



IREDE ANGELA LUCINI DALMOLIN

**“USO DE SEMENTES DE UVA, UM RESÍDUO DA
AGROINDÚSTRIA VINÍCOLA, EMPREGANDO
TECNOLOGIAS SUPERCRÍTICAS”**

CAMPINAS
2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

IREDE ANGELA LUCINI DALMOLIN

**“USO DE SEMENTES DE UVA, UM RESÍDUO DA
AGROINDÚSTRIA VINÍCOLA, EMPREGANDO
TECNOLOGIAS SUPERCRÍTICAS”**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista

Co-orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA IREDE ANGELA LUCINI DALMOLIN E
ORIENTADA PELO PROF. DR. EDUARDO AUGUSTO CALDAS BATISTA

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

D169u Dalmolin, Irede Angela Lucini
Uso de sementes de uva, um resíduo da agroindústria
vinícola, empregando tecnologias supercríticas / Irede
Angela Lucini Dalmolin. -- Campinas, SP:[s.n.], 2012.

Orientador: Eduardo Augusto Caldas Batista.
Coorientador: José Vladimir de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Sementes de uva. 2. Fluido supercrítico. 3.
Dados de equilíbrio de fases. 4. Extração. 5.
Encapsulamento. I. Eduardo Augusto Caldas Batista. II.
Oliveira, José Vladimir de. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Use of grape seed, a residue from wine agroindustry
employing supercritical technologies

Palavras-chave em Inglês:

Grape seeds

Supercritical fluid

Phase equilibrium data

Extraction

Encapsulation

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Eduardo Augusto Caldas Batista [Orientador]

Losiane Cristina Paviani Diehl

Julian Martínez

Wagner Luiz Priamo

Lúcio Cardozo Filho

Data da defesa: 27-03-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista – Orientador

Dr.^a Losiane Cristina Paviani Diehl – Membro Titular
DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Julian Martínez – Membro Titular
DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo – Membro Titular
IFRS/Campus Sertão

Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho – Membro Titular
DEQ/CT/UEM

Prof.^a Dr.^a Alessandra Lopes de Oliveira – Membro Suplente
DEA/FZEA/USP

Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana – Membro Suplente
DEQ/UFC

Dr. Luis Alberto Folegatti Romero – Membro Suplente
DEQ/FEQ/UNICAMP

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Nilson e ao meu irmão, Nerildo. Mais importante que um título é saber que vocês sentem orgulho de mim.

À memória de minha mãe, Zenir. Em sua coragem me inspirei.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”
Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Esta tese não é apenas mérito meu. É justamente nesta seção que posso nomear os outros responsáveis, cada um com seu papel, todos indispensáveis à materialização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo, pela amizade e por mais uma vez acreditar no meu trabalho. Agradeço também por ser um exemplo de amor pela ciência e competência em ensinar.

Ao meu co-orientador, Prof. Vladimir, pela amizade, por sempre me cativar e mesmo quando longe conseguir ser tão atencioso.

À Prof.^a Maria Angela Meireles, agradeço por sua imensa generosidade.

Aos professores Papa Ndiaye e Marcos Corazza, por tornar a etapa de modelagem “simples”.

Às jovens pesquisadoras, alunas de iniciação científica, Alana de Cezaro e Aline Rigo, minhas “chefes” amadas.

Aos meus ajudantes, nonno Narciso (*in memorian*) e pequenina Ariana. A melhor companhia na etapa braçal de separação das sementes. Duas fases extremas da vida, me mostrando o lado terno de tudo.

A toda minha família, especialmente meu pai Nilson, nonna Élide, tia Eclaer e minha “irmãzinha” Marciele, pelo amor sem igual.

À D. Elzira Brandalise e seus filhos, minha segunda família.

Ao Guilherme Sanaioti, por me dar a mão, o colo e não desistir de nós durante estes quatro anos.

Aos meus amigos, Losiane Paviani Diehl, Gustavo Diehl, Mariana Costa, Elisvânia Santos, Marcelo Sampaio, Caroline Hardt, Marcos Aiolfi, Priscila Rohden, Lindomar Lerin, Daiane Boschetto, Luciane Batistella, Maitê Santos, Alexssandra Valerio, Gustavo Borges, Juliana De Conto, Sabrina Corassa, Fabiana Dal Magro, os levarei no coração por onde eu for. Saber que tenho a amizade de vocês me fortalece.

Aos colegas de pós-graduação e amigos Guilherme Maximo, Larissa Bessa, Marcela Cravo, Luiz Fasolin, Priscilla Veggi, Simone Monteiro e Silva, Isabel Debien, Renata Vardanega, Giovani Zabet, Andrea Limoeiro, Lorena Garcia, Rejane Castro, César Sodré, agradeço por tornarem minha vida em Campinas agradabilíssima.

Aos colegas de apartamento, Luciana Monks, Camila Grando, Patrícia Costa, Graciele Kuhn, Claudia Trentin, Claudia Menegola, Danielle Cardoso e César Piedrahíta-Aguirre.

Aos colegas do ExTrAE, Rodrigo Basso, Patrícia Castro, Taiana Deboni, Telma Porcina, Maitê Cuevas, Marina Ansolin, Luciana Previato, Rafael Falleiro, Júlia Teixeira, Natália Carareto, Simone Shiozawa, Magno Oliveira, Fábio Batista e Tábata Garmus.

Aos técnicos do ExTrAE, Camila Sousa, Thomás Crespo, Sérgio de Toledo e Silva, Paulo Mielke Neto, Bruna Candiani Lessio e Patrícia de Souza.

Ao prof. Fernando Cabral, por me encorajar a lecionar.

Aos professores Antônio José Meirelles, Débora de Oliveira, Helen Treichel, Rogério Cansian, Rogério Dallago, Marcio Mazutti, Carlos Grosso, pelas contribuições e apoio didático.

Ao LASEFI, especialmente Juliana Prado e Ariovaldo Astini.

A todos do Lab. de Termodinâmica Aplicada da URI-Campus de Erechim.

Ao Daniel Razzo do Lab. de Microscopia do IQ/UNICAMP.

Ao Lab. de Óleos e Gorduras, especialmente ao Renato Grimaldi, Priscila Silva, Ingrid Oliveira, Letícia Shiroma, Lectícia Silva, Carolina Yumi.

Aos secretários, Cosme, Marcos, Mauro, Frederico e Reinaldo.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite, pelas sugestões e correções.

À Vinícola Villa Francioni, pela doação do resíduo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e BIOEN/PRONEX FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XXI
RESUMO.....	XXIII
ABSTRACT.....	XXV
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ESCOLHA DA MATÉRIA-PRIMA	2
1.2 MOTIVAÇÃO	3
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
3.1 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	7
3.2 EXTRATO DE SEMENTES DE UVAS	8
3.2.1 <i>Processos de obtenção de extratos vegetais</i>	11
3.3 EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES.....	12
3.3.1 <i>Metodologias Experimentais</i>	21
3.4 MODELAGEM TERMODINÂMICA E CÁLCULO DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES	22
3.5 FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO.....	25
3.5.1 <i>Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como solventes</i>	26
3.5.2 <i>Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como solutos</i>	28
3.5.3 <i>Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como antissolventes</i>	30
3.6 BREVES CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	33
CAPÍTULO 4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37

4.1 MATERIAL	37
4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	38
4.3 EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE).....	41
4.3.1 <i>Obtenção do extrato de sementes de uva em escala piloto</i>	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA	44
4.5 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA	48
4.6 MEDIDA DE DENSIDADE DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA	48
4.7 DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE FUSÃO E CRISTALIZAÇÃO POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	49
4.8 SOLUBILIDADE DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA EM SOLVENTES ORGÂNICOS	49
4.9 DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES	51
4.9.1 <i>Equação de Peng-Robinson e descrição do equilíbrio de fases a altas pressões</i>	58
4.10 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE POLÍMERO E ENCAPSULAMENTO DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA	60
4.10.1 <i>Tamanho e morfologia das partículas</i>	69
4.10.2 <i>Percentual real de encapsulamento</i>	69
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	71
5.2 EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE).....	74
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA	76
5.4 EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES	87
5.4.1 <i>Sistemas contendo CO₂; Extrato de Sementes de Uva e Etanol</i>	87
5.4.2 <i>Sistemas contendo CO₂; Extrato de Sementes de Uva e Diclorometano</i>	102
5.5 MICROPARTÍCULAS DE BIOPOLÍMERO E ENCAPSULAMENTO DO EXTRATO DE SEMENTES DE UVA	111
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	123
CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS	125
APÊNDICES	137

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento experimental do estudo de encapsulamento do extrato de sementes de uva em PHBV pela técnica SEDS.	68
Tabela 2. Classificação por tamanho de partículas e diâmetro médio geométrico.....	72
Tabela 3. Composição em ácidos graxos do extrato de sementes de uva obtido a partir das sementes do Lote 1.	77
Tabela 4. Composição em ácidos graxos do extrato de sementes de uva obtido por SFE a partir das sementes do Lote 2.	78
Tabela 5. Composição provável em triacilgliceróis do extrato de sementes de uva.	80
Tabela 6. Composições em acilgliceróis e ácidos graxos livres do extrato de sementes de uva.	81
Tabela 7. Características físico-químicas do extrato de sementes de uva.	82
Tabela 8. Conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis no extrato de sementes de uva.	83
Tabela 9. Conteúdo de esteróis presentes no extrato de sementes de uva ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).	85
Tabela 10. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO_2 + Extrato de Sementes de Uva + Etanol	88
Tabela 11. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO_2 + Extrato de Sementes de Uva + Etanol. ESU com conteúdo de água reduzido para 0,135 %.	94
Tabela 11. (Continuação) Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO_2 + Extrato de Sementes de Uva + Etanol. ESU com conteúdo de água reduzido para 0,135 %.....	95

Tabela 12. Parâmetros de interação do sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) + CO ₂ + etanol para a equação de Peng-Robinson.	99
Tabela 13. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO ₂ + Extrato de Sementes de Uva + Diclorometano. ESU em solução com DCM na concentração de 5 kg·m ⁻³	103
Tabela 14. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO ₂ + Extrato de Sementes de Uva + Diclorometano. ESU obtido a partir de sementes do Lote 1 em solução com DCM na concentração de 15 kg·m ⁻³	107
Tabela 15. Tamanho e distribuição de tamanho de partículas e percentual de encapsulamento.	113
Tabela A 1. Solubilidade de Extrato de Sementes de Uva obtido a partir do Lote 1 em solventes orgânicos.	137
Tabela A 2. Valores de concentração de ESU e da mistura (ESU + PHBV) em diclorometano e absorbância em espectro de UV-Visível a 410 nm, utilizados para a construção da curva de calibração.	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama Pressão <i>versus</i> Temperatura para uma substância pura.	7
Figura 2. Equilíbrio líquido-vapor em sistemas binários.	13
Figura 3. Diagramas de fases de sistemas binários.	15
Figura 4. Projeção P-T-x para mistura de fluidos com comportamento de fases Tipo I.	16
Figura 5. Projeções P-x, P-T e T-x dos diagramas de fases do Tipo II.	17
Figura 6. Projeções P-x, P-T e T-x dos diagramas de fases do Tipo III.	18
Figura 7. Projeção P-T-x para mistura de fluidos com comportamento de fases Tipo IV. ..	19
Figura 8. Projeções P-x, P-T e T-x dos diagramas de fases do Tipo V.	20
Figura 9. Princípios operacionais da técnica RESS.	27
Figura 10. Representação esquemática do processo RESS. (a): Caminhos do processo em projeção P <i>versus</i> T; (b): conceito da prática experimental.	28
Figura 11. Princípio operacional da técnica PGSS.	29
Figura 12. Representação esquemática do processo PGSS. (a): Caminhos do processo em projeção P <i>versus</i> T; (b): conceito da prática experimental.	29
Figura 13. Princípios operacionais das técnicas GAS, SAS, ASES, PCA e SEDS.	30
Figura 14. Representação esquemática dos processos GAS, SAS, ASES, PCA e SEDS. (a): Diagrama de fases ternário hipotético; (b): Caminhos do processo em projeção P <i>versus</i> T.	31

Figura 15. Conceito da prática experimental. (a): técnica GAS; (b): técnicas SAS, ASES e PCA; (b): técnica SEDS.	32
Figura 16. Diagrama esquemático da unidade de extração por fluido supercrítico em escala piloto.....	42
Figura 17. Unidade de extração por fluido supercrítico em escala piloto.	43
Figura 18. Diagrama esquemático do aparato experimental de equilíbrio de fases a altas pressões.....	52
Figura 19. Anéis de vedação. (a): anel de cobre; (b); anel de teflon; (c): posicionamento das janelas de safira na célula de equilíbrio.....	53
Figura 20. Célula de equilíbrio de volume variável montada para experimento.....	53
Figura 21. Pistão móvel. (a): pistão desmontado, visão de cada componente; (b e c): pistão montado, vistas lateral e frontal superior, respectivamente.....	54
Figura 22. Visualização das transições de fases a altas pressões, isotermicamente - método estático sintético.	56
Figura 23. Vista frontal da unidade experimental de equilíbrio de fases a altas pressões....	57
Figura 24. Formação da molécula de trilinoleína.	59
Figura 25. Diagrama esquemático do aparato experimental baseado no método SEDS.....	61
Figura 26. Capilares de sílica fundida e <i>PEEK Tubing</i> . (a): tubos capilares conectados aos <i>PEEK Tubing</i> e (b): dispersão do jato da solução no tubo capilar.	62
Figura 27. Câmara de precipitação e encapsulamento. (a): vista externa e (b): vista interna.	64
Figura 28. Foto real da unidade experimental empregando a técnica SEDS.	65

Figura 29. Sementes de uva utilizadas neste trabalho. (a): após limpeza e secagem e (b): moídas em moinho de facas.	71
Figura 30. Comparação visual de tamanho do leite empacotado após extração com frasco de solvente e cilindro de gás.	75
Figura 31. Partículas de sementes de uva. (a): antes da extração e (b): após a extração.	76
Figura 32. Extratos de sementes de uva obtidos nos separadores em série. (a): Separador 1; (b): Separador 2 e (c): Separador 3.	79
Figura 33. Diagrama pressão <i>versus</i> composição para o sistema CO ₂ + Extrato de Sementes de Uva + Etanol. Transições de fases a 313,15 K (LV-PO; LV-PB; LL; LLV); 323,15 K (LV-PO; LV-PB; LL; LLV); 333,15 K (LV-PO; LV-PB; LL; LLV) e 343,15 K (LV-PO; LV-PB; LL; LLV).	89
Figura 34. Diagrama pressão <i>versus</i> temperatura para o sistema CO ₂ (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2). Transições de fases para w ₃ =0,0102 (LV-PB); w ₃ =0,0202 (LV-PB); w ₃ =0,0300 (LV-PO) e w ₃ =0,0396 (LV-PO).	90
Figura 35. Diagrama P <i>versus</i> T para o sistema CO ₂ (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2). Transições de fases para w ₃ =0,0501 (LL e LLV); w ₃ =0,0997 (LL e LLV); w ₃ =0,2003 (LL e LLV) e w ₃ =0,0997 (LL e LLV).	91
Figura 36. Diagramas P <i>versus</i> T para o sistema CO ₂ (1) + ESU (3) + Etanol (2). Transições de fases para (a): w ₃ =0,0501 (LL e LLV); (b): w ₃ =0,0997 (LL e LLV); (c): w ₃ =0,2003 (LL e LLV) e (d): w ₃ =0,0997 (LL e LLV).	92
Figura 37. Extrato de sementes de uva obtido a partir do Lote 1. (a): com conteúdo de água de 5,536 %; (b): com conteúdo de água reduzido para 0,135 %.	93
Figura 38. Diagrama P <i>versus</i> w para o sistema ternário Extrato de Semente de Uva (0,135 % de teor de água) + CO ₂ + Etanol. Transições de fases a 313,15 K (LV-PB; LL; LLV);	

