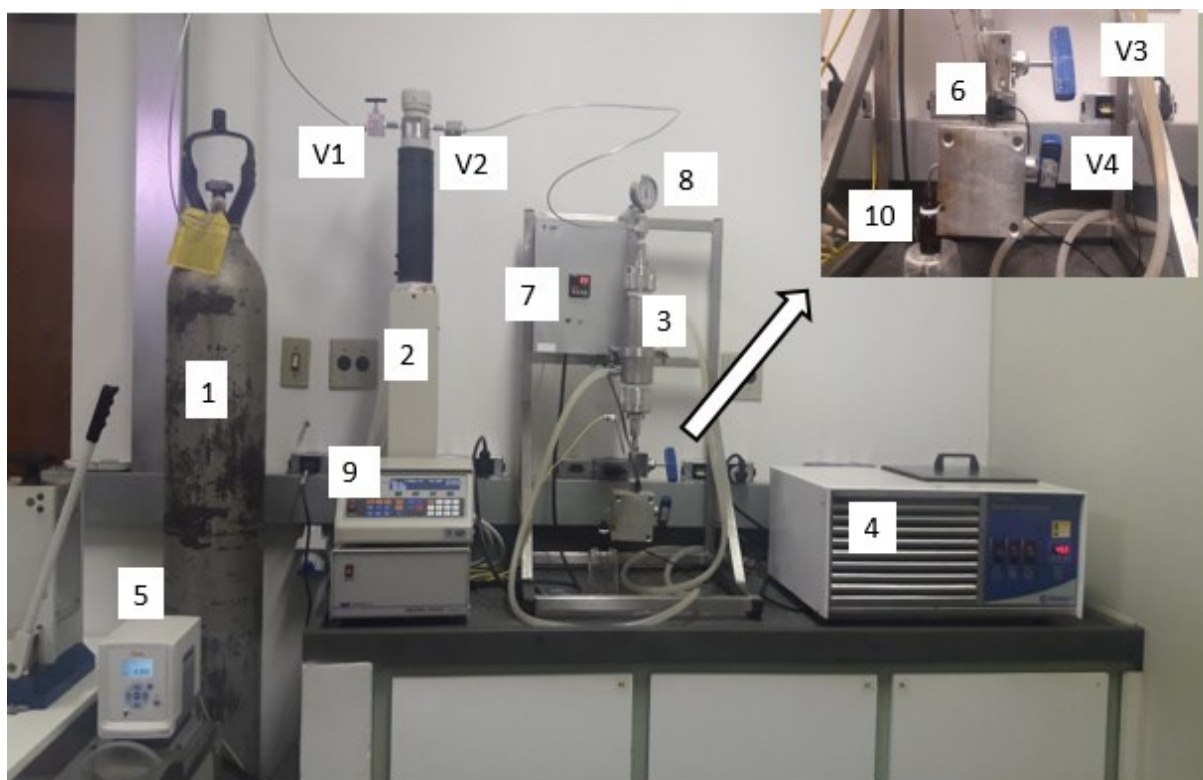


Figura 6. Aparato experimental utilizado para a extração com CO₂ supercrítico: (1) Cilindro de CO₂; (2) Bomba do tipo seringa; (3) Extrator; (4, 5) Banhos termostáticos; (6) Controlador de temperatura da válvula de expansão; (7) Indicador de temperatura; (8) Indicador de pressão; (9) Controlador da bomba; (10) Frasco de coleta das amostras; (V₁, V₂ e V₃) Válvulas agulhas; (V₄) Válvula micrométrica.

Para análise preliminar foram realizadas extrações com temperaturas variando de 30 a 90 °C, pressões de 100 a 250 bar e vazões de 1 a 5 mL/min de CO₂. Dessa forma, de posse dos resultados, 9 ensaios experimentais foram definidos para se avaliar os efeitos de temperatura e pressão sobre o rendimento (variável resposta). Além disso, a influência da densidade de CO₂ na temperatura e pressão foi estudada, com as densidades consultadas na literatura (NIST, 2017). As faixas de operação utilizadas foram de temperaturas variando de 45 a 85 °C, pressões de 150 a 250 bar, como mostra a Tabela 6. Devido aos resultados dos testes preliminares e limitações dos equipamentos e como a vazão no equipamento mostrou-se de difícil controle de variação, a mesma foi mantida constante em 3 mL/min.

Procedimento experimental da extração supercrítica de óleo de gérmen de milho com o uso de CO₂:

- 1) Inseriu-se a amostra no extrator;
- 2) Verificou-se se todas as válvulas estavam fechadas;
- 3) Ligou-se o banho termostático a 5 °C na bomba seringa, para prevenir a vaporização do solvente;
- 4) Atingida a temperatura do banho termostático, abriu-se a válvula do cilindro de CO₂ e a válvula tipo agulha de entrada na bomba (V₁), como mostra a Figura 6;
- 5) Fez-se um refill da bomba, que consistia no preenchimento do reservatório da bomba com o solvente (CO₂). Aguardou-se um tempo de cerca de 30 minutos (tempo usualmente utilizado em extrações supercríticas) para completa acomodação de CO₂ em estado líquido e obter o volume máximo de gás;
- 6) Regulou-se o controlador de temperatura (modelo N1100), interligado ao bloco de aquecimento na saída do extrator (mantido a 90 °C), para evitar o congelamento do extrato na saída do sistema devido ao abaixamento de temperatura (efeito Joule-Thompson) provocado pela expansão do gás;
- 7) Após os 30 min, as válvulas do cilindro e de entrada na bomba seringa (V₁) foram fechadas e, em seguida, abriu-se a válvula de alimentação do sistema (V₂) e pressurizou-se a bomba e o extrator simultaneamente na pressão desejada, em intervalos de pressão de 10 bar, aproximadamente;
- 8) Alcançada a pressão operacional, aguardou-se um tempo, estipulado previamente em 30 min, para eliminação dos gradientes de temperatura e pressão (chamado de tempo de pré-extração);

- 9) Após a vazão volumétrica indicada pela bomba tipo seringa alcançar o valor zero, anotou-se o volume de gás da bomba, encaixou-se o frasco coletor de amostra e iniciou-se a extração;
- 10) A válvula macrométrica foi aberta completamente (V_4) e a micrométrica (V_3) vagarosamente, até que a vazão de solvente de operação fosse alcançada;
- 11) As válvulas V_3 e V_4 foram fechadas em intervalos de 10 min para pesagem da amostra, sendo que a cada pesagem do frasco anotou-se também o volume de CO_2 remanescente na bomba;
- 12) A extração foi finalizada quando a massa instantânea ($\text{massa}_{\text{extraída}}/\text{tempo}$) fosse esgotada da matriz sólida, ou seja, não apresentasse mais alterações na pesagem.
- 13) As amostras foram fechadas, lacradas e mantidas ao abrigo da luz em geladeira comum;
- 14) O sistema foi despressurizado e todos os equipamentos (bomba seringa, banhos termostatizados e controlador de temperatura) desligados.

Tabela 6. Condições experimentais dos ensaios supercríticos de óleo de gérmen de milho com o uso de CO_2

Ensaio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Pressão (bar)	Densidade (g/mL)
1	52	164	0,715
2	80	164	0,484
3	52	235	0,811
4	80	235	0,663
5	45	200	0,813
6	85	200	0,563
7	65	150	0,554
8	65	250	0,762
9	65	200	0,692

Os rendimentos foram calculados pela Equação 2 e ajustados em um modelo quadrático usando análise de regressão e com o valor-p que menor do que 0,05 considerado como estatisticamente significativo.

$$Rendimento = \frac{m_{ext}}{m_{extseco}} \times 100 \quad (2)$$

Na qual:

m_{ext} = massa total de óleo extraída;

$m_{ext\ seco}$ = massa de extrato seco (gérmen de milho).

3.2.2 Extração com CO₂ supercrítico e cossolventes

Os experimentos de extração supercrítica com o uso de CO₂ e cossolventes foram realizados na mesma unidade de escala laboratorial que os experimentos utilizando-se apenas CO₂, com algumas modificações apenas, como apresentado na Figura 7. A mesma constava de um cilindro de CO₂; dois banhos termostatizados, um dos banhos (THERMO SCIENTIFIC, A-10) utilizado para resfriar o solvente antes de entrar na bomba e o outro (ETHIK TECHNOLOGY, 521D) usado para manter o extrator aquecido na temperatura desejada; uma bomba do tipo seringa (ISCO, modelo 500D); uma bomba HPLC isocrática (*LabAlliance, SERIES III*) e um extrator com volume interno de aproximadamente 63 mL (diâmetro de 1,98 cm e altura 20,5 cm). Os cossolventes utilizados foram: hexano, etanol e acetona.

