

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LIPÍDICO, PROTÉICO E ANTIOXIDANTE DE  
RESÍDUOS DE INDUSTRIAS DE PROCESSAMENTO DE FRUTAS E  
EMPREGO DE CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO NO ESTUDO DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS.**

**Leandro Bezerra de Lima**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2008**

*"Mesmo que se cure os cegos ou se levante os mortos, mesmo que se fale a língua dos anjos ou dos deuses, se não houver amor de nada vale a ação."*

**Jesus - Sermão da montanha**

## AGRADECIMENTOS

Como tudo em minha vida agradeço primeiramente à Deus, o responsável por todas as obras em minha vida, mesmo quando tudo parecia impossível e sem saída eu sabia que não estava só.

À professora Maria Goretti de Vasconcelos Silva, por sua orientação, conhecimento e admirável empenho em pesquisa e acima de tudo a paciência e confiança que me foi depositada.

Ao Professor Francisco José de Abreu Matos, por seus valiosos conhecimentos, e pela sua admirável dedicação as plantas medicinais.

Aos meus pais, Raimundo Bezerra de Lima e Francisca J. P. Bezerra, e meus irmãos, Douglas e Danilo que proporcionaram uma harmonia domiciliar e afetiva indispensável.

À Fernanda, minha namorada, por seu apoio indispensável, sempre ao meu lado me incentivando a enfrentar dificuldades e me fortalecer perante a elas.

Ao Fernando, Regina, Samuel e Marli que me apoiaram desde a inscrição no vestibular.

Ao Rogério por ter sido também meu orientador e amigo.

Ao Edângelo que muito me ajudou a transpor vários obstáculos.

À todos os professores do curso de Pós-graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará.

À Célia, à professora Conceição e ao professor Marcos, coordenadores do programa de pós-graduação em química orgânica na Universidade Federal do Ceará, por acreditarem em meu trabalho.

À todos os meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais: Roberto, Léo, Fábio, Paulo Roberto, Francilene, Sales, Miguel, Jaqueline, Amélia, Francy, Alexandre, que proporcionaram um ambiente de tranquilidade na minha segunda casa.

Ao PADETEC e CENAUREM, pelo uso dos equipamentos imprescindíveis aos nossos estudos.

À CAPES, CNPq e FUNCAP, pelo suporte financeiro e bolsas concedidas.

Principalmente, aqueles que com suas publicações, deram suporte a elaboração a uma pesquisa.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	I
Lista de Abreviaturas.....	II
Lista de Figuras.....	III
Lista de Fluxogramas.....	V

### ***CAPÍTULO 1***

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
----------------------------	----------

### ***CAPÍTULO 2***

<b>2 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES E TÉCNICAS EMPREGADAS.....</b>	<b>4</b>
2.1 - Considerações gerais sobre as espécies estudadas.....	4
2.2 – Considerações sobre as técnicas empregadas.....	13
2.2.1- Proteínas.....	13
2.2.2- Métodos de quantificação de proteínas.....	14
2.3 – Ácidos graxos.....	20
2.4 – Antioxidantes.....	21
2.4.1 – Métodos empregados na determinação da atividade antioxidante.....	22
2.5 – Extração de metabólitos secundários por fluidos supercríticos.....	26

### ***CAPÍTULO 3***

<b>3.0 –RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
3.1- Avaliação protéica.....	32
3.2- Avaliação lipídica.....	33
3.2.1- Avaliação lipídica dos extratos hexânicos.....	33
3.3- Extração de lipídios em CO <sub>2</sub> supercrítico.....	47
3.4- Avaliação antioxidante.....	48
3.4.1- Avaliação do potencial antioxidante pelo método do DPPH.....	49
3.4.2- Avaliação do potencial antioxidante pelo método do DHBA.....	51
3.5- Extrações sucessivas e seletivas de metabólitos secundários das sementes de	53

maracujá.....	56
3.5.1- Caracterização preliminar de PSCV.....	56
<b><i>CAPÍTULO 4</i></b>	
4.1- Material botânico.....	59
4.1.2- Obtenção e tratamento das amostras.....	59
4.2- Métodos.....	60
4.2.1- Determinação do teor protéico.....	60
4.2.2- Determinação da composição lipídica.....	61
4.2.3- Avaliação do potencial antioxidante.....	63
4.3- Extração de metabólitos secundários das sementes de maracujá em CO <sub>2</sub> supercrítico com co-solvente.....	64
4.3.1- Seleção das condições de extração de metabólitos secundários.....	64
4.4- Prospecção e identificação das classes de substâncias pertencentes a cada conjunto de condições de extração.....	65
<b><i>CAPÍTULO 5</i></b>	
<b>5.0 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b><i>CAPÍTULO 6</i></b>	
<b>6.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atividades biológicas reportadas na literatura para sementes das espécies estudadas.....	<b>11</b>
<b>Tabela 2</b>	Composição química reportada na literatura científica das sementes das espécies estudadas.....	<b>12</b>
<b>Tabela 3</b>	. Plantas industriais de extração com fluido supercrítico.....	<b>29</b>
<b>Tabela 4</b>	Referências de aplicações de extração em fluido supercrítico de metabólitos secundários.....	<b>29</b>
<b>Tabela 5</b>	Composição protéica de cada resíduo.....	<b>32</b>
<b>Tabela 6</b>	Rendimento de extrativos em extração hexânica.....	<b>33</b>
<b>Tabela 7</b>	Composição química majoritária de ácidos graxos saturados analisados por CG/EM.....	<b>34</b>
<b>Tabela 8</b>	Composição química majoritária de ácidos graxos insaturados analisados por CG/EM.....	<b>35</b>
<b>Tabela 9</b>	Composição química dos óleos analisados em CG/DIC.....	<b>36</b>
<b>Tabela 10</b>	Rendimento de extrativos em fluido supercrítico.....	<b>47</b>
<b>Tabela 11</b>	Composição química majoritária de ácidos graxos saturados extraídos em CO <sub>2</sub> supercrítico, analisados por CG/EM.....	<b>48</b>
<b>Tabela 12</b>	Composição química majoritária de ácidos graxos insaturados extraídos em CO <sub>2</sub> supercrítico, analisados por CG/EM.....	<b>48</b>
<b>Tabela 13</b>	Índice de varredura dos extrativos.....	<b>50</b>
<b>Tabela 14</b>	Condições de extração de metabólitos secundários das semente de maracujá em CO <sub>2</sub> supercrítico.....	<b>53</b>
<b>Tabela 15</b>	Teor de extrativos nas diferentes condições de extração em CO <sub>2</sub> das sementes de maracujá.....	<b>53</b>
<b>Tabela 16</b>	Classes de substâncias pertencentes à cada uma das condições de extração em CO <sub>2</sub> supercrítico das sementes de maracujá.....	<b>54</b>
<b>Tabela 17</b>	Classes de substâncias pertencentes aos extratos obtido nas três condições selecionadas para extração de 2,100 kg de semente.....	<b>55</b>
<b>Tabela 18</b>	Amostras das espécies estudadas.....	<b>59</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

·OH	Radical hidroxila
BCA	4,4-dicarboxi-2,2'-biquinolina
BG-250	Corante coomassie brilliant blue
BHT	Butil hidroxi tolueno
BSA	Albumina sérica bovina
CG/DIC	Cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DHBA	Ácido dihidroxibenzóico
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EFSC	Extração em fluido supercrítico
FAO	Food and agriculture organization
MDA	Malonaldeído
PSCV	Precipitado do supercrítico violeta
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Tris-HCl	Tris-(hidroximetil)-amino-metano-Hidrocloreto

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Reação de formação do biureto.....	16
<b>Figura 02</b> – Reação de decomposição do nitrogênio orgânico.....	17
<b>Figura 03</b> – Estrutura do corante BG- 250.....	18
<b>Figura 04</b> – Complexo formado entre o ácido bicinchonínico e o cobre monovalente....	20
<b>Figura 05</b> – Reação do teste do TBA entre o ácido 2-tiobarbitúricoe o malonaldeído....	20
<b>Figura 06</b> – Esquema proposto para a reação entre o DPPH e o BHT.....	20
<b>Figura 07</b> – Esquema de reações envolvidas no teste do DHBA.....	20
<b>Figura 08</b> – Diagrama de fases.....	21
<b>Figura 09</b> – Extrator supercrítico em forma de cavalete.....	21
<b>Figura 10</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de murici.....	21
<b>Figura 11</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de acerola.....	24
<b>Figura 12</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de graviola.....	24
<b>Figura 13</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de oiti.....	24
<b>Figura 14</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de sapoti.....	24
<b>Figura 15</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de manga madura.....	25
<b>Figura 16</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de manga verde.....	25
<b>Figura 17</b> – Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de goiaba.....	25
<b>Figura 18</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de mamão.....	26
<b>Figura 19</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de ciriguela.....	26
<b>Figura 20</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das cascas das sementes de ameixa.....	26
<b>Figura 21</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das amêndoas das sementes de ameixa..	26
<b>Figura 22</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de maracujá .....	27
<b>Figura 23</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de tamarindo.....	27
<b>Figura 24</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes morango .....	27
<b>Figura 25</b> - Cromatograma de CG/EM do óleo das cascas de abacaxi.....	27
<b>Figura 26</b> – Espectro de massas do éster metílico do ácido palmítico.....	28
<b>Figura 27</b> - Espectro de massas do éster metílico do ácido esteárico.....	28
<b>Figura 28</b> - Espectro de massas do éster metílico do ácido oleico.....	28
<b>Figura 29</b> - Espectro de massas do éster metílico do ácido mirístico.....	28
<b>Figura 30</b> - Espectro de massas do éster metílico do ácido araquídico.....	29

<b>Figura 31</b> - Espectro de massas do éster metílico do ácido linoleico.....	29
<b>Figura 32</b> - Espectro de massas do éster metílico do ácido palmitoleico.....	29
<b>Figura 33</b> – Espectro de absorção de infravermelho de PSCV.....	29
<b>Figura 34</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300MHz, DMSO) de PSCV.....	30

**LISTA DE FLUXOGRAMAS**

<b>Fluxograma 1</b>	Procedimentos aos quais submeteram-se as amostras <i>4.2.1.Determinação do teor protéico.....</i>	<b>60</b>
---------------------	---	-----------

## 1-INTRODUÇÃO

A pobreza e miséria são problemas que afetam grande parte de nosso país. Elas trazem consigo uma série de doenças que são causadas pela falta de nutrientes necessários para o bom funcionamento do corpo humano. Segundo dados da FAO (Food and Agricultural Organization), órgão da ONU responsável por assuntos de agricultura e alimentação, pois o mundo parou no combate a fome 854 milhões de pessoas não têm acesso à comida suficiente, o que caracteriza a estagnação da redução da fome no mundo.

Dentre os nutrientes indispensáveis para o ser humano estão as proteínas e os lipídios. As proteínas desempenham papel no controle do metabolismo, catálise de reações ou mesmo a sustentação estrutural de tecidos e os ácidos graxos, especialmente os insaturados, que não são sintetizados pelo homem, têm importantes funções antioxidantes, cardioprotetora, antiinflamatória, entre outras.

O fornecimento de uma fonte de proteína alimentar de boa qualidade, com baixo custo e oferta regular, que possa suprir as necessidades da população mundial, é um problema que se acentua a cada momento, principalmente nas regiões mais carentes.

O homem é capaz de sintetizar ácidos graxos saturados e monoinsaturados, porém, os poliinsaturados devem ser obtidos através da dieta de vegetais, denominados ácidos graxos essenciais, destacando-se os da série omega, tais como o ácido linolênico (da família  $\omega 3$ ) e o ácido linoleico (da família  $\omega 6$ ). Estes ácidos graxos, principalmente os da série omega, desempenham importantes funções por serem potencialmente antioxidantes.

O Nordeste brasileiro é considerado como região onde as condições climáticas adversas prejudicam o desenvolvimento das atividades na agropecuária, gerando carências, principalmente as nutricionais, que acometem

parte de sua população. A situação se estende também aos rebanhos criados, cuja baixa produtividade deve-se ao manejo alimentar, sanitário e reprodutivo deficiente.

Na Região Nordeste vem se desenvolvendo um importante setor da agropecuária, a fruticultura. Nos últimos anos, vem-se observando, de uma maneira geral, um processo de profissionalização, caracterizado pela exploração de áreas mais extensas, pela utilização da irrigação e pelo incremento de novas tecnologias, visando a elevadas e qualitativas produções de frutos. Em resposta a esse avanço, o número de agroindústrias instaladas por toda a região tem aumentado significativamente, gerando um incremento na produção de resíduos agroindustriais não utilizáveis na alimentação humana, que podem ser aproveitados na dieta animal, tornado-se importante fator de barateamento nos custos de produção. Atualmente, a produção de frutas destina-se atender à demanda por frutas frescas, no entanto, existe uma tendência mundial para o mercado de produtos transformados, como conservas, sucos, geléias e doces. Entretanto, nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, as perdas pós-colheita de frutas frescas são estimadas na ordem de 20 a 50%. Em geral, calcula-se também que, do total de frutas processadas, sejam gerados, na produção de sucos e polpas, 40% de resíduos agroindustriais para as frutas manga, acerola, maracujá e caju. Atualmente, as agroindústrias investem no aumento da capacidade de processamento, gerando grandes quantidades de subprodutos, que em muitos casos são considerados custo operacional para as empresas ou fonte de contaminação ambiental.

A acerola, goiaba, manga, mamão, maracujá, caju (pseudofruto) e banana respondem por 69,6%; 19,8%; 49,71%; 52,4%; 44%; 96,5% e 37,4% da produção nacional. [LOUSADA, 2006]

A Região Nordeste apresenta grande importância no cultivo da maioria das espécies frutíferas tropicais, figurando entre as principais o abacaxi, abacate, banana, caju, coco, mamão, manga, maracujá, uva, acerola e goiaba.

As sementes das frutas utilizadas no processamento de polpa, sucos e outros produtos, são descartadas e pode estar havendo um desperdício desta possível

fonte de nutrientes por parte de mais de uma centena de indústrias somente no estado do Ceará. As sementes de oleaginosas são fontes promissoras de ácidos graxos insaturados e proteínas, uma vez que estes nutrientes são de extrema importância ao organismo humano.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial lipídico, protéico e determinar capacidade antioxidante e realizar um estudo fitoquímico de resíduos de quatorze espécies gerados por indústrias de processamento e produção de conservas de frutas do estado do Ceará, haja visto não ter sido encontrado na literatura científica tais dados para as amostras estudadas.

Em uma segunda etapa do trabalho, o CO<sub>2</sub> no estado supercrítico foi utilizado na extração seletiva de metabólitos secundários das sementes de *Passiflora edulis*. Utilizou-se para este fim extração convencional com solventes no estado líquido e CO<sub>2</sub> no estado supercrítico.

Com os resultados deste trabalho espera-se possibilitar o aproveitamento racional dos resíduos gerados pelas indústrias de processamento

## 2- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES E TÉCNICAS EMPREGADAS

### 2.1-CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS

#### ABACAXI (*Ananas comosus* L.)

O abacaxizeiro, família das Bromeliáceas, é uma planta de pequeno porte, podendo atingir 80 cm de altura. Folhas longas e duras, dispostas espiraladamente, partindo da base, formando uma roseta. Possui flores pequenas, de coloração rósea a roxo-purpúrea, que surgem aglomeradas em uma haste, formando uma espiga que se desenvolverá originando a fruta do abacaxi [BRAGA, 1976]

O abacaxi é um conjunto dos pequenos frutos que formam sua estrutura de forma ovóide, ou seja, aquilo que se costuma considerar como uma fruta inteira, única, na verdade é um conjunto de uma ou duas centenas de pequenos frutos aglomerados em torno de um mesmo eixo central. Cada "olho" ou "escama" da casca do abacaxi é um fruto que cresceu a partir de uma flor, fundindo-se todos os frutos em um grande corpo, chamado infrutescência, no topo do qual se forma a coroa de folhas duras e de coloração verde intensa denominadas brácteas. A haste interna do abacaxi é envolta pela suculenta polpa que é comestível. Esta polpa é refrescante e cheia de caldo, sendo usada para produção de compotas, doces cristalizados, geléias, sucos, sorvetes, entre outros produtos.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, sendo que as principais plantações estão localizadas na região Nordeste do país, notadamente no Estado da Paraíba [AMARAL, 2001].

#### AMEIXA ( *Prunus domestica* L. )

A ameixeira pertence a família das Rosáceas a ao gênero *Prunus*, com diversas espécies, há portanto grande variedade de ameixa. As mais conhecidas são: a vermelha, a amarela e a roxa. Elas têm tamanhos diferentes, podendo ser

pequenas como uma cereja ou grandes como um ovo de galinha. A ameixa é uma fruta com caroço, de sabor doce, ligeiramente mais ácida na parte da polpa próxima ao caroço. Pode ser consumida fresca, seca ou na preparação de geléias e outros tipos de doce. A ameixa seca tem várias aplicações: em caldas, sorvetes, pudins, musses, bolos, tortas, refrescos e licores. Além disso, combina muito bem com pratos salgados [GRELLMANN, 1993].

O óleo extraído do núcleo das sementes de ameixa apresenta toxicidade seletiva para insetos como *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* e *Callosobruchus analis*. Estas frações mostraram atividades antifúngicas contra *Trichphyton longifusus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Fusarium solani* e *Candida glabrata* [AHMED, 2007].

A ameixa tem alto valor nutritivo, rica em açúcar, sais minerais (cálcio, fósforo e ferro) e algumas vitaminas. É um ótimo alimento, pois funciona como laxante natural. O caroço da ameixa mede aproximadamente 10cm de comprimento e apresenta um forma ovóide achatada, sendo composto por uma amêndoa coberta por uma casca dura [BRAGA, 1976].

#### CIRIGUELA (*Spondias purpurea* L.)

A ciriguela, pertencente à família Anacardiaceae, é uma drupa elipsoidal de 3 a 5 cm de comprimento, pesando de 15 a 20g, lisa e brilhante, com o epicarpo firme. Apresenta uma boa qualidade nutritiva bem como aroma e sabor agradável, sendo muito apreciada na forma de polpas, sucos, doces, néctares, picolés e sorvetes [BRAGA, 1976].

Sua forma de propagação, como a maioria das fruteiras tropicais, ocorre pelos métodos sexuais e assexuais. O endocarpo, comumente chamado de caroço, é utilizado como semente na propagação sexual, porem algumas seleções de ciriguela não produzem grãos de pólen férteis e nem sementes viáveis [SOUZA, 1998].

### GOIABA (*Psidium guajava* L.)

Pertencente à família das Mirtáceas, a goiabeira é originária das Américas Centrais e do Sul, cultivada em todos os países tropicais, sendo bem conhecidos seus dois tipos mais comuns, a goiabeira-vermelha e a goiabeira branca. O fruto é uma baga globosa. Internamente, apresenta um mesocarpo de textura firme e quatro a cinco lóculos, cheios por uma massa de consistência pastosa, onde estão numerosas sementes. Estas sementes são pequenas possuindo uma forma levemente arredondada [BRAGA, 1976].

A goiaba, além de consumida crua ou natural, tem aplicações comerciais como a goiabada, geléia, pasta, fruta em calda, purê, alimentos para crianças, base para bebidas, refrescos, sucos, xaropes, vinhos e outros. A fruta é excepcionalmente rica em vitamina C, superando o conteúdo nos sucos cítricos. Por isso, também são utilizadas como aditivos para outros sucos e purês, fortificando-os em vitamina C [MEDINA, 1978].

A presença de taninos, óleos essenciais, quercetina e rutina são citadas para sua composição química, mas seu princípio ativo ainda não está bem definido [MATOS, 2000].

As longas experiências populares, aliadas aos resultados da experiência científica permitem recomendar o chá dos brotos da goiabeira-vermelha no tratamento das diarreias como medicação antiinfeciosa e reidratante. O chá pode também ser usado em bochechos e gargarejos no tratamento de inflamações da boca e da garganta [MATOS, 2000].

O óleo de goiaba é uma boa fonte de ácido linoleico, como ácido graxo essencial, podendo ser utilizado com vantagens nutricionais, misturando-o com outros óleos comestíveis de alta saturação para resultar num novo óleo com valores nutricionais modificados [KOBORI, 2005].

### MAMÃO (*Carica papaya* L.)

O mamoeiro, família das Caricáceas, é uma fruteira bastante cultivada principalmente em países de clima quente como no Brasil. Os frutos são

consumidos maduros ao natural ou com açúcar, e verde em doces, industrializados ou para extração da papaína e da pectina. A papaína é uma enzima cuja função é catalisar a hidrólise de proteínas. Sua extração é feita com uma incisão na casca verde do fruto, que libera a papaína bruta, na forma de um líquido branco que se coagula rapidamente. As sementes dos frutos são numerosas, pequenas, possuindo forma arredondada. São usadas para extração de óleo comestível [MANICA, 1982].

O fruto do mamão tem teores elevados de provitamina A, além de apresentar ácido ascórbico (vitamina C) e cálcio. As folhas das plantas podem ser usadas como forragens e no preparo de expectorantes [SANTANA, 2004].

#### MORANGO (*Fragaria vesca* L)

Planta rasteira da família das rosáceas tem folhas ovaladas e flores de pétalas brancas. O caule, rastejante, gera folhas que dão origem a novas touceiras. Os frutos são pequenos, agrupados em uma haste carnosa, de coloração vermelha quando maduros. Os pequenos pontos pretos e duros são na verdade os frutos do morangueiro, conhecidos popularmente como sementes. Seu cultivo necessita de sol, pouca umidade e solo silicoso, rico em matéria orgânica. Multiplica-se através de forma vegetativa, pela divisão de estolhos que nascem ao redor da planta-mãe. No Brasil como em quase todo o mundo, existem inúmeras variedades diferentes de morangos sendo cultivadas e, em geral, utilizam-se as mais adaptadas localmente. O Estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor de morangos do país, sendo o extremo sul de Minas Gerais também um pólo considerável de cultivo da fruta [SANTOS, 1993].

#### MURICI (*Byrsonyma crassifolia*, H. B. K)

O murici, da família Malpighiaceae é uma drupa trilocular, carnosa, com aproximadamente 1 cm de diâmetro. É um fruto saboroso e constitui um importante recurso alimentar para populações pobres do litoral, onde é consumido misturado com farinha. Existe em abundância e possui um grande poder nutritivo.