323,15 K (LV-PB; LL; LLV); 333,15 K (LV-PB; LL; LLV) e 343,15 K (LV-PB; LL; LLV). 96

Figura 39. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário Extrato de Semente de Uva (0,135 % de teor de água) (3) + CO₂ (1) + Etanol (2). Transições de fases para $w_3=0,0111$ (LV-PB); $w_3=0,0199$ (LV-PB); $w_3=0,6002$ (LV-PB) e $w_3=0,6994$ (LV-PB). 97

Figura 40. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário Extrato de Semente de Uva (0,135 % de teor de água) (3) + CO₂ (1) + Etanol (2). Transições de fases para $w_3= 0,0305$ (LL e LLV); $w_3= 0,0417$ (LL e LLV); $w_3= 0,0499$ (LL e LLV); $w_3= 0,1000$ (LL e LLV); $w_3= 0,2001$ (LL e LLV); $w_3= 0,2998$ (LL e LLV); $w_3= 0,4006$ (LL e LLV); $w_3= 0,5002$ (LL e LLV) e $w_3= 0,6002$ (LL e LLV). 97

Figura 41. Diagramas P *versus* T para o sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) (3) + CO₂ (1) + Etanol (2). Transições de fases para (a): $w_3= 0,0305$ (LL e LLV) e $w_3= 0,0417$ (LL e LLV); (b) $w_3= 0,0499$ (LL e LLV) e $w_3= 0,1000$ (LL e LLV); (c) $w_3= 0,2001$ (LL e LLV) e $w_3= 0,2998$ (LL e LLV) e (d) $w_3= 0,4006$ (LL e LLV), $w_3= 0,5002$ (LL e LLV) e $w_3= 0,6002$ (LL e LLV). 98

Figura 42. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) (3) + CO₂ (1) + Etanol (2). Transições de fases experimentais $w_3= 0,6994$; $w_3= 0,6002$ e $w_3= 0,4006$ e modelo de Peng-Robinson. 100

Figura 43. Diagrama Pressão de transição calculada *versus* Pressão de transição experimental para o intervalo de temperatura (313,15 – 343,15) K para o sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) + CO₂ + Etanol. 100

Figura 44. Diagrama P *versus* w para o sistema ternário CO₂ + Extrato de Sementes de Uva + Diclorometano. ESU em solução com DCM na concentração de 5 kg·m⁻³. Transições de fases a 313,15 K (LV-PO e LV-PB); 323,15 K (LV-PO e LV-PB); 333,15 K (LV-PO e LV-PB) e 343,15 K (LV-PO; LV-PB). 104

Figura 45. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário CO₂ (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de 5 kg·m⁻³. Transições de fases para w₁=0,9600 (LV-PO); w₁=0,9500 (LV-PB); w₁= 0,9397 (LV-PB); w₁=0,9200 (LV-PB); w₁=0,9100 (LV-PB e LV-PO); w₁=0,8970 (LV-PB e LV-PO); w₁=0,8504 (LV-PB e LV-PO); w₁=0,8201 (LV-PB e LV-PO); w₁=0,7998 (LV-PB e LV-PO); w₁=0,7002 (LV-PB); w₁=0,4999 (LV-PB) e w₁=0,3007 (LV-PB). 105

Figura 46. Diagramas P *versus* T para o sistema ternário CO₂ (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de 5 kg·m⁻³. Transições de fases (a): entre w₁=0,9600 e w₁=0,8970 e (b): entre w₁=0,8504 e w₁=0,3007. 105

Figura 47. Diagrama P *versus* w para o sistema ternário CO₂ + Extrato de Sementes de Uva + Diclorometano. ESU em solução com DCM na concentração de 15 kg·m⁻³. Transições de fases a 313,15 K (LV-PO e LV-PB); 323,15 K (LV-PO e LV-PB); 333,15 K (LV-PO e LV-PB) e 343,15 K (LV-PO; LV-PB). 108

Figura 48. Diagramas P *versus* w para o sistema ternário CO₂ + ESU + DCM contendo ESU em solução com DCM a 15 kg·m⁻³ (a): comparado ao sistema contendo ESU em solução com DCM a 5 kg·m⁻³ (legenda idêntica a Figura 44) e (b): comparado ao sistema binário CO₂ + DCM (CORAZZA et al. 2003) com transições de fases a 313,15 K (LV-PO e LV-PB); 323,15 K (LV-PO e LV-PB); 333,15 K (LV-PO e LV-PB) e 343,15 K (LV-PO; LV-PB). 108

Figura 49. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário CO₂ (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de 15 kg·m⁻³. Transições de fases para w₁≅ 0,3000 (LV-PB); w₁= 0,4997 (LV-PB); w₁= 0,6001 (LV-PB); w₁= 0,6997 (LV-PB); w₁= 0,7799 (LV-PO; LV-PB); w₁= 0,7999 (LV-PO; LV-PB); w₁= 0,8200 (LV-PO; LV-PB); w₁= 0,8500 (LV-PO; LV-PB); w₁= 0,8701 (LV-PO; LV-PB); w₁= 0,8801 (LV-PB); w₁= 0,9000 (LV-PO; LV-PB); w₁= 0,9200 (LV-PB); w₁= 0,9300 (LV-PB); w₁= 0,9500 (LV-PB); w₁= 0,9600 (LV-PO). 109

Figura 50. Diagramas P <i>versus</i> T para o sistema ternário CO ₂ (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de 15 kg·m ⁻³ . Transições de fases entre (a): w ₁ = 0,8500 e w ₁ = 0,9600 e entre (b): w ₁ ≅ 0,3000 e w ₁ = 0, 8200..	110
Figura 51. Termograma do extrato de sementes de uva obtido a partir de sementes do Lote 1.	111
Figura 52. Precipitação de PHBV. Fotomicrografias para (a): Teste de precipitação 1 (8 MPa) e (b): Teste de precipitação 2 (12 MPa).	114
Figura 53. Encapsulamento do ESU em PHBV. Fotomicrografias para (a): Ensaio de encapsulamento 1 (1:1); (b): Ensaio de encapsulamento 2 (1:2) e (c): Ensaio de encapsulamento 3 (1:3).	115
Figura 54. Encapsulamento do ESU em PHBV. Fotomicrografias para os Experimentos (a): 1; (b): 2; (c): 3; (d): 4; (e): 5 e (f): 6.	117
Figura 54. (Continuação) Encapsulamento do ESU em PHBV. Fotomicrografias para os Experimentos (g): 7; (h): 8; (i,j e l): 9 (em triplicata).	119
Figura A 1. Curva padrão de absorbância do Extrato de Sementes de Uva (●) e da mistura Extrato de Sementes de Uva + PHBV (■), em 410 nm, em função da concentração em Diclorometano.	140
Figura A 2. Construção do diagrama de equilíbrio isotérmico através do método estático sintético, por meio de visualizações das transições de fases. Única fase líquida: ●; <i>cloud point</i> : ●; líquido-líquido-vapor: ●; líquido-vapor ponto de bolha: ● e líquido-vapor ponto de orvalho: ●	142
Figura A 3. União dos pontos de pressão de transição correspondentes às composições determinadas para a construção das curvas de transição, —: líquido-vapor ponto de bolha; —: líquido-vapor ponto de orvalho; —: líquido-líquido e —: líquido-líquido-vapor. Regiões bifásicas, LL: líquido-líquido e LV: líquido-vapor.	143

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ϕ –	coeficiente de fugacidade;
f –	fugacidade;
μm –	micrômetro;
nm –	nanômetro;
σ –	desvio padrão;
w –	fração mássica;
x –	fração molar fase líquida pesada;
y –	fração molar fase vapor;
z –	fração molar fase líquida leve;
ASES –	Sistema de Extração de Solvente em Aerossol;
GAS –	Gás Antissolvente;
PCA –	Precipitação com Antissolvente Comprimido;
PGSS –	Partículas de Soluções Saturadas de Gás;
RESS –	Rápida Expansão de Soluções Supercríticas;
SAS –	Antissolvente Supercrítico;
SEDS –	Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos;
SFEE –	Extração de Emulsões por Fluido Supercrítico;
SSI –	Impregnação por Solvente Supercrítico;
CO_2 –	dióxido de carbono;
DCM –	diclorometano;
ESU –	Extrato de Sementes de Uva;
PHBV –	poli-(hidroxibutirato-cohidroxivalerato);
TAG –	triacilgliceróis;
DAG –	diacilgliceróis;
MAG –	monoacilgliceróis;
AGL –	ácidos graxos livres;
EDE –	equação de estado;

L ou l –	fase líquida;
V ou G ou g –	fase vapor (gás);
LL –	transição bifásica do tipo Líquido-Líquido;
LLV –	transição trifásica do tipo Líquido-Líquido-Vapor;
LV-PB –	transição bifásica do tipo Líquido-Vapor Ponto de Bolha;
LV-PO –	transição bifásica do tipo Líquido-Vapor Ponto de Orvalho;
PR –	Peng-Robinson;
m –	massa (kg);
F –	massa de alimentação (kg);
D_{mg} –	Diâmetro médio geométrico (m);
P –	pressão;
P_C –	pressão crítica;
R –	constante universal dos gases ideais;
T –	temperatura;
T_C –	temperatura crítica;
v ou V –	volume (m ³);
ρ_{H_2O} –	densidade (kg·m ³);
a_w –	atividade de água;
M –	massa molecular;
N –	normalidade;
PRE –	Percentual Real de Encapsulamento;
MEV-EED –	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de Energia Dispersiva;
LCEP (inglês)	<i>Lower Critical End Point</i> ;
UCEP (inglês)	<i>Upper Critical End Point</i> ;
SFE (inglês) –	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> .

USO DE SEMENTES DE UVA, UM RESÍDUO DA AGROINDÚSTRIA VINÍCOLA, EMPREGANDO TECNOLOGIAS SUPERCRÍTICAS

Autora: Irede Angela Lucini Dalmolin

Orientador: Eduardo Augusto Caldas Batista (DEA/FEA/UNICAMP)

Co-orientador: José Vladimir de Oliveira (EQA/CTC – UFSC)

RESUMO

A utilização de resíduos e o emprego de tecnologias ambientalmente seguras são tendências gerais de pesquisa da comunidade científica, impulsionadas pelas exigências governamentais e apelo do mercado consumidor, que buscam cada vez mais produtos naturais de alta qualidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi obter o extrato de sementes de uva através de extração por fluido supercrítico, caracterizá-lo química e fisicamente, e aplicá-lo ao encapsulamento em poli-(hidroxibutirato-cohidroxivalerato) utilizando tecnologia de antissolvente supercrítico. Para tanto, o estudo do ponto de vista termodinâmico, através de dados de equilíbrio de fases e modelagem, fez-se necessário para obtenção de informações dos sistemas de interesse à extração bem como ao encapsulamento. A caracterização desse extrato aponta uma importante fonte natural de ácido linoléico, como componente majoritário, e também de ácidos oléico, palmítico e esteárico, e de antioxidantes e fitoesteróis. Através de separadores dispostos em série foi possível fracionar por meio de despressurização e obter extratos com diferentes composições desejadas. Na determinação de dados de equilíbrio de fases do sistema Extrato de Sementes de Uva (ESU) + Dióxido de Carbono (CO₂) + Etanol, verificou-se que a quantidade de água no extrato, remanescente da matéria-prima, prejudicava a obtenção de dados de equilíbrio com porcentagens de (CO₂ + Etanol) inferiores a 70 %. Observaram-se transições bifásicas do tipo Líquido-Vapor Ponto de Bolha (LV-PB), Líquido-Vapor Ponto de Orvalho (LV-PO) e Líquido-Líquido (LL), e trifásicas do tipo Líquido-Líquido-Vapor (LLV). Com a redução de água no ESU foi possível descrever o comportamento do equilíbrio de fases, porém para ambas as temperaturas estudadas ocultaram-se as transições LV-PO. Para o mesmo sistema, a modelagem foi feita utilizando a equação de Peng-Robinson, que foi capaz de correlacionar os dados com a utilização de dois parâmetros de interação binária ajustados. Dados de equilíbrio de fases do sistema ESU + CO₂ + Diclorometano (DCM) foram determinados onde transições bifásicas do tipo LV-PB e LV-PO foram observadas. Verificou-se que a adição de ESU em solução de DCM, em concentrações de até 15 kg·m⁻³, não influenciou nas pressões de transição do sistema binário CO₂ + DCM. O encapsulamento foi realizado com percentual de encapsulamento de até 72 % de ESU.

USE OF GRAPE SEED, A RESIDUE FROM WINE AGROINDUSTRY EMPLOYING SUPERCRITICAL TECHNOLOGIES

Authors: Irede Angela Lucini Dalmolin

Adviser: Eduardo Augusto Caldas Batista (DEA/FEA/UNICAMP)

Co-adviser: José Vladimir de Oliveira (EQA/CTC – UFSC)

ABSTRACT

The use of residues and environmentally safe and benign technologies comprise a general research trend of scientific community, stimulated by government requirements and appeal to the consumer market which increasingly seek natural products of high quality. In this context, the aim of this work was to obtain grape seed extract by supercritical fluid extraction, characterize it chemically and physically, and apply it to the encapsulation in polymer poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using supercritical anti-solvent technology. Thus, the study from the thermodynamic point of view, by phase equilibrium data and modeling, was necessary to obtain information of the interest system for the extraction and for encapsulation. According to the characterization, grape seed extract is an important natural source of linoleic acid, as major component, and also by oleic, palmitic and stearic acids, and antioxidants and phytosterols. Through separators displayed in series was possible to fractionate the depressurization and to obtain extracts with different desired compositions. In the determination of phase equilibrium data of the system Grape Seed Extract (GSE) + Carbon Dioxide (CO₂) + Ethanol, it was found that the amount of water in the extract, remaining in the raw materials, limited obtaining equilibrium data with percentages of (CO₂ + ethanol) lower than 70 %. Two-phase transitions were observed, Vapor-Liquid Bubble Point (VL-BP), Vapor-Liquid Dew Point (VL-DP), and Liquid-Liquid (LL), and three-phase transitions Vapor-Liquid-Liquid (VLL). With the reduction of water in the GSE was possible to describe phase equilibrium behavior, but for both temperatures studied were put out transitions VL-DP. For the same system, the modeling was performed using Peng-Robinson equation which was able to correlate data with the use of two adjusted binary interaction parameters. Phase equilibrium data of GSE + CO₂ + dichloromethane (DCM) system were determined where two-phase transitions VL-BP and VL-DP were observed. It was verified that the addition of GSE to the DCM solution in concentration up to 15 kg·m⁻³ did not affect the transition pressure of the binary system CO₂ + DCM. The encapsulation was realized with percentage of encapsulation up to 72 % of GSE.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Em 1822, ano em que o Brasil se torna um país independente e tem seu primeiro imperador coroado, Dom Pedro I, o mundo presencia também o descobrimento dos fenômenos críticos, mérito do cientista francês Barão Charles Cagniard de la Tour.