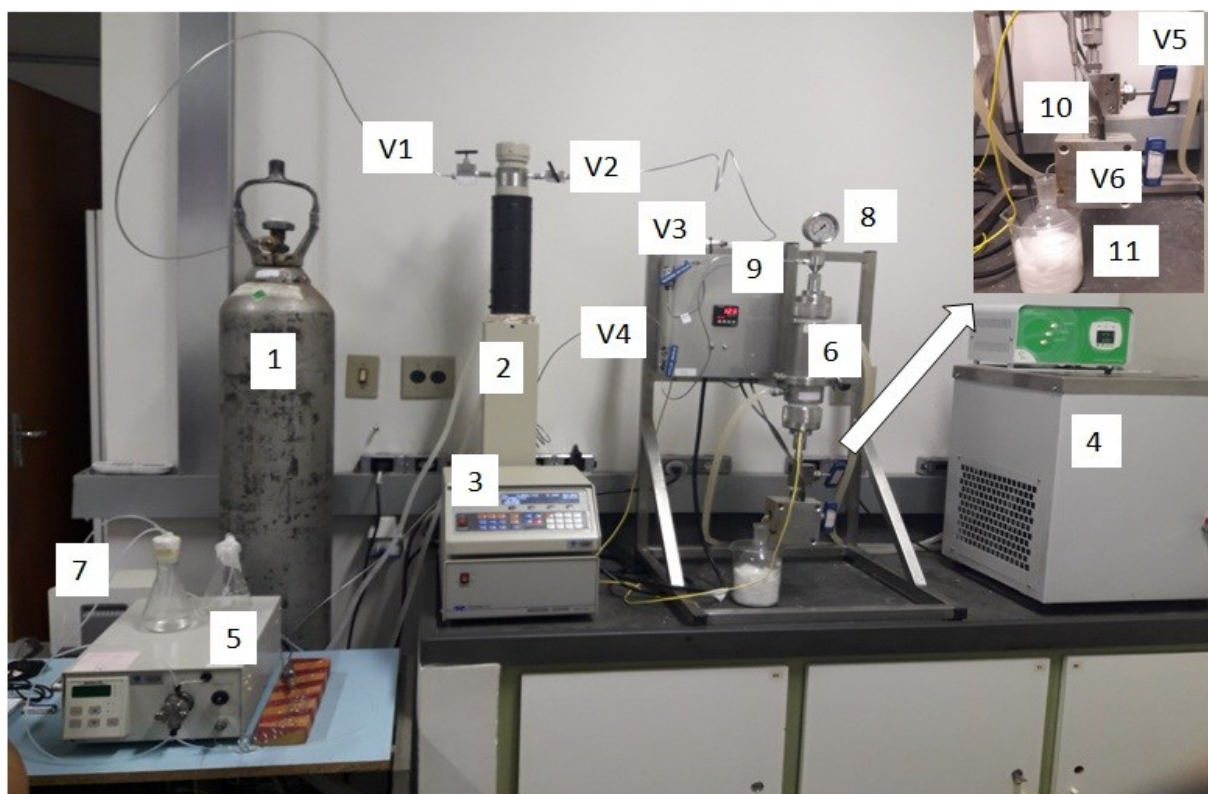


Figura 7. Aparato experimental utilizado para a extração com CO₂ supercrítico e cossolventes: (1) Cilindro de CO₂; (2) Bomba do tipo seringa; (3) Controlador da bomba; (4, 7) Banhos termostáticos; (5) Bomba HPLC isocrática (com erlenmeyer para alimentação de cossolventes); (6) Extrator; (8) Indicador de pressão; (9) Indicador de temperatura; (10) Controlador de temperatura da válvula de expansão; (11) Balão de coleta das amostras; (V₁, V₂, V₃, V₄ e V₅) Válvulas agulhas; (V₆) Válvula micrométrica.

As extrações supercríticas com o uso de CO₂ e adição dos cossolventes (hexano, etanol e acetona) foram realizadas em temperaturas variando de 40 a 80°C, vazões de 0,01 a 0,1 mL/min decossolvente, pressão fixa de 250 bar, vazão de CO₂ de 3 mL/min e tempo de 4 horas, com uma única pesagem da amostra extraída ao final de cada ensaio. A delimitação do tempo de extração foi realizada devido a não existência de esgotamento dos cossolventes no processo, visto que o mesmo era alimentado continuamente no extrator. A amostra foi pesada uma única vez, ao final do processo, pois o cossolvente poderia evaporar durante o procedimento experimental causando oscilações nos resultados das pesagens das amostras extraídas.

Procedimento experimental da extração supercrítica de óleo de gérmen de milho com o uso de CO₂ e cossolventes:

- 1) Inseriu-se a amostra no extrator;
- 2) Verificou-se se todas as válvulas estavam fechadas;
- 3) Ligou-se o banho termostático a 5 °C na bomba seringa, para prevenir a vaporização do solvente;
- 4) Atingida a temperatura do banho termostático, abriu-se a válvula do cilindro de CO₂ e a válvula tipo agulha de entrada na bomba (V₁), como mostra a Figura 6;
- 5) Fez-se um refil para preenchimento do reservatório da bomba com o solvente (CO₂). Aguardou-se um tempo de cerca de 30 minutos para completa acomodação de CO₂ em estado líquido e obter o volume máximo de gás;
- 6) Regulou-se o controlador de temperatura (modelo N1100), interligado ao bloco de aquecimento na saída do extrator (mantido a 90 °C), para evitar o congelamento do extrato na saída do sistema devido ao abaixamento de temperatura (efeito Joule - Thompson) provocado pela expansão do gás;
- 7) Realizou-se a purga da bomba de líquido, para evitar que grande volume de ar entrasse na bomba e atrapalhasse o funcionamento da mesma;
- 8) Após os 30 min, as válvulas do cilindro e de entrada na bomba seringa (V₁) foram fechadas e, em seguida, abriu-se as válvulas de alimentação do sistema (V₂, V₃ e V₄) e regulou-se a vazão das duas bombas e esperou-se a bomba seringa atingir a pressão desejada para a extração apenas com a regulação da vazão;
- 9) Aguardou-se um tempo, estipulado previamente em 30 min, para eliminação dos gradientes de temperatura e pressão (chamado de tempo de pré-extração);
- 10) Anotou-se o volume de gás da bomba, encaixou-se o frasco coletor de amostra e iniciou-se a extração;
- 11) Abriu-se a válvula macrométrica completamente (V₅) e a micrométrica (V₆) vagarosamente, até que a pressão de operação permanecesse no valor desejado;
- 12) A extração foi finalizada ao se completar 4 horas de processo e então foi realizada a única pesagem da amostra;
- 13) As amostras foram mantidas em estufa para eliminar o cossolvente remanescente até pesagem constante;
- 14) As amostras, após eliminação completa do cossolvente, foram fechadas, lacradas e mantidas ao abrigo da luz em geladeira comum;
- 15) O sistema foi despressurizado e todos os equipamentos (bomba seringa, bomba isocrática, banhos termostatizados e controlador de temperatura) desligados.

3.2.3 Extração com solvente orgânico

A extração usando solvente orgânico foi realizada no equipamento Soxhlet (Vidrolabor), segundo métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2004). O aparelho consistia em um extrator do tipo Soxhlet, um condensador tipo bola e um balão de fundo redondo equipado com juntas esmerilhadas. A Figura 8 apresenta uma forma esquemática do Soxhlet utilizado na extração de óleo de gérmen de milho. Uma quantidade de 30 g de gérmen de milho foi adicionada em cartuchos de papel filtro dobrados e costurados com fios limpos, de maneira a prevenir perda da amostra. Separadamente, 220 mL de cada um dos solventes utilizados foram adicionados, sendo eles etanol, acetona e hexano no balão de fundo redondo. Os solventes orgânicos foram escolhidos devido às diferenças de suas polaridades e constantes dielétricas. O etanol é um solvente polar prótico, a acetona é polar aprótica e o hexano apolar e suas constantes dielétricas são, respectivamente, iguais a 30, 19,5 e 1,88.

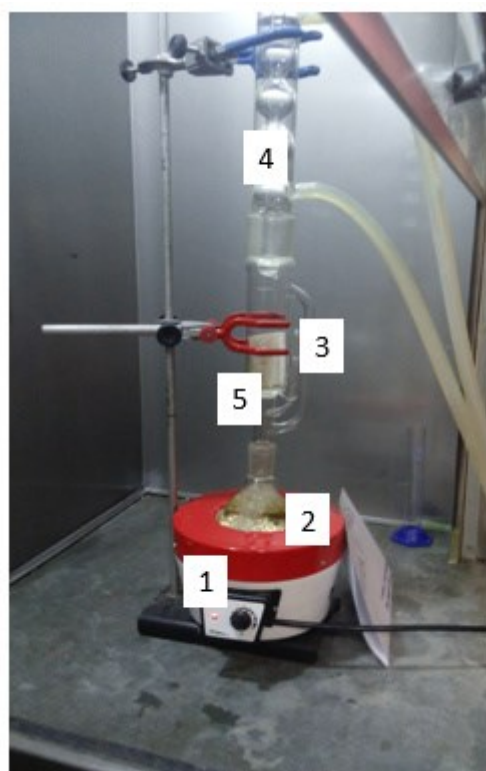


Figura 8. Aparato Soxhlet: (1) Manta aquecedora; (2) Balão volumétrico de fundo redondo com juntas esmerilhadas; (3) Extrator do tipo Soxhlet; (4) Condensador tipo bola; (5) Cartucho poroso com a matriz sólida.

O sistema foi mantido em refluxo durante 8 horas. Em seguida, evaporou-se o excesso de solvente do extrato de interesse em um rotaevaporador (IKA RV10 digital) na rotação de 140 rpm e o material remanescente foi acondicionado em estufa até peso constante ($\pm 0,01$ g). Os resultados de rendimento foram definidos em relação à massa de amostra inicial (Equação 3).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_E}{m_{alim}} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

m_E = massa da amostra extraída;

m_{alim} = massa de gérmen de milho alimentada inicialmente.