O muricizeiro cresce bem em solos pobres e forma bosques nos tabuleiros arenosos do litoral cearense [BRAGA, 1976].

#### TAMARINDO (*Tamarindus indica*, L)

O tamarindo, pertence à família Fabaceae, é uma vagem chata, de extremidades arredondadas, contraída ao nível das sementes, com epicarpo crustáceo, frágil, castanho e mesocarpo polposo e espesso em torno das sementes [BRAGA, 1976].

As sementes são achatadas, de cor castanhas brilhante, de forma arredondada. Sua polpa é bastante ácida, por isso normalmente a tamarindo é consumida como refresco, sorvete ou doce. São referidos dois tipos de tamarindo, os de frutos longos, contendo até 12 sementes (*T indica* L.) e os de frutos curtos (*T. occidentalis* G.). A polpa do fruto maduro contém cerca de 10% de ácido tartárico livre, 8% de tartarato ácido de potássio e 25-40% de frutose ou açúcar invertido. O refresco feito na proporção de 1-10% tem a propriedade de mitigar a sede e uma ação laxativa leve [MATOS, 2000]

O extrato metanólico das sementes aquecidas cruas e secas conteve nível mais alto de fenóis e taninos, bem como apresentam atividade antioxidante [SIDDHURAJU, 2007].

#### GRAVIOLA (*Annona muricata* L.)

Espécie da família das Anonáceas é uma árvore de porte magestoso, cuja ramificação se inicia perto do solo, e alcança até 30m de altura e mais de 4m de circunferência. Vagem indeiscente, chata, mesocarpo polposo e espesso em torno das sementes, amarelo escuro e de sabor ácido adocicado. Sementes achatadas, castanho-lustrosas, oval-orbiculares, lisas no centro, pontuadas na circunferência [BRAGA, 1976].

O óleo das sementes apresenta atividade antiinflamatória significativa em ratos albinos. Este é o primeiro relatório de estudo químico como também de atividade antiinflamatória de óleos de semente das anonáceas. Os estudos de toxicidade aguda revelaram que o óleo das sementes não é tóxico [JOY, 2006].

SAPOTI (*Achras sapota* L.)

Árvore da família Sapotácea de até 15m de altura, de seiva leitosa, com numerosos ramos fortes, dispostos quase verticalmente, formando frondosa copa, mais ou menos oval. Folhas alternadas, pecioladas, coriáceas, inteiras, elítico-oblongadas ou elíticas. As sementes são de coloração escura, bem duras, possuem poder germinativo bem longo, achatadas ou ovóides [BRAGA, 1976].

O extrato aquoso da semente é intensamente tóxico a ratos via intraperitoneal com sintomas de dispnea, apnea, e convulsões, mas atóxico pela rota oral. Aparentemente, a toxicidade da semente é principalmente devido ao alto teor de saponinas [SINGH, 1984]

MARACUJÁ (*Passiflora edulis* S.)

Trepadeira das passifloráceas sublenhosa e de grande vigor vegetativo. Folhas pecioladas, estipuladas, serreadas e glabras. Flores axilares e solitárias, brancas com franja roxa, medindo 5cm de diâmetro. Sementes numerosas, pretas, cobertas por uns arilos amarelos, translúcidos, polposos, suculento, ligeiramente ácido e perfumado [BRAGA, 1976].

MANGA (*Mangifera indica* L.)

A mangueira, pertencente à família das Anacardiáceas, é uma árvore de porte elevado, às vezes com mais de 20m de altura e até 2,50m de diâmetro, esgalhada, formando densa e frondosa copa, cuja sombra não cresce planta alguma. Folhas alternadas, pecioladas, inteiras, de comprimento agudo. Semente chata, de testa delgada, com cotilédones plano-convexos, comumente lobados [BRAGA, 1976].

OITI (*Moquilea tomentosa* Benth.)

A árvore, da família Chrysobalanaceae, atinge até 10m de altura, com bela e frondosa copa. Folhas simples, alternadas, elíticas, lanceoladas, tomentosas em

ambas as faces. Frutos comestíveis e amêndoas bastante ricas em óleo [BRAGA, 1976].

#### ACEROLA (*Malpighia glabra* L.)

Da família Malpighiaceae, é um pequeno arbusto de até 3m de altura, bem copado, originário da América Central. É muito cultivado no em vários países tropicais. A aceroleira é uma planta rústica que se desenvolve bem em clima tropical e subtropical, sendo resistente a temperatura próxima a 0°C [MATOS, 2000].

Estudos revelam que administração em forma de dosagem oral de ácido ascorbico seguida de dosagem tópica de antioxidantes obtidos da acerola inibe 66% a 70% a cadeia de reação de radicais livres. Estes resultados representam o sinergismo entre o ácido ascórbico e flavonoides contidos no extrato de acerola, que surpreendentemente apresenta maior potencial na atividade antioxidante do que qualquer forma de dosagem única dos mesmos antioxidantes [EVANS, 2005].

**Tabela 1** – Atividades biológicas reportadas na literatura para sementes das espécies estudadas.

<b>Espécie (nome comum)</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Annona muricata</i> (graviola)</b>	Anti-séptico, curativo de dermatoses e antimalárico	Wélé,2004
	Anti-parksonismo	Kotake ,2004
	Anti-tumoral, parasiticida e pesticida.	Yu, 1998
<b><i>Carica papaya</i> (mamão)</b>	Contraceptivo masculino	Nirmal, 2005
	Vermífugo e tocolítico	Adebiyi, 2003
	Anti-helmíntico, antibacteriano e antimicrobiano	Kermanshai,2001
	Anti-helmintico	Lans, 2000
	Contraceptivo masculino	Nirmal, 1999
<b><i>Passiflora edulis</i> (maracujá)</b>	Anti-améxico	Tona, 1998
	Prevenção de câncer de cólon e problemas cardiovasculares	Chau, 2004
<b><i>Mangifera indica</i> (manga)</b>	Fungicida	Agizzio, 2003
	Potencial anti-oxidante	Yean, 2005
<b><i>Tamarindus indica</i> (tamarindo)</b>	Atividade antidiarréica	Saíram, 2003
	Atividade antimicrobiana	Kabuki, 2000
	Atividade anti-amébrica	Tona, 1998
	Atividade anti-oxidante	Sudjaroen, 2005
	Biossorvente	Agarwal, 2005
	Anticancerígeno, prevenção de efisema pulmonar	Kaewkrom, 2005
	Antidiabético	Maiti, 2004

**Tabela 2**– Composição química reportada na literatura científica das sementes das espécies estudadas.

<b>Espécie</b>	<b>Constituinte</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Passiflora edulis</i></b> <b>(maracujá)</b>	$\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, ácido linoleico e ácido oleico	GIUFFRÉ, 2007
	Ácido linoleico	PIOMBO, 2006
	Ácidos linoleico, oleico, palmítico e esteárico	NYANZI, 2005
<b><i>Spondias purpurea</i></b> <b>(ciriguela)</b>	Ácido aspártico	PEREZ 1995
<b><i>Psidium guajava</i></b> <b>(goiaba)</b>	Ácido linoleico	KOBORI, 2005
	Quercetina, kaempferol, apigenina, luteolina	ABDEL, 2004
	Ácido linoleico	PIOMBO, 2006
<b><i>Malpighia glabra</i></b> <b>(acerola)</b>	Flavonóides	EVANS, 2005
<b><i>Annona muricata</i></b> <b>(graviola)</b>	Anonamuricatina (hexapeptídeo), acetogeninas	WU, 2007
	Ácido linoleico	JOY, 2007
<b><i>Carica papaya</i></b> <b>(mamão)</b>	isotiocianato	NAKAMURA, 2007
<b><i>Mangifera indica</i></b> <b>(manga)</b>	Ácido gálico e ácido elágico	SOONG, 2006

<b><i>Byrsonima crassifolia</i></b> (murici)	Ácidos linoleico, oleico, esteárico, palmítico, butírico e hexanoico	REZENDE, 2003
<b><i>Achras sapota</i></b> (sapoti)	Ácidos palmítico, esteárico, oléico e linoleico	KHATRI, 1995
<b><i>Tamarindus indica</i></b> (tamarindo)	Ácidos palmítico, oléico, linoleico e linolênico.	KANCHANAMAYOON, 2007

## 2.2-CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS EMPREGADAS

### 2.2.1- PROTEÍNAS

As proteínas são biomoléculas de alto peso molecular existentes em todos os organismos vivos. Representam cerca de 50 a 80% do peso seco da célula sendo, portanto, o composto orgânico mais abundante na matéria viva. Independentemente de sua forma ou função, todas as moléculas de proteínas contêm unidades de aminoácidos interligadas em uma longa cadeia. Existem muitos tipos diferentes de proteínas que desempenham uma grande variedade de funções biológicas. A queratina da pele e das unhas, a fibroína da seda e das teias de aranha e a DNA-polimerase que catalisa a síntese do DNA nas células são proteínas [LEHNINGER, 2005].

### CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas são classificadas, de acordo com sua composição, em dois grandes grupos. As proteínas simples, como a albumina, presente no soro sanguíneo, que, quando hidrolisadas, dão apenas aminoácidos. As proteínas conjugadas, muito mais comuns do que as proteínas simples, que, quando hidrolisadas, dão aminoácidos e outros compostos como carboidratos, gorduras ou ácidos nucleicos [BERG, 2004].

Classificam-se as proteínas também como fibrosas ou globulares, de acordo com sua forma tridimensional. As proteínas fibrosas, como por exemplo o colágeno e a queratina, são formadas por cadeias de polipeptídeos arrumadas lado a lado em longos filamentos. Estas proteínas são rígidas e insolúveis em água, e são usadas na natureza como constituintes de estruturas como tendões, cascos, chifres e músculos. As proteínas globulares são em geral enroladas e formam um conjunto compacto, quase esférico. Estas proteínas são usualmente solúveis em água e podem deslocar dentro das células. A maior parte das aproximadamente duas mil enzimas conhecidas é globular [LEHNINGER, 2005].

Do ponto de vista celular as proteínas exercem uma grande variedade de funções e podem ser divididas em dois grupos: Dinâmicas: Transporte, defesa, catálise de reações, controle do metabolismo e contração, e Estruturais: Proteínas como o colágeno e elastina, por exemplo, que promovem a sustentação estrutural da célula e dos tecidos. O valor nutritivo de uma proteína depende do seu conteúdo e das proporções dos aminoácidos essenciais [LEHNINGER, 2005].

### *2.2.2- MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.*

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios, uma vez que haja diferentes interferentes para cada método. Os métodos geralmente mais utilizados são o do biureto, de Kjeldahl, de Lowry, do "Coomassie brilliant blue" BG-250 ou reagente de Bradford, do BCA ou reagente de Smith, e de absorção de proteínas no ultravioleta [ZAIA, 1998].

#### *a) Método de Lowry*

O método que atualmente conhecemos como de Lowry, para a determinação de proteínas totais, baseia-se numa mistura contendo molibdato,

tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm [LOWRY, 1951].

O constituinte ativo deste reagente é uma mistura de ácidos fosfomolibdato-fosfotungstico:



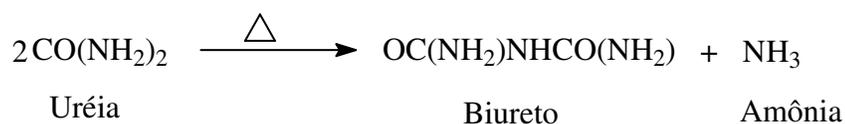
A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: líquido cérebro espinhal (líquor), plasma sangüíneo, saliva humana, tecido animal, plantas, suco biliar, membranas, leite humano e produtos alimentícios.

Apesar de este método apresentar uma grande sensibilidade para proteínas, o mesmo possui algumas desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas, e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas, além de sofrer interferência de lipídio, que turva a amostra, impossibilitando o estudo em sementes oleaginosas [ZAIA, 1998].

#### b) *Método do Biureto*

O método se baseia na reação do reativo do biureto [GORNALL, 1949], que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta duas bandas de

absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto, a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método.



**Figura 1-** Reação de formação do Biureto

O método de biureto tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: soro ou plasma sangüíneo, líquido cérebro espinhal (líqüor), urina, alimentos, saliva, fibrinogênio e tecido animal. O método de biureto tem sido, também, utilizado em análise por injeção em fluxo, assim como em alguns métodos cinéticos. Apesar de ser rápido, utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absortividade específica para diferentes proteínas, este método não é muito sensível, além de sofrer pela presença de interferentes, tais como lipídios, peptídeos livres, lactose e amido, colocando-o em grande desvantagem, em relação a outras metodologias, e por isto tem sido, ao longo dos anos, substituído por métodos mais sensíveis [ZAIA, 1998].

### *c) Método de Kjeldahl*

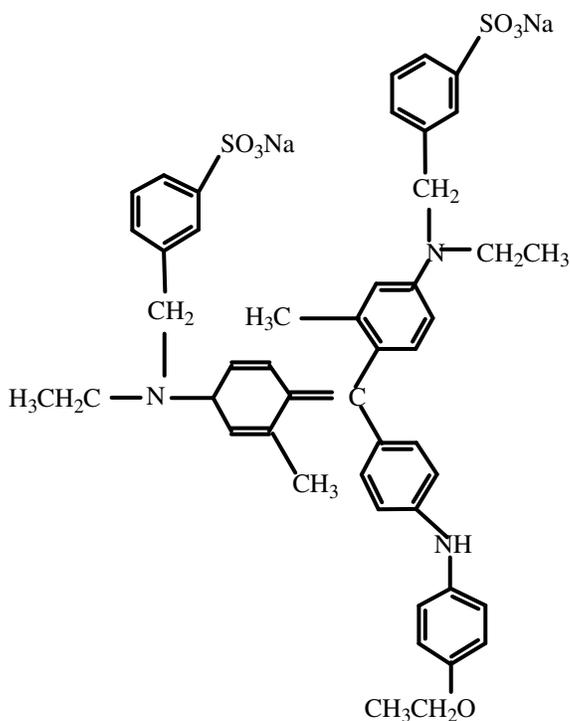
O método de Kjeldahl [AOAC, 1995], é um método clássico de análises no qual se determina a concentração de nitrogênio total após decomposição da amostra com ácido sulfúrico. É empregado como método de referência, mas apresenta como limitação o tempo longo exigido por análise e possíveis erros nos resultados ocasionados pela presença de nitrogênio não protéico na amostra.



**Figura 2-** Reação de decomposição do nitrogênio orgânico

*d) Método de Bradford.*

Este método [BRADFORD, 1976] é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.



**Figura 3-** Estrutura do corante BG-250

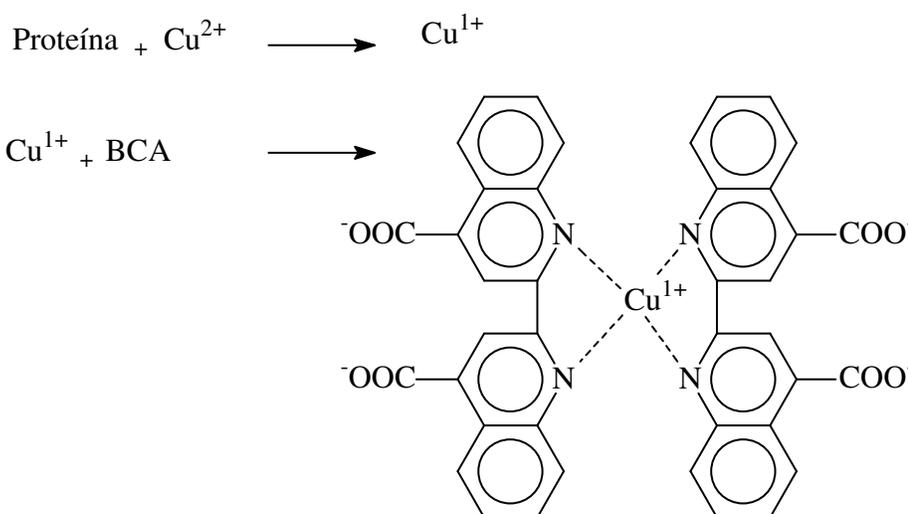
O método de Bradford é mais rápido e sensível que o de Lowry e tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios: plasma ou soro sanguíneo, líquido, saliva humana, produtos alimentícios, leite humano,

tecido de plantas, suspensões de células, avidina e estreptavidina, urina e detergentes.

Apesar do método de Bradford ser mais rápido, sensível e estar sujeito a um número bem menor de interferentes que o método de Lowry, o mesmo apresenta algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixo peso molecular das mesmas, e fornecimento de resultados nem sempre reproduzíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência, sendo recomendável a padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido [ZAIA, 1998].

### e) Método de Smith

Também conhecido por método do ácido bichoninico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina), se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm.



**Figura 4-** Complexo formado entre cobre monovalente e o ácido bicinchonínico.

Este método tem a vantagem de ser mais simples no preparo dos reagentes, tão sensível quanto o método de Lowry e relativamente rápido, sendo aplicado na determinação da concentração de proteínas totais em saliva, proteínas celulares, interferons, leite humano e determinação de grupos funcionais [ZAIA, 1998].

#### *f) Método de absorção no ultravioleta*

Diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina) apresentam absorção na região de 280 nm e na região abaixo de 220 nm, baseando-se em tais propriedades é possível a quantificação de proteínas por espectrofotometria nesta região espectroscópica. O método tem sido muito utilizado durante os procedimentos de purificação e separação de proteínas para a quantificação das mesmas. Suas principais vantagens são as de não destruir a amostra e de ser rápido, entretanto diversas substâncias absorvem no ultravioleta tornando os resultados pouco confiáveis [ZAIA, 1998]

### **2.3. ÁCIDOS GRAXOS**

Os ácidos graxos são constituintes da maior parte dos lipídeos, os ácidos graxos são definidos quimicamente por compostos que tem uma longa cadeia alifática, podendo esta ser saturada ou insaturada, e uma carboxila terminal. Os lipídeos, por sua vez, podem ser classificados em duas classes: os que têm ligações éster e podem ser hidrolisados, como por exemplo, as gorduras e as ceras, e os que não podem ser hidrolisados, como, por exemplo, esteróides que são derivados do colesterol e as prostaglandinas [BERG, 2004]

Os ácidos graxos obtidos na hidrólise de triacil-gliceróis não possuem, em geral, ramificações nas cadeias e têm número par de carbonos, entre 12 e 20. As ligações duplas, quando presentes, costumam ter geometria Z (cis). Os três ácidos graxos dos triacil-gliceróis não são necessariamente idênticos, e a gordura ou o óleo obtidos de uma dada fonte natural são provavelmente uma mistura complexa de muitos triacil-gliceróis diferentes.

### *2.3.1- SAPONIFICAÇÃO*

Os ácidos graxos não estão presentes na natureza em sua forma livre, mas são encontrados na forma de éteres. Estes ésteres são os triglicerídeos, portanto faz-se necessário a hidrólise destes ésteres para que os ácidos possam ser quimicamente estudados.

A hidrólise dos ésteres de ácidos graxos é promovida sob condições alcalina produzindo o glicerol e uma mistura de sais de ácidos graxos:

### *2.3.2. ESTERIFICAÇÃO*

Sob catálise ácida e em presença de álcool os ácidos carboxílicos sofrem uma reação de esterificação.

Uma vez esterificado o ácido graxo, torna-se possível sua percolação por uma coluna cromatográfica em cromatografia gasosa, haja visto que os óleos tornam-se mais voláteis e menos polares.

## *2.4. Antioxidantes*

Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” [SIES, 1995].

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos [SIES, 1993].

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres.

Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.

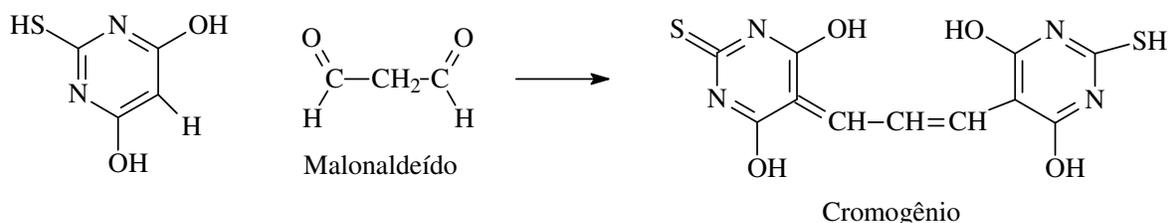
Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes. O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico [BARNETT, 1995].

#### 2.4.1. MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### a) Método do TBA (Ácido Tio-Barbitúrico)

É o método [LIN, 1996] mais antigo e freqüentemente usado para detectar e quantificar peroxidação lipídica em amostras biológicas. O teste é popular, porque é simples e inespecífico. Consiste na determinação de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA (malonaldeído) com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA). Essa reação, chamada de “teste TBA”, que é utilizada por múltiplos métodos, forma o complexo 1:2 MDA:TBA,  $C_{11}H_8N_4S_2O_4 \times H_2O$  (PM =

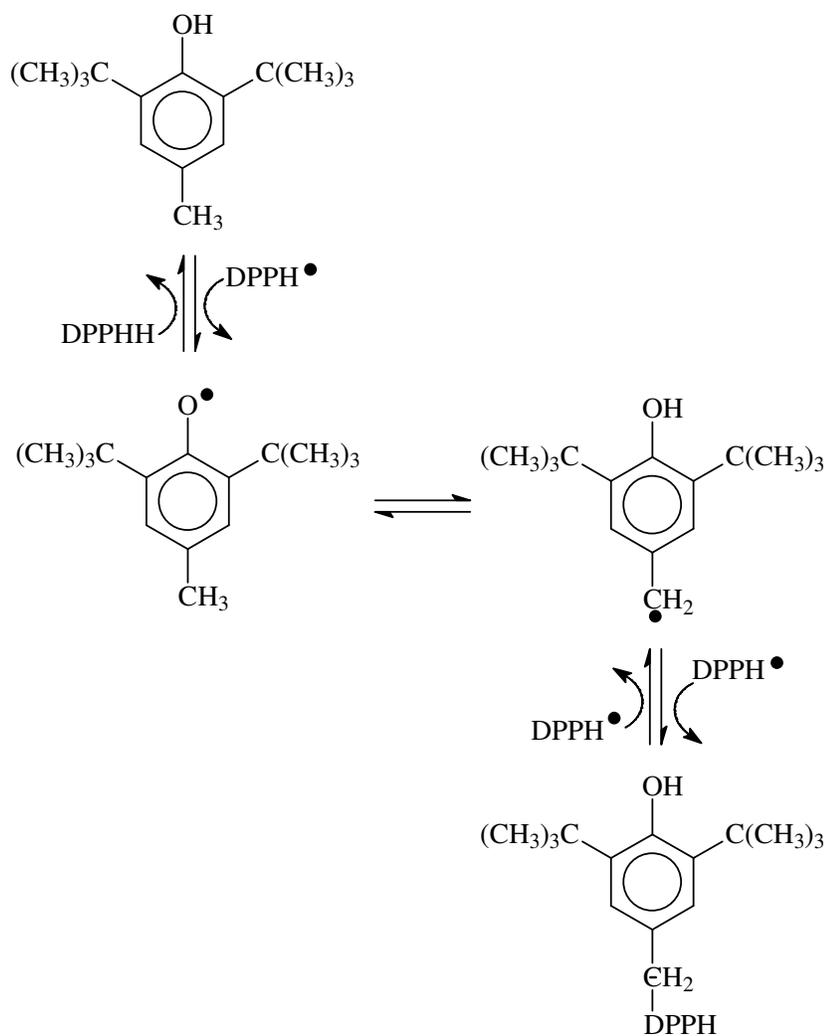
342,35 um), que tem absorção máxima a 535nm e emissão a 533nm, tendo propriedades fluorescentes.