O experimento de descoberta consistia em dispor uma bola de sílex em um digestor cheio de líquido. Ao girar o equipamento, um barulho era produzido sempre que a bola penetrava na interface líquido-vapor. Cagniard de la Tour notou que ao aquecer o sistema a uma temperatura muito além do ponto de ebulição do líquido, o barulho de pedra caindo no líquido desaparecia acima de uma certa temperatura (BERCHE, HENKEL, KENNA, 2009). Esta observação marca a descoberta da fase fluida supercrítica e do então chamado “*l'état particulier* - o estado particular”.

O que se iniciara como uma curiosidade exótica do Barão Cagniard de la Tour, tornou-se uma área que hoje vive sua plena maturidade, formando um dos pilares da física de sistemas complexos. Entre suas aplicações destaca-se o uso alternativo a processos clássicos de separação (extração, fracionamento, adsorção, cromatografia e cristalização), como meio de reação de polimerização, inativação celular e tratamento de materiais lignocelulósicos.

Existe uma ampla variedade de compostos que podem ser usados como fluidos supercríticos, porém a maioria das aplicações em indústrias de alimentos emprega dióxido de carbono (CO₂). Este solvente permite operações com pressão e temperatura crítica amenas ($T_C = 304,2 \text{ K}$ e $P_C = 7,38 \text{ MPa}$), é GRAS (*Generally Recognized As Safe* = comumente reconhecido como seguro), atóxico, deixando praticamente nenhum vestígio na matriz processada, não inflamável e está prontamente disponível em baixo custo.

Entre as várias técnicas de obter extratos, a extração por fluidos supercríticos (SFE–*Supercritical Fluid Extraction*) tem se destacado nas últimas duas décadas por possibilitar o ajuste de parâmetros visando a seletividade dos compostos de interesse, empregar baixas temperaturas minimizando a degradação de compostos termossensíveis e produzir um único

resíduo, resultante da matriz sólida esgotada, que pode ser reaproveitado como fonte de amido, açúcares e outros constituintes disponíveis nas diferentes matrizes.

Contudo, extratos são materiais sensíveis e podem facilmente sofrer degradações quando submetidos à ação da luz, oxigênio ou temperatura. Além disso, são insolúveis em água, limitando certas aplicações industriais. De tal modo, a busca por proteção e facilidade de manuseio de extratos na forma de encapsulados torna-se interessante (MARTÍN et al., 2010).

Nos últimos anos, várias técnicas de formação de encapsulados e partículas baseadas no uso de fluidos pressurizados ou supercríticos têm sido propostas, especialmente por explorar as propriedades peculiares dos fluidos supercríticos em geral. Outra característica destas técnicas é a eficiente separação do solvente das partículas após a precipitação, dispensando etapas adicionais de secagem e micronização.

1.1 Escolha da matéria-prima

Após o processamento industrial da uva, gera-se grande quantidade de resíduo sólido, composto principalmente de casca e semente. No Brasil, esse resíduo é simplesmente destinado à fertilização de solos, alimentação animal, incineração e de forma artesanal à obtenção do destilado conhecido como grapa.

Da semente de uva é possível obter extratos com presença de vitaminas e compostos antioxidantes de interesse para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Segundo a *FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2012), o extrato de semente de uva tem uma composição típica em ácidos graxos insaturados, linoléico e oléico, e saturados palmítico e esteárico. Apresenta ainda, alto conteúdo de tocóis e de esteróis, tais como β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, além de compostos fenólicos, evidenciando a qualidade deste extrato.

1.2 Motivação

Apesar das vantagens que oferece o uso de fluidos supercríticos, a indústria ainda resiste ao uso desta tecnologia. Um dos fatores que contribui a esta relutância é o complexo comportamento de fases observado em sistemas a altas pressões (NDIAYE, 2004). Portanto, informações sobre os fenômenos que ocorrem a altas pressões através de dados de equilíbrio de fases dos sistemas com extratos vegetais e líquidos comprimidos tornam-se imprescindíveis para a elaboração de projetos de engenharia e construção de plantas em escala piloto e industrial.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve o propósito de caracterizar o extrato de sementes de uva obtido por extração supercrítica, bem como investigar experimentalmente o comportamento de fases a altas pressões de sistemas de interesse para suporte de estudos futuros de obtenção de extrato de sementes de uva e encapsulamento desse em biopolímero poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) utilizando tecnologia supercrítica.

As seguintes atividades podem ser vistas como objetivos específicos:

1. Através do método de extração com dióxido de carbono supercrítico, obter extrato de sementes de variedades de uvas Malbec, Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, em mistura;

1.1 Caracterização química e físico-química de extratos obtidos com e sem manipulação de separadores na etapa de despressurização;

2. Investigar o equilíbrio de fases a altas pressões dos sistemas contendo extrato de sementes de uva bruto, dióxido de carbono como solvente e etanol como co-solvente;

2.1 Fundamentar através de dados de equilíbrio de fases o processo de obtenção do extrato utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente;

3. Levantamento de solubilidade e curvas de saturação do extrato e biopolímero em solventes orgânicos a baixas pressões;

3.1 Definir concentrações de soluções contendo material a ser precipitado (biopolímero + extrato) em solvente orgânico bem como volume de solvente necessário para etapa de limpeza das cápsulas obtidas;

4. Selecionar condições de temperatura e pressão de encapsulamento do extrato explorando diferentes regiões dos diagramas de fases para os sistemas envolvendo solvente orgânico, extrato e dióxido de carbono pressurizado.

5. Representar dados de equilíbrio de fases a altas pressões utilizando modelo termodinâmico;

6. Utilizar a tecnologia de antissolvente supercrítico para o encapsulamento de extrato de semente de uva em biopolímero com aplicação na indústria alimentícia.

CAPÍTULO 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta tese contempla uma linha ampla de pesquisa, a qual está dividida em tópicos que serão abordados na revisão bibliográfica, ordenada no presente capítulo. Finaliza-se com considerações a respeito do estado da arte.

3.1 Fluidos Supercríticos

Considera-se que um fluido se encontra no estado supercrítico quando sua pressão e sua temperatura estão acima do seu ponto crítico, representado pelo ponto C, na Figura 1. As coordenadas do ponto crítico são a pressão crítica (P_c) e a temperatura crítica (T_c), a pressão e temperatura mais elevadas nas quais uma espécie química pura pode existir em equilíbrio líquido/vapor.

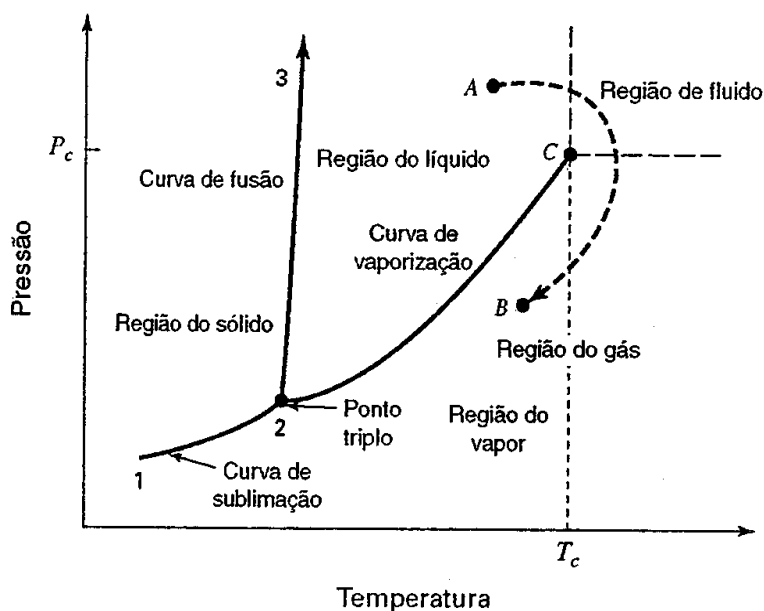


Figura 1. Diagrama Pressão *versus* Temperatura para uma substância pura (SMITH, VAN NESS e ABBOTT, 2007).

Segundo Smith, Van Ness e Abbott (2007), fluidos homogêneos normalmente são divididos em duas classes, líquidos e gases. Porém, quando no ponto crítico, a distinção

entre eles nem sempre pode ser delimitada com nitidez. Por consequência, apresentam propriedades intermédias entre as dos gases e líquidos, como:

- Viscosidade mais baixa que líquidos e semelhante a gases;
- Valores de densidade próximos aos do estado líquido e maiores que os de gases;
- Maiores coeficientes de difusão que líquidos.

Nos últimos dez anos foram medidas, de forma experimental, mudanças na constante dielétrica de vários solventes em função das condições de temperatura e pressão. O CO₂, por exemplo, apolar em condições normais de temperatura e pressão, em elevadas pressões, apresenta constante dielétrica equivalente a substâncias polares em condições normais de temperatura e pressão, e a água, considerada como substância altamente polar em condições normais de temperatura e pressão, apresenta constante dielétrica próxima de zero em elevadas temperaturas e pressões (LANÇAS, 2000).

Estas propriedades particulares abrem perspectivas para que se explorem novas possibilidades de emprego de fluidos supercríticos, e em condições diferentes das usualmente conhecidas, incluindo-se: extrações; cromatografia; formação de partículas; além de muitas outras aplicações ainda a descobrir.

3.2 Extrato de Sementes de Uvas

Os primeiros registros de vinhas cultivadas na história da humanidade datam de, pelo menos, 7.000 a 5.000 anos a.C., porém, os registros de vinhos datam dos séculos XIII e XIV a.C. com os fenícios (JOHNSON, 2001). No Brasil, o cultivo de videiras ocorreu apenas por volta de 1532, quando Martin Afonso de Souza trouxe videiras da Ilha da Madeira, em Portugal, ao Brasil, onde foram plantadas inicialmente por Brás Cubas no litoral paulista e depois na região de Tatuapé (VALDUGA, 2007).

A vitivinicultura brasileira ocupou em 2010 o 12º lugar em produção mundial de uvas e o 19º em área cultivada, segundo a FAO (2012). Dados do IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012) no último Levantamento Sistemático da Produção Agrícola realizado em fevereiro de 2012, um comparativo entre as safras de 2011 e 2012 mostra que houve crescimento de 1,3 % de área plantada com videiras, ou 1.000 hectares. Esta vigorosa expansão em área cultivada reflete diretamente na difusão da elaboração de vinhos.

A variabilidade de climas e solos do Brasil traz como resultado adicional um enorme potencial de obtenção de produtos com características distintas, aptas a agradarem os diferentes paladares dos consumidores. A produção de uvas é da ordem de 1,2 milhões de toneladas/ano (IBRAVIN, 2012). Deste volume, cerca de 55,0 % é comercializado *in natura*, como uvas de mesa, e 45,0 % destinado ao processamento, para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados (IBGE, 2012).

Segundo dados do Instituto Brasileiro do Vinho - IBRAVIN (2012), do total de produtos industrializados, 77,0 % são vinhos de mesa e 9,0 % são sucos de uva, ambos elaborados a partir de uvas de origem americana, especialmente cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos interespecíficos diversos. Cerca de 13,0 % são vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*; o restante dos produtos industrializados, 1,0 % do total, são outros derivados da uva e do vinho.

A produção de vinhos finos no Brasil está localizada na região conhecida como Serra Gaúcha (RS), e em novas regiões que iniciaram a produção na década de 1980: Campanha e Serra do Sudeste (RS) e Vale do Submédio São Francisco (PE e BA). São Joaquim, situada no Planalto Sul Catarinense, é a região mais recente a desenvolver uma viticultura para elaboração de vinhos finos com vinhedos de altitude e representa a mais fria das regiões produtoras de vinhos do Brasil (ACAVITIS, 2012).

Entre as cepas cultivadas de *Vitis vinifera* L., predominam nos vinhedos Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Pinot Noir, Malbec e Sangiovese, entre as tintas e Chardonnay e Sauvignon Blanc, entre as brancas.

No processo de vinificação, após a etapa de fermentação alcoólica, inicia-se a operação enológica de descuba, que consiste na separação do bagaço, parte sólida da uva (casca, semente e engaço), do mosto seguindo para a etapa de prensagem, restando assim, apenas o bagaço seco que corresponde em média a 25,0 % (m/m) da uva, dos quais 20,0-26,0 % são sementes (GÓMEZ, LÓPEZ e de la OSSA, 1996).

Como grande parte dos resíduos industriais, o bagaço seco não recebe atenção, sendo destinado na maioria das vezes como adicional à ração animal, como matéria orgânica para fertilização de solos ou ainda, eliminado por incineração. Porém, as sementes apresentam quantidades elevadas de fibras acarretando em lenta biodegradabilidade, com conversão parcial apenas da matéria orgânica de uma safra para outra e também tornam-se impróprias ao consumo animal em grande escala (FREITAS, 2007).

Um destino alternativo para parte desse resíduo é a extração do óleo das sementes, diversificando, agregando valor a produtos da agroindústria vinícola e diminuindo o custo de obtenção de matéria-prima para extração. A semente de uva pode conter 8,0 - 20,0 % de óleo (PASSOS et al., 2009).

A vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil e geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento. Em 2009, a crise mundial refletiu fortemente na produção de uvas de mesa no Brasil, sendo que alguns produtores abandonaram parte dos vinhedos e em 2010, fatores climáticos desfavoráveis, especialmente nas áreas de produção de uvas para vinhos, resultaram em menor produção (CNPUV, 2012). A utilização de resíduos da agroindústria vinícola, como a semente da uva para obtenção do extrato, confere valor agregado, minimizando as perdas causadas por eventos inesperados durante a produção da uva.

3.2.1 Processos de obtenção de extratos vegetais

O método convencional de obtenção de extratos a partir de sementes consiste na combinação da prensagem da matriz sólida com a extração utilizando solvente orgânico. O solvente proporciona algumas vantagens frente à extração mecânica. Possibilita o emprego de temperaturas mais amenas, sem comprometer compostos termossensíveis presentes e, além disso, o solvente consegue extrair mais componentes não glicéricos, que não são retirados pela ação mecânica (SHAHIDI, 2005).

O solvente mais utilizado é o n-hexano (solvente alifático obtido por destilação das frações de petróleo), pois apresenta excelente poder de solvência para um grande número de sementes oleaginosas, separação facilitada de óleos ou gorduras, simplificando o processo de recuperação do solvente e não afetando a qualidade dos produtos obtidos.

Apesar do n-hexano ser o solvente mais empregado, este é suspeito de deixar resíduos nocivos à saúde, pois é obtido por destilação de frações de hidrocarbonetos de petróleo, podendo conter hidrocarbonetos aromáticos e polinucleares, os quais são carcinogênicos e podem se concentrar no óleo ou permanecer na torta prensada após a dessolventização. Nesse contexto, estudos têm mostrado relativa eficiência de outros solventes quanto à utilização (substituição/mistura) no processo de extração.

A extração por fluidos supercríticos (SFE–*Supercritical Fluid Extraction*) é uma operação unitária que consiste na separação de um soluto, ou mistura de solutos, presente em uma matriz sólida através do contato com um solvente adequado, no estado supercrítico (ROSA e MEIRELES, 2009; BRUNNER, 1994). SFE é um processo alternativo de extração, aplicado à indústria de alimentos há mais de 20 anos (BRUNNER, 2005). Devido principalmente às características do solvente no estado supercrítico, oferece algumas vantagens sobre os métodos clássicos de extração como, elevada taxa de transferência de massa, fácil eliminação do solvente, pressão e temperatura facilmente ajustável (MCHUG e KRUKONIS, 1994) e não há necessidade de operações unitárias adicionais para obtenção do produto final, as quais podem modificar sensorialmente o extrato (MEIRELES, 2003) e também aumentar custos de produção.