3.2.4 Caracterização do extrato

3.2.4.1 Propriedades físicas

a) Densidade

A determinação da densidade de óleos tem importante papel nas indústrias alimentícias, possibilitando-se verificar a existência de adulterações nos produtos, seja por adição de água ou presença de substâncias contaminantes. Neste trabalho, a determinação da densidade foi feita por picnometria, segundo métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2004), utilizando-se um picnômetro de 1 mL com tampa e gargalo esmerilhados para aumentar a precisão do volume de líquido, a 20 °C com o auxílio de um banho termostático. O procedimento consistiu em realizar medida de massa do picnômetro vazio, em seguida, água deionizada foi colocada no mesmo picnômetro, o mesmo era medido e após 10 min dentro do banho termostático, para estabilizar a temperatura, era medido novamente (a água foi utilizada por ser o líquido de referência na determinação de densidade de líquidos). Conhecendo a massa (1,9349 g) e densidade da água a 20 °C (0,9982 g/mL) (WEAST *et al*, 1984), determinava-se o volume da água. Pela Equação 4 que representava o volume do picnômetro, o procedimento era repetido, usando o óleo. Dessa forma, a massa do óleo de gérmen de milho poderia ser medida no picnômetro e, com conhecimento de sua massa e

volume previamente determinado pela análise da água, a densidade era calculada para os extratos.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (4)$$

Em que: ρ = densidade (g/mL); m = massa (g); V = volume (mL).

b) Índice de refração

O índice de refração refere-se à relação da velocidade de radiação de uma frequência no vácuo com a mesma frequência no meio em que se está trabalhando, indicando alterações na densidade e contaminações da substância em análise, sendo muito utilizado na indústria alimentícia. No presente trabalho, a determinação do índice de refração foi feita de acordo com métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2004), fazendo-se uso de um refratômetro de Abbé utilizando-se uma temperatura de 40 °C.

O procedimento consistia em, primeiramente, limpar os prismas com algodão umedecido com acetona. Após certificação de que os prismas estavam completamente limpos e secos, o instrumento e a luz eram ajustados para possibilitar uma leitura precisa e, então a amostra era inserida em pequenas gotas nos prismas, os mesmos eram fechados e travados. A amostra permanecia então por 2 minutos em repouso, até que a temperatura do aparelho fosse atingida e a leitura então realizada.

3.2.4.2 Perfil de ácidos graxos em cromatografia gasosa

a) Derivatização

Uma porção de 60 mg de cada amostra de óleo de gérmen de milho obtida nos ensaios de extração foi pesada em um tubo de ensaio com tampa e 2 mL da solução de KOH/Metanol previamente preparada foram adicionados e o tubo foi fechado. Em seguida, o tubo foi agitado por 5 minutos ininterruptamente em agitador vórtex e 5 mL de heptano foram adicionados. Então, aguardou-se ocorrer a separação das fases e transferiu-se a fase superior para o recipiente onde seria realizada a quantificação dos ácidos graxos do óleo de gérmen de milho.

b) Análise do perfil de ácidos graxos

Na análise do perfil dos ácidos graxos do óleo de gérmen de milho foi utilizado um cromatógrafo gasoso, da marca Shimadzu, modelo GC – 2010, equipado como um detector FID e uma coluna capilar (30 m x 0,32 mm de diâmetro interno) RTX – Wax, da marca Restek. A coluna foi mantida a 210 °C e a injeção e detecção foram realizadas a 250 °C, usando hélio em *split* de 1:50. O método de padronização interna foi usado, sendo injetado o padrão interno de cada ácido graxo e o padrão interno em separado para se conhecer os seus tempos de retenção. Dessa forma, os picos de ácidos graxos foram identificados e determinados por comparação com o tempo de retenção de cada componente. A Tabela 7 apresenta os tempos de retenção dos padrões usados neste trabalho.

Tabela 7. Padrões de ácidos graxos e tempos de retenção utilizados na análise quantitativa de óleo de gérmen de milho (Rade *et al.*, 2015)

Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Composição (% em peso)
Palmítico	4,720	12,00
Estearico	6,303	2,90
Oléico	6,447	32,20
Linoléico	6,856	52,20
Linolênico	7,474	0,70

3.2.4.3 Análise da atividade antioxidante - DPPH•

A atividade antioxidante foi determinada utilizando-se o radical livre estável DPPH•, que sofre redução na presença de antioxidantes, segundo método descrito por Rufino *et al.* (2007). O EC₅₀ refere-se a uma estimativa da concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•. Portanto, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

O reagente DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)(SIGMA ALDRICH CO) foi usado como padrão e as soluções foram preparadas com o uso de metanol como solvente. O procedimento consistiu, inicialmente, no preparo da solução de álcool metílico a 50% e da solução de acetona a 70%, ambos em água e da solução controle de álcool metílico, acetona e

água. Esta última foi preparada adicionando-se 40 mL de cada solução preparada e completando o volume para 100 mL com água destilada, seguida por homogeneização e armazenamento a temperatura ambiente. Após o preparo das soluções acima, 0,024 g de DPPH• foram dissolvidos em álcool metílico e completou-se o volume para 100 mL em um balão volumétrico também com álcool metílico. Após homogeneização, a solução foi transferida para um frasco de vidro âmbar (para proteção do contato com a luz). A partir da solução inicial de DPPH•, foram preparadas as soluções para a construção da curva do DPPH•, variando de 10µM a 50µM, conforme a Tabela 8.

Tabela 8. Preparo das soluções para a curva do DPPH•

Solução de DPPH• (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final de DPPH• (µM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Em um ambiente escuro, uma alíquota de cada solução de DPPH• (10µM a 60µM) foi transferida para cubetas de vidro e foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Pró-análise, V1200), no comprimento de onda de 515nm, utilizando-se álcool metílico, como branco para calibração do equipamento. Com os resultados, as concentrações de DPPH• (µM) foram determinadas através de um gráfico de absorbância *versus* concentração DPPH• (µM).

Para os extratos, foram preparadas cinco diluições em duplicata com água destilada. Em ambiente sem luz, uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato foi transferida para tubos de ensaio com 3,9 mL do DPPH• e homogeneizada agitando-se manualmente. Então, utilizou-se 0,1 mL da solução controle com 3,9 mL do DPPH• e homogeneizou-se também. O álcool metílico foi utilizado como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras foram monitoradas a cada minuto para observação da absorbância até sua estabilização. Após a leitura, o valor correspondente à metade da absorbância inicial do controle foi obtido através da equação da curva do DPPH• anteriormente calculado, para encontrar o consumo em µM de DPPH•.

Para o seu cálculo, foi construído um gráfico de absorbância no eixo versus a diluição em (mg/L) e determinou-se a equação da reta. Para o cálculo da atividade antioxidante, substituiu-se a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH• e encontrou-se o resultado do EC₅₀.

3.2.4.4 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez fornece uma importante avaliação do estado de conservação do óleo e foi realizada de acordo com o método Ca 5a-40, como apresentado por Abdala *et al.* (2014). As amostras foram homogeneizadas e 0,1 g pesadas em um béquer de 250 mL. Adicionou-se 25 mL de álcool (96%, em água), 25 mL de éter etílico e 0,2 mL do indicador fenolftaleína. Titulou-se com a solução de hidróxido de sódio 0,1 M (preparada em um balão de 250 mL, com a quantidade de 1 g de NaOH, 10 mL de água e o restante do balão completado com etanol) movendo-se o béquer vagarosamente e até aparecimento da cor rosa (aspecto mais intenso, escuro) e permanência por 30 segundos. Anotou-se, então, o volume gasto na titulação.

Com o resultado da titulação, calculou-se o índice de acidez em termos de porcentagem de ácido oleico (ácido graxo utilizado no cálculo de acidez de óleos e gorduras) com o uso da Equação 5.

$$\text{Ácido oléico} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ mg}} \right) = \frac{282 \times CM \times V}{10 \times m_A} \quad (5)$$

Em que:

CM = concentração molar do NaOH (M) ;

V = volume de NaOH usado na titulação (mL);

m_A = massa da amostra (g).

3.2.4.5 Índice de Peróxido

O teste de índice de peróxido foi realizado segundo os métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2004). O procedimento consistiu, primeiramente, no preparo de uma solução saturada de iodeto de potássio. Mediu-se 30 g de iodeto de potássio e adicionou-se 21 mL de água, mantendo-se, então, a mesma em frasco âmbar até o momento de sua utilização. Em seguida, pesou-se 5 g da amostra em um

erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se, 30 mL de uma solução ácido acético-clorofórmio 3:1 e agitando até a dissolução da amostra. Adicionou-se, a seguir, 0,5 mL da solução saturada de KI e deixando em repouso, protegendo da luz, por um minuto. Acrescentou-se 30 mL de água e titulou-se com solução de tiossulfato de sódio 0,1 N, com constante agitação até que a coloração amarela desaparecesse.

Posteriormente, adicionou-se 0,5 mL de solução de amido indicadora (0,5% m/v) e procedeu-se com a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul e anotou-se o volume gasto na titulação. Uma prova em branco também foi preparada e titulada nas mesmas condições. Com o resultado da titulação, calculou-se o índice de peróxido em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de óleo (meq/ kg óleo) com o uso da Equação 6.

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(V_A - V_B) \times N \times f \times 1000}{m_A} \quad (6)$$

Onde:

V_A = volume da solução de tiossulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra;

V_B = volume da solução de tiossulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação do branco;

N = normalidade da solução de tiossulfato de sódio;

f = fator da solução de tiossulfato de sódio;

m_A = massa da amostra.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão sobre a extração supercrítica com CO₂ e adição de cossolventes, propriedades físicas e qualidade do óleo de gérmen de milho, a partir das análises de potencial oxidativo, perfil de ácidos graxos, acidez e peróxido.