**Figura 5** – Reação do teste do TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído

b) *Método da Atividade Seqüestradora do Radical Livre DPPH*

O DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é um radical livre que para se tornar uma molécula estável diamagnética, precisa aceitar um elétron ou um radical hidrogênio. Devido ao seu elétron livre, a solução etanólica do DPPH mostra uma forte banda de absorção a 515nm. Radicais DPPH reagem com quantidade adequada de agentes redutores, tornando seus elétrons emparelhados e causando perda estequiométrica da cor da solução como número de elétrons recebidos. O decréscimo na absorbância de 515nm indica a redução do radical DPPH, logo nos mostra a eficiência do extrato com relação ao seu poder antioxidante e como seqüestrador de radicais livres.



Estabilização do radical DPPH

**Figura 6** – Esquema proposto para a reação entre DPPH e o BHT [BONDET, 1997]

Este método é utilizado à temperatura ambiente, logo descarta a possibilidade de degradação térmica das moléculas estudadas. Contudo, o mecanismo reacional entre o antioxidante e o DPPH depende da estrutura conformacional do antioxidante.

### c) Método DHBA

Método do DHBA [OWEN, 2000] avalia a capacidade antioxidante baseado em um sistema enzimático baseado em um sistema enzimático em que utiliza-se a Xantina Oxidase. Este método baseia-se na ação oxidante da enzima xantina

oxidase sobre hipoxantina, convertendo-a ao ácido úrico, gerando assim no meio o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ). Tal radical reage com o ácido salicílico, produzindo os ácidos benzóicos di-hidroxilados (2,3-DHBA e 2,5-DHBA). Estes DHBA foram previamente quantificados em um experimento padrão, via CLAE (Cromatografia Líquida de Alta eficiência), obtendo-se uma curva de calibração. Desta forma é possível inserir no sistema uma substância que tenha um potencial antioxidante para ser avaliada. Portanto, se a referida substância conseguir competir com o ácido salicílico na captura do radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), menores quantidades de DHBA serão formadas, indicando uma capacidade antioxidante para a substância testada [MACEDO, 2003].

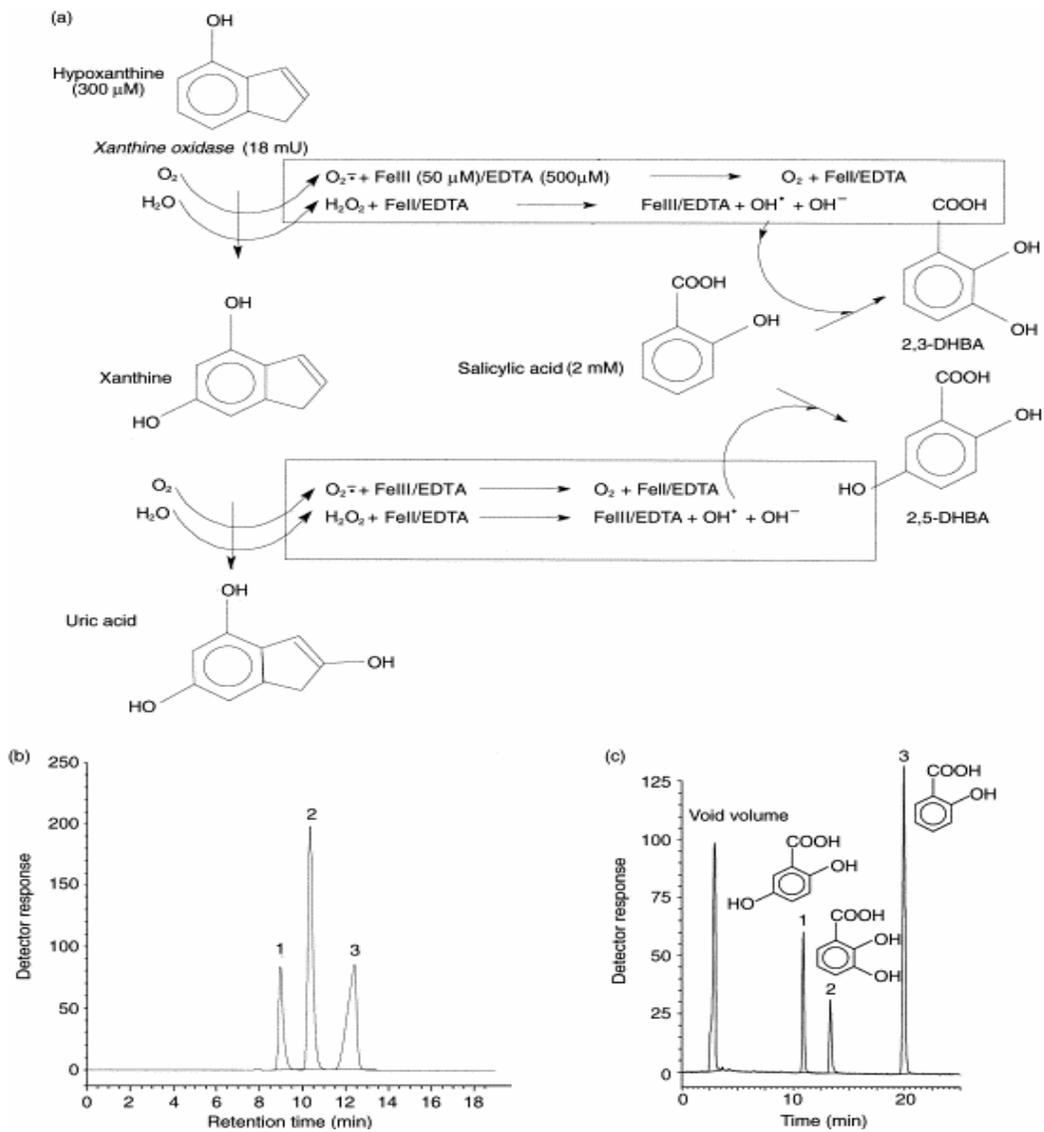
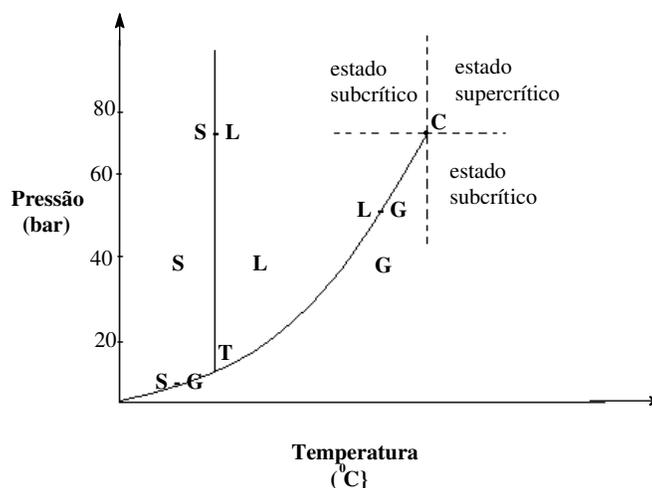


Figura 7- Esquema de reações envolvidas no teste do DHBA.

## 2.5- EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Um fluido supercrítico é qualquer fluido que esteja a uma temperatura acima da sua temperatura crítica e da sua pressão crítica. É importante ressaltar que nenhuma substância é um fluido supercrítico, mas sim que pode ser levada ao estado supercrítico pelo uso de calor e pressão até superar o seu ponto crítico.



**Figura 8-** Diagrama de fases

O poder de solubilização de um solvente é tanto maior quanto mais denso ele for. Acima e nas proximidades do ponto crítico, um pequeno aumento de pressão produz um grande aumento do poder de solubilização do solvente. É esta característica bastante peculiar do fluido supercrítico que se constitui no princípio fundamental do processo de extração supercrítica.

Em síntese, pequenas variações de pressão e/ou temperatura na região supercrítica podem levar a grandes variações da densidade do solvente supercrítico, influenciando diretamente no seu poder de solubilização.

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso. Propriedades relacionadas à capacidade de solubilização, como a densidade, de um fluido supercrítico aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto que propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos de um gás. Sabe-se que os líquidos são excelentes solventes, mas de difusão lenta e alta viscosidade. Os gases, por sua vez, são péssimos solventes, mas se difundem com extrema facilidade e são

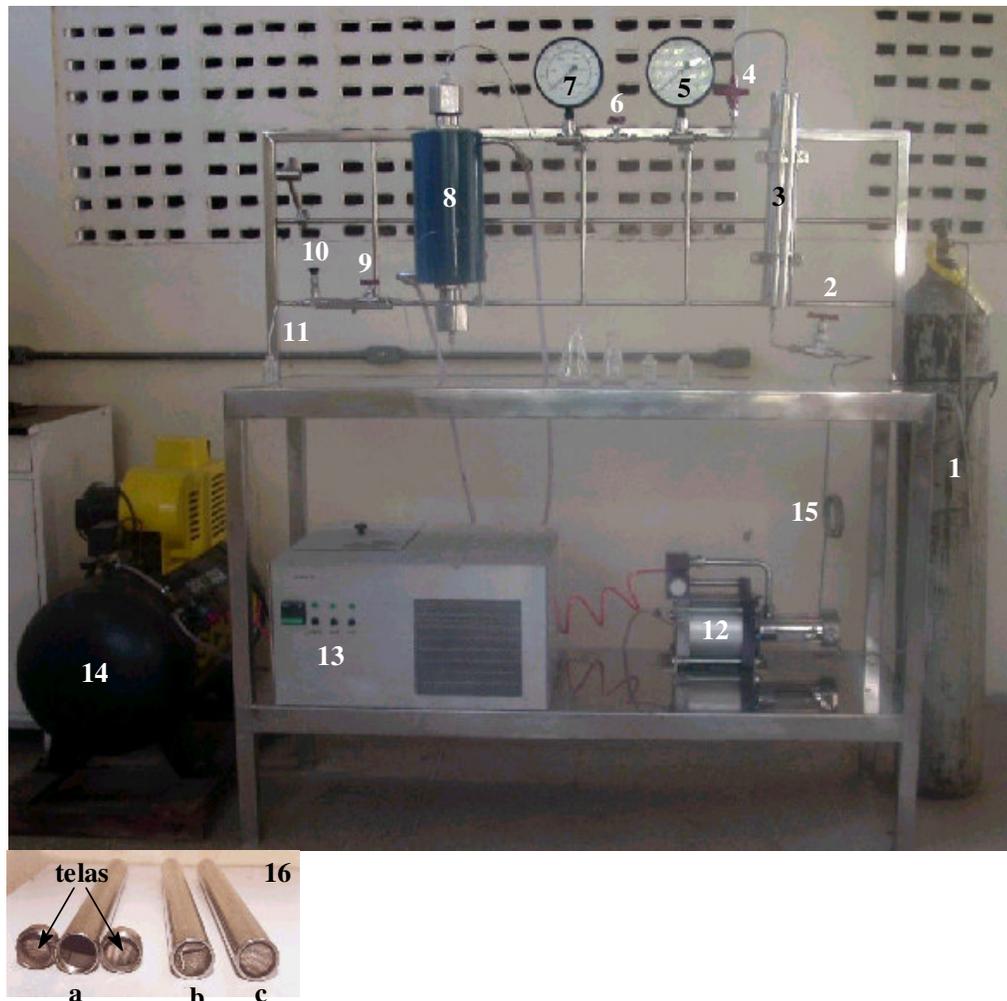
pouco viscosos. Os solventes supercríticos, combinando características desejáveis tanto de líquidos quanto de gases, são ótimos solventes com alta difusividade e baixa viscosidade. Como consequência, a extração com fluido supercrítico torna-se um processo rápido e eficiente [PRADO, 2003].

Uma das grandes vantagens da extração com fluido supercrítico (EFSC) é permitir o processamento de materiais a baixas temperaturas, o que é especialmente adequado quando compostos termossensíveis estão presentes. Dessa forma, evita-se a degradação desses compostos, que é um problema duplamente prejudicial: os produtos degradados comprometem a qualidade do produto final e geram rejeitos industriais indesejáveis que precisam ser tratados antes de eliminados.

Uma característica é a possibilidade de fácil recuperação do solvente supercrítico após o processo de extração, apenas pelo ajuste de pressão e/ou temperatura, sendo o mesmo continuamente reciclado. Isto elimina uma das etapas mais dispendiosas dos processos de extração convencionais que é a separação entre produto extraído e solvente orgânico. Além disso, a manipulação de grandes quantidades de solventes orgânicos poluidores representa uma dificuldade adicional para o controle ambiental, seja da qualidade do ar, seja dos efluentes líquidos ou rejeitos sólidos. Como consequência positiva da eficiente separação entre soluto e solvente supercrítico tem-se a obtenção de produtos com alto grau de pureza, já que o processo não deixa resíduos de solvente no produto final.

Encontram-se aplicações industriais do fluido supercrítico, já implantadas ou em fase de estudo ou experimentação, nas mais diversas áreas. Na tabela 1, apresenta-se uma breve amostra da potencialidade de uso dessa tecnologia. Vale ressaltar que, em quase todos os exemplos citados, o grande passo em termos de evolução de gerenciamento ambiental é a substituição de solventes orgânicos poluidores pelos solventes supercríticos.

Entre as aplicações de fluido supercrítico em indústrias pode-se citar a descafeinização de café e chá, extração de corantes e antioxidantes naturais de dendê e urucum, redução do teor de nicotina do tabaco, extração de óleos de sementes vegetais e frutas oleaginosas, desodorização e redução da acidez de óleos comestíveis, extração de estimulantes do cacau, redução do teor de colesterol de alimentos.



**Figura 9-** Extrator supercrítico em forma de cavalete

A figura acima apresenta um extrator em fluido supercrítico constituído de cilindro de CO<sub>2</sub> (1), válvulas de pressão (2, 4 e 9), manômetros (5 e 7), compressor (14), bomba pneumática (12), termostato (13), camisa de condicionamento de temperatura (8) e colunas de extração (16)

**Tabela 3.** Plantas industriais de extração com fluido supercrítico.

Ano de implantação	Empresa	Material Processado
1987	Messer Griesheim	Vários produtos naturais
1988	CAL-Pfizer	Aromas
1989	Clean Harbors	Efluentes industriais líquidos
1990	Jacobs Suchard	Café
1991	Texaco	Rejeitos de refinaria de petróleo
1993	Agrisana	Fármacos de origem botânica
1995	Phillip Morris Co.	Tabaco

**Tabela 4-** Referências de aplicações de extração em fluido supercritico de metabólitos secundários

Referência	Planta	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
<b>Alcalóides</b>			
Duan, 2007	<i>Tripterigium wilfordii</i>	30-50	200-400
Cai, 2007	<i>Termopsis lanceolata</i>	45	200
Santana, 2007	<i>Andreadoxa flava</i>	40	200-400
Ling, 2007	<i>Sofora flavescens</i>	50	250
Yuan, 2007	<i>Coridalis yanhusuo</i>	37	100
Santana, 2006	<i>Andreadoxa flava</i>	40	100-200
Cai, 2006	<i>Termopsis lanceolata</i>	45	200
Cai, 2006	<i>Macleaya cordata</i>	45	350
Su, 2005	<i>Coridalis Yanhusuo</i>	60	450
Pereira, 2004	<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	45	250
Zhang, 2003	<i>Sophora flavescens</i>	45	300
Then, 2004	<i>Chelidonium majus</i>	35	250-300
Fang, 1999	<i>Colchicum autumnale</i>	40	200-400

Rincon, 1998	<i>Nicotiana tabacum</i>	50-70	150-300
Saldana, 1997	<i>Coffea arabica</i>	40-70	95-235
Caetano, 1996	<i>Lupinus albus</i>	30-40	100-200
Vandana, 1996	<i>Taxus brevifolia</i>	47-58	100-380
Lee, 1992	<i>Catharanthus roseus</i>	40	150
Bicchi, 1991	<i>Senecio cordatus</i>	55	150
<b>Flavonoides</b>			
Yu, 2007	<i>Citrus paradisi</i>	60	420
Wang, 2007	<i>Chaenomeles speciosa</i>	32-65	80-150
Li, 2006	<i>Artemisia capilaris</i>	55	300
Sun, 2006	<i>Ginkgo biloba</i>	40	200
Hou, 2006	<i>Morus alba</i>	32-65	80-150
Peng, 2006	<i>Patrinia villosa</i>	45	250
Hu, 2004	<i>Ginkgo biloba</i>	55	150
Ke, 2004	<i>Citrus sinensis</i>	60	350
Liu, 2004	<i>Epimedium koreanum</i>	60	300
Giannuzzo, 2003	<i>Citrus paradisi</i>	60	95
Liu, 1997	<i>Perilla frutescens</i>	20-45	400
<b>Antraquinona</b>			
Lu, 2006	<i>Polygonum cuspidatum</i>	30	200
Bertalan, 2000	<i>Ribes nigrum L</i>	35-55	100-400
<b>Terpenoides</b>			
Duan, 2007	<i>Tripterigium wilfordii</i>	30-50	400
Lu, 2006	<i>Pinus tabulaeformis</i>	40	150
<b>Cumarinas</b>			
Mi, 2005	<i>Cnidium monieri</i>	50	250

Gong, 2005	<i>Rodiola sacra</i>	40-60	200-450
<b>Fenois</b>			
Wang, 2007	<i>Spirulina pratensis</i>	48	200

Como mostra a tabela 3, a aplicação de CO<sub>2</sub> supercrítico está sendo recentemente utilizada em estudos de constituintes fixos em produtos naturais.

Observa-se, entretanto, maior número de publicações referente aos alcalóides sendo do ano de 1987 o relato mais antigo de extração seletiva de metabólito secundário utilizando o CO<sub>2</sub> em seu estado supercrítico.

Em processos de extração de constituintes fixos de plantas utiliza-se, costumeiramente, agentes que podem provocar a degradação dos extratos, sendo estes agentes a aplicação de temperaturas elevadas, tal como extrações em Soxhlet, e aplicação de solventes orgânicos, entre os quais usa-se álcoois, organo-clorados, acetona e éteres. Em extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico as temperaturas de extração, normalmente, são abaixo de 60°C, o que evita a degradação dos constituintes durante o processo de extração, bem como o CO<sub>2</sub> não é considerado um solvente químico, mas sim um agente físico que atua por forças de interações provenientes de dipolo induzido da molécula de CO<sub>2</sub> que é apolar [SALDANA, 1997].

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas quatorze espécies, cujas partes estudadas estão relacionadas na tabela 18, pág. 59.

#### 3.1. AVALIAÇÃO PROTÉICA

A curva padrão com BSA (albumina sérica bovina) apresentou a curva  $Y(\text{concentração na cubeta}) = 22,156A - 30,522$  e um coeficiente de correlação entre os pontos  $r = 0,996$ .

Considerando-se as diluições durante a extração e isolamento das proteínas, obteve-se a equação abaixo, a partir da qual encontrou-se diretamente o percentual protéico na equação, que se encontra na tabela 5.

$$Y(\% \text{proteína no resíduo em p/p}) = (22,1560A - 30,522) \times 25$$

**Tabela 5.** Composição protéica de cada resíduo

Amostra	Absorbância Média	Desvio padrão	% p/p (resíduos seco)
Acerola	1,4361	0,0016	<b>32,40</b>
Ameixa (amêndoas)	1,4353	0,0003	31,96
Ameixa (casca)	1,4122	0,0008	19,17
Ciriguela	1,4336	0,0004	<b>31,02</b>
Goiaba	1,4224	0,0003	24,82
Graviola	1,4223	0,0009	24,76
Mamão	1,4224	0,0002	24,82
Manga	1,4102	0,0011	13,52
Manga (verde)	1,4075	0,0006	16,56
Maracujá	1,4326	0,0006	<b>30,47</b>
Morango	1,4076	0,0005	16,62
Murici	1,3961	0,0004	10,25
Oiti	1,3891	<b>0,0000</b>	6,37
Sapoti	1,4290	<b>0,0026</b>	28,47
Tamarindo	1,4342	0,0006	31,35

A determinação do teor de proteínas pelo método de Bradford apresentou boa reprodutibilidade, com desvios padrões bem baixos. Destacando-se o sapoti com o maior desvio padrão e o oiti com o menor dos desvios.