O processo de separação por SFE é baseado no equilíbrio de fases (limita-se a região de duas fases, sólido-líquido) e na diferença na solubilidade dos compostos da matriz sólida frente a mudanças de condições operacionais e solventes utilizados. Porém, não menos importante, é a seletividade do processo, que permite a obtenção de um produto final com um perfil de compostos desejados. Reverchon e de Marco (2006) observam que a alta seletividade resulta da baixa solubilidade, e o contrário também é verdadeiro. No processo de SFE, pequenas mudanças de temperatura ou pressão refletem em grandes variações de solubilidade, ou seja, é possível, através de ajustes de pressão e temperatura do sistema adequar as propriedades de solvatação dos fluidos supercríticos aos solutos de interesse.

3.3 Equilíbrio de Fases a Altas Pressões

Dado um sistema onde, um solvente constituído de moléculas pequenas e simples, que na temperatura e pressão ambiente são gasosas, é colocado em contato com solutos, os quais são moléculas mais complexas e menos voláteis, e esta mistura é submetida a condições de temperatura e pressão utilizadas em aplicações industriais, geralmente bem próximas do ponto crítico do solvente, implica em um complicado comportamento de fases. O sucesso das tecnologias que empregam fluidos pressurizados depende em grande parte do estudo e compreensão das variadas e complexas transições de fases comumente observadas (CHARIN, 2010).

As propriedades termodinâmicas da mistura normalmente são expressas em termos das coordenadas pressão, temperatura e composição, com as projeções Pressão *versus* Temperatura (P-T), Temperatura *versus* Composição (T-x) e Pressão *versus* Composição (P-x).

Para uma mistura binária de compostos quimicamente similares, considera-se um plano P-x, para diferentes temperaturas. Em temperaturas menores que a temperatura crítica do composto mais volátil, obter-se-á diagramas semelhantes ao da Figura 2.a. Para temperaturas maiores, diagramas do tipo igual ao apresentado na Figura 2.b são obtidos. No primeiro caso, as curvas do ponto de bolha e de orvalho interceptam os pontos extremos de

composição unitária, correspondendo à pressão de vapor da substância pura. No segundo caso, um dos componentes (A) está supercrítico, e o envelope de fase não corta o eixo do composto puro (A), haja vista que não pode existir equilíbrio líquido-vapor (LV) acima do ponto crítico de uma substância pura. O ponto de interseção das curvas de bolha e de orvalho, no qual existe uma fase líquida e uma fase vapor com a mesma composição corresponde ao ponto crítico da mistura binária (ponto C na Figura 2.c). Para cada temperatura acima da temperatura crítica do composto A, corresponde um diagrama do Tipo II (VAN KONYNENBURG E SCOTT, 1980 – explanado a seguir) caracterizado pelo deslocamento progressivo do ponto crítico para composições próximas às do composto B puro. Como o ponto crítico da mistura não está necessariamente localizado no extremo da região bifásica, pode existir equilíbrio LV acima do ponto crítico, ao contrário das correspondentes substâncias puras. Se no plano P-T, unirmos por uma linha todos os pontos críticos, obteremos a linha de pontos críticos de uma mistura binária de compostos quimicamente similares (linha pontilhada da Figura 2.d). As linhas pontilhadas finas correspondem a envelopes de fases para diferentes composições (NDIAYE, 2004).

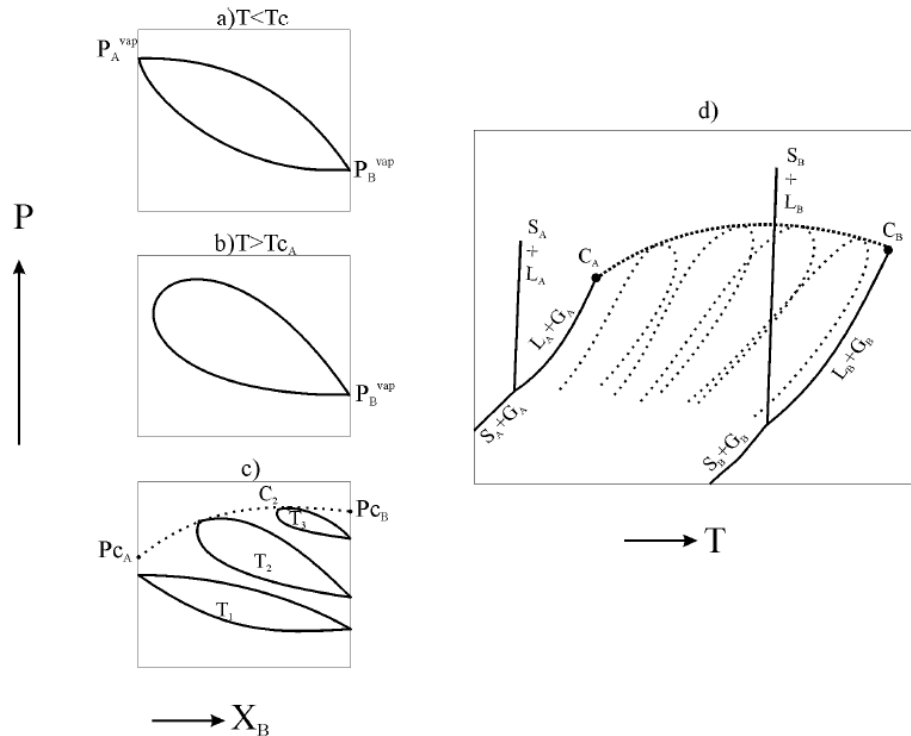


Figura 2. Equilíbrio líquido-vapor em sistemas binários (ESPINOSA, 2001).

Em um sistema binário em que as interações entre os componentes sejam suficientemente fortes, o sistema pode se separar em duas fases líquidas de diferentes composições. Ainda, são possíveis equilíbrios em que existam fases sólidas, de modo que a geometria de equilíbrio de fases é bastante diversificada.

Van Konynenburg e Scott (1980) agruparam os diagramas de fases binários em cinco tipos básicos que podem ser descritos qualitativamente a partir da equação de van der Waals. Rowlinson e Swinton (1982) introduziram um sexto tipo, comumente encontrado em sistema envolvendo água e que, diferentemente dos anteriores não pode ser descrito usando a equação de van der Waals. Estes seis tipos de diagramas apresentados na Figura 3 podem ocorrer em função da assimetria molecular (diferença de tamanho, polaridade e funcionalidade molecular) entre os componentes. Entretanto, além destes seis tipos de diagramas clássicos, existem outros tipos de diagramas de fases reportados na literatura (BOSKHOV e YELASH, 1998; YELASH e KRASKA, 1998; WANG, WU e SADUS, 2000), os quais o comportamento de fases não está confirmado experimentalmente, mas sim através do uso de equações de estado.

Para melhor visualização da diferença entre os seis tipos de diagramas de Van Konynenburg e Scott (1980), a ocorrência de fases sólidas, assim como de azeótropos, são omitidas.

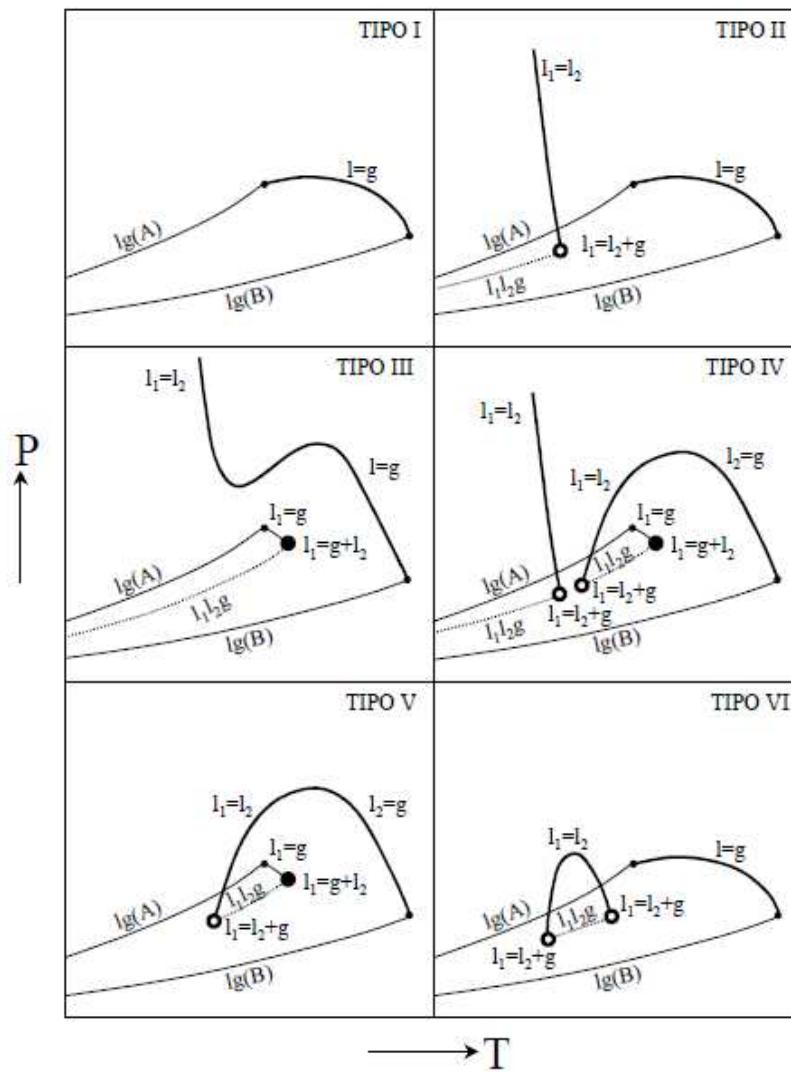


Figura 3. Diagramas de fases de sistemas binários (ESPINOSA, 2001).

Cada fase líquida, de diferente composição, é identificada como l_1 ou l_2 e o equilíbrio trifásico é indicado como l_1l_2g . Os pontos críticos $l=g$ representam a curva formada por todos os pontos onde coexistem uma fase líquida e uma fase gasosa com a mesma composição. Da mesma forma, $l_1=l_2$ corresponde à curva formada por pontos coexistentes das duas fases líquidas. Os pontos indicados por $l_1=l_2+g$ são pontos onde existem duas fases líquidas críticas (de igual composição) em equilíbrio com uma fase gasosa. Por outro lado, $l_1=g+l_2$ indica todos os pontos onde coexistem uma fase líquida e

uma fase gasosa de igual composição em equilíbrio com uma outra fase líquida. Em ambos os casos, na pressão e na temperatura correspondente a estes pontos, uma fase líquida desaparece.

Em resumo, segundo Ndiaye (2004):

TIPO I: Este tipo de diagrama é obtido quando os fluidos da mistura binária têm natureza química similares e possuem propriedades críticas de mesma magnitude. Apenas poucos sistemas envolvendo substâncias polares são conhecidos por exibirem comportamento do Tipo I (PRAUSNITZ, LICHTENTHALER, de AZEVEDO, 1999). A Figura 4 apresenta uma projeção P-T-x típica para este grupo.

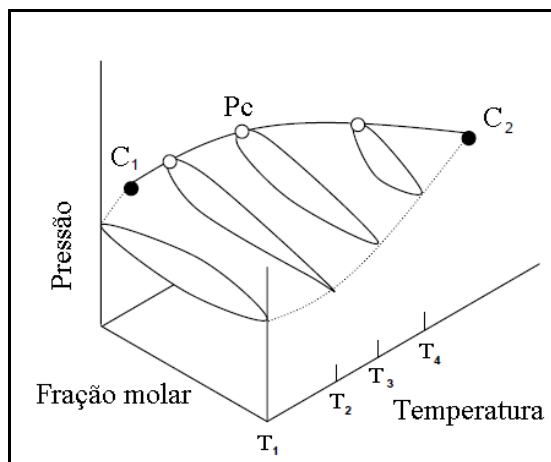


Figura 4. Projeção P-T-x para mistura de fluidos com comportamento de fases Tipo I (ARCE, 2005).

Na Figura 4, pode-se observar a linha crítica característica à qual pertence um ponto crítico (P_c) em função da pressão, temperatura e a composição. Os pontos críticos dos componentes puros estão representados por C_1 e C_2 . Observa-se apenas a ocorrência da transição Líquido-Vapor (LV).

TIPO II: Apresentam presença de uma imiscibilidade l-l em temperaturas inferiores à temperatura crítica do componente mais volátil, em adição à curva l-g ou LV, encontrada

nos diagramas de Tipo I. A Figura 5 apresenta projeções P-x, P-T e T-x, as quais conversam entre si através de linhas pontilhadas.

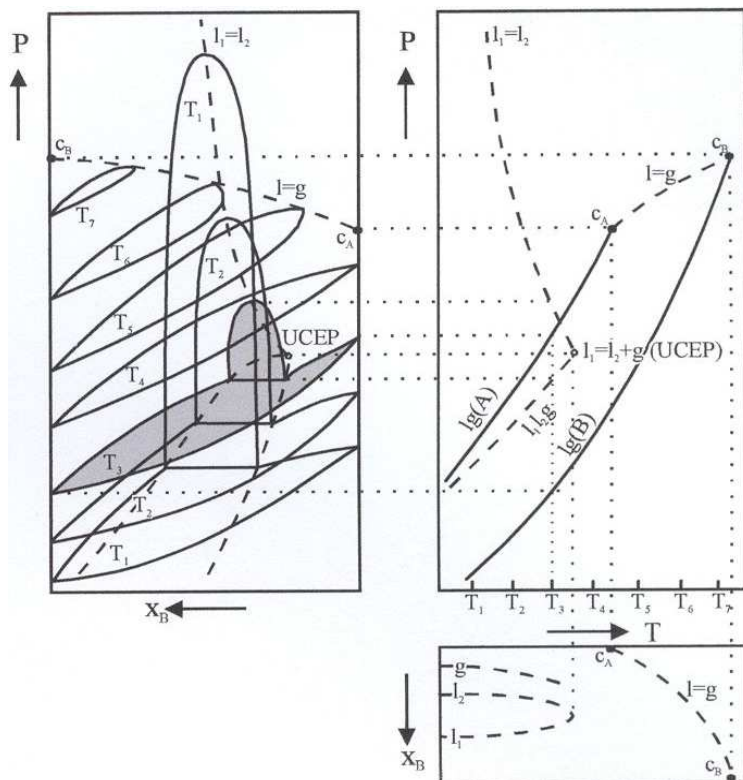


Figura 5. Projeções P-x, P-T e T-x dos diagramas de fases do Tipo II (ESPINOSA, 2001).

No diagrama P-x apresentado na Figura 5 encontra-se o comportamento de sete isothermas das quais T_1 , T_2 e T_3 exibem equilíbrio líquido-vapor (ELV) ou líquido-gás (lg) e equilíbrio líquido-líquido (ELL) ou $l_1=l_2$. Já as isothermas T_4 a T_7 exibem somente ELV. Na projeção P-T da Figura 5, as isothermas localizadas abaixo das temperaturas críticas dos compostos A e B interceptam os eixos verticais nas pressões de vapor dos componentes puros. Para as isothermas que se encontram acima do ponto crítico do componente A, existe um ponto crítico de mistura cada vez mais perto de B conforme a temperatura aumenta. Nos três diagramas, a linha descontínua $l=g$ que se estende desde C_A até C_B une todos os pontos críticos da mistura binária. Para a isoterma T_3 , a baixas pressões, uma fase vapor se

encontra em equilíbrio com uma fase líquida. Com o aumento da pressão, a fase líquida se divide em duas l_1 e l_2 , de composições diferentes. Unindo todos os pontos de equilíbrio trifásico e projetando sobre o plano P-T, obtém-se a linha l_1l_2g . O domínio característico do equilíbrio líquido-líquido vai diminuindo conforme a temperatura aumenta, até chegar no ponto $l_1=l_2+g$ onde a segunda fase líquida desaparece, correspondendo à definição anteriormente dada ao Ponto Crítico Terminal Superior (UCEP- *Upper Critical End Point*) (NDIAYE, 2004; BENDER, 2008).