4.1 Processos de extração do óleo

4.1.1 Curvas cinéticas da extração supercrítica

As curvas cinéticas de extração, relacionando a massa de óleo extraída com o tempo e rendimento dos extratos com o tempo, obtidas para os ensaios 1, 2, 3 e 4 de extração supercrítica com o uso de CO₂ (PCC) são apresentadas na Figuras 9 e 10.

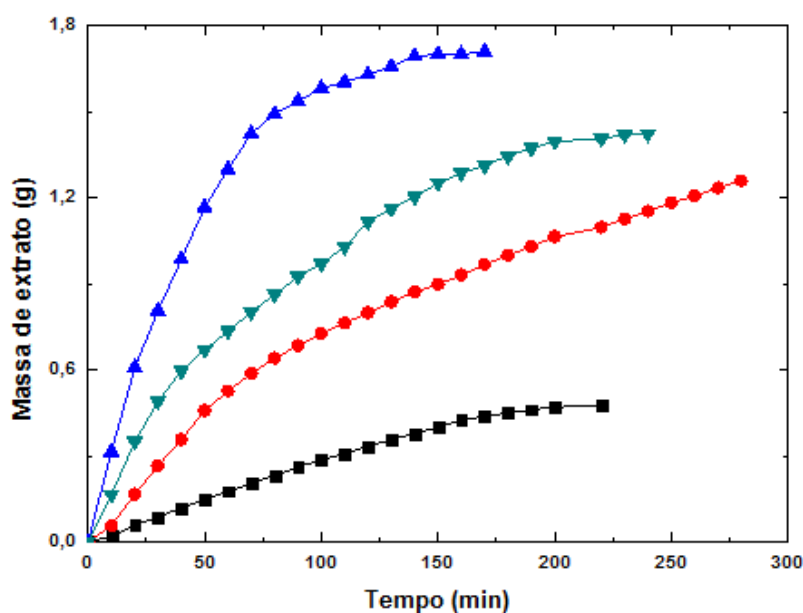


Figura 9. Curvas massa de extrato *versus* tempo do processo de extração de óleo de gérmen de milho em diferentes condições de extração utilizando o CO₂ supercrítico como solvente (Ensaio 1 (●) 52 °C e 164 bar; Ensaio 2 (■) 80 °C e 164 bar; Ensaio 3 (▲) 52 °C e 235 bar; Ensaio 4 (►) 80 °C e 235 bar)

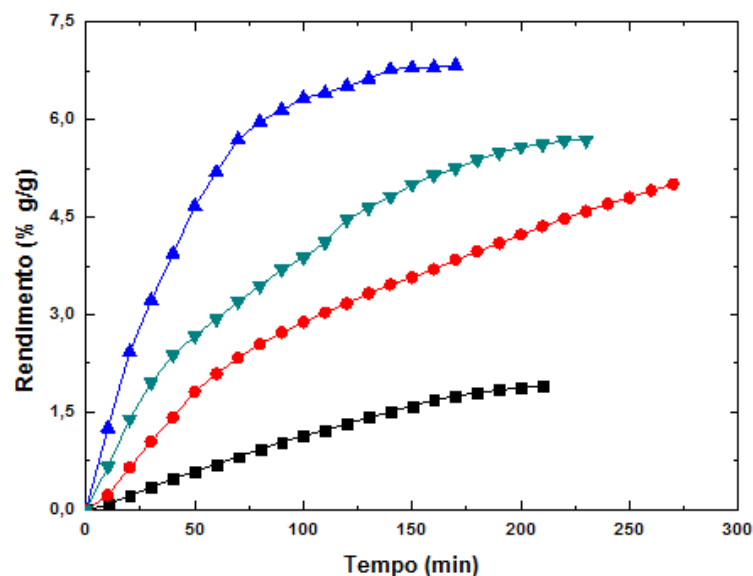


Figura 10. Curvas rendimento *versus* tempo do processo de extração de óleo de gérmen de milho em diferentes condições de extração utilizando o CO₂ supercrítico como solvente (Ensaio 1 (●) 52 °C e 164 bar; Ensaio 2 (■) 80 °C e 164 bar; Ensaio 3 (▲) 52 °C e 235 bar; Ensaio 4 (►) 80 °C e 235 bar)

As curvas obtidas mostram o comportamento não linear típico da cinética de extração com fluido supercrítico. Observa-se pela Figura 9, que o tempo mínimo de extração foi de 140 min e o tempo máximo de extração foi de 280 min, ambos suficientes para extrair o óleo no gérmen de milho. Além disso, nota-se que dois períodos de tempo merecem destaque. No primeiro, ocorre um rápido aumento na massa de extrato acumulado em um curto período de tempo, caracterizando o período t_{cer} , tempo da taxa de extração constante. Para o ensaio 1, o período CER ocorre entre 0 e 50 minutos e no ensaio 3 o t_{cer} ocorre entre 0 e 30 minutos, o que demonstra a variação de ocorrência existente em cada ensaio, decorrente das diferentes condições de temperatura. No segundo período (platô da curva) nota-se que a extração do óleo de gérmen de milho no CO₂ supercrítico é quase nula, caracterizando o período t_{fer} (tempo da taxa de extração decrescente). Para o ensaio 3 o período FER ocorre entre 75 e 140 minutos e no ensaio 4 o t_{fer} ocorre entre 35 e 220 minutos. A não visualização completa das três fases típicas de uma curva cinética é bastante comum e isso ocorre com frequência quando se tem alta solubilidade do extrato no CO₂ supercrítico (SANTOS, 2012).

Com os resultados da Figura 10, observa-se que o maior valor de rendimento obtido ocorreu no ensaio 3 que apresentou o menor tempo de extração (140 minutos), um período de extração CER de 0 a 30 minutos e um período de extração FER de 30 a 130 minutos. Já o menor

valor de rendimento ocorreu no ensaio 2 com um tempo total de extração de 210 minutos, um período de extração CER de 0 a 50 minutos e um período de extração FER de 50 a 180 minutos. Estes resultados demonstraram que o menor tempo total de extração e menores tempos de duração dos períodos CER e FER proporcionaram maior rendimento no ensaio 3. O mesmo resultado é observado para os ensaios 1 e 4, pois o ensaio 1 com rendimento de 5,00% apresentou maior tempo total de extração e períodos CER e FER, com relação ao ensaio 4, que apresentou um rendimento maior de extração de 5,68%. Portanto, pode-se afirmar que menores tempos de ocorrência dos períodos CER e FER ocasionaram os maiores rendimentos nos ensaios de extração supercrítica.

4.1.2 Extração com CO₂ supercrítico, efeito da temperatura e pressão do processo

Com resultados de testes preliminares foi possível observar os limites de temperatura e pressão a serem utilizados no equipamento de extração. Na pressão de 100 bar, não se obteve resultados de rendimento, independente do valor de temperatura utilizado e tal resultado permitiu a exclusão desse valor de pressão na definição dos limites a serem usados no planejamento experimental. Dessa forma, os limites para os 9 ensaios experimentais foram definidos como: temperaturas variando de 45 a 85 °C, pressões entre 150 e 250 bar e vazão constante de 3 mL/min. Os resultados dos experimentos da extração com CO₂ em condições supercríticas para avaliação dos efeitos de temperatura e pressão são apresentados na Tabela 9.

Observou-se pelos valores obtidos, que as extrações realizadas a pressão constante apresentaram uma diminuição no rendimento da extração supercrítica com a elevação da temperatura (ensaios 1 e 2 realizados a 164 bar, ensaios 3 e 4 realizados a 235 bar e ensaios 5 e 6 realizados a 200 bar), o que demonstra o efeito negativo da temperatura sobre o rendimento. Salgin *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes na extração supercrítica de óleo de girassol, em que, a pressões abaixo de 300 bar o aumento da temperatura resultou em uma diminuição significativa do rendimento e da solubilidade. Estes resultados podem ser explicados pelo efeito “*crossover*”, ou seja, o aumento na temperatura, com pressão constante, ocasiona uma queda na densidade de CO₂ bem como o aumento na pressão de vapor do soluto. A queda na densidade de CO₂ é significativa a pressões próximas ao ponto crítico, resultando em uma queda na solubilidade. Özkal *et al.* (2005 a) também observou uma queda na solubilidade com o aumento da temperatura, na extração de sementes de damasco a 150 bar, atribuindo os resultados ao efeito “*crossover*”. Rebolleda *et al.* (2012) estudaram a extração supercrítica de óleo de gérmen de milho com CO₂, mas verificaram efeito contrário quanto à

influência da temperatura. No entanto, a pressão de operação constante utilizada foi de 450 bar, significativamente maior do que a pressão utilizada no presente estudo.

Tabela 9. Rendimento da extração supercrítica com o uso de CO₂ a diferentes condições de temperatura e pressão

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade de CO ₂ (g/mL)	Rendimento (%)
1	52	164	0,72	5,00
2	80	164	0,48	1,90
3	52	235	0,81	6,83
4	80	235	0,66	5,68
5	45	200	0,81	6,71
6	85	200	0,56	3,39
7	65	150	0,55	2,34
8	65	250	0,76	6,41
9	65	200	0,69	5,86

O efeito da pressão no rendimento do óleo extraído em condições supercríticas também foi avaliado. De acordo com a Tabela 10, notou-se que a pressão teve um efeito positivo no rendimento do óleo a temperatura constante. Nos ensaios 2 e 4 realizados a 80 °C e ensaios 7,8 e 9 realizados a 65 °C, a elevação da pressão ocasionou um aumento no rendimento das extrações. Rebolleda *et al.* (2012); Pederssetti *et al.* (2011) e Nimet *et al.* (2009) que realizaram a extração supercrítica de óleo de gérmen de milho, canola e girassol, respectivamente, verificaram o mesmo efeito, principalmente a pressões acima de 200 bar.