### 3.2. AVALIAÇÃO LIPÍDICA

#### 3.2.1. Avaliação lipídica dos extratos hexânicos

Os resultados do estudo da composição lipídica, tais como umidade, rendimento de extrativos e teor de ácidos graxos no óleo estão expressos nas tabelas 6, 7 e 8. Os óleos foram analisados em cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas (CG/EM) e em cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama (CG/DIC),

**Tabela 6.** Rendimento de extrativos em extração hexânica

Espécie	Umidade (%)	Rendimento de extrativos (%)	Teor de ácidos graxos no óleo (%)
Acerola	13,37	4,25	48,73
Ameixa (amêndoas)	8,82	<b>33,80</b>	<b>89,48</b>
Ameixa (casca)	8,37	0,98	52,68
Ciriguela	6,63	6,63	42,65
Goiaba	9,69	0,18	53,50
Graviola	36,01	17,98	66,49
Mamão	10,40	24,97	<b>92,74</b>
Manga Madura	17,13	5,28	41,45
Manga Verde	47,22	22,31	29,72
Maracujá	7,29	10,02	64,59
Morango	8,76	11,07	75,55
Murici	10,75	<b>5,52</b>	<b>93,46</b>
Oiti	26,82	1,72	27,66
Sapoti	21,62	21,62	18,22
Tamarindo	12,55	6,68	80,31

A tabela acima aponta as amêndoas das sementes de ameixa, as sementes de mamão e as sementes de murici com maior teor de ácidos graxos no óleo, entretanto, estes valores devem ser relacionados com o rendimento de extrativos. Logo o teor ácidos graxos no óleo das amêndoas das sementes de ameixa (89,48%) com rendimento de extrativos de 33,80% são mais expressivos do que o teor de ácidos graxos no óleo do murici (93,46%) com um modesto rendimento de extrativos de 5,52%.

**Tabela 7.** Composição química majoritária de ácidos graxos saturados analisados por CG/EM

<b>Espécie</b>	<b>Ác. Palmítico (C<sub>16:0</sub>) (%)</b>	<b>Ác. Estearico (C<sub>18:0</sub>) (%)</b>	<b>Ac. Mirístico (C<sub>14:0</sub>) (%)</b>	<b>Ac. Araquídico (C<sub>20:0</sub>) (%)</b>
<b>Abacaxi</b>	<b>60,20</b>	7,99	-	-
<b>Acerola</b>	21,40	17,76	-	2,43
<b>Ameixa (amendoa)</b>	14,80	5,41	-	-
<b>Ameixa (casca)</b>	14,67	4,87	-	-
<b>Ciriguela</b>	<b>63,33</b>	-	-	-
<b>Goiaba</b>	-	-	-	-
<b>Graviola</b>	25,10	10,26	-	1,97
<b>Mamão</b>	24,05	9,88	-	-
<b>Manga madura</b>	9,12	<b>45,15</b>	-	3,42
<b>Manga verde</b>	13,22	-	20,96	3,59
<b>Maracujá</b>	<b>56,98</b>	21,98	-	2,20
<b>Morango</b>	<b>45,17</b>	-	-	-
<b>Murici</b>	24,23	10,65	-	-
<b>Oiti</b>	30,87	19,84	-	3,74
<b>Sapoti</b>	22,93	15,56	0,34	2,42
<b>Tamarindo</b>	29,69	12,29	-	5,51

Dentre os ácidos graxos saturados a tabela acima demonstra a maior incidência do ácido palmítico, especialmente para os resíduos de abacaxi, ciriguela, maracujá e morango.

**Tabela 8.** Composição química majoritária de ácidos graxos insaturados analisados por CG/EM

<b>Espécie</b>	<b>Ácido Palmitoleico (C<sub>16:1</sub>) ω7 (%)</b>	<b>Ácido Linoleico (C<sub>18:2</sub>) ω6 (%)</b>	<b>Ácido Oleico (C<sub>18:1</sub>) ω9(%)</b>
Abacaxi	-	-	-
Acerola	-	3,34	<b>52,20</b>
Ameixa (amendoa)	0,45	1,79	<b>47,17</b>
Ameixa (casca)	-	-	17,48
Ciriguela	-	-	<b>36,69</b>
Goiaba	-	-	-
Graviola	2,55	0,85	<b>49,71</b>
Mamão	-	-	<b>38,58</b>
Manga Madura	-	6,57	<b>34,21</b>
Manga Verde	-	10,25	<b>46,75</b>
Maracujá	2,25	10,97	-
Morango	-	-	<b>54,82</b>
Murici	-	-	17,25
Oiti	1,12	19,06	21,17
Sapoti	-	-	<b>54,17</b>
Tamarindo	-	-	-

O ácido oléico aparece como constituinte majoritário da maioria dos óleos analisados, podendo este ser o responsável por boa parte da atividade antioxidante dos resíduos nos quais ele está presente.

**Tabela 9.** Composição química dos óleos analisados em CG/DIC

	<b>Ácido Palmítico (C<sub>16</sub>:0)</b>	<b>Ácido Linoleico (C<sub>18</sub>:2)</b>	<b>Ácido Oléico (C<sub>18</sub>:1)</b>	<b>Ácido Esteárico (C<sub>18</sub>:0)</b>
<b>Abacaxi</b>	44,98	48,47	---	---
<b>Ameixa (Casca)</b>	10,26	<b>79,38</b>	4,83	2,71
<b>Ameixa (Amêndoas)</b>	4,43	85,31	3,39	2,23
<b>Ciriguela</b>	31,87	31,30	14,80	---
<b>Goiaba</b>	54,5	45,49	---	---
<b>Mamão</b>	15,95	68,24	6,31	5,17
<b>Morango</b>	---	34,50	2,82	---
<b>Murici</b>	20,59	38,70	8,54	2,06
<b>Tamarindo</b>	20,49	38,61	9,12	---

De acordo com a tabela acima observa-se grande discrepância entre os teores de ácidos graxos analisados em CG/DIC e CG/EM, pois a técnica de CG/EM não é uma técnica quantitativa, logo os teores obtidos por análise em CG/EM não representam valores reais. Destacando-se na tabela o teor de ácido linoleico nas cascas das sementes de ameixa com 79,38% identificado pelo CG/DIC e não identificado em CG/EM.

As figuras a seguir representam os cromatogramas obtido por CG/EM e CG/DIC dos óleos obtidos por extração hexânica das amostras estudadas.