TIPO III: Estes diagramas se caracterizam pela interseção de regiões de coexistência de fases e por apresentarem uma linha divergente de pontos críticos. O diagrama P-x da Figura 6 expõe a evolução da zona de imiscibilidade líquido-líquido a diferentes temperaturas.

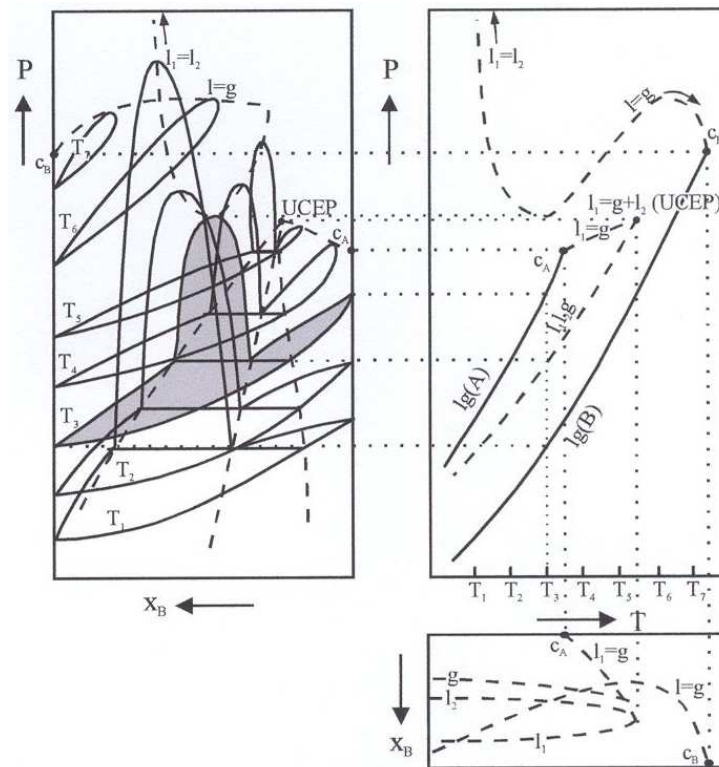


Figura 6. Projeções P-x, P-T e T-x dos diagramas de fases do Tipo III (ESPINOSA, 2001).

Pode-se observar que um aumento de temperatura, a partir de C_B , modifica a forma da região bifásica, com um tipo de transição gradual passando das formas típicas de equilíbrio l-g para aquelas com domo característico do equilíbrio líquido-líquido. A linha dos pontos críticos se estende desde o ponto crítico do componente menos volátil (C_B) até a zona de alta pressão. A forma desta linha pode variar bastante conforme aumentam as diferenças entre componentes.

TIPO IV: Resultam da interseção de regiões de coexistência de fases e se caracterizam por exibirem uma linha crítica que parte do ponto crítico do composto menos volátil e converge para a linha de equilíbrio trifásico l-l-g com uma transição continua de l-g a l-l. Na Figura 7, é possível observar a localização dos pontos críticos dos componentes puros, representados por C_1 e C_2 e as transições bifásicas e trifásicas.

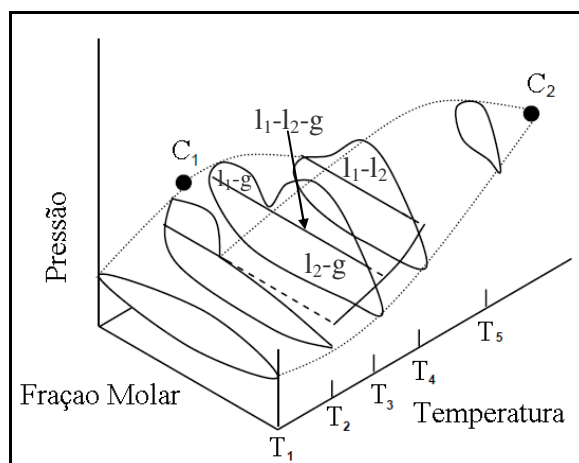


Figura 7. Projeção P-T-x para mistura de fluidos com comportamento de fases Tipo IV (ARCE, 2005).

TIPO V: Os diagramas de fases do Tipo V são, na verdade, diagramas do Tipo IV com o Ponto Crítico Inferior Terminal (LCEP- Lower Critical End Point), de baixa temperatura, oculto devido à presença de uma fase sólida, dificilmente obtidos experimentalmente. Na Figura 8, constam projeções P-x, P-T e T-x para um sistema binário de comportamento pertencente ao Tipo V. Mais uma vez a ocorrência de transições

bifásicas l-l e l-g e trifásicas l-l-g, porém o aparecimento da solidificação abaixo do LCEP ou em alguns casos até acima deste.

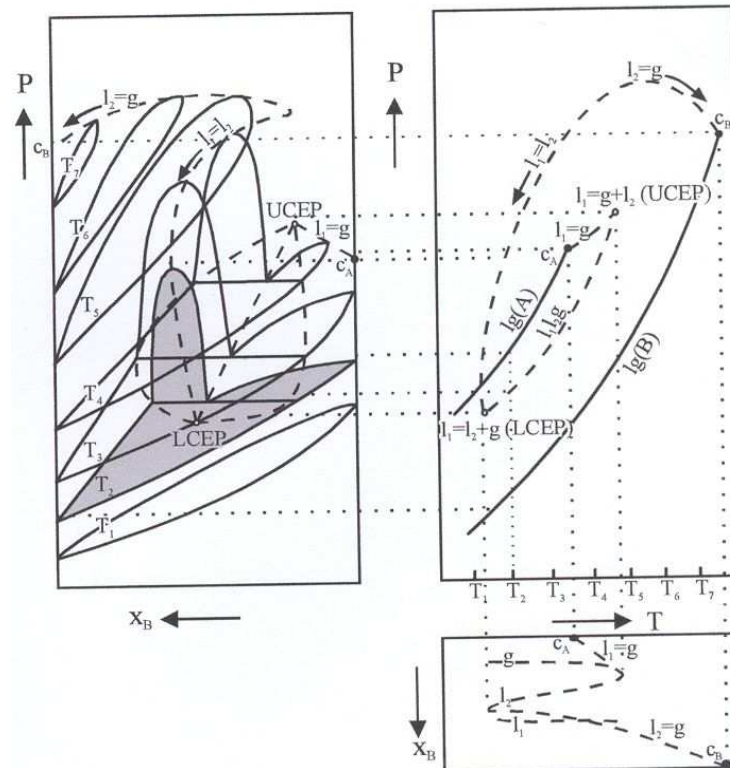


Figura 8. Projeções P-x, P-T e T-x dos diagramas de fases do Tipo V (ESPINOSA, 2001).

TIPO VI: Este tipo de comportamento de fase é encontrado em misturas binárias onde, as moléculas dos componentes possuem ligações do tipo ligação de hidrogênio, por esta razão, vários sistemas aquosos pertencem a este grupo. É caracterizado por duas linhas críticas. A primeira conecta o UCEP ao LCEP, de um equilíbrio l-l-g de baixa temperatura, e formação de uma parábola côncava ou domo que dá origem a lacunas fechadas de imiscibilidade LL. A segunda linha crítica conecta os pontos críticos dos componentes puros.

3.3.1 Metodologias Experimentais

O equilíbrio de fases a altas pressões pode ser determinado por diferentes metodologias experimentais, sendo que a seleção da técnica mais adequada depende basicamente de três fatores: custo, propriedades físico-químicas dos componentes envolvidos e condições de operação dos experimentos (MCHUGH e KRUKONIS). São divididos em três categorias:

i. Métodos Dinâmicos $\left\{ \begin{array}{l} \text{Extrativo (saturação)} \\ \text{Contínuo} \end{array} \right.$

Métodos dinâmicos são aqueles em que pelo menos uma das fases do sistema está sujeita a um deslocamento em relação à outra. Os dois métodos dinâmicos distinguem-se quanto ao contato entre as fases envolvidas no sistema.

ii. Métodos Estáticos $\left\{ \begin{array}{l} \text{Analítico} \\ \text{Sintético} \end{array} \right.$

Os métodos estáticos, por sua vez, têm como principal característica o fato do sistema ser fechado, sendo que no método estático analítico a identificação da composição é feita diretamente pela retirada de amostra das fases em equilíbrio, enquanto que no método estático sintético, a análise é realizada através de técnicas não intrusivas (DARIVA, 2000).

iii. Métodos com Recirculação

Alguns autores classificam o método com recirculação como dinâmico (uma vez que ocorre fluxo de uma fase para outra), enquanto outros o consideram como estático devido às semelhanças na etapa de retirada de amostras das fases em equilíbrio. Historicamente, pode-se dizer que o método com recirculação surgiu como melhoria aos métodos estáticos; porém, devido as suas semelhanças com os métodos dinâmicos, muitos autores preferem classificá-lo como tal.

3.4 Modelagem Termodinâmica e cálculo de equilíbrio de fases a altas pressões

A grande maioria dos processos de engenharia química e de alimentos centra seus estudos em misturas. O *design* destes processos é baseado em informações termodinâmicas, com particular interesse na composição das fases que estão em equilíbrio. Equilíbrio, do ponto de vista termodinâmico, significa ausência de modificações e de qualquer tendência para modificações em uma escala macroscópica (SMITH, VAN NESS e ABBOTT, 2007).

Do critério de equilíbrio de fases temos que:

$$\hat{f}_i^I = \hat{f}_i^{II} \quad (1)$$

onde f é a fugacidade, i representa um componente e I e II as fases.

Para o equilíbrio líquido-vapor (L-V) e líquido-líquido (L_1 - L_2) aqui representados temos, respectivamente:

$$\hat{f}_i^V = \hat{f}_i^L \quad (2)$$

ou

$$y_i \hat{\phi}_i^V(T, P, y) = x_i \hat{\phi}_i^L(T, P, x) \quad (3)$$

e

$$\hat{f}_i^{L_1} = \hat{f}_i^{L_2} \quad (4)$$

ou

$$x_i \hat{\phi}_i^{L_1}(T, P, x) = z_i \hat{\phi}_i^{L_2}(T, P, z) \quad (5)$$

onde, ϕ denota o coeficiente de fugacidade, y a fração molar na fase vapor, x e z , as frações molares nas fases líquidas pesada e leve, respectivamente.

Desta forma, estabelecem-se relações entre a fugacidade de um componente e as quantidades fisicamente mensuráveis, tais como temperatura, pressão e composição.

A utilização de Equações de Estado (EDEs) para calcular ou correlacionar propriedades termodinâmicas e descrever o equilíbrio de fases, abrindo o exaustivo e por vezes caro processo prático de obtenção de dados, é continuamente foco de estudos das áreas da engenharia, haja vista a evolução dos modelos e o aumento de sua complexidade.

Os modelos termodinâmicos utilizados na literatura para o estudo do comportamento de fases de sistemas a altas pressões podem ser divididos em três grupos: EDEs cúbicas, modelos de perturbação e modelos de rede. Nesta tese, optou-se pela utilização de uma EDE cúbica, a equação de Peng-Robinson (PENG e ROBINSON, 1976), extremamente simples e eficiente para correlação de dados experimentais, a qual integra o grupo dos modelos mais usados na representação do equilíbrio de fases a altas pressões.

A equação de Peng-Robinson (PR) é uma EDE tipo van der Waals, cúbica em volume, a qual pode ser obtida a partir da função de partição generalizada de van der Waals usando ferramentas da termodinâmica estatística.

As EDEs cúbicas tipo van der Waals têm como forma original a equação geral apresentada por Sandler (2006).

$$P - \frac{RT}{v-b} + \frac{a}{v^2 + ubv + qb^2} = 0 \quad (6)$$

Quando fixos $u = 2$ e $q = -1$, obtém-se a equação de estado cúbica de Peng-Robinson:

$$P = \frac{RT}{v-b} - \frac{a}{[v(v+b) + b(v-b)]} \quad (7)$$

onde P é a pressão absoluta do sistema, T a temperatura absoluta e v o volume molar. Para o cálculo dos coeficientes a e b da Equação 7, podem ser empregados as regras de mistura quadráticas de van der Waals a dois parâmetros independentes da temperatura (vdW2):

$$a = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j a_{ij} \quad (8)$$

$$b = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j b_{ij} \quad (9)$$

Na Equação 8 a_{ij} é conhecido como o parâmetro atrativo presente na equação de estado (EDE) em relação às moléculas dos componentes i e j , enquanto que na Equação 9 b_{ij} é o parâmetro que representa a repulsão entre as moléculas dos componentes do sistema. Para o cálculo de a_{ij} e b_{ij} , as seguintes regras de combinação são comumente utilizadas:

$$a_{ij} = (a_{ii} a_{jj})^{0.5} (1 - k_{ij}) \quad (10)$$

$$b_{ij} = 0.5(b_{ii} + b_{jj})(1 - l_{ij}) \quad (11)$$

onde k_{ij} e l_{ij} são parâmetros de interação binária entre os componentes de uma mistura. O parâmetro k_{ij} está associado à energia de atração entre as moléculas da mistura (a_{ij}) e o parâmetro l_{ij} é associado à energia de repulsão entre tais moléculas (b_{ij}). Na literatura, para algumas misturas os parâmetros k_{ij} e l_{ij} já estão bem definidos. Entretanto, quando os valores desses parâmetros não estão disponíveis, eles podem ser obtidos através do ajuste do modelo termodinâmico a dados experimentais (NDIAYE, 2004).

Para a Equação de Peng-Robinson tem-se que:

$$a_{ii} = \frac{0,45724R^2 Tc_i^2}{Pc_i} \left[1 + (0,37464 + 1,54226w - 0,26992w^2) (1 - Tr_i^{0.5}) \right]^2 \quad (12)$$

$$b_{ii} = 0,07779R \frac{RTc_i}{Pc_i} \quad (13)$$

onde, w é o fator acêntrico, T_{c_i} e P_{c_i} representam respectivamente as temperaturas e pressão críticas do componente i , e $Tr_i = \frac{T}{T_{c_i}}$, a temperatura reduzida do componente i .

3.5 Formação de Micropartículas e Encapsulamento

Extratos vegetais podem ser utilizados na sua forma bruta, mas por serem susceptíveis a modificações físico-químicas e sensoriais, estes devem sofrer algum processo de conservação para manter sua estabilidade como matéria-prima. Ainda, esses extratos podem apresentar compostos que possuem atividade biológica, porém, a maioria destes compostos são quimicamente instáveis e, portanto, passíveis de oxidação. Submeter extratos ao encapsulamento é uma forma de estabilizar estes compostos com a possibilidade de uma única operação após a extração.