Para comparação com os resultados das extrações em condições supercríticas com o uso de CO₂ foram realizadas extrações com o uso de solventes orgânicos, em um aparato Soxhlet e obteve-se os maiores rendimentos de óleo com o uso de etanol (35,70 %), seguido do hexano (30,24 %) e acetona (22,50 %). A extração em Soxhlet com etanol apresentou o maior rendimento, o que pode ser justificado pelo fato do etanol ter natureza polar, podendo extrair não somente compostos polares, que não se dissolvem no hexano, como também componentes apolares. Além disso, o contato entre o solvente e o substrato na extração em Soxhlet é diferente do existente na extração supercrítica. No Soxhlet, o solvente é aquecido em refluxo, o vapor

passa por uma “alça de by-pass” para chegar ao condensador. Em seguida, o solvente goteja para dentro do sistema e se difunde na matriz do substrato. As substâncias a serem extraídas, consequentemente, se dissolvem no solvente e esta mistura de solvente e substâncias extraídas se difundem da matriz do substrato de volta ao solvente. Uma vez que a mistura no extrator alcança o topo da “alça”, o solvente e o extrato retornam ao balão. Portanto, esse é um processo de extração em batelada. Na extração supercrítica com o uso de CO₂ e também de cossolventes, uma vez que o CO₂ difunde na matriz do substrato e solubiliza os componentes extraíveis, em seguida, a mistura de componentes e CO₂ difunde da matriz do substrato e flui com o volume da fase fluida. Portanto, a extração supercrítica é um processo contínuo, envolvendo fenômenos de transporte diferentes da extração em Soxhlet, que proporcionam uma maior seletividade do processo e, consequente extração de compostos de maior interesse (ZHAO; ZHANG, 2014).

No entanto, apesar dos maiores rendimentos obtidos com o uso de solventes orgânicos em Soxhlet, estas extrações foram realizadas por um longo tempo de extração, cerca de 8 horas. Além disso, uma grande quantidade de solvente é utilizada, o que não é unicamente dispendioso, mas também fonte de problemas ambientais adicionais. As amostras foram extraídas por longos períodos, o que pode resultar em decomposição térmica dos compostos e não apresenta alta seletividade (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Já os ensaios das extrações em condições supercríticas foram realizados em menores tempos de extração, denotando máximo 4 horas (tempo dependente do esgotamento da amostra extraída), o que pode levar a menor degradação do óleo. A técnica utiliza um solvente reconhecido como seguro para a saúde humana e meio ambiente. Além disso, o extrato é preservado do contato com a luz, onde reações luminosas poderiam ocorrer e ocasionar oxidação do óleo sendo que a eliminação do solvente da amostra e sua posterior recuperação do mesmo ocorre facilmente com a despressurização do sistema. Estes fatores, portanto, justificam a extração supercrítica como uma alternativa promissora para a extração do óleo de milho.

Dentro da faixa experimental avaliada, pode-se notar uma correlação linear entre rendimentos e densidade de CO₂, como mostrado na Figura 11. Para experimentos posteriores, essa correlação, que alcançou um coeficiente de correlação (R^2), pode ser útil para rendimentos preditos estimados.

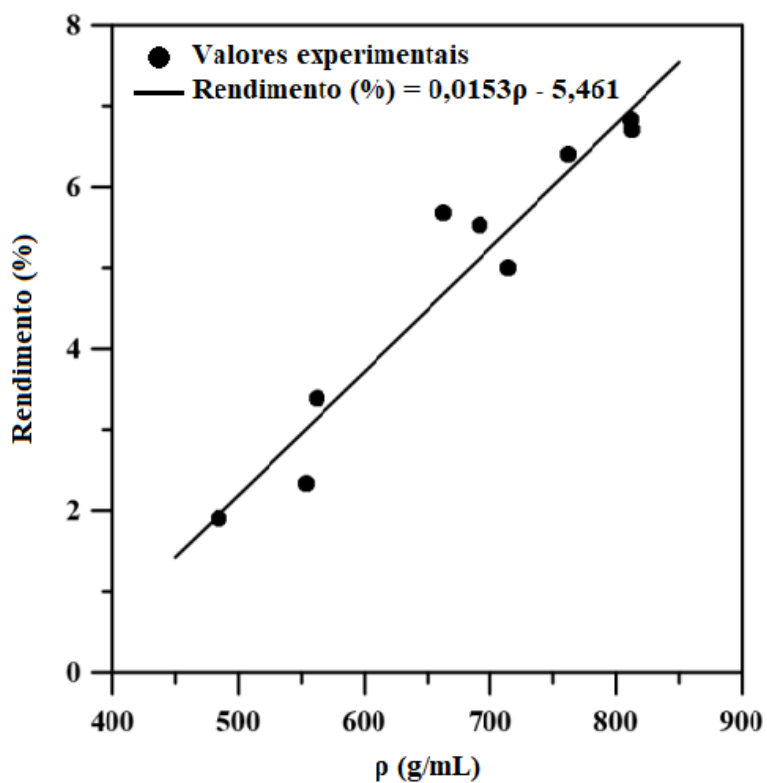


Figura 11. Correlação linear entre rendimentos e densidade de CO₂ na extração supercrítica com o uso de CO₂

4.1.3 Extração com CO₂ supercrítico e cossolventes

Os resultados dos ensaios realizados nas extrações de gérmen com o uso de CO₂ e adição dos cossolventes etanol, hexano e acetona são mostrados na Tabela 10. As condições de processo utilizadas foram: temperaturas de 40 a 80°C, pressão e vazão de CO₂ constantes de 250 bar e 3 mL/min, respectivamente e vazões de cossolventes de 0,01 a 0,10 mL/min.

Tabela 10. Resultados dos ensaios realizados nas extrações de óleo de gérmen de milho com o uso de CO₂ e cossolventes a temperaturas de 40, 60 e 80°C, vazões de cossolventes de 0,01; 0,05 e 0,1 mL/min, pressão e vazão de CO₂ constantes de 250 bar e 3 mL/min.

Temperatura (°C)	Vazão de cossolvente (mL/min)	Rendimento (%):		
		Etanol	Acetona	Hexano
40	0,01	11,42	10,72	6,12
	0,05	11,14	10,83	6,01
	0,1	12,80	10,94	5,98
60	0,01	10,62	13,54	11,01
	0,05	13,03	13,43	10,50
	0,1	13,81	13,12	10,25
80	0,01	9,55	11,30	6,36
	0,05	10,08	12,41	6,88
	0,1	11,25	13,04	7,37

Krichnavaruk *et al.* (2008) observaram quena extração supercrítica de astaxantina com o uso de óleos vegetais que a adição de cossolventes aumentou o rendimento da extração alcançado. O ensaio a 70 °C, 40 MPa e 3 mL/min de CO₂ com a adição de 10% de óleo de soja, resultou em um rendimento de 51,03% (g/g), em relação ao rendimento obtido no mesmo ensaio com o uso de CO₂ puro (36,36 % g/g). Sánchez-Vicente *et al.* (2009) também observaram no estudo da extração supercrítica do óleo da semente de pêssago usando CO₂ e etanol como cossolvente, que a 51 °C e 19,80 MPa, aumentando-se a vazão do etanol utilizado como cossolvente, de 2,5 para 5,0 % mol, o rendimento aumentou de cerca de 30% para 40% (g/g). Avaliando-se o efeito da variação da temperatura de operação e mantendo-se a vazão constante, nota-se que os maiores valores de rendimento de óleo foram obtidos a temperatura de 60 °C, para os três cossolventes utilizados: 11,01% de hexano, 13,54% de acetona e 13,81% de etanol. Este resultado de temperatura coincidente nas extrações com os três cossolventes utilizados indica a possibilidade de existência de uma temperatura ótima para extração de óleo de milho com cossolventes.

4.2 Propriedades físicas

4.2.1 Densidade e índice de refração

A densidade e o índice de refração foram determinados nos ensaios realizados no planejamento experimental com o uso de CO₂ supercrítico, assim como nos experimentos com

o uso de cossolventes e solventes orgânicos (Soxhlet), em triplicata. Observou-se que não houve variação destas propriedades nos óleos obtidos pelos diferentes tipos de extração realizados (Tabela 13). Comparando-se os valores da Tabela 11 com os resultados obtidos por Rebolleda *et al.* (2012) observa-se que o valor da densidade foi coincidente e que o valor do índice de refração foi similar (densidade, $0,92 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$; refração, $1,472 \pm 0,001$).