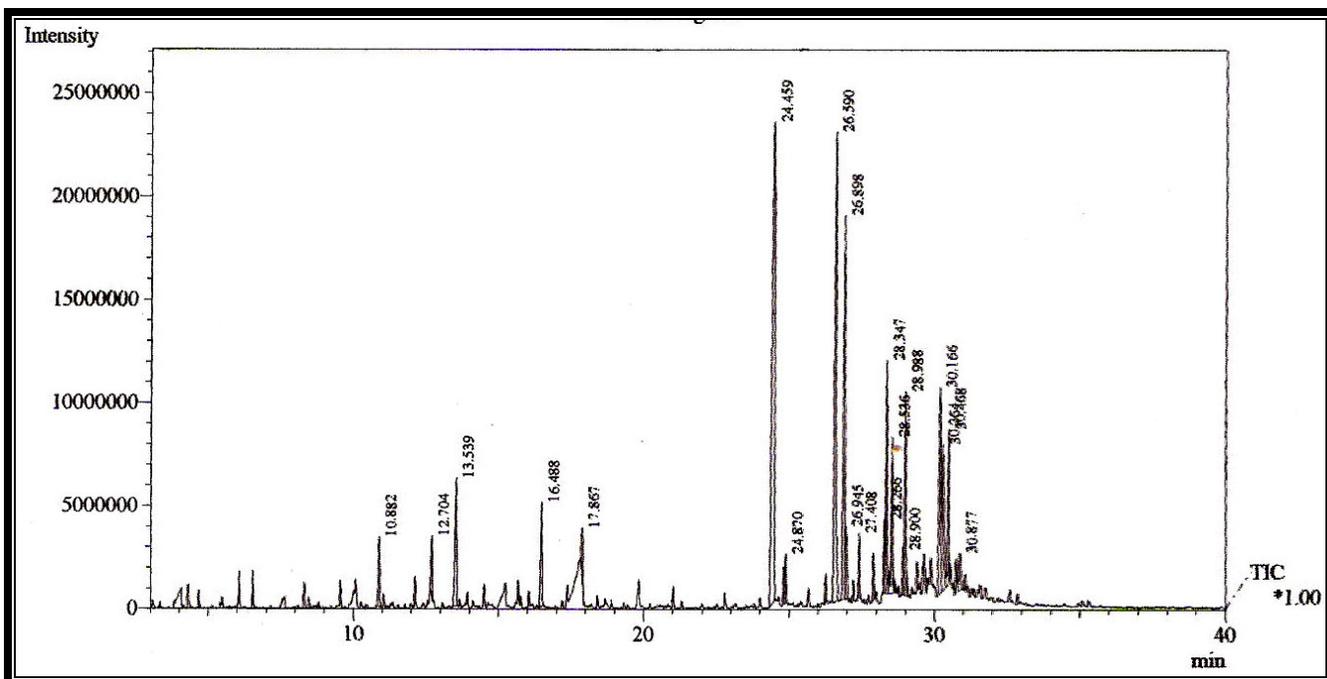


Figura 10- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de murici

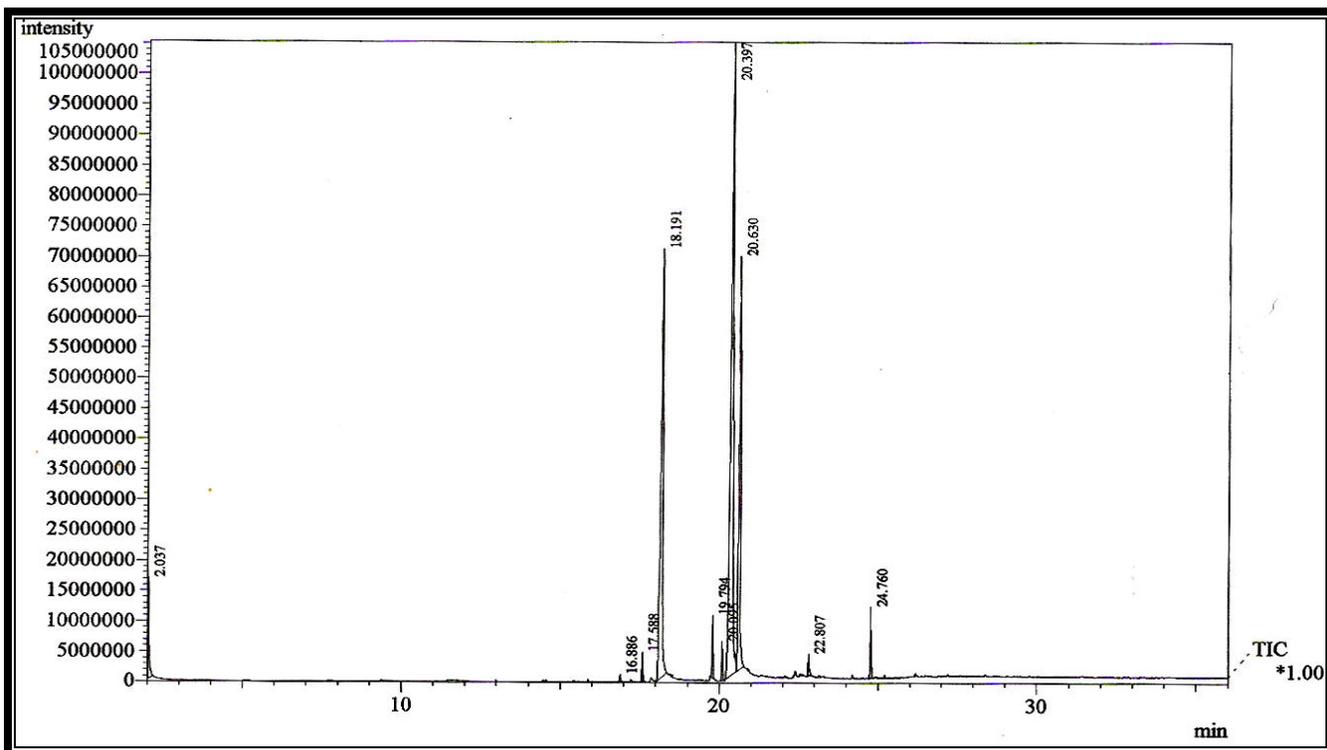


Figura 11- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de acerola

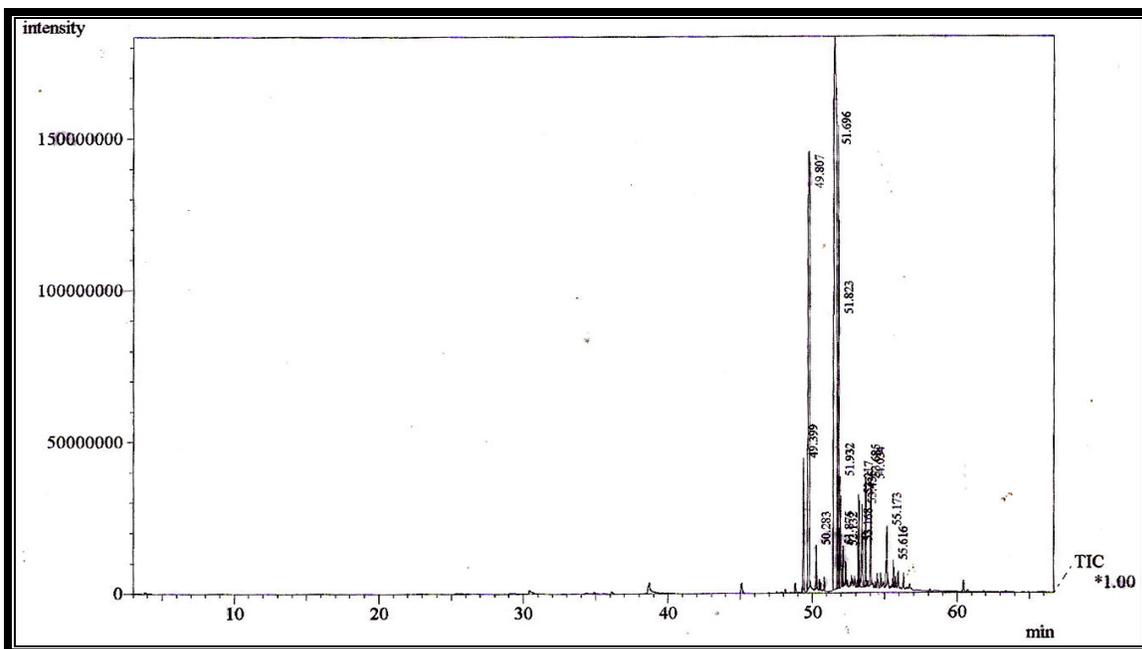


Figura 12- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de graviola

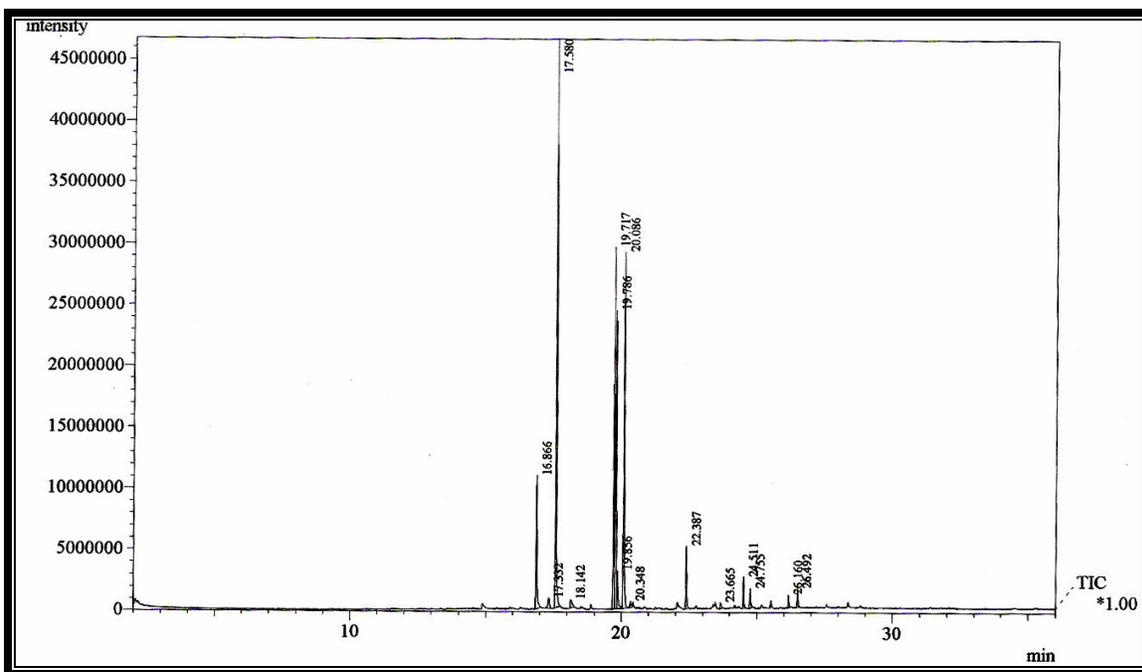


Figura 13- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de oiti

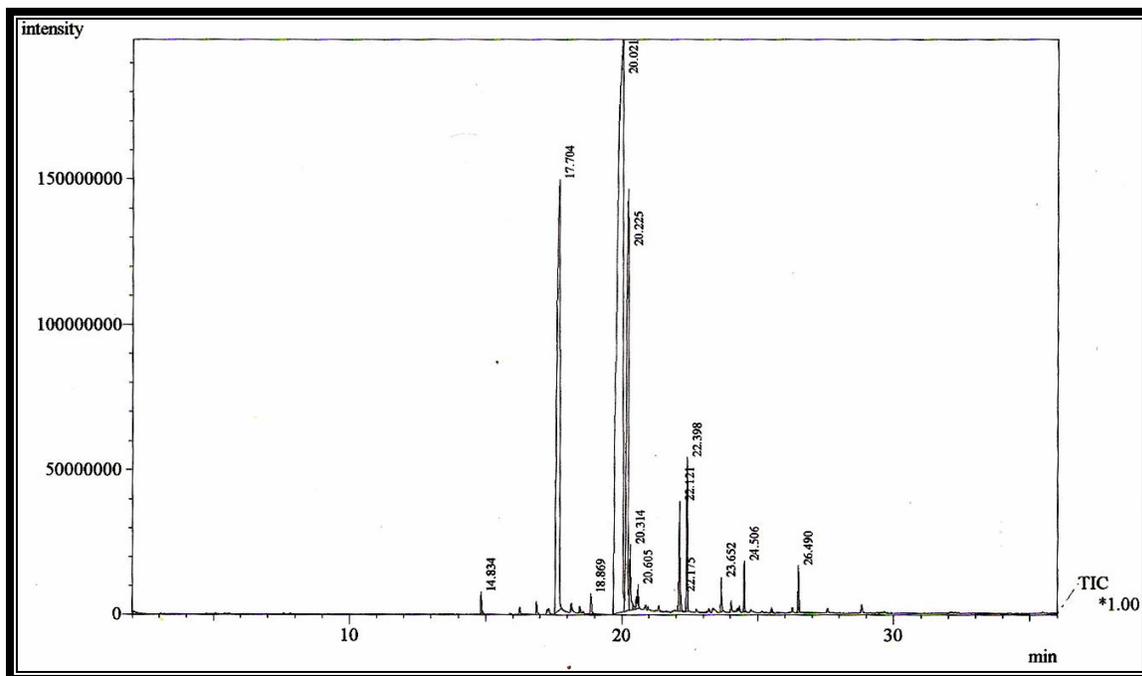


Figura 14- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de sapoti

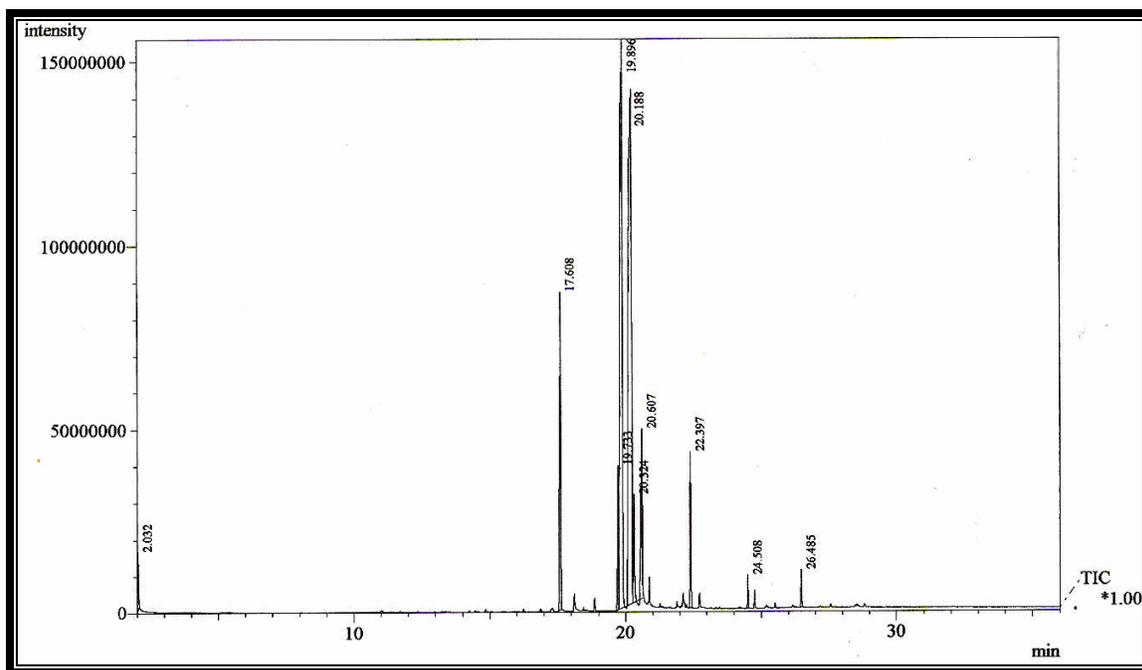


Figura 15- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de manga madura

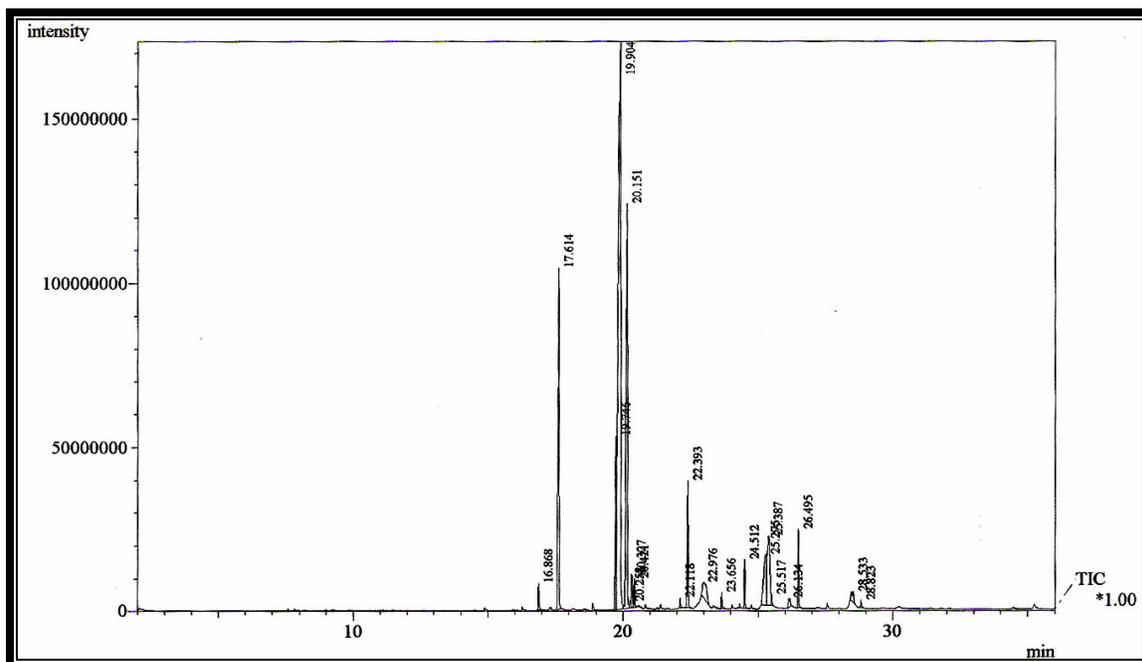


Figura 16- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de manga verde

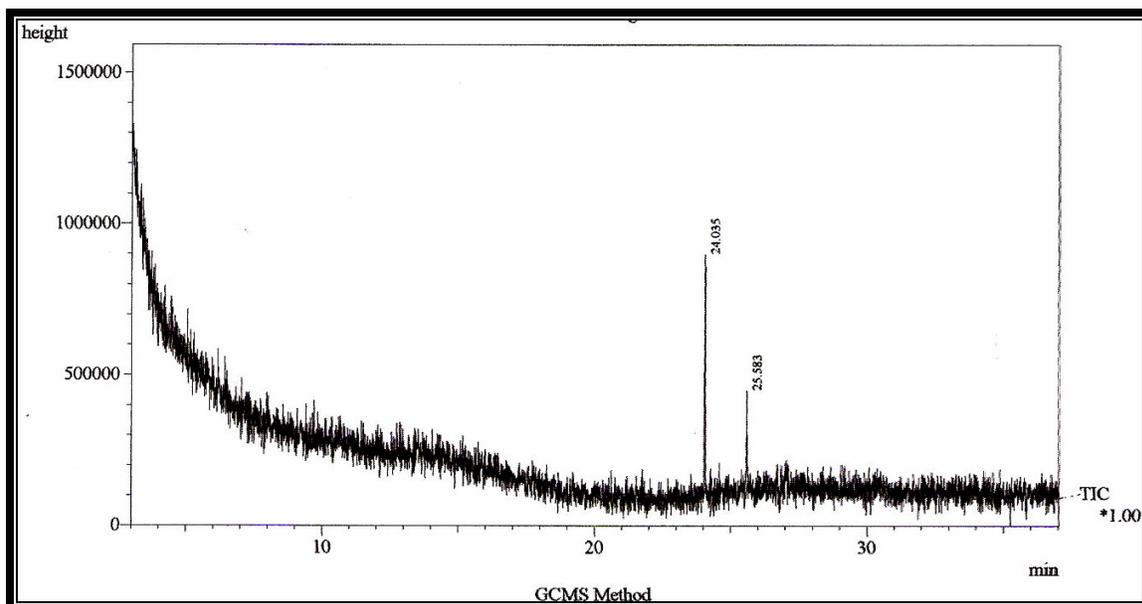


Figura 17- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de goiaba

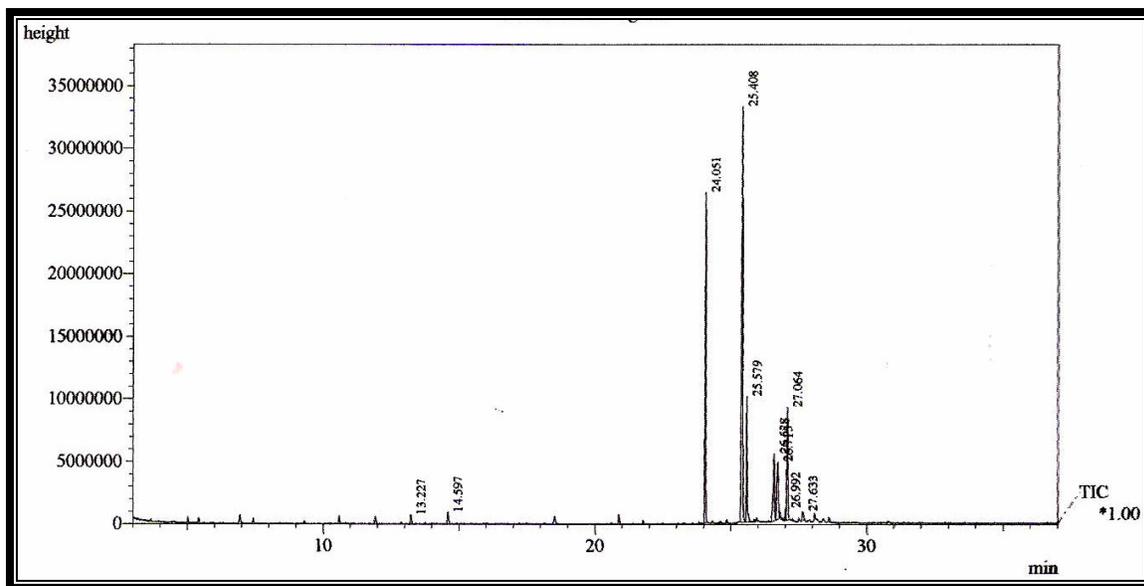


Figura 18- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de mamão

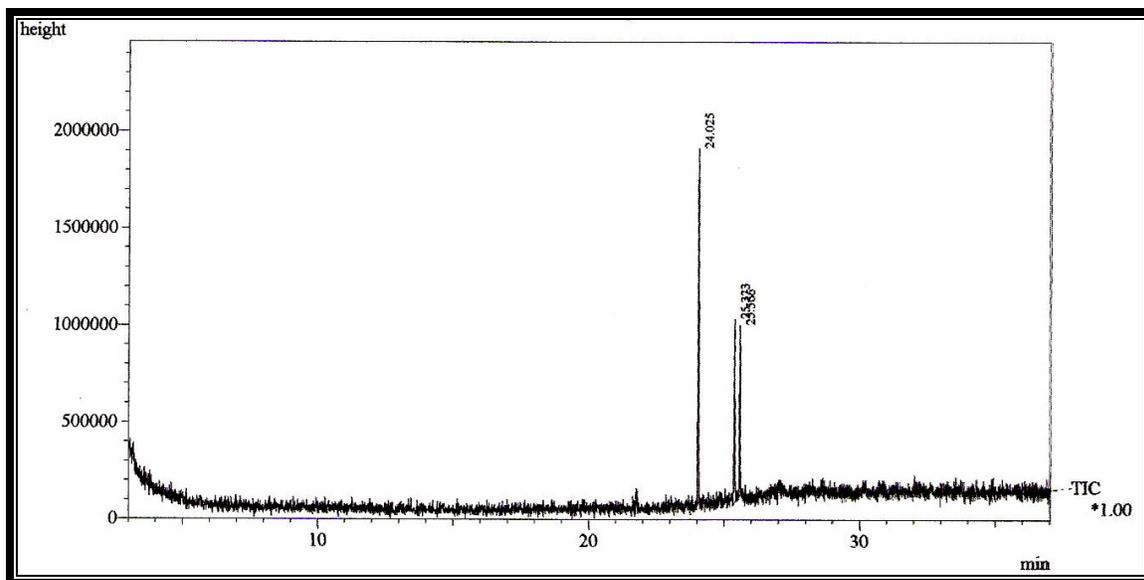


Figura 19- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de ciriguela

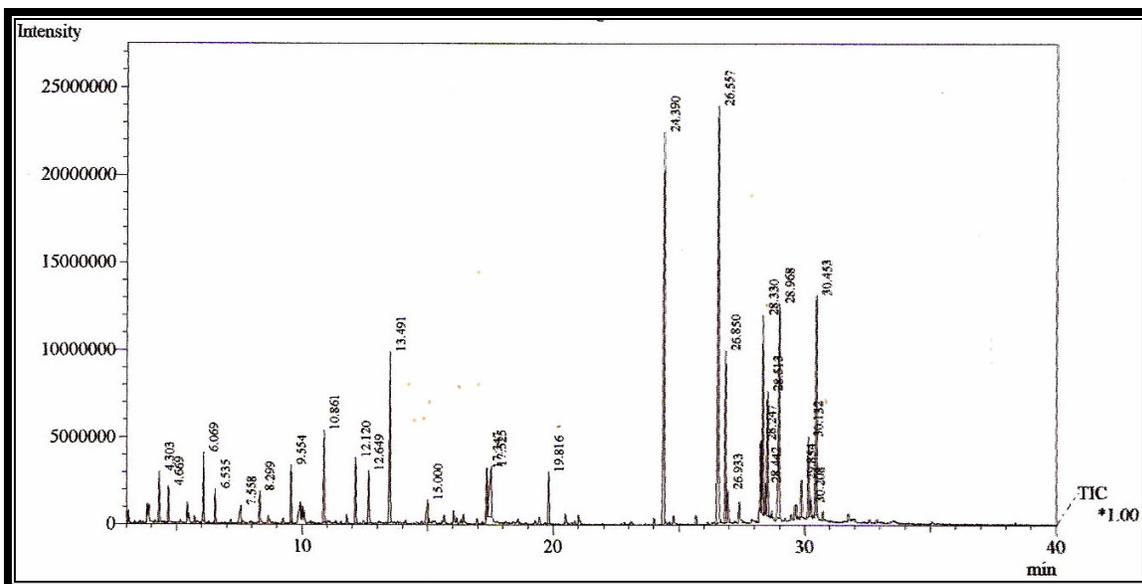


Figura 20- Cromatograma de CG/EM do óleo das cascas das sementes de ameixa

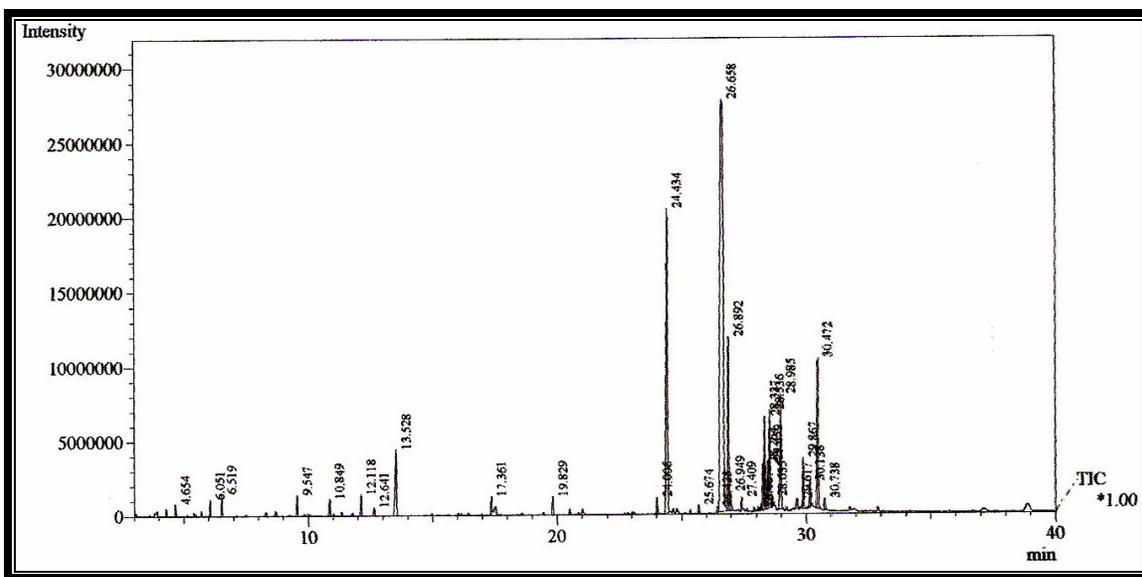


Figura 21- Cromatograma de CG/EM do óleo das amêndoas das sementes de ameixa

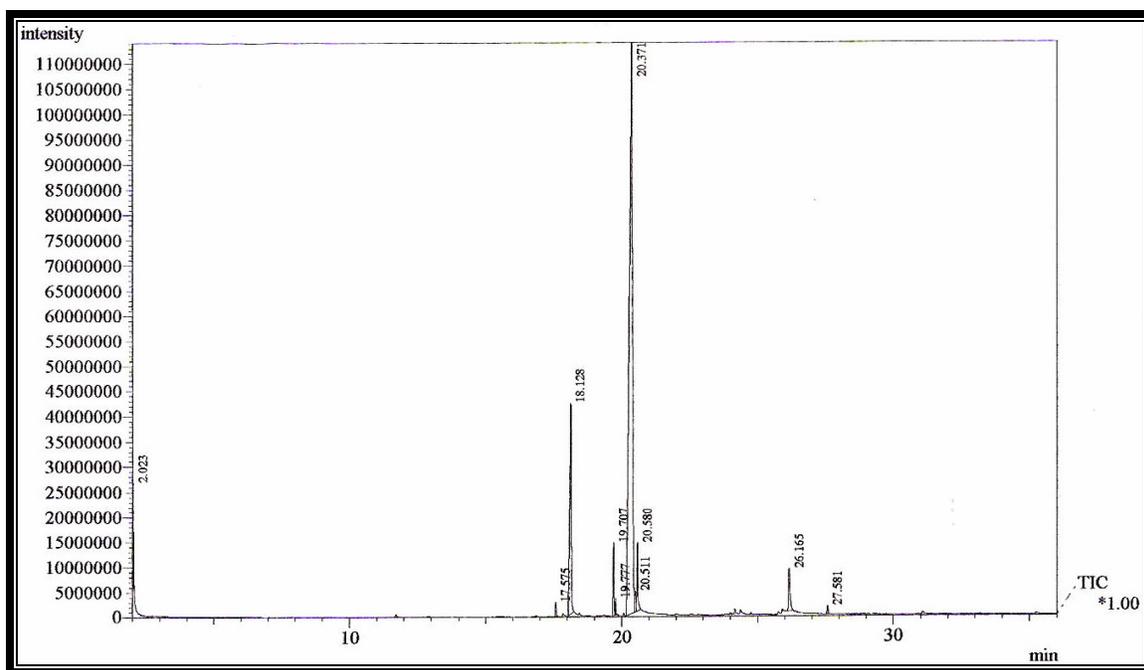


Figura 22- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de maracujá

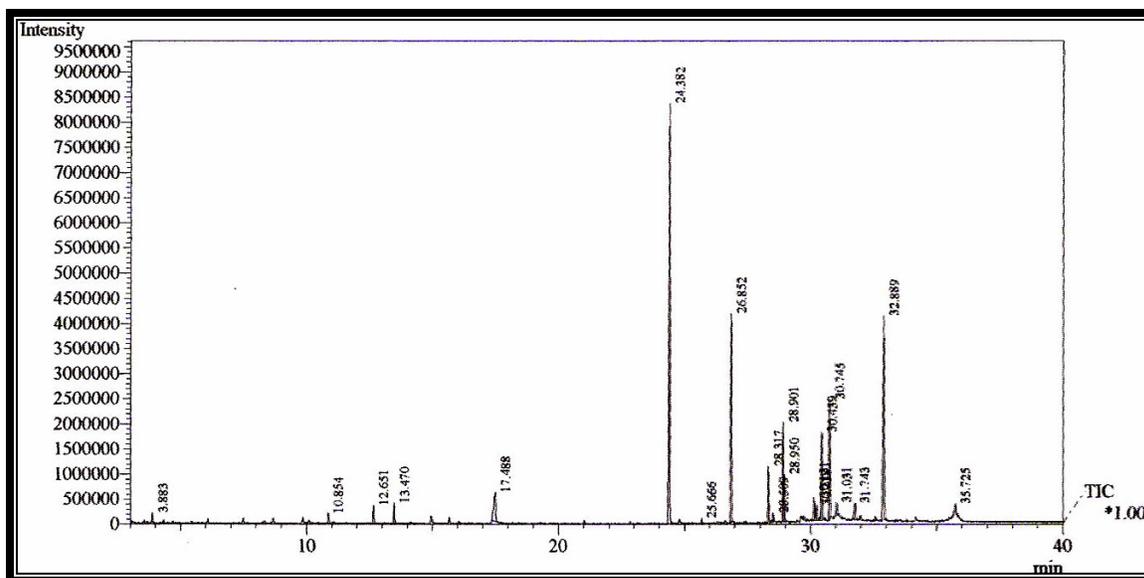
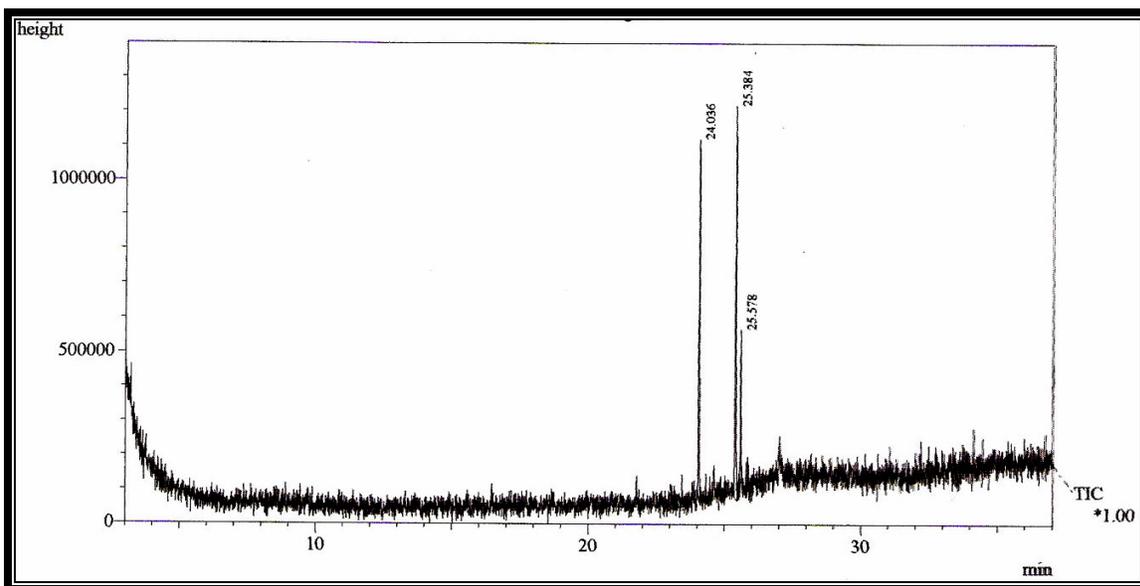
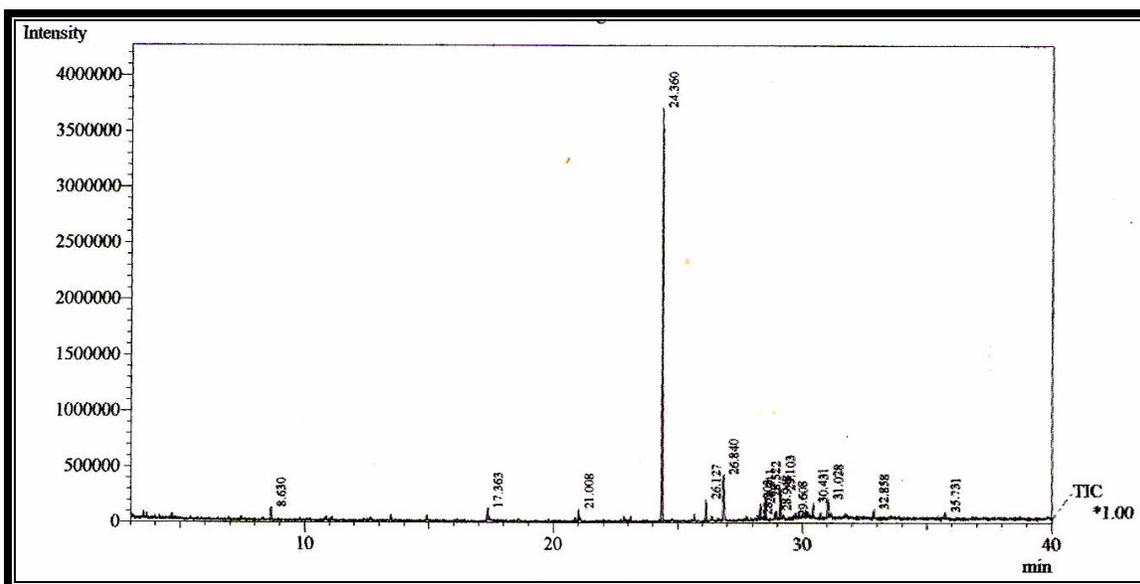


Figura 23- Cromatograma de CG/EM do óleo das sementes de tamarindo



**Figura 24-** Cromatograma de CG/EM do óleo dos frutos de morango



**Figura 25-** Cromatograma de CG/EM do óleo das cascas de abacaxi

As figuras a seguir mostram os espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos graxos representados.