A indústria de alimentos utiliza técnicas de encapsulamento com várias aplicações, como (DESAI e PARK, 2005):

- Proteger o material que está no núcleo da cápsula da sua degradação, devido a efeitos causados pelo ambiente externo (calor, umidade, ar e luz);
- Controlar a taxa de transferência do material do núcleo para o exterior;
- Modificar características físicas do material original;
- Mascaram o gosto desagradável de determinados ingredientes;
- Conseguir uma dispersão uniforme no alimento que acolherá o material;
- Separar componentes de uma mistura que possam reagir de alguma forma com o outro.

Quanto ao tamanho, segundo Ré (1998), as partículas formadas podem ser classificadas em nanopartículas ($< 0,2 \mu\text{m}$), micropartículas ($0,2$ a $5000 \mu\text{m}$) e macropartículas ($> 5000 \mu\text{m}$). Entretanto, em outubro de 2011, a Comissão Europeia (European Commission- EC, 2012) designou que, entende-se por nanomaterial, um

material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50 % ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm.

As técnicas de encapsulamento podem ser divididas em três principais classes: (i) processos físicos, como *spray drying*, pulverização em banho térmico, leiteo fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização; (ii) processos químicos: inclusão molecular ou polimerização interfacial; e (iii) processos físico-químicos: coacervação, separação por fase orgânica, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico.

Tecnologias que empregam fluidos sub e/ou supercríticos fazem parte de um conjunto de técnicas de precipitação e encapsulamento que têm sido, de modo recente, foco de pesquisa e inovação. A possibilidade de explorar as propriedades de fluidos sensíveis às mudanças de temperatura e pressão do sistema na busca de maior controle de morfologia, tamanho e distribuição de tamanho das partículas motivam tais investigações.

Para aplicações em indústrias de alimentos, dá-se preferência a utilização de CO₂ como fluido pressurizado, permitindo operações em condições de temperatura amena, em uma atmosfera inerte, apropriadas para produtos termossensíveis (MARTÍN e COCERO, 2008b).

Estas técnicas podem ser divididas em três categorias segundo o emprego do fluido pressurizado, seja como solvente, como soluto, ou como antissolvente.

3.5.1 Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como solventes

A Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS) é uma técnica de formação de partículas que emprega fluidos supercríticos como solventes. Explora as variações do poder de solvência do fluido com as mudanças de pressão. Assim sendo, a maior limitação da técnica RESS é a baixa solubilidade de muitas substâncias no fluido supercrítico.

Algumas modificações na técnica RESS vêm sendo sugeridas para minimizar esta limitação, como o uso de co-solventes, promovendo maior solubilidade do soluto no fluido supercrítico ou surfactantes, para melhorar a dispersão de fases, originando assim a técnica de Impregnação por Solvente Supercrítico (SSI) (COCERO et al., 2009).

Yeo e Kiran (2005) usaram uma abordagem muito interessante para elucidar as tecnologias de formação de partículas que empregam fluidos pressurizados, voltada a representações esquemáticas e diagramas de fases. Para as técnicas de formação de partículas que empregam fluidos supercríticos como solventes os autores escolherem como representante a técnica RESS, explanada nas Figuras 9 e 10, a seguir.

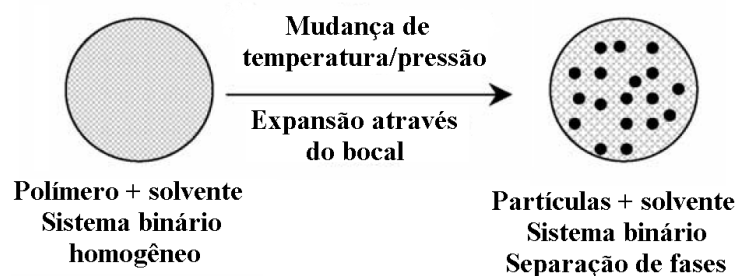


Figura 9. Princípios operacionais da técnica RESS (adaptado de YEO e KIRAN, 2005).

A técnica RESS consiste em expandir, a condições ambientes de temperatura e pressão, uma solução supercrítica contendo o soluto dissolvido, levando à perda do poder solvente do fluido e, conseqüentemente, à precipitação do soluto.

Na Figura 10a observa-se, em diagrama P-T, o deslocamento do sistema durante o processo para a obtenção das partículas através dos processos onde o fluido pressurizado é utilizado como solvente.

As linhas pontilhadas na projeção P-T representam o caminho do processo. O sistema, representado através da posição do símbolo ●, é submetido inicialmente a uma região homogênea, ou seja, a solução encontra-se em uma fase, então é conduzida a uma

região de separação, de duas fases, cruzando o limite Fluido-Sólido (F-S) ou, também possível, limite líquido-líquido (L-L), para consequente precipitação.

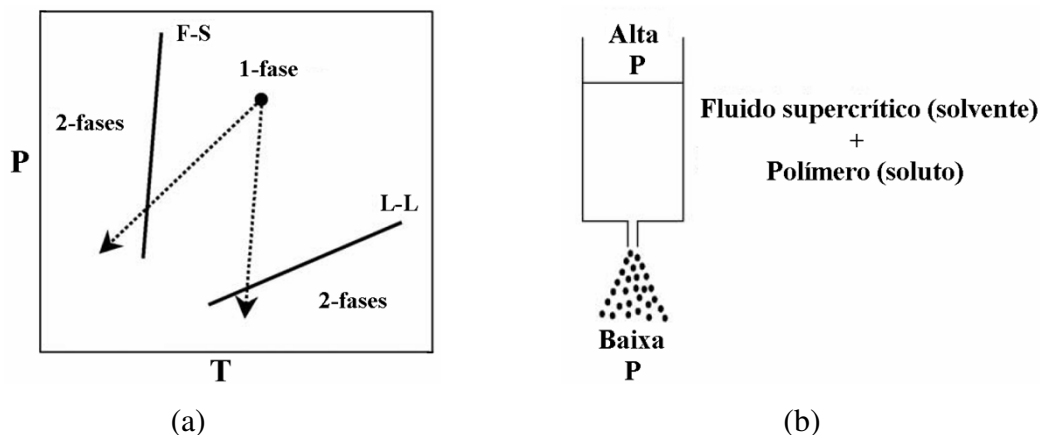


Figura 10. Representação esquemática do processo RESS (adaptado de YEO e KIRAN, 2005). (a): Caminhos do processo em projeção P versus T ; (b): conceito da prática experimental.

Já a Figura 10b apresenta a expansão através do bocal. O diâmetro e comprimento do bocal são fatores que influenciam o tamanho da partícula gerada.

3.5.2 Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como solutos

Partículas de Soluções Saturadas de Gás (PGSS) é a técnica indicada para produzir partículas de materiais que absorvem fluidos supercríticos em altas concentrações. Necessita de baixa demanda de gás e reduzida pressão de operação. O princípio da técnica PGSS (Figura 11) e os parâmetros de operação diferem muito pouco da técnica RESS, porém, aqui, o fluido supercrítico ou gás comprimido é dissolvido em um material sólido fundido e esta mistura é rapidamente despressurizada, acarretando na formação de partículas por precipitação. De tal forma, esta técnica tem com desvantagem que poucas substâncias podem ser fundidas a altas temperaturas sem a ocorrência de alterações químicas ou físicas (MARTÍN e COCERO, 2008a).

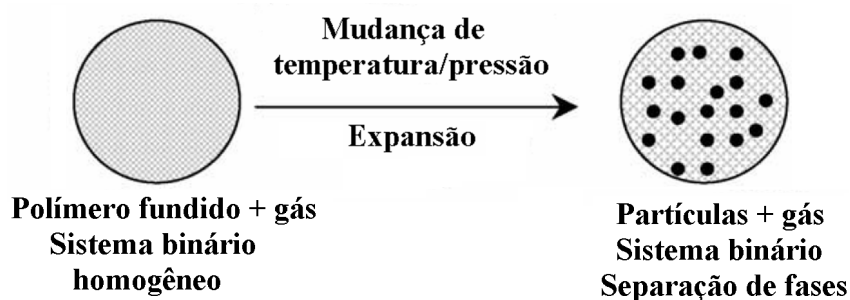


Figura 11. Princípio operacional da técnica PGSS (adaptado de YEO e KIRAN, 2005).

A Figura 12a apresenta o princípio que governa a indução à separação de fases após o estado homogêneo inicial da solução, onde nesta técnica, a linha pontilhada na projeção P-T representa o único caminho para precipitação, cruzando o limite F-S.

A expansão através do bocal para a técnica PGSS é idêntica à técnica RESS, como pode ser visto na Figura 11b.

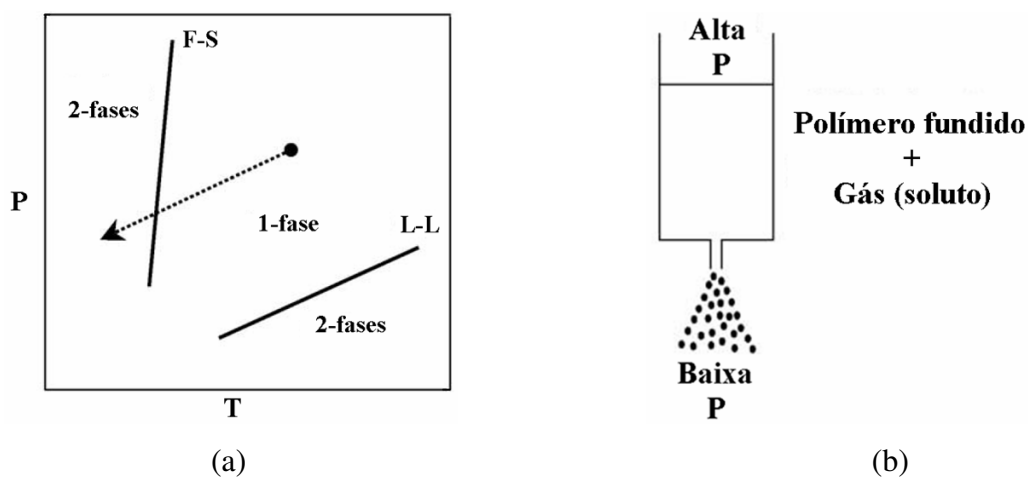


Figura 12. Representação esquemática do processo PGSS (adaptado de YEO e KIRAN, 2005). (a): Caminhos do processo em projeção P *versus* T; (b): conceito da prática experimental.

3.5.3 Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como antissolventes

São várias as técnicas que pertencem a esta categoria, pois ambas têm como base a imiscibilidade ou muito baixa miscibilidade do soluto no antissolvente, e completa miscibilidade no solvente. É desejado, ainda, que o solvente tenha afinidade maior pelo antissolvente do que pelo soluto, de tal forma que, quando a solução (solvente+soluta) é colocada em contato com o antissolvente e ao mesmo tempo a pressão é reduzida, a solubilidade do soluto no solvente é drasticamente reduzida, assim, o antissolvente causa uma queda no poder de solvatação do solvente, levando à precipitação do soluto.

Fazem parte deste conjunto as técnicas: Gás Antissolvente (GAS); Antissolvente Supercrítico (SAS); Sistema de Extração de Solvente em Aerossol (ASES); Precipitação com Antissolvente Comprimido (PCA); Extração de Emulsões por Fluido Supercrítico (SFEE); e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS).

O princípio de operação das técnicas que empregam fluidos pressurizados como antissolvente é esboçado na Figura 13, onde o polímero representa o soluto, e o gás ou fluido supercrítico recebe o papel de antissolvente.

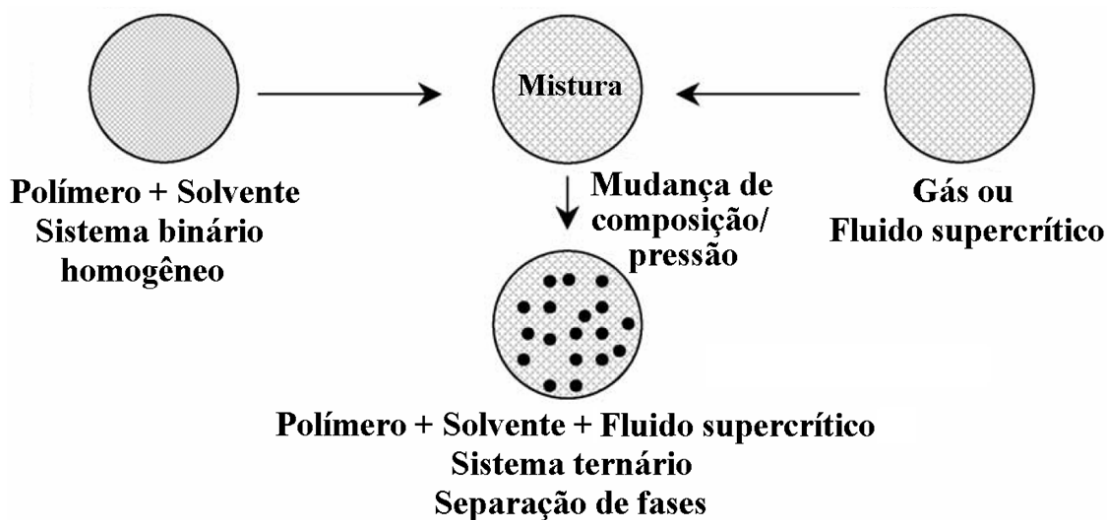


Figura 13. Princípios operacionais das técnicas GAS, SAS, ASES, PCA e SEDS (adaptado de YEO e KIRAN, 2005).

Dispõe-se, inicialmente, de um sistema binário homogêneo formado pelo soluto e pelo solvente, como pode ser visto na Figura 13 e Figura 14a. Este sistema então é conduzido ao encontro do antissolvente, formando uma mistura. Como resultado à mudança de pressão, temperatura e composição, o sistema que se situava inicialmente em região de única fase é deslocado para a região de duas fases onde a separação é possível, induzindo a formação de partículas.

Na Figura 14b, a projeção P-T demonstra a consequência do contato da solução, que se encontrava na região monofásica, com o antissolvente. Ocorre, para estes sistemas, um deslocamento do limite de L-L, a pressões mais altas, ou do limite de F-S, a temperaturas mais altas, de tal forma que, o sistema se encontrará então, no domínio da região bifásica.

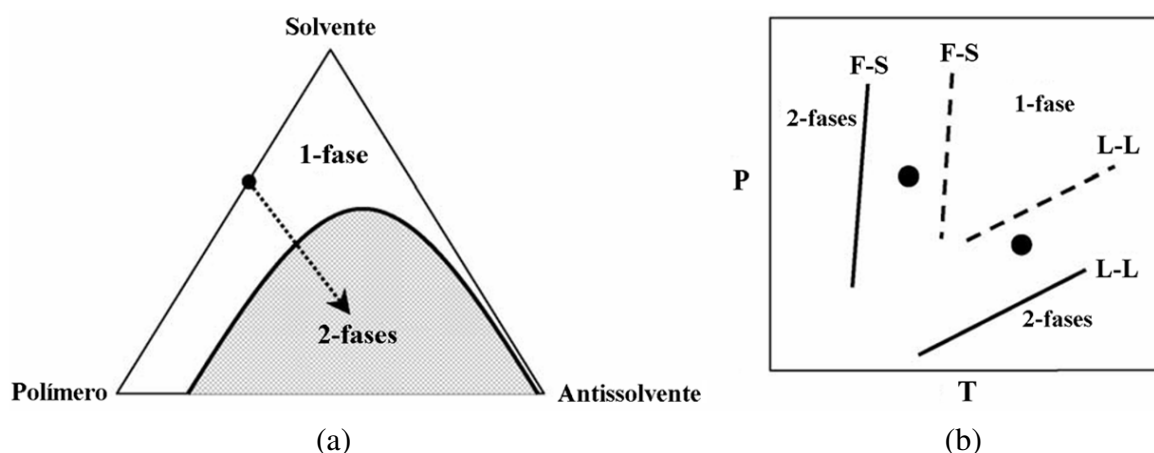


Figura 14. Representação esquemática dos processos GAS, SAS, ASES, PCA e SEDS (adaptado de YEO e KIRAN, 2005). (a): Diagrama de fases ternário hipotético; (b): Caminhos do processo em projeção P *versus* T.