Tabela 11. Propriedades físicas do óleo de gérmen de milho

Parâmetro Físico	Valor médio	Desvio padrão
Densidade (g/cm^3)	0,9175	$\pm 0,0003$
Índice de refração	1,4665	$\pm 0,0007$

4.2.2 Índice de acidez

O índice de acidez das amostras de óleo de gérmen de milho extraídas com o uso de solventes orgânicos, CO_2 supercrítico e adição de cossolventes foi avaliado pelo método de titulação ácido-base. O índice de acidez é um importante indicador da qualidade e estado de conservação do óleo vegetal, definido como a quantidade de hidróxido de potássio em mg necessário para neutralizar 1 g do óleo extraído e estes são comumente expressos em termos do componente ácido principal, o ácido oléico. Este índice é dependente de diversos fatores relacionados à composição do óleo, ao procedimento de extração usado, ao grau de pureza da gordura e, principalmente, às condições de conservação e à qualidade da matéria-prima utilizada na análise (FUENTES, 2011; REBOLLEDA *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos foram de 4,02 a 4,03 % $\pm 0,1$ (ácido oléico) para todos os ensaios realizados neste trabalho. Este valor encontra-se dentro do limite dos valores comumente descritos e aceitos na literatura para o óleo de gérmen de milho obtido por extrações convencionais, que indica a faixa de 1,5 a 4,0 % de ácido oléico (ANVISA, 1999; JOHNSON, 2004 *apud* REBOLLEDA *et al.*, 2012). Entretanto, em comparação com os trabalhos de Rebolleda *et al.* (2012) e List *et al.* (1984) os valores deste trabalho são mais altos do que os valores encontrados por eles. Destacando-se a extração por CO_2 supercrítico, realizada por List *et al.* (1984), ao comparar o índice de acidez em extrações com o uso de prensa mecânica e com o uso de CO_2 supercrítico, menores valores de acidez pela extração supercrítica foram observados. Os valores encontrados nas condições de 70 °C e 12000 PE

foram: $0,7\% \pm 0,1$ ácido oléico, em prensa mecânica e de $0,5\% \pm 0,1$ ácido oléico na extração com CO₂, em condições supercríticas.

4.2.3 Índice de peróxido

O índice de peróxido é um parâmetro comumente avaliado em óleos, relacionado à oxidação primária de produtos, indicando o nível de deterioração do óleo, no qual os radicais lipídicos são atacados pelo oxigênio para formar hidroperóxidos lipídicos. O índice de peróxido é a quantidade de peróxidos, expressa em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma da amostra, que ocasionam a oxidação do iodeto de potássio, com a solução dissolvida em ácido acético e clorofórmio. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos na análise de índice de peróxidos para as amostras extraídas com o uso de solventes orgânicos, CO₂ supercrítico e CO₂ supercrítico com adição de cossolventes. A temperatura é um dos fatores que podem afetar o estágio de iniciação e, portanto a oxidação do óleo, pela formação dos peróxidos ser menor que a sua decomposição. O índice de peróxido é um teste aplicável a todos os óleos e gorduras normais, incluindo margarinas e creme vegetal e geralmente, admite-se que o seu valor não ultrapasse 10 meq/ kg óleo, para se ter normalidade (ANVISA, 1999).

Observa-se pelos resultados uma variação no índice de peróxidos de 16,45 a 22,38 meq/ kg óleo em todos os ensaios de extração analisados, o que significa que o óleo já estava em processo de oxidação e, conseqüente deterioração. Os melhores resultados foram observados para as amostras extraídas com o uso de solventes orgânicos, seguida pela extração com CO₂ e adição de cossolventes. Para as amostras extraídas com CO₂ supercrítico, os resultados encontram-se em acordo com Rebolleda *et al.* (2012) que também observaram valores elevados de índice de peróxido (20 a 25 meq/kg óleo). Listet *al.* (1989) *apud* Rebolleda *et al.* (2012) afirmaram que os óleos vegetais extraídos por extração supercrítica sofrem rápida deterioração e que diversos fatores podem afetar a estabilidade oxidativa dos óleos, tais como, a composição de ácidos graxos, a estabilidade de antioxidantes e a presença de componentes pró-oxidantes (ácidos graxos livres, peróxidos lipídicos, ou metais pró-oxidantes).

Tabela 12. Resultados das análises de índice de peróxido obtidos nas extrações de óleo de gérmen de milho com CO₂ em condições supercríticas, com o uso de solventes orgânicos e com o uso de cossolventes.

Método de extração	Condições e/ou solventes	Índice de peróxido (meq/kg óleo)
CO₂ Supercrítico	1 (T = 52 °C e P = 164 bar)	21,56 ± 0,12
	2 (T = 80 °C e P = 164 bar)	21,21 ± 0,92
	3 (T = 52 °C e P = 235 bar)	22,38 ± 0,69
Soxhlet	Etanol	16,45 ± 0,22
	Hexano	16,92 ± 0,40
	Acetona	18,14 ± 0,11
CO₂ Supercrítico + Cossolventes	Etanol (0,1 mL/min e 60 °C)	20,15 ± 0,85
	Hexano (0,1 mL/min e 60 °C)	20,12 ± 1,08
	Acetona (0,1 mL/min e 60 °C)	20,87 ± 0,98

4.2.4 Perfil de ácidos graxos em cromatografia gasosa

A análise do perfil de ácidos graxos do óleo de gérmen de milho foi realizada para todas as amostras resultantes dos ensaios realizados com o uso de solventes orgânicos em Soxhlet (hexano, etanol e acetona) e em alguns pontos do planejamento experimental com diferentes valores de rendimentos (ensaios 1, 2 e 3) e com o uso de cossolventes a 60 °C e 0,01 mL/min. A Tabela 13 apresenta os resultados das análises.

Tabela 13. Perfis de ácidos graxos obtidos nas extrações de óleo de gérmen de milho com CO₂ em condições supercríticas, com o uso de solventes orgânicos e com o uso de cossolventes (etanol=E; hexano = H e acetona=A).

Método de extração	Ensaio/ Solvente	Ácido Graxo (% g/góleo)				
		Estearíco C18:0	Palmítico C16:0	Oléico C18:1	Linoléico C18:2	Linolênico C18:3
CO₂ Supercrítico	1	1,52 ± 0,35	13,84 ± 0,48	34,89 ± 0,34	47,55 ± 0,64	0,76 ± 0,02
	2	1,51 ± 0,02	12,35 ± 0,13	35,85 ± 0,15	48,70 ± 0,08	0,81 ± 0,04
	3	1,77 ± 0,15	11,74 ± 0,77	37,02 ± 0,35	48,71 ± 0,27	0,77 ± 0,01
Soxhlet	E	1,22 ± 0,15	13,70 ± 0,55	34,63 ± 0,59	49,20 ± 0,05	1,27 ± 0,16
	H	1,22 ± 0,11	11,77 ± 0,74	36,55 ± 0,59	49,30 ± 0,80	1,18 ± 0,43
	A	1,37 ± 0,20	13,81 ± 0,75	37,05 ± 0,75	47,70 ± 0,88	0,57 ± 0,37
Cossolventes (0,1 mL/min e 60 °C)	E	1,25 ± 0,02	12,87 ± 0,44	37,25 ± 0,05	47,69 ± 0,27	0,92 ± 0,10
	H	1,20 ± 0,01	11,40 ± 1,14	37,37 ± 0,04	49,00 ± 1,05	1,07 ± 0,07
	A	1,65 ± 0,58	13,13 ± 2,73	35,76 ± 1,74	48,74 ± 1,71	1,72 ± 0,11

Verifica-se que os ácidos graxos encontrados em maior proporção foram os ácidos insaturados linoléico e oléico, respectivamente, para todos os tipos de extração realizados, enquanto que os ácidos graxos saturados, palmítico e estearíco foram encontrados em menor quantidade. Além disso, os resultados obtidos nas análises quantitativas dos ácidos graxos para o óleo de gérmen de milho com o uso de diferentes métodos de extração não evidenciaram variação significativa dos teores de ácidos graxos entre as condições ou solventes utilizados.

Para as extrações com CO₂ supercrítico, o mesmo resultado de maior proporção dos ácidos insaturados linoléico e oleico, foi observado por Rebolleda *et al.* (2012) para a extração do gérmen de milho e, também, para outros óleos vegetais, tais como, para a extração do óleo de canola por Pederssetti *et al.* (2011) e óleo de girassol por Nimet *et al.* (2011), as faixas de cada ácido graxo obtido nos estudos citados são mostradas na Tabela 14.

Observou-se na comparação dos resultados com Rebolleda *et al.* (2012), que o perfil de ácido oléico (responsável por ajudar a reduzir o colesterol ruim e consequentemente o risco de doença cardíaca e acidente vascular cerebral) encontrado no presente trabalho foi significativamente mais alto e que a composição de ácido linoléico (caracterizado como essencial, não produzido pelo organismo humano e por isso de ingestão necessária por meio da alimentação ou da suplementação alimentar) foi equivalente ao dos autores. E, ainda, quanto a composição de ácido linolênico (causador da rancidez em alimentos) os perfis evidenciados foram cerca de 8 vezes menores do que os encontrados por Rebolleda *et al.* (2012).

Estes resultados demonstram a excelente composição e qualidade do óleo de gérmen de milho, em termos de ácidos graxos e, especialmente, a necessidade da realização de processos posteriores para refino do óleo, afinal, os testes foram realizados com o óleo bruto.

Tabela 14. Perfil de ácidos graxos para outros óleos vegetais extraídos com o uso de CO₂ supercrítico como solvente

Estudo	Ácido Graxo (% g/ g _{óleo})				
	Estearíco C18:0	Palmítico C16:0	Oléico C18:1	Linoléico C18:2	Linolênico C18:3
Rebolleda <i>et al.</i> (2012) (óleo de gérmen de milho)	1,9 – 2,0	10,5 – 10,7	23,4 – 24,5	45,5 – 47,5	8,0
Nimetet <i>et al.</i> (2011) (óleo de girassol)	4,4 – 4,9	5,9 – 7,4	17,3 – 19,1	68,3 – 70,1	0,1 – 0,2
Pederssetti <i>et al.</i> (2011) (óleo de canola)	2,4 – 2,5	4,7 – 5,1	66,8 – 68,3	15,1 – 16,1	7,8 – 9,0

4.2.5 Análise da atividade antioxidante - DPPH•

A atividade antioxidante das amostras obtidas com o uso de CO₂ supercrítico, solventes orgânicos e CO₂ supercrítico com a adição de cossolventes foi determinada pelo

método DPPH• que refere-se à habilidade de doação de íons de hidrogênio ou elétrons dos compostos presentes nas amostras de óleo de gérmen de milho. Em geral, o método é mais eficiente em frações polares contendo componentes fenólicos, que apresentam maior poder de solvatação do que outros compostos (CAPELETTO *et al.*, 2016).