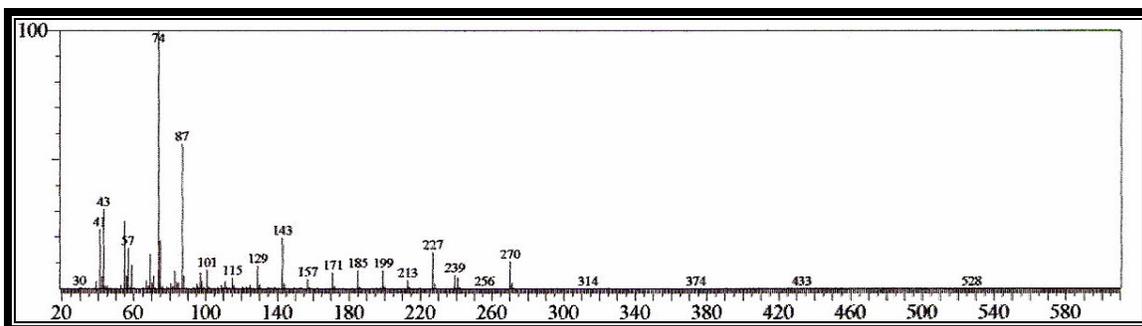


Figura 26- Espectro de massas do éster metílico do ácido palmítico

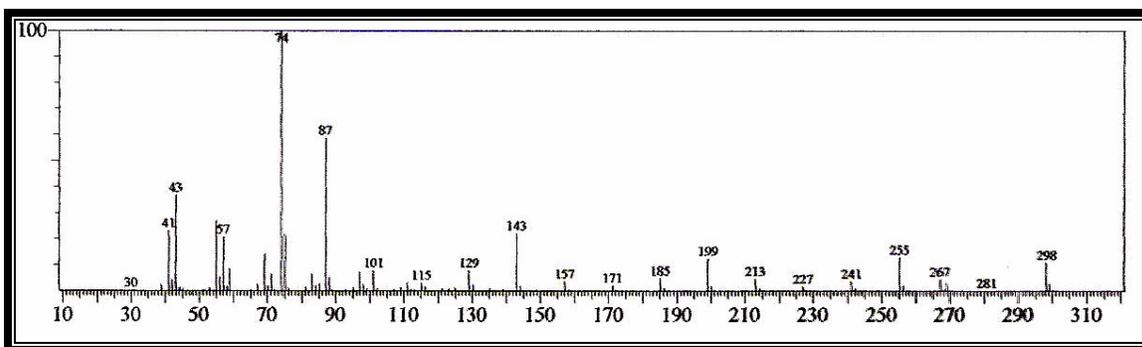
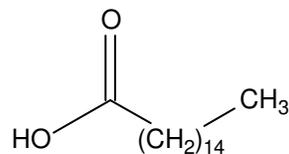


Figura 27- Espectro de massas do éster metílico do ácido esteárico

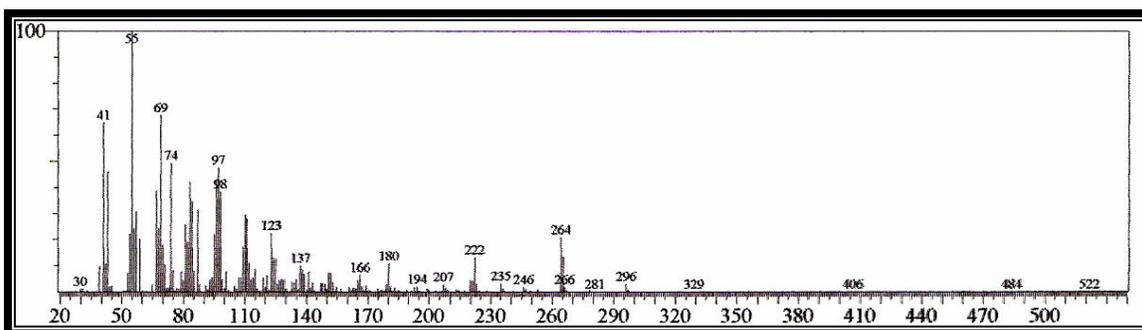
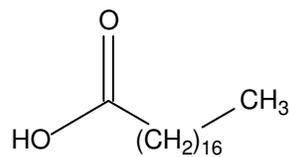
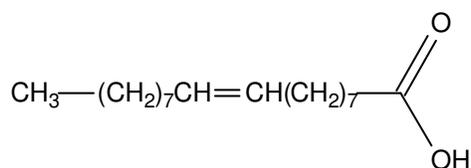


Figura 28- Espectro de massas do éster metílico do ácido oléico



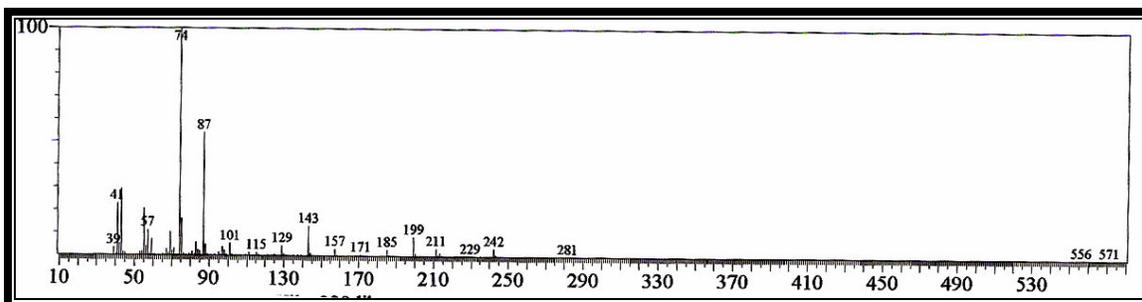


Figura 29- Espectro de massas do éster metílico do ácido mirístico

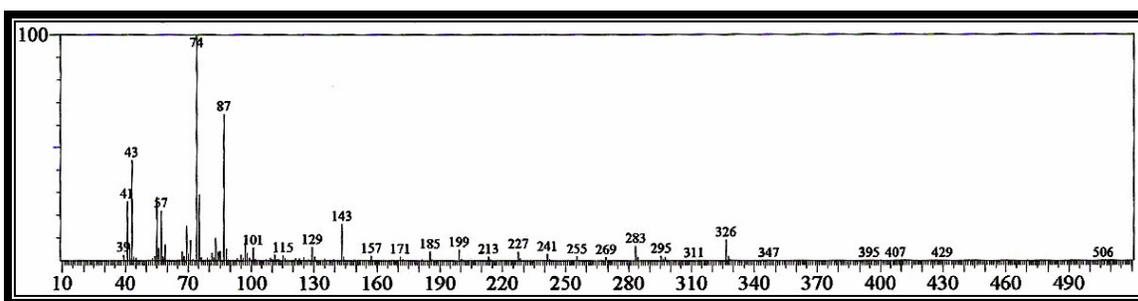
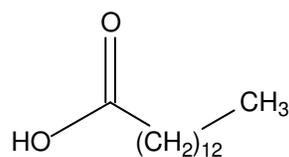


Figura 30- Espectro de massas do éster metílico do ácido araquídico

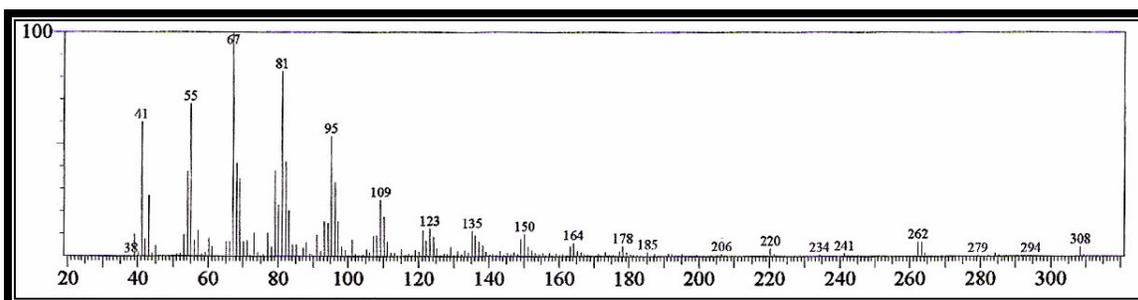
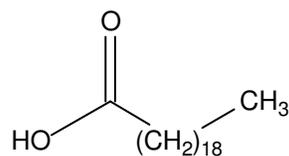
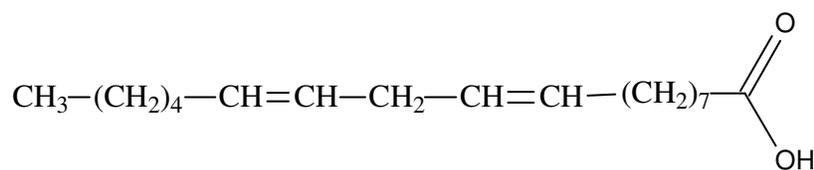
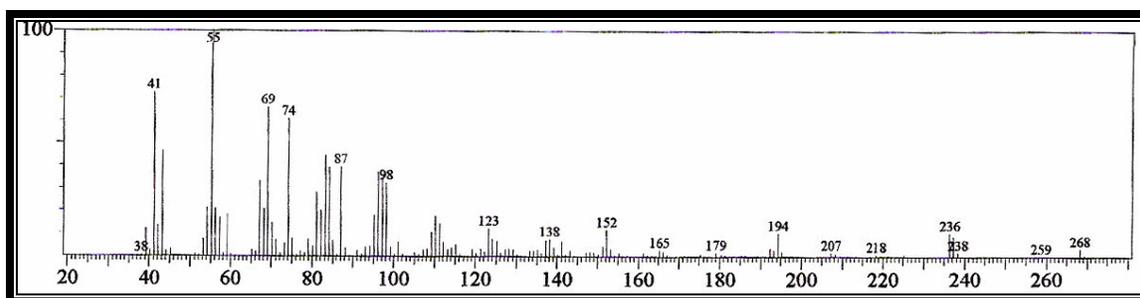
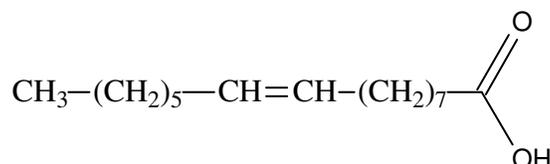


Figura 31- Espectro de massas do éster metílico do ácido linoleico





**Figura 32-** Espectro de massas do éster metílico do ácido palmitoleico



### 3.3- EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

Algumas das espécies foram extraídas em CO<sub>2</sub> supercrítico, para avaliar a composição lipídica do extrato obtido por este método.

**Tabela 10- Rendimento de extrativos em fluido supercrítico**

Espécie	Umidade (%)	Rendimento de extrativos (%)	Teor de ácidos graxos (%)
Graviola	36,01	1,81	23,57
Acerola	13,37	1,28	35,05
Sapoti	21,62	3,00	23,15
Maracujá	7,29	2,09	31,50
Morango	8,76	1,11	14,45
Mamão	10,40	1,03	41,87

Os rendimentos de extrativos de óleos fixos em CO<sub>2</sub> supercrítico são modestos, entretanto, assegura-se de que não há formação de artefatos.

**Tabela 11-** Composição química majoritária de ácidos graxos saturados extraídos em CO<sub>2</sub> supercrítico, analisados por CG/EM

Espécie	Ac. Esteárico (%)	Ac. Palmítico (%)	Ac. Araquídico (%)
Graviola	---	24,44	---
Acerola	32,45	12,35	---
Sapoti	26,09	58,33	---
Maracujá	5,06	37,01	17,52
Morango	58,23	35,74	---
Mamão	---	23,93	15,89

**Tabela 12-** Composição química majoritária de ácidos graxos insaturados extraídos em CO<sub>2</sub> supercrítico, analisados por CG/EM

Espécie	Ac. Oleico (%)	Ac. Linoleico (%)
Graviola	20,46	36,13
Acerola	25,49	28,07
Sapoti	---	14,73
Maracujá	<b>13,97</b>	<b>26,84</b>
Morango	---	3,40
Mamão	19,18	38,04

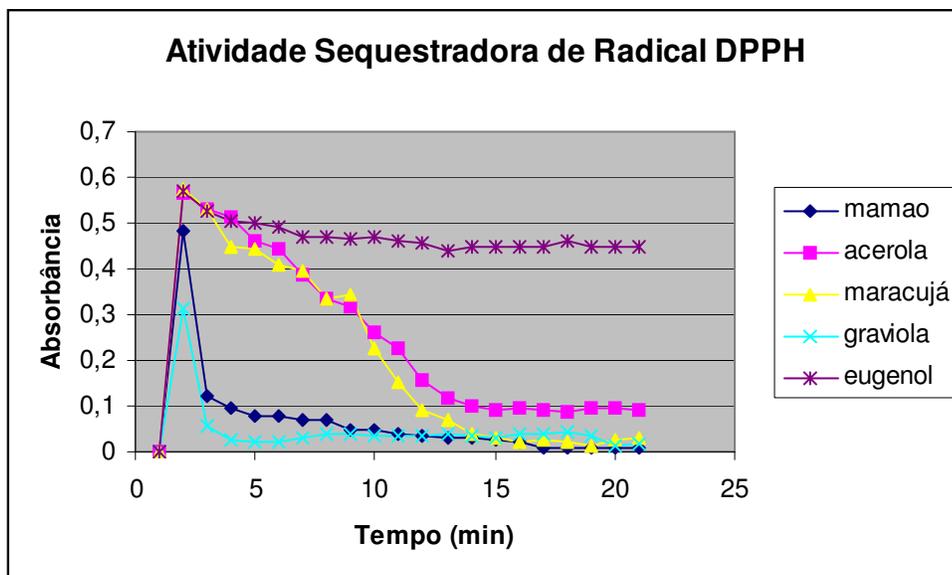
Os óleos obtidos em fluido supercrítico apresentam razoável variedade de ácidos graxos insaturados.

### 3.4 AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE

#### 3.4.1-Avaliação do potencial antioxidante pelo método do DPPH

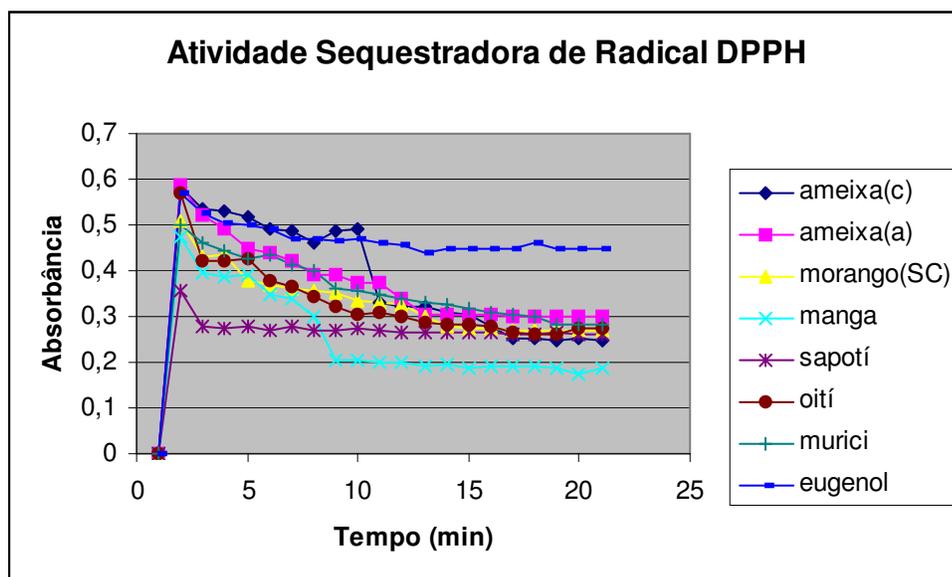
A queda de absorvância em função do tempo está diretamente relacionada a variação da concentração de radical DPPH no meio reacional, ou seja, quanto mais significativa o decréscimo da absorvância mais efetiva a atividade antioxidante do substrato.

Os dados obtidos são apresentados em três gráficos para permitir uma observação e uma análise mais clara dos mesmos (gráficos 1,2 e 3).

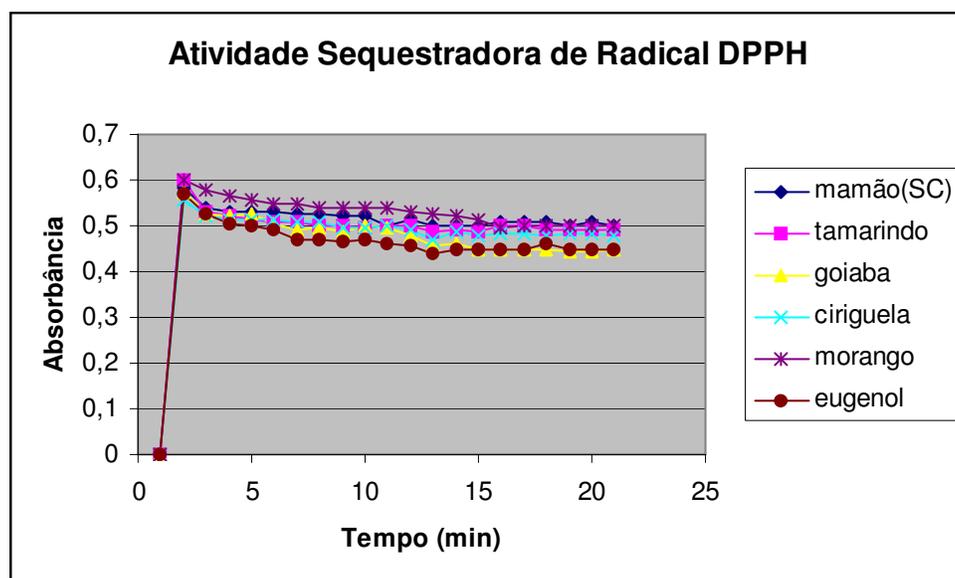


Grá

**Gráfico 1.** Variação da absorbância em função do tempo, cujos resíduos apresentaram considerável índice de varredura.



**Gráfico 2.** Variação da absorbância em função do tempo, cujos resíduos apresentaram razoáveis índices de varredura.



**Gráfico 3.** Variação da absorbância em função do tempo, cujos resíduos apresentaram modestos índices de varredura.

**Tabela 13.** Índice de varredura dos extrativos

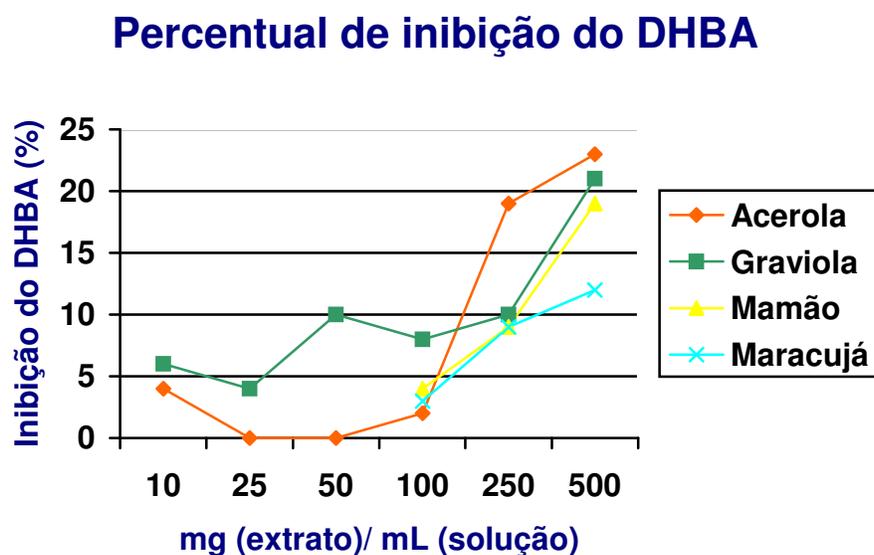
Espécie	Índice de varredura (%)
Acerola	<b>83,51</b>
Ameixa (amendoa)	48,98
Ameixa (casca)	57,12
Ciriguela	13,51
Goiaba	21,74
Graviola	<b>93,97</b>
Mamão	<b>98,92</b>
Manga	61,130
Maracujá	<b>94,94</b>
Morango	16,69
Murici	43,17
Oiti	51,93
Sapoti	26,97
Tamarindo	18,33

Dentre todos resíduos avaliados, os óleos das sementes de mamão, acerola, graviola e maracujá apresentaram os melhores índices de varredura, sendo este um forte indício de atividade antioxidante, logo, não considera-se

estes resultados como atividade pois o ensaio apenas representa a redução de concentração do radical DPPH, o que não garante que outro radical esteja sendo formado e continuando a cadeia de reação radicalar.

#### 3.4.2-Avaliação do potencial antioxidante pelo método do DHBA.

Os potenciais antioxidantes determinados pelo método do DHBA, realizados pela professora Dra. Maria Teresa Salles Trevisan dos extratos hexânicos de acerola, graviola, mamão e maracujá, estão relacionados no gráfico 4.



**Gráfico 4.** Inibição da formação de DHBA (%) por mg(extrato)/mL(solução)

A determinação do teor protéico nos resíduos estudados através do método de Bradford, mostrou resultados razoáveis notadamente para a acerola que apresentou 32,40%, ciriguela 31,02%, o tamarindo com teor de 31,35% e o maracujá (30,47%), quando se compara com um grão tipicamente brasileiro, o feijão, cujo teor proteico pode variar de 30 a 64% [Ribeiro, 2006].

A avaliação da composição lipídica mostrou que esta é formada principalmente por sete ácidos graxos, quatro saturados e três insaturados, dos quais o ácido palmítico (ácido hexadecanóico) está presente em todas as sementes estudadas, com exceção da goiaba, e na maioria delas, encontra-se como componente majoritário. As sementes de ciriguela, abacaxi, maracujá e morango apresentaram percentuais de 63,33; 60,20; 56,98 e 45,17% respectivamente.

Em relação aos ácidos graxos insaturados, nas sementes de goiaba, abacaxi e tamarindo este tipo de composto não foi detectado. Nas outras amostras, o ácido oleico (ac. 9-octadecenóico) foi o que se apresentou em maior teor obtendo-se para o morango, sapoti, acerola e graviola percentuais em torno dos 50%. O único ácido graxo duplamente insaturado que foi identificado, foi o ácido 9,12-octadecadienóico (ac. Linoleico,  $\omega 6$ ) que está presente em maior quantidade nas sementes do oiti (19,06%).

A avaliação antioxidante pelo método do DPPH apresentou consideráveis resultados, principalmente para acerola, graviola, mamão e maracujá, com índices de varredura de 83,51, 93,97, 98,92 e 94,94% respectivamente.