A principal diferença entre estas técnicas é a maneira como ocorre o contato entre a solução (soluto+solvente) e o antissolvente comprimido, como demonstra a Figura 15. Na técnica GAS o antissolvente é injetado na solução, aumentando a pressão e sua concentração no sistema, causando a precipitação do soluto. Para a técnica GAS, o antissolvente não necessita estar em seu estado supercrítico. As técnicas SAS, ASES e PCA

têm o contato feito de forma contrária a GAS, uma vez que a solução é borrifada no antissolvente. Já para a técnica SEDS, o contato é semelhante ao praticado nas técnicas SAS, ASES e PCA, porém é feito de forma axial no bocal, como ilustrado na Figura 15c. Ainda, nesta última técnica é possível adicionar um terceiro canal no bocal para sistemas que fazem uso de dois solventes.

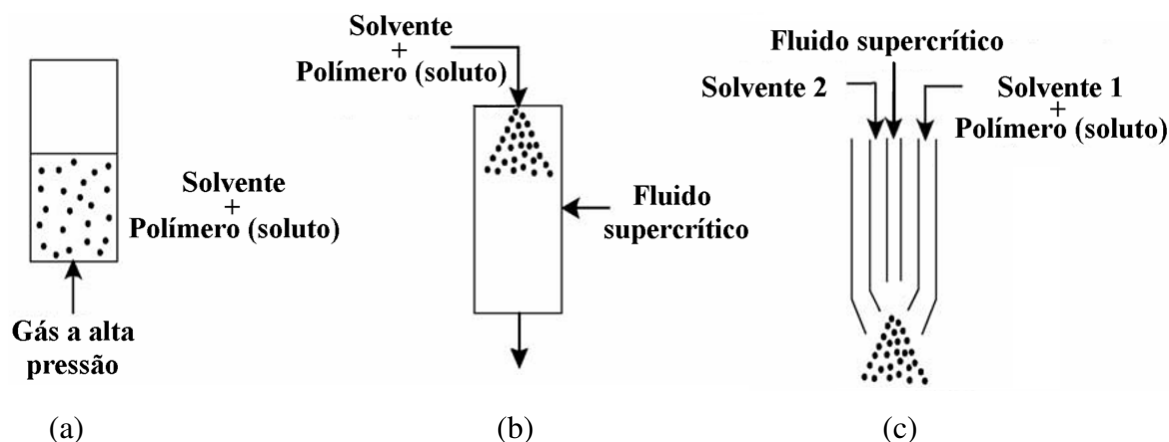


Figura 15. Conceito da prática experimental (adaptado de YEO e KIRAN, 2005). (a): técnica GAS; (b): técnicas SAS, ASES e PCA; (c): técnica SEDS.

Cocero et al. (2009) apresentaram uma revisão sobre os polímeros mais frequentemente utilizados para o processo de encapsulamento empregando fluidos pressurizados. Os mesmos autores citam que são priorizados os polímeros à base de amido ou biopolíésteres. Desses últimos, os principais são o ácido polilático (PLA), policaprolactona (PCL), polilactídeo, poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PGLA), polietilenoglicol (PEG), polihidroxialcanoatos (PHAs) e poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV).

Existem algumas características desejáveis consideradas na escolha de um polímero para aplicação na indústria de alimentos como material encapsulante, principalmente para gorduras, óleos e aromas. É evidente, porém cabe mencionar, que o polímero deve ser atóxico, necessita apresentar baixa higroscopicidade, ser de sabor leve, não deve reagir com o material a ser encapsulado (material de núcleo), possuir baixa viscosidade em concentrações elevadas, de fácil manipulação durante o processo, deve ainda ter habilidade

de selar e reter o material ativo dentro da estrutura da cápsula, ter solubilidade em solventes comumente utilizados, e por outro lado, deve “liberar” completamente este solvente ao final do processo. Ainda, proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos e possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo (SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000).

3.6 Breves considerações sobre o estado da arte

Pesquisas realizadas na Embrapa Semi-Árido (Petrolina-PE), em conjunto com as Universidades Federais da Bahia e Paraíba, e as vinícolas Santa Maria, Garziera e Milano, ambas localizadas em Pernambuco, na busca por novas rotas para resíduos da agroindústria vinícola, identificaram qualidades forrageiras nas sobras das uvas processadas na indústria de vinho. Este material fibroso foi apontado pelos pesquisadores como um bom ingrediente para compor dietas alimentares para ovinos e caprinos, em especial durante o período seco quando há escassez de forragens no sertão.

Coordenador deste estudo, Gherman Garcia Leal Araújo, da Embrapa Semi-Árido, considera que, embora seja resíduo, este material deve ser valorizado como um produto da agroindústria vinícola e do negócio agrícola da ovinocultura. As boas propriedades nutricionais, que o qualificam como um alimento volumoso para compor dietas completas, aliado a uma oferta que pode ser estável ou até crescente devido à expansão das vinícolas, devem tornar mais frequente o uso desse produto nas roças de agricultores, prevê o pesquisador (CPATSA, 2012).

Outra proposta aqui apresentada é a utilização das sementes, para a obtenção do extrato de sementes de uvas. Da revisão realizada nota-se que, apesar do emprego de SFE para obtenção de extrato estar consolidado (GÓMEZ; LÓPEZ e de la OSSA, 1996; LEE et al., 2000; MURGA et al., 2000; REVERCHON e MARRONE, 2001; MURGA et al., 2002; ASHRAF-KHORASSANI e TAYLOR, 2004; BEVERIDGE et al., 2005; FIORI, 2007; FREITAS, 2007; FREITAS, et al., 2008; PASSOS et al., 2010), por não ser um método clássico, ainda não se encontram disponíveis informações do sistema específico estudado

através de dados de equilíbrio para determinar comportamento de fases da mistura, a distribuição dos compostos de interesse nas distintas fases e estimar a possível composição do produto extraído (SOUSA et al., 2002) frente a diferentes temperaturas, pressões e composições do sistema.

Quanto à aplicação na forma de encapsulado, na literatura são reportados vários trabalhos sobre a utilização de técnicas de encapsulamento para retardar ou evitar a oxidação de óleos e extratos, atraindo a atenção da indústria de alimentos (AYALA-ZAVALA et al., 2008; HUSSAIN e MAJI, 2008; CHOI et al., 2009; LEIMANN et al., 2009; AHN et al., 2008a;b; KLAYPRADIT e HUANG, 2008; KLINKESORN e MCCLEMENTS, 2009; KOLANOWSKI, LAUFENBERG, KUNZ, 2009; OMAR et al., 2009), no entanto, todos estes trabalhos utilizaram técnicas convencionais de encapsulamento.

Constam alguns trabalhos utilizando técnicas baseadas em fluidos pressurizados ao encapsulamento de extratos e óleos vegetais (VARONA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2004; MARTÍN et al., 2010), porém não foi encontrado na literatura aberta a utilização da técnica SEDS para o encapsulamento de extratos. Percebe-se que é uma área nova de aplicação de óleos e extratos com grandes possibilidades de estudo.

O método estático sintético, assim como o aparato experimental e os procedimentos estão descritos com detalhes em vários estudos relacionados a equilíbrio de fases a altas pressões de óleos e extratos, e dos seus principais componentes (ácidos graxos insaturados) em fluidos comprimidos (NDIAYE et al., 2006; NDIAYE, 2004; LANZA, 2004; FRANCESCHI et al., 2004; FRANCESCHI et al., 2006; BENAZZI et al., 2006; ROSSO et al., 2009; RODRIGUEZ-REARTES et al., 2009; ROSSO COMIM et al., 2010a; STUART, DARIVA e OLIVEIRA, 2000) e, desta forma, foi o método selecionado para desenvolvimento do presente trabalho. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura que reportasse dados de equilíbrio de fases dos sistemas contendo extrato de semente e/ou seus componentes em dióxido de carbono utilizando o método estático sintético.

Poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) ou simplesmente PHBV foi recentemente utilizado para a produção de micro e nanopartículas para encapsulamento de compostos nutracêuticos e pigmentos de interesse em engenharia de alimentos (FRANCESCHI et al., 2008a,b; FRANCESCHI, 2009; FRANCESCHI et al., 2009; PRIAMO et al., 2010). Ressalta-se que este composto já foi proposto como matéria-prima na produção de embalagens para a indústria de alimentos (BUCCI, TAVARES e SELL, 2005) e tem se consolidado no campo de biomedicina (BARAN, OZER e HASIRCI, 2002; CHEN e DAVIS, 2002; CHEN e WU, 2005).

Na literatura estão disponíveis também, dados de equilíbrio de fases a altas pressões para os sistemas binário contendo CO₂ + Diclorometano (CORAZZA et al., 2003), antissolvente e solvente, respectivamente e, também para o ternário CO₂ + Diclorometano + PHBV (FRANCESCHI et al., 2008b), onde o polímero PHBV é o soluto. Ambos os sistemas foram determinados para fundamentar o processo de encapsulamento aplicando a técnica SEDS (PRIAMO et al., 2010; PRIAMO, 2011; FRANCESCHI, 2009). Sendo assim, a partir destas informações, optou-se por estes três componentes somados ao extrato de sementes de uva para a formação do sistema de encapsulamento empregando a mesma técnica SEDS, como uma forma de aplicação deste trabalho na indústria alimentícia.

CAPÍTULO 4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo encontra-se descrito o material utilizado durante o desenvolvimento experimental deste trabalho, assim como a descrição detalhada dos métodos e análises utilizadas para o alcance dos resultados. O capítulo está subdividido sequencialmente em etapas que envolvem a aquisição das sementes de uva, a obtenção e caracterização do extrato, o equilíbrio de fases e, por fim, a aplicação com o encapsulamento do extrato.

Os experimentos de extração por fluido supercrítico foram desenvolvidos em cooperação com o Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais (LASEFI) do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A caracterização do extrato de sementes de uva foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da UNICAMP. A obtenção de dados de equilíbrio de fases e encapsulamento do extrato de sementes de uva empregando fluido supercrítico foram realizados no Laboratório de Termodinâmica Aplicada do DEA da Universidade Regional Integrada (URI), Campus de Erechim (RS). O tamanho e morfologia das partículas formadas foram observadas no Laboratório de Microscopia do Instituto de Química da UNICAMP. Demais experimentos e análises foram efetuados no Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (ExTrAE), DEA/UNICAMP.

4.1 Material

Foram utilizados neste trabalho os solventes etanol anidro (99,9 % de pureza) e diclorometano (99,5 % de pureza), ambos adquiridos junto à Merck (Darmstadt, Alemanha), e também clorofórmio (99,5 % de pureza) e heptano (99,5 % de pureza), estes fornecidos pela Quimex (Porto Alegre, Brasil). Dióxido de carbono (CO_2) em fase líquida (99,0 % de pureza) utilizado para a SFE foi obtido da Gama Gases Industriais (Campinas, Brasil). Já para a obtenção dos dados de equilíbrio de fases e para a técnica SEDS, CO_2 em fase líquida (99,9 % de pureza) foi adquirido da White Martins S.A (São Paulo, Brasil). Todos estes solventes foram utilizados como recebidos, sem quaisquer tratamentos prévios,

apenas armazenados em local apropriado segundo recomendações de fornecedores. O polímero poli (hidroxibutirato-cohidroxivalerato) (PHBV) com massa molecular média (Mw) de 196.000 Da e índice de polidispersão de 1,85 foi cedido pela empresa PHB Industrial S/A (Ribeirão Preto, Brasil).

4.2 Obtenção e caracterização da matéria-prima

Neste trabalho, para melhor aproximação da realidade industrial, foi obtido posteriormente à descuba e prensagem, o resíduo integral do processo de vinificação, sendo composto de semente, casca e engaço de três variedades de uva (espécie *Vitis vinifera*), Malbec, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. As uvas foram cultivadas em São Joaquim (SC) a 1260 m de altitude e processadas pela vinícola Villa Francioni, que gentilmente doou o material para o desenvolvimento deste trabalho.

Duas coletas de resíduo, em momentos diferentes, foram feitas. A primeira ocorreu em abril de 2009, em que se obteve uma mistura composta apenas das variedades Malbec e Cabernet Franc, na proporção 1:1, denominada “**Lote 1**”. Todo material foi seco ao sol por sete dias ininterruptos e o máximo de sementes foram recolhidas com auxílio de peneira e ar forçado, contudo ainda restaram algumas cascas unidas às sementes. Em maio do ano de 2011, a segunda coleta foi feita, a qual era formada de três variedades Malbec, Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, na proporção 1:1:2, chamada “**Lote 2**”. Porém, nesta última coleta não ocorreram dias sucessivos de sol para efetuar a secagem, de tal forma, foi feita uma pré-secagem ao sol por 3 dias, finalizada em secador de bandejas em leito fixo com ar forçado ascendente, na velocidade de $2,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, estabilizado a 313 K por 12 horas. Esta secagem foi realizada no Laboratório de Engenharia de Sistemas Agro-Alimentares (LENSAA) do DEA da UNICAMP. Após este procedimento, as sementes, dispostas nas diferentes bandejas, foram unidas e homogeneizadas para armazenamento. A separação das sementes do bagaço, casca e engaço foi mantida da mesma forma para ambos os lotes.

Durante todo o transporte, desde a coleta na vinícola até a chegada ao laboratório, a matéria-prima foi acomodada em sacos de plástico preto, fechados, visando minimizar ao

máximo possível reações de oxidação. No laboratório, as sementes foram acondicionadas em freezer doméstico a 255 K. As sementes do **Lote 1** ficaram armazenadas pelo período de 11 dias até as etapas descritas a seguir, antes da extração do óleo. Já o **Lote 2** ficou armazenado por 10 meses.

As sementes de uva foram trituradas em moinho de facas (Marconi, modelo MA 340, Piracicaba, SP) provocando aumento na superfície de contato, forçando então as partículas menores formadas a passarem através de uma peneira, em crivo circular de 10 *Mesh*, disposta na saída da câmara de moagem. A moagem foi sempre realizada no dia antecedente à extração, de forma lenta e com tempo efetivo de moagem de 2 minutos. Nos intervalos entre as moagens o moinho era desligado por 5 minutos para evitar aumento de temperatura, ocasionado pelo atrito das facas no cabeçote de moagem, o qual acarretaria em aumento da acidez livre do extrato final.

Determinou-se, em etapa seguinte, a umidade das sementes trituradas do **Lote 1** através de destilação com solvente imiscível xilol (JACOBS, 1973), método utilizado pelo LASEFI, onde a obtenção do extrato foi realizada, explanada na próxima seção. Este método permite diferir água de materiais voláteis da matéria-prima. São utilizados dispositivos de simples manipulação como, balão de vidro de fundo redondo de 250 mL, contendo as sementes e xilol, disposto sobre uma manta de aquecimento com controlador de voltagem Fisaton (modelo 102, São Paulo, Brasil), conectado a um condensador com saída para coletor graduado, que recebe a água evaporada da amostra. O sistema foi levado à ebulição sob refluxo por 3 h.