O EC₅₀ representa uma estimativa da concentração da amostra necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do DPPH•, expressa em µg/mL, sendo que quanto menor o consumo de DPPH• de uma amostra, maior será a sua EC₅₀. Os resultados referentes ao EC₅₀ obtido a partir da equação da reta gerada do gráfico da % A.A. em função das concentrações da amostra (µg/mL), são mostrados na Tabela 15. A Tabela 16 apresenta a classificação de Garmus *et al.* (2015), dos extratos, de acordo com o valor de EC₅₀ obtido.

Tabela 15. Potencial antioxidante das amostras de óleo de gérmen de milho usando o método DPPH• nas extrações com o uso de CO₂ e cossolventes em condições supercríticas e com o uso de solventes orgânicos por Soxhlet

Método de extração	Condições e/ou solventes	EC ₅₀ (µg/mL)
CO₂ Supercrítico	1 (T = 52 °C e P = 164 bar)	8,69 ± 0,09
	2 (T = 80 °C e P = 164 bar)	5,03 ± 0,16
	3 (T = 52 °C e P = 235 bar)	7,93 ± 0,00
Soxhlet	Etanol	12,95 ± 0,22
	Hexano	16,34 ± 0,73
	Acetona	14,90 ± 0,29
CO₂ Supercrítico + Cossolventes	Etanol (0,1 mL/min e 60 °C)	12,29 ± 0,03
	Hexano(0,1 mL/min e 60 °C)	17,43 ± 1,89
	Acetona(0,1 mL/min e 60 °C)	14,85 ± 1,35

Tabela 16. Classificação do potencial antioxidante das amostras de óleo de gérmen de milho usando o método DPPH•

Grupo	Classificação
$EC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$	Extratos muito ativos
$100 < EC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$	Extratos moderadamente ativos
$200 < EC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$	Extratos ligeiramente ativos
$EC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$	Extratos inativos

Observa-se que todos os extratos apresentam atividade antioxidante, sendo classificados como muito ativos. Os menores valores de EC_{50} e, portanto, os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos com a extração supercrítica com o uso de CO_2 . Isso demonstra que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante presentes no óleo de gérmen de milho possuem maior afinidade por solventes apolares.

Ressalta-se que os resultados da extração supercrítica com CO_2 , foram obtidos com variações de temperatura e pressão, parâmetros que interferem na densidade de CO_2 e no processo de extração devido à transferência de massa. Em relação à pressão, observou-se que a variação de 164 bar para 235 bar ocasionou uma diminuição sobre os valores do EC_{50} , o que demonstra que, com a elevação da pressão, a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante também aumenta. O efeito da temperatura mostrou um comportamento semelhante ao da pressão, em que, ao se aumentar a temperatura, mantendo a pressão constante, ocorreu diminuição do EC_{50} , ou seja, um aumento da concentração dos componentes com potencial antioxidante, efeito este mais pungente que o efeito da pressão.

Os extratos obtidos por Soxhlet e pela extração com adição de cossolventes apresentaram resultados semelhantes, com o etanol apresentando-se com o maior potencial oxidante, seguido da acetona e hexano, respectivamente, confirmando os estudos de Kitzberger *et al.* (2007), de que a natureza polar do etanol favorece o seu uso como cossolvente para obtenção de componentes antioxidantes.

Com as análises de qualidade e composição do óleo de gérmen de milho com o uso de CO_2 supercrítico e cossolventes, observou-se que o óleo de milho extraído apresenta um alto valor de índice de peróxido, indicando o início do processo de deterioração do óleo, no entanto, deve-se ressaltar que estes testes e os posteriores foram realizados no óleo bruto de gérmen de milho, sem qualquer tipo de tratamento ou refino posterior ao processo de extração, o que pode

explicar os resultados. O índice de acidez encontrou-se nos limites aceitáveis. Por outro lado, o óleo de gérmen de milho apresenta ótima densidade e índice de refração, também possui um excelente perfil de ácidos graxos, contendo grande quantidade de ácido linoléico e pequena quantidade de ácido linolênico, ou seja, alto poder nutritivo e ainda possui elevado potencial antioxidante, com os melhores resultados encontrados nas extrações com o uso de CO₂ supercrítico. Portanto, apesar de alcançarem menores valores de rendimento, quando comparados com o método de extração convencional com Soxhlet, a qualidade do óleo extraído com o uso de CO₂ supercrítico e cossolventes é alta, compensando e viabilizando seu uso em fármacos e alimentos de forma segura e sustentável a saúde e meio ambiente, em detrimento do processo convencional.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

5.1 PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no trabalho, pode-se concluir que:

- ✓ O rendimento global de extração do óleo de gérmen de milho obtido por fluido supercrítico variou de 1,90% a 6,83% a partir das condições definidas nos ensaios experimentais. A condição de extração que favoreceu o maior rendimento para o óleo de gérmen de milho foi de 52 °C e 235 bar.
- ✓ A variável temperatura mostrou-se significativamente negativa quanto a sua elevação sobre os valores de rendimento de óleo de gérmen de milho obtido, nas faixas estudadas, enquanto a pressão apresentou-se como significativamente positiva sobre os resultados, quando elevada.
- ✓ Os rendimentos dos extratos obtidos com o uso de CO₂ e adição de cossolventes (hexano, acetona e etanol) foram maiores quando comparados aos rendimentos apresentados pela extração supercrítica com o uso de CO₂ apenas, sendo que, o etanol mostrou ser o melhor cossolvente, com rendimento máximo de 13,81%.
- ✓ Os solventes orgânicos apresentaram os maiores valores de rendimento dentre todos os ensaios realizados, com os mesmos variando de 22,50% a 35,70%.
- ✓ Os compostos majoritários encontrados no óleo de gérmen de milho pelos métodos de extração utilizados foram: ácido linoléico (47,55 – 49,30%), ácido oléico (34,63 – 37,37%), ácido palmítico (11,40 – 13,84%), ácido esteárico (1,20 – 1,77%) e ácido linolênico (0,57 – 1,72%).
- ✓ Os resultados das propriedades físicas densidade e índice de refração e, também do índice de acidez não apresentaram diferenças de acordo com o método de extração utilizado e em concordância com a literatura.

- ✓ A análise de DPPH• evidenciou que o óleo de gérmen de milho apresentou elevado potencial antioxidante para todas as amostras analisadas, no entanto, quanto à estabilidade oxidativa, o teste de índice de peróxido indicou que as amostras já estavam em processo de deterioração pelos altos valores encontrados.
- ✓ Comparando-se os diferentes métodos de extração, o óleo de gérmen de milho extraído com CO₂ supercrítico apresentou menores rendimentos. No entanto, ainda assim, o método de extração supercrítica mostrou-se uma alternativa promissora, uma vez que se utilizou solventes sustentáveis ambientalmente, que podem difundir facilmente através de materiais sólidos e possibilitar extrações mais rápidas, maior poder de solvatação e óleo de maior qualidade. Além disso, a adição de cossolventes aumentou a eficiência da extração elevando a solubilidade do soluto e modificando a seletividade do processo de forma mais segura para a saúde humana e meio ambiente.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo da extração supercrítica do óleo de gérmen de milho com o uso de CO₂ e adição de cossolventes, as principais sugestões para futuros trabalhos são:

- ✓ Avaliar a influência da vazão para a extração supercrítica do óleo de gérmen de milho com o uso de CO₂ e também a influência em conjunto das vazões CO₂/cossolventes;
- ✓ Avaliar o uso de outros cossolventes, que possam elevar o rendimento do óleo de gérmen de milho e a sua qualidade;
- ✓ Realizar a modelagem matemática das curvas cinéticas da extração do óleo de gérmen de milho com CO₂ supercrítico;
- ✓ Realizar análises para melhora da qualidade do óleo a ser produzido;
- ✓ Estudar o efeito em separado e em conjunto das demais variáveis (tamanho de partícula, empacotamento do leito, etc.).

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdala, A.C.A., Garcia, V.A.S., Trentini, C.P., Cardozo-Filho, L., Silva, E.A., Silva, C. Continuous catalyst-free esterification of oleic acid in compressed ethanol. *International Journal of Chemical Engineering*, Article ID 803783, pp. 1-5, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8994-1-0%5D.pdf>>. Acesso em: 07/07/2017>.

Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D.A.J. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 5507-5511, 2000.
<https://doi.org/10.1021/jf000311t>
[PMid:11087510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11087510/)

Brunner, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, pp.21-33, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>

Capeletto, C., Conterato, G., Scapinello, J., Rodrigues, F.S., Copini, M.S., Kuhn, F., Tres, M.V., Magro, J.D. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. *Journal of Supercritical Fluids*, 110, pp. 32-38, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.12.009>

Carlucci, G., Mazzeo, P., Del Governatore, S., Di Giacomo, G., Del Re, G. Liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in malt sprouts with supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography*, 935, pp. 87-91, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01080-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01080-9)

Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Torres, A., Macías, F.A., Martínez de la Ossa, E. Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 152, pp. 301-306, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.06.027>

Castro, M. D. L., Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 2383-2389, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
[PMid:19945707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945707/)

Christianson, D.D., Friedrich, J.P., List, G.R., Warner, K., Bagley, E.B., Stringfellow, A.C., Inglett, G.E. Supercritical fluid extraction of dry-milled corn germ with carbon dioxide.