Não se pode, no entanto, fazer uma comparação direta entre as duas técnicas, pois o método do DPPH expressa apenas o consumo do radical DPPH no meio, tendo possibilidade de formação de outro radical. Uma vez que o método do DHBA está diretamente fundamentado na interrupção da cadeia de reação de um radical, este expressa efetivamente o potencial anti-oxidante. No entanto, a avaliação anti-oxidante dos extratos hexânicos, pelo método do DHBA, comprovou a atividade anti-oxidante destes resíduos, porém em resultados menos expressivos. Obtendo-se um percentual de inibição de DHBA de 23% para acerola, 21% para graviola, 19% para o mamão e 12% para o maracujá.

### 3.5- Extrações sucessivas e seletivas de metabólitos secundários das sementes de maracujá

A tabela abaixo apresenta as condições de extração selecionadas, baseado nas combinações de condições que variaram em temperatura, pressão e volume de co-solvente, no caso, o co-solvente utilizado foi o álcool metílico.

**Tabela 14-** Condições de extração de metabólitos secundários das semente de maracujá em CO<sub>2</sub> supercrítico

Condições	Temperatura °C	Pressão Atm	Teor de metanol como o co-solvente v/m na amostra
1	40	100	20
2	40	100	50
3	60	100	20
4	60	100	50
5	60	120	20
6	60	120	50

**Tabela 15-** Teor de extrativos nas diferentes condições de extração em CO<sub>2</sub> das sementes de maracujá

Condições de Extração	Teor de Extrativos
1	(2,3461g) 1,7%
2	<b>(8,6651g) 6,4%</b>
3	(1,5317g) 1,1%
4	(5,8372g) 4,3%
5	(0,8653g) 0,6%
6	(3,6489g) 2,7%

A condição de extração 2 (40°C, 100 atm e 50% de co-solvente), apresentou teor de extrativos maior que as outras condições.

**Tabela 16-** Classes de substâncias pertencentes à cada uma das condições de extração em CO<sub>2</sub> supercrítico das sementes de maracujá

condições Compostos	1	2	3	4	5	6
<b>Fenóis</b>	+	+	-	-	+	+
<b>Xantona</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Flavanona</b>	-	+	+	+	-	+
<b>Esteróide</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Triterpenóide</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Catequina</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Tanino</b>	-	+	-	+	-	-
<b>Antocianina</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Flavanonol</b>	-	+	+	+	-	-

A tabela acima mostra a baixa seletividade da condição 2, logo as condições com melhor relação de seletividade e teor de extrativos foram 1, 4 e 6, que foram selecionadas para extrações exaustivas dos resíduos do maracujá.

**Tabela 17-** Classes de substâncias pertencentes aos extratos obtido nas três condições selecionadas para extração de 2,100 kg de semente.

<b>Condições</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<b>Compostos</b>			
<b>Fenóis</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Xantona</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Flavanona</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Esteróide</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Triterpenóide</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Catequina</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Tanino</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Antocianina</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Flavanonol</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>

Na tabela acima observa-se a eficiência da condição 1 em extrair seletivamente xantonas, esteróides e triterpenóides de forma a não serem detectados nas outras condições. Bem como é nítida a seletividade de não extração de flavanona para esta condição

A condição 4 se mostra seletiva para taninos e flavanonol, assim como antocianinas são extraídas apenas na condição 6.

Com os resultados obtidos da prospecção química, selecionou-se três conjuntos de condições de extração para viabilizar a extração em quantidades mais significativas, haja visto que no equipamento disponível era possível extrair uma massa máxima em torno de 120 g.

Por motivos de rendimento e seletividade de substâncias extraídas selecionou-se as condições 1, 4 e 6. Nestas condições, extraiu-se 2,100 kg em que cada porção de 120g é extraída em cada uma das três condições, totalizando 51 extrações.

Os extratos obidos nas condições 1, 4 e 6, pesaram respectivamente 28,5992g; 97,8705 e 53,1732g.

Do extrato da condição 6 (53,1732g), parcialmente solúvel em metanol, foi realizado um coluna cromatográfica de sílica, resultando na obtenção de uma solução amarela eluída com metanol e acetato de etila 1:1.

A solução amarela oxida-se em temperatura ambiente levando a formação de um precipitado violeta e insolúvel na solução em que foi obtido denominado de PSCV. O precipitado, no entanto, mostrou-se parcialmente solúvel em piridina e DMSO, obtendo-se para o teste de ponto de fusão uma faixa de 254,4<sup>o</sup>-261,9<sup>o</sup>.

### 3.5.1- Caracterização preliminar de PSCV

O espectro de absorção na região do infravermelho da amostra PSCV (Figura 33) mostrou uma banda em 3420 cm<sup>-1</sup> característica de deformação axial de ligação O-H, duas bandas em 2922 e 2852 cm<sup>-1</sup> de deformação axial de ligação C-H, em 1619 cm<sup>-1</sup> de deformação axial de C=O de carbonila quelada, 1458 e 1400 cm<sup>-1</sup> de deformação axial de ligação C=C de sistema aromático e duas bandas em 804 e 668 cm<sup>-1</sup> de deformação angular de ligação OH.

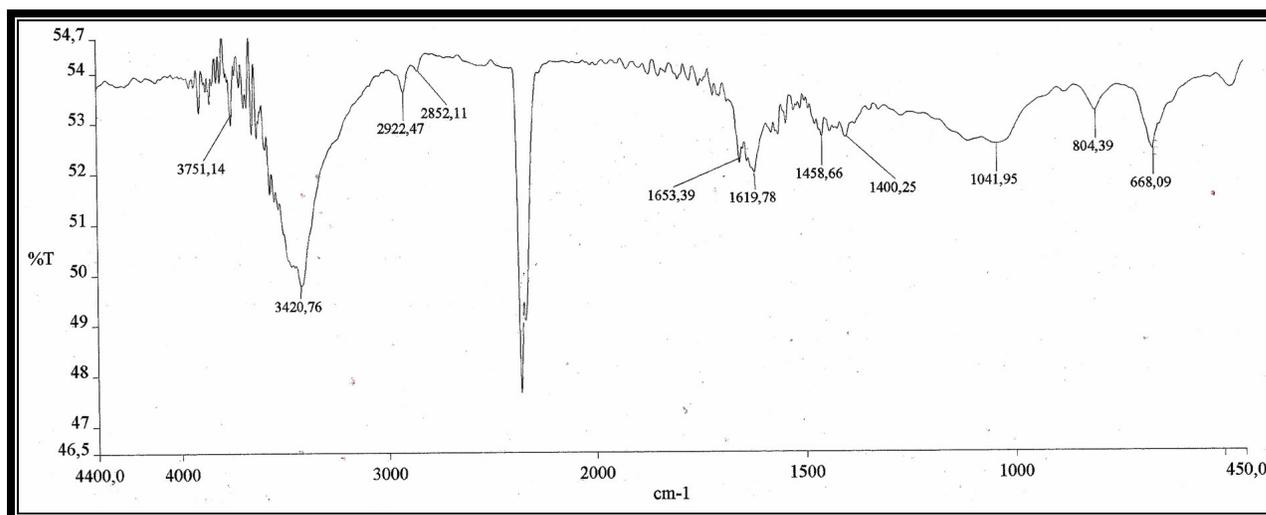
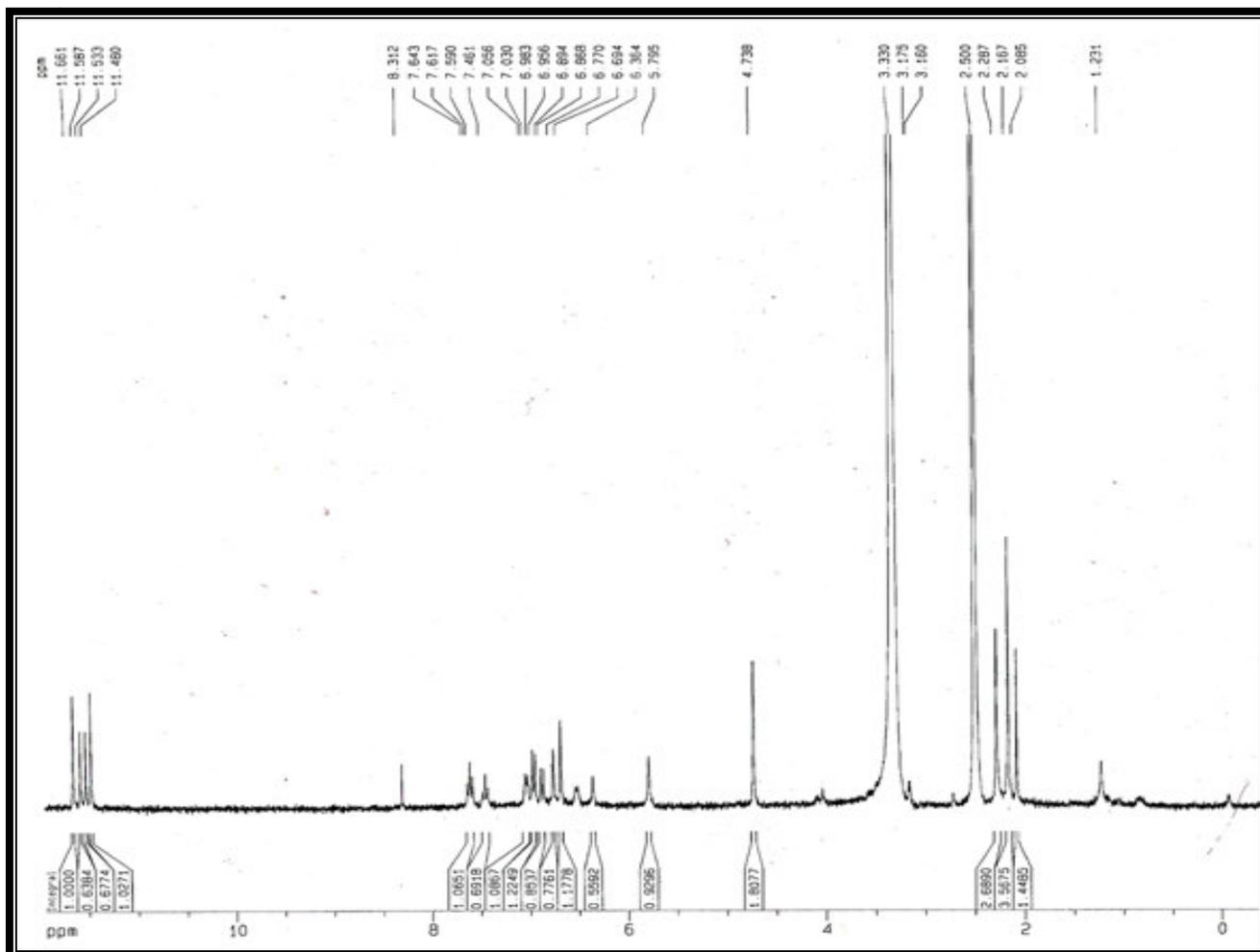


Figura 33- Espectro de absorção de infravermelho de PSCV.



**Figura 34-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO) de PSCV.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO), (Figura 2) de PSCV permitiu propor que PSCV se trate de uma mistura de substâncias, cujos sinais em  $\delta$  7,61 (triplete), 7,46 (triplete) e 6,96 (dubleto de triplete) são característicos de hidrogênios aromáticos. Mostrou também sinais simples localizados em região de desproteção,  $\delta$ 11,66 (simples),  $\delta$ 11,59 (simples),  $\delta$ 11,53 (simples) e  $\delta$ 11,48 (simples) possivelmente referentes a hidroxilas aromáticas queladas por ligação de hidrogênio. E um sinal em  $\delta$  4,74 (simples) provavelmente de hidrogênio ligado a um carbono oxigenado.

Com os dados de absorção na região de infravermelho e RMN  $^1\text{H}$  pode-se dizer que se trata de uma mistura de substâncias aromáticas com hidroxilas e carbonilas possivelmente presente nos dois compostos da mistura. Os grupos

---

funcionais detectados, estão de acordo com o esperado para a condição 6, que como mostrado acima, extraiu compostos fenólicos e aromáticos.

O estudo continua no sentido de caracterizar inequivocamente as substâncias detectadas.

## 4 - PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. MATERIAL BOTÂNICO

Avaliou-se a composição lipídica, protéica e potencial antioxidante de sementes de quatorze espécies de frutas tropicais em indústrias de processamento de frutas no estado do Ceará.

**Tabela 18**– Amostras das espécies estudadas

<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Parte estudada</b>
<i>Malpighia glabra</i> L.	Acerola	Sementes
<i>Ananas comosus</i> L.	Abacaxi	Cascas
<i>Prunus domestica</i> L.	Ameixa	Casca e amêndoas das sementes
<i>Spondias purpurea</i> L.	Ciriguela	Sementes
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiaba	Sementes
<i>Annona muricata</i> L.	Graviola	Sementes
<i>Carica papaya</i> L.	Mamão	Sementes
<i>Mangifera indica</i> L.	Manga	Sementes
<i>Passiflora edulis</i> S.	Maracujá	Sementes
<i>Fragaria vesca</i> L.	Morango	Frutos
<i>Byrsonima crassifolia</i> H. B. K.	Murici	Sementes
<i>Moquilea tomentosa</i> Benth.	Oiti	Sementes
<i>Achras sapota</i> L.	Sapoti	Sementes
<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindo	Sementes

#### 4.1.2. Obtenção e tratamento das amostras

Lavou-se e secou-se, à temperatura ambiente, as sementes obtidas. Devido a características particulares dos resíduos de ameixa e morango, estes receberam um tratamento diferenciado.

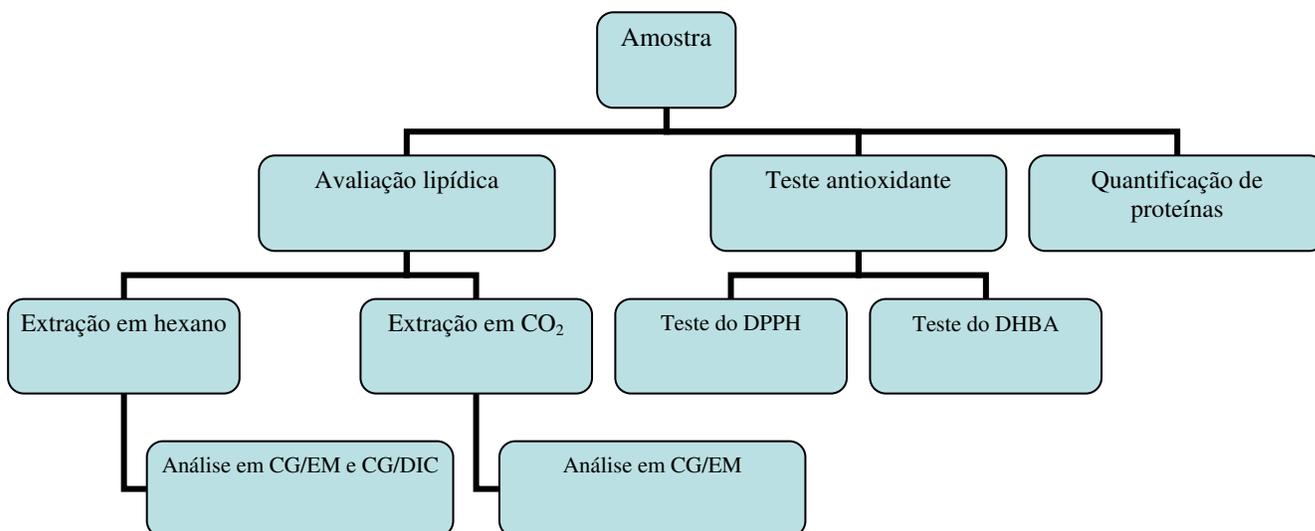
A semente de ameixa é composta por uma amêndoa e um duro invólucro (casca). Estas sementes foram quebradas e separou-se casca e amêndoa. Foram analisados separadamente os óleos da casca e da amêndoa.

O morango é composto por pequenos grânulos duros, sendo estes os frutos, envolvidos por uma massa pastosa. O fruto foi então separado e analisado.

Após lavagem e secagem durante cinco dias, todos os resíduos foram triturados para posterior extração e análise de composição protéica, lipídica e antioxidante.

## 4.2. MÉTODOS

As amostras obtidas em indústrias da região foram submetidas a testes e análises como descreve o fluxograma 1.



**Fluxograma 1-** Procedimentos aos quais submeteram-se as amostras

### 4.2.1. Determinação do teor protéico

Estimou-se o teor de proteínas por um método colorimétrico convencional, em que se usa o corante coomassie brilliant blue em solução etanólica acidificada com ácido fosfórico (reagente de Bradford).

#### *a) Extração e Isolamento das Proteínas*

Para determinação do teor protéico utilizou-se o método de Bradford. Em três porções de 1g de resíduo lavado e seco adicionou-se 10mL de solução tampão Tris-HCl (ph 7,5). Após cinco horas de maceração em solução tampão retirou-se as impurezas por filtração à vácuo. Em seguida submete-se a solução filtrada à centrifugação por dez minutos, na qual separa-se as proteínas pela formação de um precipitado. Lavou-se o precipitado com solução de ácido tricloro-acético e a este se acrescentou 5mL de NaOH 1mol/L.

#### *b) Análise Espectrofotométrica*

Da solução alcalina retira-se 0,1mL e dilui-se com água destilada para 5mL. Retira-se uma alíquota de 0,1mL do diluído, para análise em triplicata, e adiciona-se 2,5 mL do reagente de Bradford em cada alíquota para leitura em espectrofotômetro à 595 nm. O teor de proteínas é diretamente proporcional à absorbância, pois o produto formado pela reação entre a proteína e o corante coomssie brilliant blue presente no reagente de Bradford absorve fortemente em 595 nm.

### *4.2.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA*

#### *a) Extração dos ácidos graxos com hexano*

Pesou-se em média cerca de 20g de resíduo lavado e seco e submeteu e esta massa à extração hexânica em aparelho de soxhlet e aquecimento por aproximadamente 80 min. Os extratos obtidos foram submetidos ao tratamento com sulfato de sódio e breve aquecimento para evaporação do solvente. Posteriormente o extrato foi pesado e calculou-se o

rendimento de extrativos em massa seca, com base na umidade de cada resíduo.

#### *b) Extração de lipídios em CO<sub>2</sub> supercrítico*

Extrauiu-se em supercrítico os constituintes lipídicos das sementes de graviola, acerola, sapoti, maracujá, morango e mamão. Utilizou-se quantidades em torno de 120g de sementes lavadas e secas, conforme descrito na preparação de amostras, para extração de cada espécie.

Para todas as extrações utilizou-se temperatura entre 33°C e 35°C, pressão de 80 atm, tempo de contato de 120 min, tempo de extração de 90 min e um volume de 6 mL (5% da massa de cada amostra) de metanol como o co-solvente indutor da polaridade do CO<sub>2</sub>.

#### *c) Saponificação*

Pesou-se cerca de 300 mg de óleo obtidos através das duas técnicas de extração. Dissolveu-se 300 mg de hidróxido de potássio em 100mL de metanol, adicionou-se o óleo a esta solução metanólica alcalina. Saponificou-se por aproximadamente uma hora sob refluxo.

Destilou-se cerca de 80% do metanol da saponificação e o volume foi restaurado com água destilada. Desta solução aquosa extraiu-se os insaponificáveis com éter dietílico em um funil de separação. Descartou-se a fase orgânica e acidificou-se a fase aquosa, contendo os sais de ácidos graxos, promovendo a protonação dos ácidos e conseqüentemente tornando-os insolúveis em água. Lavou-se novamente com éter dietílico e desta vez os ácidos foram extraídos pela fase orgânica. O éter foi evaporado obtendo-se os ácidos graxos, que foram pesados e calculou-se então o teor destes no óleo.

#### *d) Esterificação dos ácidos graxos*

Para fins de análise dos ésteres metílicos em CG/EM, esterificou-se os ácidos graxos, obtidos na saponificação descrita no item anterior, em 15 mL de metanol e ácido clorídrico ao nível de catalisador. A reação ocorreu sob

refluxo, por aproximadamente noventa minutos. Adicionou-se água destilada a amostra e extraiu-se os éteres metílicos com éter dietílico. Destes produtos de esterificação separou-se em torno de 1mg para análise em CG/EM.

#### 4.2.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.

Para estimar o potencial antioxidante dos resíduos coletados, utilizou-se o método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Bem como os resíduos de maracujá, graviola, acerola, sapoti e manga foram também avaliados pelo método do DHBA, em ensaios realizados pela professora Maria Tereza Salles Trevisan.

##### *a) Avaliação pelo método do DPPH*

Em 3,9mL de uma solução do radical DPPH adicionou-se 0,1mL da solução teste, e foi feita a leitura no espectrofotômetro a 515nm. Observa-se a redução da absorbância em intervalo de tempo de 0-300min.

Construiu-se um gráfico de absorbância x tempo, que demonstrou o índice de varredura de cada amostra. Comparou-se os resultados obtidos com o índice de varredura do eugenol, usado como padrão.

##### *b) Avaliação pelo método do DHBA*

A amostra dissolvida em metanol, foi diluída para 2 mL e centrifugada em tubos e o solvente foi removido utilizando-se um fluxo de nitrogênio. O resíduo seco em tampão fosfato (1,0 mL), e 10,0 µL de uma diluição 1:5 de xantina oxidase em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3,20 mol/L) foi adicionada para iniciar a reação. Os tubos foram incubados por 3 horas até que a reação se completasse a uma temperatura de 37°C. Depois da incubação, 20,0 µL da mistura reacional foi analisada por HPLC utilizando como método de detecção absorciometria na região do ultravioleta.

A análise em CLAE realizada em um cromatógrafo líquido Hewlett-Packard (HP) 1090, provido com uma coluna C-18, fase-reversa (5 µm) (25 cm × 4 mm

I.D.; Latex, Eppelheim, Germany). O HPLC Semipreparativo foi administrado em um cromatógrafo líquido HP 1100, provido com uma coluna C-18 (10-mm I.D.). As frações eluídas foram coletadas em um HP 220 Microplate Sampler. Os compostos lipídios fenólicos no eluente foram detectados com um UV detetor de diodos (HP 1040M) a 278 e 340 nm. As amostras de compostos lipídicos nos extratos foram determinadas em comparação com curvas de materiais puros.