Journal of Food Science, 49, pp. 229-232, 1984.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13714.x>

CORN REFINERS ASSOCIATION. Washington, D.C., Corn Refiners Association, 2006. 5 ed.

Corso, M.P., Fagundes-Klen, M.R., Silva, E.A., Filho, L.C., Santos, J.N., Freitas, L.S., Dariva, C. Extraction of sesame seed (*Sesamunindicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52, pp. 56-61, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.11.012>

Dalmolin, I., Mazutti, M.A., Batista, E.A.C., Meireles, M.A.A., Oliveira, J.V. Chemical characterization and phase behavior of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 42, pp. 797-801, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.jct.2010.02.003>

Filippis, F.M. Extração com CO₂ supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho – experimentos e modelagem. Porto Alegre, UFRS, 2001. 102 p.

Fiori, L. Supercritical extraction of sunflower seed oil: Experimental data and model validation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 50, pp. 218-224, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.06.011>

FOOD INGREDIENTS BRASIL. São Paulo, Marcia Fani (Mtb 19876), 2014, v. 31.

Friedrich, J. P.; Pryde, E. H. Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, pp.223–228, 1984.
<https://doi.org/10.1007/BF02678773>

Fuentes, P.H.A. Avaliação da qualidade de óleos de soja, canola, milho e girassol durante o armazenamento. Santa Catarina, UFSC, 2011. 109 p.

Garmus, T.T., Paviani, L.C., Queiroga, C.L., Cabral, F.A. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippiasidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, pp. 68-75, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.016>

Gunstone, F.D. Fatty Acid and Lipid Chemistry, Blackie, London, 1996.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4131-8>

Gunstone, F.D. Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, Blackwell, Oxford, 2002.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J.A., Ibañez, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 43, pp. 67-82, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.008>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IMESP, pp. 118-119, 2004.

Jokic, S., Nagy, B., Zekovic, Z., Vidovic, S., Bilic, M., Velic, D., Simándi, B. Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on soybean oil yield. Food and Bioproducts Processing, 90, pp. 693-699, 2012.

JORGE, N. Química e Tecnologia de Óleos Vegetais, Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

Justo, O. R., Moraes, A. M., Barreto, G. P. M, Mercadante, A. Z., Rosa, P. T. KARDASH, E., TUR'YAN, Y. Acid value determination in vegetable oils by indirect titration in aqueous-alcohol media. Croatica Chemica Acta, 78, pp. 99-103, 2005.

Kitzberger, C.S.G., Smânia jr., A., Pedrosa, R.C., Ferreira, S.R.S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. Journal of Food Engineering, 80, pp. 631-638, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.013>

Krichnavaruk, S., Shotipruk, A., Goto, M., Pavasant, P. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. Bioresource Technology, 99, pp. 5556-5560, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.049>
[PMid:18068354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18068354/)

List, G.R., Friedrich, J.P. Oxidative stability of seed oils extracted with supercritical carbon dioxide. Journal of the American Oil Chemists' Society, 66, pp. 98-101, 1989.
<https://doi.org/10.1007/BF02661793>

List, G.R., Friedrich, J.P., Christianson, D.D. Properties and processing of corn oils obtained by extraction with supercritical carbon dioxide. Journal of the American Oil Chemists' Society, 61, pp. 1849-1851, 1984.
<https://doi.org/10.1007/BF02540815>
<https://doi.org/10.1007/BF02540814>

Marsal, A., Celma, P.J., Cot, J., Cequier, M. Supercritical CO₂ extraction as a clean degreasing process in the leather industry. Journal of Supercritical Fluids, 16, pp. 217-223, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(99\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(99)00031-5)

Maul, A. A., Wasicky, R., Bacchi, E. M. Extração por fluido supercrítico. Revista Brasileira de Farmacognosia, São Paulo, Divulgação técnica, pp. 185-200, 1986.

Meireles, M.A.A. Extracting bioactive compounds for food products. New York, CRC Press, 2009.

Mezzomo, N., Martínez, J., Ferreira, S.R.S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus Persia*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 51, pp. 10-16, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.07.008>

Modey, W.K.; Mulholland, D.A.; Raynor, M.W. Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products. *Phytochemical analysis*, 7, pp. 1-15, 1996.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199601\)7:1<1::AID-PCA275>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199601)7:1<1::AID-PCA275>3.0.CO;2-U)

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. 1ed, CRC Press, USA, 2000.

Nimet, G. Avaliação dos solventes dióxido de carbono supercrítico e propano subcrítico na extração do óleo de girassol. Toledo - PR, UNIOESTE, 2009. 120 p.

Nimet, G., Silva, E.A., Palú, F., Dariva, C., Freitas, L.S., Neto, A.M., Cardozo-Filho, L. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus* L.) oil with supercritical CO₂ and subcritical propane: Experimental and modeling. *Chemical Engineering Journal*, 168, pp. 262-268, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.088>

NIST. No Title. In: nist Thermophys. Prop. Pure Fluids.
<<http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>>. Acesso em: 20/07/2016.

Papamichail, I., Louli, V., Magoulas, K. J. Supercritical fluid extraction of celery seed oil, *Journal of Supercritical Fluids*, 18, pp. 213-226, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(00\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(00)00066-8)

Park, H.S., Lee, H.J., Shin, M.H., Lee, K., Lee, H., Kim, Y., Kim, K.O., Kim, K.H. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 105, pp. 1011-1017, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.064>

Pederssetti, M.M., Palú, F., Silva, E.A., Rohling, J.H., Cardozo-Filho, L., Dariva, C. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 102, pp. 189-196, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.018>

Pereira, C.G., Meireles, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technology*, 3, pp. 340-372, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>

Pessoa, A.S., PODESTÁ.R., BLOCK, J.M., FRANCESCHI, E., DARIVA, C., LANZA, M. Extraction of Pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. *The Journal of Supercritical Fluids*, 101, pp. 95-103, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.03.006>

Rade, L.L., Arvelos, S., Barrozo, M.A.S., Romanielo, L.L., Watanabe, E.W., Hori, C.E. Evaluation of the use of degummed soybean oil and supercritical ethanol for non-catalytic biodiesel production. *The Journal of Supercritical Fluids*, 105, pp. 21-28, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.017>

Rebolleda, S., Rubio, N., Beltrán, S., Sanz, M. T., González-Sanjosé, M. L. Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, pp. 270-277, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.10.001>

Reverchon, E., Marco, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, pp. 146-166, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>

Reverchon, E., Marrone, C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 19, pp. 161-175, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(00\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(00)00093-0)

Rónyai, E., Simándi, B., Tömösközi, S., Deák, A., Vigh, L., Weinbrenner, Zs. Supercritical fluid extraction of corn germ with carbon dioxide – ethyl alcohol mixture. *Journal of Supercritical Fluids*, 14, pp. 75-81, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(98\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(98)00096-5)

Rostagno, M.A., Araújo, J.M.A., Sandi, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. *FoodChemistry*, 78, pp. 111-117, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00106-1)

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH•. *Comunicado Técnico online*, 127, pp. 1-4, 2007.

Sahena, F., Zaidul, I. S. M, Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. *Journal of Engineering*, 95, pp. 240-253, 2009.

Sairam, P., Ghosh, S., Jena, S., RAO, Dr. K.N.V., BANJI, Dr. D. Supercritical Fluid Extraction (SFE) – An Overview. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2, pp. 112-120, 2012.

Salea, R., Veriansyah, B., Tjandrawinata, R.R. Optimization and scale-up process for supercritical fluids extraction of ginger oil from *Zingiber officinale* var. *Am arum*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, pp. 285-294, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.035>

Salgin, U., Döker, O., Çalimli, A. Extraction of sunflower oil with supercritical CO₂:

experiments and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, pp. 326-331, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.11.015>

Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J.A.R., Pando, C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus Persia*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. *Tem Journal of Supercritical Fluids*, 49, pp. 167-173, 2009.

Santos, D.N. Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Pirassununga – SP, USP, 2012. 100 p.

Santos, E.R.M. Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de *Rumex acetosa*. Natal, UFRN, 2013. 86 p.

Silva, C., Mantovani, D., Garcia, V.A.S., Cardozo-Filho, L. Extraction of *Mucuna atterima* seed oil using compressed propane and quantification of L-Dope in the defatted meal. *Latim América Applied Research*, 45, pp. 101-106, 2015.

Sovová, H., Komers, R., Kucera, J., Jez, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. *Chemical Engineering Science*, 49, pp. 2499-2505, 1994.
[https://doi.org/10.1016/0009-2509\(94\)E0058-X](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)E0058-X)

TAYLOR, L.T., *Supercritical Fluid Extraction*. 1ed, USA, Wiley, 1996.

Temelli, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 47, pp. 583-590, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.014>

Uquiche, E., Cirano, N., Millao, S. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂. *Industrial Crops and Products*, 77, pp. 307-314, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.001>

Zhao, S., Zhang, D. Supercritical CO₂ extraction of Eucalyptus leaves oil and comparison with Soxhlet extraction and hydro-distillation methods. *Separation and Purification Technology*, 133, pp. 443-451, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.07.018>

Watson, S.A., Ramstad, P.E. *Corn: Chemistry and technology*. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, pp. 31-51, 1994.

Weast, R.C., Astle, M.J., Beyer, W.H. *Handbook of Chemistry and Physics*. Houston, Texas, USA, 1984.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *Food Chemistry*, 78, pp. 457-461, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00156-5)