#### *4.3- EXTRAÇÃO DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS DAS SEMENTES DE MARACUJÁ EM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO COM CO-SOLVENTE*

Com base na quantidade de publicações, na relevância das atividades biológicas relatadas, a aparente ausência de toxicidade e na disponibilidade das sementes em indústrias da região, as sementes de maracujá foram selecionadas a serem submetidas a uma etapa posterior de estudo em relação a todas as outras espécies.

##### *4.3.1- Seleção das condições de extração de metabólitos secundários em CO<sub>2</sub> supercrítico.*

Realizou-se um levantamento bibliográfico na literatura científica para determinar condições de extração para cada classe de substâncias.

Com base nos dados obtidos da literatura estipulou-se algumas combinações de condições possíveis e realizáveis no equipamento disponível, o extrator em fluido supercrítico.

Uma vez determinada as condições de extração das sementes de maracujá em CO<sub>2</sub> supercrítico, as amostras lavadas e secas foram submetidas a 120 min de contato com o fluido e seu respectivo teor de co-solvente e 30 min de extração

contínua, mantendo-se pressão e temperatura fixas de acordo com cada uma das seis condições pré-determinadas. Cada porção de 120 g é extraída em cada uma das seis condições, desta forma a de extração com fluido supercrítico assemelha-se a uma cromatografia, ou seja, em diferentes condições retira-se diferentes substâncias, sendo o CO<sub>2</sub> supercrítico a fase móvel e a própria matriz a fase estacionária.

#### *4.4- Prospecção e identificação das classes de substâncias pertencentes a cada conjunto de condições de extração [MATOS, 1998]*

Do extrato foram retiradas sete porções de 3-4 mL em tubos de ensaio numerados para os seguintes testes.

##### *a) Teste para fenóis e taninos*

Adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub>, agitou-se e observou-se qualquer variação na coloração ou formação de precipitado. Caso seja vermelho, positivo para fenóis, caso seja azul ou verde, positivo para taninos.

##### *b) Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.*

De posse dos tubos 2, 3 e 4, acidificou-se o tubo 2 a pH 3, alcalinizou-se o tubo 3 a pH 8,5 e o tubo 4 a pH 11.

Para o tubo 2, o surgimento de coloração vermelha representa a presença de antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas.

Para o tubo 3, o surgimento da coloração lilás confirma a presença de antocianinas e antocianidinas.

Para o tubo 4, a coloração azul confirma a presença de antocianinas e antocianidinas. O surgimento da coloração amarela representa a presença de flavonas, flavonóis e xantonas. Coloração vermelha púrpura, confirma chalconas e auronas. A coloração vermelho alaranjado representa flavanonóis.

##### *c) Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.*

Tomou-se os tubos 5 e 6, acidificou-se o primeiro por adição de HCl até pH 1-3 e alcalinizou-se o segundo tubo com NaOH até pH 11. Cuidadosamente, aquece-se os tubo por 2 min e observa-se qualquer mudança de coloração.

Ao tubo 5, a coloração vermelha identifica leucoantocianidinas. A coloração pardo-amarelada, confirma catequinas.

Ao tubo 6, a surgimento de coloração laranja confirma flavanonas.

*d) Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.*

Adicionou-se ao tubo 7 alguns centigramas de magnésio granulado de 0,5 mL de HCl concentrado. Ao término da efervesceência observa-se, por comparação ao tubo 5, alguma diferença na coloração. A intensificação da cor vermelha é indicativos de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seu heterosídios.

---

## 5- CONCLUSÕES.

Dentre as sementes estudadas, as sementes de ciriguela, tamarindo e maracujá destacaram-se como uma boa fonte de proteínas.

As sementes do murici apresentaram bons resultados quanto ao teor de ácidos graxos (94%) analisados em CG/EM, porém a melhor fonte de insaturados de todas as amostras analisadas foram as sementes de oiti.

A análise dos óleos em CG/DIC mostrou que dentre as sementes estudadas, as sementes de mamão destacou-se como uma fonte promissora de ácidos graxos.

A semente da ameixa também apresentou bons resultados, principalmente no teor de extrativos e na quantidade de ácido linoleico presentes neles.

Através dos resultados obtidos pelas técnicas utilizadas, pode-se concluir que várias das amostras estudadas têm potencial antioxidante, embora esta indicação seja mais adequada através do teste do DHBA.

A extração em fluido supercrítico das sementes de maracujá apresenta-se como um método de extração seletiva tanto para extratos de composição apolar como para extratos mais polares como foi observado na mistura de compostos aromáticos obtida através de cromatografia posterior à extração, podendo ser considerado uma técnica de separação.

Correlacionando os dados e valores obtidos em teor de proteínas, rendimento de extrativos de lipídios, teor de ácidos graxos insaturados e atividade antioxidante, conclui-se que as sementes de mamão ,acerola, maracujá, graviola, sapoti e as amêndoas das sementes de ameixa se mostram como resíduos potencialmente utilizáveis como fonte de suplementação alimentar, entretanto é necessário um estudo toxicológico das amostras.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL W. S. M; HIFNAWY, M. S; AZZAM, S. M; EL GOHARY, H. M; ISAK, M. Study of carbohydrates, lipids, protein, flavonoids, vitamin C and biological activity of *Psidium guajava* L. growing in Egypt. Journal of Biomedical Sciences. V. 16, p. 35-52, 2004.

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2001.

ADEBIYI, A. ADAIKAN, P. G. and PRASAD, R. N. V. Tocolytic and toxic activity of *papaya* seed extract on isolated rat uterus. Life Sciences, v. 74, n. 5, p. 581-592, 2003.

AGARWAL, G.S; BHUPTAWAT, H.K; CHAUDHARI, S. Biosorption of aqueous chromium(VI) by *Tamarindus indica* seeds. Bioresource Technology, v. 7, n. 97, p. 949-956, 2005.

AHMED, R.; HMOOD, A.; RASHID, F.; AHMAD, Z.; NADIR, M.; NASEER, Z.; KOSAR, S. Components seed chemists (nucleus) of it tames of *Prunus*, insecticidal and antifungal activities. Diary of Saudi Chemical Society, v. 11, n. 1, p. 121-129, 2007.

AMARAL, C. M; Abacaxi pós-colheita. Informativo Cnpat-EMBRAPA, 2001.

AOAC. Official methods of analysis (15th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 1990. v. 2.

AUGUSTO, F. Métodos de separação. Disponível em: [http://www.chemkeys.com/bra/md/mds\\_11/cagced\\_2/cagced\\_2.htm](http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/cagced_2/cagced_2.htm). Acesso em: 18/01/2006.

BARNETT, Y.A., KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. Mutation Research, v.338, n.1/6, p.115-128, 1995.

BERG, J. M. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2004. 1059 p. 3

BERTALAN, L.; SZABO, F. D.; DAOOD, H.; THEN, M.; ILLES, V. Recovery of fatty oil from the Transsylvanian black currant by means of supercritical and conventional extraction. Olaj, Szappan, Kozmetika, n. 49, p. 40-45. 2000

BICCHI, C.; RUBIOLO, P.; FRATTINI, C.; Off-line supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species. Journal of Natural Products. n. 54, v. 4, p. 941, 1991

BONDET, V.; BRABD-WILLIAMS, B. and BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 30, p.609–615, 1997

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 248, 1976.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**, 3ª. Ed., Coleção Mossoroense, Mossoró, 1976.

CAI, J.; ZHANG, T.; CHEN, L. Total alkaloid extract from *Macleaya cordata* using supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction. *Zhongcaoyao*, v. 37, n. 6, p.852-854, 2006.

CAI, Z.; NI, C.; JIA, R.; SHEN, M.; WANG, H. Study on extraction technology of alkaloids from *Thermopsis lanceolate* by supercritical carbon dioxide. *Linchan Huaxue Yu Gongye*, v.26, n. 4, p. 70-72, 2006.

CASTANHO, J.R. Um processo de separação de substâncias. Disponível em: <http://jacintocastanho.planetaclix.pt/cromatografia.htm>. Acesso em: 18/01/2006.

CHAU, C. F. e HUANG, Y. L. Effects of fibre derived from passion fruit seed on the activities of ileum mucosal enzymes and colonic bacterial enzymes in hamsters. *Food Chemistry*, v. 85, n 2, p. 189-194, 2004.

DIOUF, J. FAO: Fome mata 6 milhões de crianças por ano. Disponível em: [http://www.vermelho.org.br/diario/2005/1123/1123\\_fao\\_fome.asp](http://www.vermelho.org.br/diario/2005/1123/1123_fao_fome.asp). Acesso em 22/11/2007.

DUAN, H.; LI, S.; ZHOU, W.; LI, H.; TENG, J.; ZHANG, Y. Method for extracting active terpenoids from *Tripterygium wilfordii* with supercritical CO<sub>2</sub>. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*. 2007.

EVANS, G. S.; GROCHOSKI, G.; RANDOLPH, K.; CONNOR, L. M.; SCIMECA, J. V.; GELLENBECK, K. W.; MAYNE, J. R.; ROH-SCHMIDT, H.; SLAGA, T. J.; HANAUSEK-WALASZEK, M.; WALASZEK, Z. Methods and equipments with antioxidants for reducing cellular damage, inhibiting radical production free, and to clean the radicals free in mammals. *Pat americana. Appl. Publ.* 11 pp, 2005.

GAO, Y.; YOU, H.; CHEN, Q.; HE, X.; CHEN, C. Soft capsules containing extracts from *Eucommia* and *Perilla* seed oils rich in  $\alpha$ -linolenic acid. *Shipin Kexue*, v. 23, n. 8, p. 154-157, 2002.

GIANNUZZO, A. N.; BOGGETTI, H. J.; NAZARENO, M. A.; MISHIMA, H. T.

Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. *Phytochemical Analysis*, v. 14, n. 4, p. 221-223, 2003.

GIUFFRÉ, A. M; Chemical composition of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims var. *edulis*) seed oil. *Rivista italiana delle sostanze grasse*. v. 84, n.2, p. 87-93, 2007.

GONG, G.; WANG, H.. Supercritical carbon dioxide extraction process for coumarin compounds from *Rhodiola sacra*. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2005.

GRELLMANN, E. O; SIMONNETO, P. R; A cultura da amexeira, *Boletim FEPAGRO*, 1993.

IRVAN, H.; FAISAL, M.; DAIMON, H.; FUJIE, K. Supercritical carbon dioxide extraction of ubiquinones and menaquinones from activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 69, n. 5, p. 506-509, 2006.

KABUKI, T.; NAKAJIMA, H.; ARAI, M. U.; KUWABARA, Y. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *Food Chemistry*, v. 71, n 1, p. 61-66, 2000.

KAEWKROM, P; GAJASENI, J. Floristic regeneration in five types of teak plantations in Thailand. *Forest Ecology and Management*, v. 210, n 1-3, p. 351-361, 2005.

KANCHANAMAYOON, W; KANENIL, W. Determination of some fatty acids in local plant seeds. *Chiang Mai Journal of Science*. v. 34, n. 2, p. 249-252, 2007.

KERMANSHAI, R; McCARRY, B E; ROSENFELD, J; SUMMERS, P S. Production of plant secondary metabolites using adsorption and elicitation in cell suspension culture. *Phytochemistry*, v.57, n 3, p. 427-435, 2001.

KHATRI, L. M; NASIR, M. K. A.; SALEEM, R; NOOR, F. Characteristics and chemical composition of the fixed oil of *Achras zapota* seeds. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. v. 38, n. 11-12, p. 28-429, 1995.

KOTAKE, Y.; OKUDA, K.; KAMIZONO, M.; MATSUMOTO, N.; TANAHASHI, T.; HARA, H.; LEFEBVRE, D. C.; and OHTA, S. Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* , v. 806, n.1, p.75-78. 2004.

LANS, C; HARPER, T; GEORGES, K; BRIDGEWATER, E, Properties of *Carica papaya* L. (Papaya) seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods. Preventive Veterinary Medicine, V. 45, n. 12, p. 201-220, 2000.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L.; COX, M. M, **Principles of biochemistry**, 4º ed; p. 75-84, 2005.

LI, Z.; YIN, D.; HU, J.; SHI, A.; OUYANG, Y. Study on extracting flavonoids from *Artemisia capillaris* Thunb. by supercritical carbon dioxide. Linchan Huaxue Yu Gongye , v. 26, n. 3, 66-68, 2006.

LOUSADA JUNIOR, J. E.; COSTA, J. M. C; NEIVA, J. M. N. e RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. Revista Ciência Agronômica, v.37, n.1, p.70-76, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; *J. Biol. Chem.* P.93, 1951.

LU, H.; NI, W.; LIANG Y.; MAN R.. Extraction of organic substances from diluted aqueous solutions by supercritical carbon dioxide. Journal of separation science, v. 29, n.14, p. 2136-42, 2006.

MACEDO, E.M.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de leguminosas do nordeste do Brasil**. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará. Monografia de graduação-UFC, 2003.

MAITI, R; JANA, D; DAS, U K; GHOSH, D. Journal of Ethnopharmacology, v. 92, n 1, 2004, p. 85-91.

MANICA, I; **Fruticultura tropical: Mamão**, Ed Agrônoma Ceres, 1982.

MATOS, F.J.A., **Introdução á Fitoquímica Experimental**, 2ª ed., Fortaleza: EUFC, 1998.

MATOS, F.J.A., **Plantas medicinais**, 2ª ed., Fortaleza: Imprensa Universitária –UFC, 2000.

MEDINA, J. G; GARCIA, J. L. M; KATO, K; MARTIN, Z. J; VIEIRA, L.F; RENESTO, O. V. Goiaba: da cultura ao processamento e comercialização. CNPAT. p. 105, 1978.

MI, H.; Qu, L.; Ren, Y. Study on extraction of coumarins in *Cnidium monieri* by supercritical CO<sub>2</sub> and separation of compositions analysis. Zhongguo Zhongyao Zazhi, v. 30, n. 14, p. 1080-1082, 2005.

MOURA, E.C. Segurança Alimentar e Nutricional. Disponível em: [http://www.rebidia.org.br/dicas/segalim/dicas\\_seguralim.htm](http://www.rebidia.org.br/dicas/segalim/dicas_seguralim.htm). Acesso em 22/11/2005.

NAKAMURA, Y; YOSHIMOTO, M; MURATA, Yi; SHIMOISHI, Y; ASAI, Y; PARK, E; SATO, K; NAKAMURA, Y. Papaya Seed Represents a Rich Source of Biologically Active Isothiocyanate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 55, n. 11, p. 4407-4413, 2007.

NIRMAL, K.; LOHIYA, N. P.; PRADYUMNA, K.; MISHRA and MANIVANNAN, B. Efficacy trial on the purified compounds of the seeds of *Carica papaya* for male contraception in albino rat.. Reproductive Toxicology, v. 13, n 1, p. 59-66, 1999.

NIRMAL, K.; LOHIYA, N. P.; PRADYUMNA, K.; MISHRA and MANIVANNAN, B.; SATISH, S.; BHANDE, S. P. and SRIRAM, S. Toxicological investigations on the methanol sub-fraction of the seeds of *Carica papaya* as a male contraceptive in albino rats. Reproductive Toxicology, v. 20, n. 1, p.135-148, 2005.

NUNES, A. V. M.; MATIAS, A. A.; NUNES, M.; DUARTE, C. M. M. Quaternary Phase Equilibria for scCO<sub>2</sub> + Biophenolic Compound + Water + Ethanol Journal of Chemical & Engineering Data. v. 52, n. 1, p. 244-247, 2007.

NYANZI, S. A.; CARSTENSEN, B; SCHWACK, W. A comparative study of fatty acid profiles of Passiflora seed oils from Uganda. Journal of the American Oil Chemists' Society. v. 82, n. 1, p. 41-44, 2005.

OWEN, R. W; MIER, W; GIACOSA, A; HULL, E; SPIEGELHALDER, B. and BARTSCH, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. Food and chemical toxicology. v. 38, n. 8, p. 647-659.

PEIXOTO, J., Azoto KJELDAHL – TKN, disponível em <http://www.biologica.eng.uminho.pt/TAEL/downloads/analises/azotokjeldhal.pdf> Acesso em: 22/01/2008.

PENG, J.; FAN, G.; CHAI, Y.; WU, Y. Isolation and extraction of total flavonoids

from *Epimedium koreanum* Nakai by supercritical fluid extraction. Journal of Chromatography, A. V.1102, n.1-2, p. 44-50, 2006.

PEREZ, G. R. M; SANCHEZ A. J; PEREZ G. S; Vargas S. R. An analytical study of gums from *Leucaena glabrata* and *Spondias purpurea*. Journal of the Science of Food and Agriculture. v. 68, n. 1, p. 39-41, 1995.

PIOMBO, G; BAROUH, N; BAREA, B; BOULANGER, R; BRAT, P; PINA, M; VILLENEUVE, P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). Lipides. v. 13, n. 2-3, p. 195-199, 2006.

REZENDE, C. M; FRAGA, S. R. G. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.) Journal of the Brazilian Chemical Society. v 14, n. 3, p. 425-428, 2003

RIBEIRO, N.D.; POERSCH, N.L.; CARLOS FILHO, A.C.; LONDERO, P.M.G. Dissimilaridade genética para proteína e fibra em grãos de feijão dos grupos preto e de cor. Disponível em: [http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe\\_2005-0032.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe_2005-0032.pdf). Acesso em 25/012006.

RINCON, J.; DE LUCAS, A.; GARCIA, M. A.; GARCIA, A.; ALVAREZ, A.; CARNICER, A. Preliminary study on the supercritical carbon dioxide extraction of nicotine from *tobacco* wastes. V. 33, n. 3, p. 411-423, 1998.

SAIRAM, K.; HEMALATHA, S.; KUMAR, A.; SRINIVASAN, T.; GANESH, J.; SHANKAR, M.; VENKATARAMAN. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. Journal of Ethnopharmacology, v. 84, n 1, p. 11-15, 2003.

SAKA, S.; LIN, L. Supercritical fluid extraction of polar analytes using modified carbon dioxide and in situ chemical derivation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005.

SALDANA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S. Extraction of the alkaloids: caffeine and trigonelline from coffee beans using supercritical CO<sub>2</sub>. Food Science and Technology v.17, n. 4, p. 371-376, 1997.

SANTANA, L. L. B.; CARDOSO, L. A.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, V. F.; COSTA, T. A. C.; NOBREGA, D. A.; HOHLEMWERGER, S. V. A.; VELOZO, E. S. Selectivity in the extraction of 2-quinolone alkaloids with supercritical CO<sub>2</sub>. Brazilian Journal of Chemical Engineering. v. 23, n. 4, p. 525-530, 2007.

SANTANA, L. R. R; MATSUURA, F. C. A. U; CARDOSO, R. L. **GENÓTIPOS**

**MELHORADOS DE MAMÃO (*Carica papaya* L.): AVALIAÇÃO SENSORIAL E FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS. Ciência e tecnologia de alimentos. v. 24, n. 2, p. 2217-222, 2004**

SANTOS, A. M; **A cultura do morango**. Coleção plantar. EMBRAPA-SPI. n. 7, 1993.

SIDDJURAJU, P. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. V. 40, n. 6, p. 982-990, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. European Journal of Biochemistry, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SINGH, P. D. A.; SIMON, O. R.; WEST, M. E. Acute toxicity of seeds of the sapodilla (*Achras sapota* L.). Toxicon. V. 22, N. 1, P. 145-7, 1984.

SOLIS, A.; LUNA, H.; PÉREZ, H. I. and MANJARREZ, N. Evaluation of guanabana (*Annona muricata*) seed meal as a source of (S)-oxynitrilase. Tetrahedron: Asymmetry, v.14, n 16, p. 2351-2353, 2003.

SOLOMONS, T.W.GRAHAM. **Química Orgânica 1**, Tradução de Macedo, H. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S/A, 1996.

SOONG, Y; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. Food Chemistry. v. 97, n.3, p. 524-530, 2006.

SOUZA, F. X; **Spondias agroindustriais e seus métodos de propagação**. EMBRAPA-Cnpq, 1998.

SUDJAROEN, Y.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; HULL, W. E.; ERBEN., G.; SPIEGELHALDER, B.; CHANGBUMRUNG, S.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Cosmetics containing vitamins and natural products in separate containers. Food And Chemical Toxicology. v. 43, n 11, p. 1673-1682, 2005.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A J. Production of plant secondary metabolites using adsorption and elicitation in cell suspension culture Journal of Ethnopharmacology, v. 61, n 1, p. 57-65, 1998.

TRATADO DA FAO SOBRE FITOGENÉTICOS. Disponível em: [http://www.comciencia.br/200407/noticias/4/tratado\\_fao.htm](http://www.comciencia.br/200407/noticias/4/tratado_fao.htm). Acesso em: 17/06/2007.

VANDANA, V.; TEJA, A. S.; ZALKOW, L. H. Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *Taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide+ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*. V. 116, n. 1-2, p. 162-9, 1996.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*. v. 105, n. 1, p. 36, 2007.

WÉLÉ, A.; ZHANG, Y.; CAUX, C.; BROUARD, J. P.; POUSSET, J. L. and BODO, B. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*). *Comptes Rendus Chimie*, v. 7, n.10-11,p. 981-988, 2004.

WU, L; LU, Y; ZHENG, Q; TAN, N; LI, CHAO, Z. Study on the spatial structure of annomuricatin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona*. *Journal of Molecular Structure*. v. 827, n. 1-3, p. 145-148, 2007.

YEAN, S. and BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*. v. 88, n. 3, p. 411-417, 2005.

YU, J. G.; GUI, H. Q.; LUO, X. Z.; and SUN, S. Muricatalicin, a new pentahydroxy derivative of acetogenin from *Annona muricata* (Annonaceae). *Phytochemistry*, v. 49, n. 6, p. 1689-1692, 1998.

YU, J.; DANDEKAR, D. V.; TOLEDO, R. T.; SINGH, R. K.; PATIL, B. S. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. *Food Chemistry*. v. 105, n. 3, p. 1026-1031, 2007.

YUAN, H.; PENG, G.; ZHENG, Y. Isolation of protopine and etrahydropalmatine in *Corydalis yanhusuo* by packed-column supercritical fluid chromatography. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*. V. 19, n. 2, p. 283-285, 2007.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. *Quím. Nova* v. 21 n. 6, 1998.