A umidade foi expressa em porcentagem (%), base úmida – b.u), calculada pela Equação 14, a seguir:

$$umidade = 100 \times \frac{v \rho_{H_2O}}{F} \quad (14)$$

onde: v é o volume de água condensada (m^3); ρ_{H_2O} é a densidade da água na correspondente temperatura ($kg \cdot m^{-3}$) e F é a massa de alimentação (kg).

Já para as sementes trituradas do **Lote 2**, a umidade foi determinada, em triplicata, através de dois métodos: 1. De acordo com o método da oficial A.O.C.S. - Association of Analytical Communities Ca 2e-84 (2009), por titulação em Karl Fischer (modelo Metrohm 710 KF Tritino - Mettler Toledo, Suíça). Ressalta-se que foi acoplado ao titulador o forno Termoprep, necessário para a determinação de teor de água em amostras sólidas. A vazão de gás nitrogênio (gás de arraste) utilizada foi de $8,33 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$, borbulhado no vaso de titulação, sendo a umidade das sementes evaporada. A temperatura utilizada no forno foi de 383 K, por 6 minutos, cabe assim salientar, que é um método rápido. 2. Utilizou-se uma placa de petri de 50 mm de diâmetro e uma estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, MA – 035). Três amostras de aproximadamente 5 gramas foram acondicionadas nas placas e mantidas por $(377 \pm 1) \text{ K}$ por três horas. Assim, foram retiradas e alocadas em dessecador por aproximadamente 30 minutos, posteriormente pesadas em balança analítica e repetido o procedimento até massa constante. A porcentagem de água nas sementes de uva foi então calculada da seguinte forma:

$$\%_{\text{umidade}} = \frac{[massa_{\text{inicial}} - (massa_{\text{final}} - massa_{\text{placa}})]}{massa_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (15)$$

Determinou-se ainda, para as partículas do **Lote 2**, a atividade de água (a_w), uma análise direta para avaliação de condições críticas de estocagem, já que as amostras deste lote permaneceram mais tempo armazenadas. Conduziu-se a análise em higrômetro digital Aqualab (modelo Series 3TE, Decagon Devices, Pullman, USA) a $(313,1 \pm 0,3) \text{ K}$, em triplicata. Segundo Maltini *et al.* (2003), a_w está relacionada com a maioria das reações de degradação de natureza química, enzimática e física dos alimentos; e é mais fácil de ser medida do que o teor de umidade, além de ser uma medida não destrutiva.

Também, para o mesmo lote, realizou-se a extração convencional do óleo de 0,01 kg de sementes trituradas através da passagem de $1,5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ de hexano (99,0 % de pureza, Merck, Darmstadt, Alemanha), em extrator Soxhlet por 20 horas, segundo Gómez, López e de la Ossa (1996), para simples comparação de rendimento global de extração (% , em base

seca - porcentagem em peso de óleo extraído em relação à quantidade inicial de matéria-prima submetida à extração) em relação à técnica de extração por fluido supercrítico.

4.3 Extração por fluido supercrítico (SFE)

Os experimentos para obtenção do extrato de semente de uva foram desenvolvidos em colaboração com o grupo de pesquisa Tecnologia Supercrítica e Extração com Solvente Aplicadas ao Processamento de Produtos Naturais e Alimentos Funcionais do LASEFI, e em extensão ao trabalho de tese de Prado (2010).

4.3.1 Obtenção do extrato de sementes de uva em escala piloto

Para a obtenção do extrato de sementes de uva foi utilizada uma unidade de SFE em escala piloto Thar Technologies (modelo SFE-2X5LLF-2-FMC, Pittsburgh, EUA), com sistema de controle de pressão, vazão e temperatura automatizado. A unidade é equipada com dois extratores, ambos com volume interno de ~ 5,0 litros e encamisados com mantas de aquecimento de 2000 W de potência, mas apenas um extrator (7), como apresentado na Figura 16, foi operado. Quando utilizados os dois extratores, estes operam de forma alternada simulando um processo contínuo. No interior do extrator acondicionou-se uma célula de *nylon* de abertura 80 *mesh*, com a mesma capacidade do extrator e dentro dessa foi feito o empacotamento da matéria-prima. O sistema possui uma bomba (3) com capacidade máxima de bombeamento de $3,33 \times 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$, utilizada para pressurização e controle de deslocamento do solvente (1 – reservatório contendo solvente).

O solvente foi inicialmente resfriado para atingir o estado líquido com o auxílio de um banho com etileno glicol e água, possibilitando a medida de vazão deste para o sistema. Em seguida, o solvente passa por um trocador de calor (4), antecedente ao extrator, para alcançar a temperatura de operação desejada, e através de um totalizador (5) era conhecida a vazão de solvente. O solvente percorria o leito do extrator que permanecia, assim, pressurizado por um período estático de 20 minutos, garantindo o contato homogêneo do solvente com toda a matéria-prima disposta. Ao término deste período, solvente + extrato

foram então expandidos a três separadores em série (11, 14 e 17) que permitiam operações em diferentes temperaturas e também, com auxílio de válvulas do tipo *Back Pressure Regulator* (13, 16 e 19) diferentes pressões, possibilitando assim, quando desejável, uma separação fracionada, ou, caso contrário, apenas a um separador para realizar a coleta do extrato.

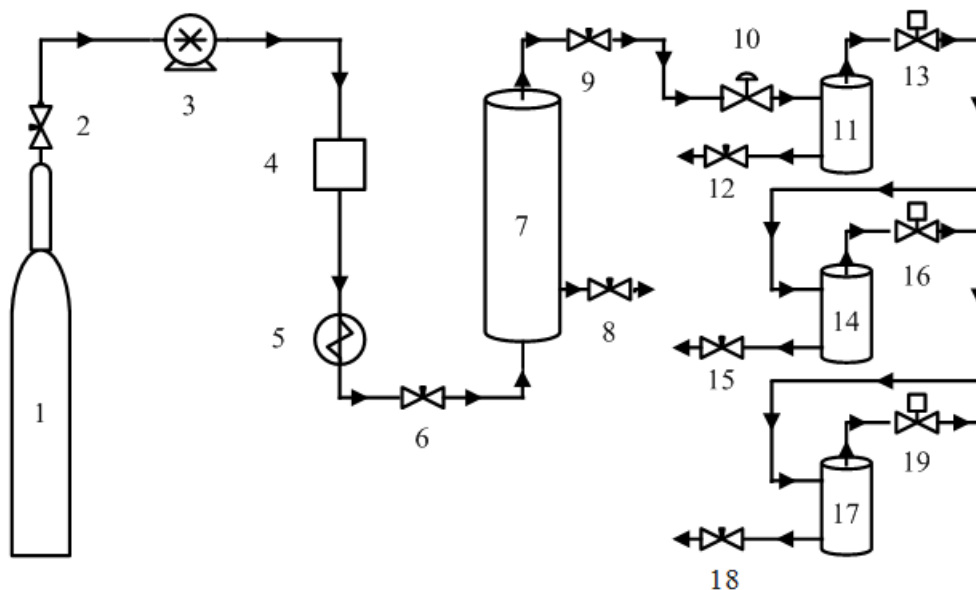


Figura 16. Diagrama esquemático da unidade de extração por fluido supercrítico em escala piloto.

É possível visualizar no diagrama, ainda, a válvula de saída/bloqueio do reservatório de solvente (2); válvula de entrada do extrator (6); válvula de saída do extrator (9); válvula automática de controle de pressão do extrator (10), as válvulas para coleta do extrato (12, 15 e 18) nos separadores (11, 14 e 17), respectivamente e a válvula de segurança (8).

Na Figura 17, uma foto da unidade piloto de SFE é exibida, a qual se encontra no LASEFI do DEA da UNICAMP. Destaca-se na imagem o cilindro contendo o solvente CO₂ (A), extrator (B), bomba de pressurização e deslocamento de CO₂ (C), totalizador de vazão de solvente (D) e separadores em série (E, F e G).



Figura 17. Unidade de extração por fluido supercrítico em escala piloto (Thar Technologies).

Foi utilizado como solvente o dióxido de carbono (CO_2) supercrítico em uma vazão média de $2,17 \times 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$ pelo período de 5 h. As condições de operação do extrator foram 313 K e 35 MPa, baseadas em dados publicados na literatura sobre SFE aplicada à obtenção de extrato de sementes de uva (GÓMEZ, LÓPEZ e de la OSSA, 1996; REVERCHON e MARRONE, 2001; FIORI, 2007). Sob condições semelhantes a estas, os autores destes trabalhos anteriores alcançaram rendimento e coeficiente de transferência de massa, através de SFE, próximos aos de uma extração convencional com hexano. Para ambos os lotes, os separadores foram utilizados e operados a 313 K/10 MPa (**11**), 313 K/6 MPa (**14**) e 313 K/3 MPa (**17**). No entanto, os extratos obtidos a partir do **Lote 1**, coletados nos três separadores, foram unidos e homogeneizados. Enquanto para o **Lote 2**, manteve-se a separação dos extratos. Todos os experimentos de extração foram realizados em triplicata e os extratos obtidos foram armazenados em freezer doméstico a 255 K para análises futuras.

O extrato de sementes de uva obtido a partir do **Lote 1** foi utilizado neste trabalho para o estudo da determinação experimental de dados de equilíbrio de fases a altas

pressões, para posteriormente ser submetido ao encapsulamento. Enquanto os extratos obtidos a partir do **Lote 2** foram apenas caracterizados, com foco no fracionamento de componentes através da disposição de separadores em série com diferentes pressões de operação.

4.4 Caracterização do extrato de sementes de uva

O extrato de semente de uva obtido foi caracterizado pelas metodologias com técnicas descritas a seguir:

- Composição em ácidos graxos através de cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos – Metodologia Oficial Ce 1–62 da A.O.C.S. – American Oil Chemists' Society (2009). As amostras foram preparadas na forma de ésteres metílicos dos ácidos graxos, anteriormente à análise cromatográfica, pelo método Hartman e Lago (1973).

Para o extrato obtido a partir do **Lote 1**, utilizou-se o Cromatógrafo Gasoso Capilar AGILENT (modelo 6850 SERIES GC SYSTEM) em coluna capilar: DB-23 AGILENT (50 % cianopropil - 50 % metil polisiloxano e dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 μm de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram de fluxo na coluna de $1,67 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, velocidade linear de $0,24 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura do detector de 553 K, temperatura do injetor de 523 K e temperaturas do forno de 383 K por 300 s, 383 a 488 K (5 K/60 s), 488 K por 1440 s. O gás de arraste foi o Hélio e o volume injetado de $1 \times 10^{-9} \text{ m}^3$. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões cromatográficos da Nu Check Prep. (Elysian/Minnesota, EUA).

Já para o extrato obtido do **Lote 2**, a análise foi realizada no ExTrAE. O gás de arraste também foi o Hélio com o mesmo volume de injeção e utilizou-se o mesmo cromatógrafo, porém em coluna capilar: Elite 225 - PERKIN ELMER (50 % cianopropil-metil - 50 % fenil-metil polisiloxano) e dimensões de 29 m, diâmetro interno de 0,25 mm, 0,25 μm de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram de fluxo na coluna de $2,17 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura do detector de 523 K, temperatura do injetor de 523 K e

temperaturas do forno: inicial de 373 K por 120 segundos, 373 a 503 K (7 K /60 s), 503 K por 600 segundos. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de ésteres metílicos de óleos previamente identificados no laboratório. A quantificação foi feita a partir das áreas relativas dos picos;

- A partir da composição molar em ácido graxo do extrato, calculou-se diretamente o índice de iodo do extrato, de acordo com o método oficial Cd 1c-85, recomendado pela A.O.C.S. (2009). É um método simples, que considera a porcentagem do ácido graxo na amostra multiplicada por um fator de conversão, que representa o número potencial de átomos de iodo que reagem com cada ácido graxo;

- A composição em ácidos graxos livres e acilgliceróis parciais foi realizada através de uma recuperação inicial em tetrahidrofurano (THF) livre de bolhas e filtrado e seguida de análise em *High-Performance Size-Exclusion* (HPSEC). Esta análise foi determinada apenas para o **Lote 2**. Empregou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu (modelo LC-20AT, Kyoto, Japão), com bomba quaternária, injetor automático SIL – 20A, equipado com detector de índice de refração Waters (modelo 2414, Waters Associates, Milford, MA, USA). Para a separação foi introduzida em série uma terceira coluna de 50 Å. A temperatura do detector foi mantida a 313 K, volume de injeção de $2 \times 10^{-8} \text{ m}^3$ e como fase móvel THF com fluxo de $1,67 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. A porcentagem relativa de cada componente foi calculada através do *software* LCSolution Shimadzu, dividindo a área do pico de cada classe lipídica (triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol ou ácido graxo) pela soma das áreas dos picos de todos os componentes;

- Estimou-se a provável composição em triacilgliceróis da triplicata do extrato obtido no **Lote 1** com recuperação inicial em tetrahidrofurano (THF) livre de bolhas e filtrado, em seguida encaminhado para cromatografia em cromatógrafo gasoso capilar AGILENT (modelo 6850, series GC SYSTEM) provido de Coluna capilar DB-17 (modelo HT AGILENT CATALOG: 122-1811, 50 % phenil - 50 % metilpolisiloxane), dimensões 15 m, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,15 µm de espessura de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: $1,67 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ fluxo de THF como fase móvel.

Temperatura do detector: 648 K, temperatura do injetor: 633 K e temperatura do forno de 523 - 623 K - (5 K/60 s), 623 K - 1200 segundos. O gás de arraste foi Hélio e o volume injetado $1,0 \times 10^{-9} \text{ m}^3$.

Para o **Lote 2**, foi feita a estimativa, assim como para o **Lote 1**, porém para os dois primeiros separadores em série, descartando o terceiro separador. Ainda, visto que a amostra é um extrato vegetal obtido via SFE, comparou-se o resultado obtido através da cromatografia com o método computacional estatístico recomendado por Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995), a partir da composição molar em ácidos graxos. Este método computacional foi aplicado para a triplicata dos extratos obtidos, novamente apenas nos dois primeiros separadores, e se baseia nas teorias da distribuição “casual” e “1,3-casual 2-casual”. A teoria da distribuição “casual” diz que os ácidos graxos se encontram distribuídos ao acaso, estatisticamente, entre as três posições da molécula do glicerol. Para calcular a composição provável em triacilgliceróis, dois aspectos foram considerados; 1. As composições dos isômeros *trans* foram somadas aos seus respectivos isômeros *cis*. 2. Os triacilgliceróis que apresentaram valores menores que 0,5 % foram ignoradas;

- Por meio de titulação com NaOH (~ 0,03 N) foi determinado o teor de ácidos graxos livres, de acordo com o metodologia oficial da IUPAC (Método 2201, 1979). Empregou-se um titulador automático Metrohm (modelo Titrand 808, Herisan, Suíça), utilizando um *software* TIAMO que demonstra o ponto de viragem potenciométrico, ou seja, o ponto de inflexão da curva de titulação. Diluiu-se 0,001 kg de extrato em $4 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ de solução solvente éter:etanol (1:1, v/v), e submeteu-se à titulação. Através da Equação 16 obteve-se teor de ácidos graxos livres do extrato de sementes de uva.

$$100 \times w_{AGL} = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times \overline{M}_{ácido}}{10 \times m_{amostra}} \quad (16)$$

onde w_{AGL} denota a fração mássica de ácidos graxos livres, V_{NaOH} e N_{NaOH} são o volume gasto na titulação e a normalidade da solução de hidróxido de sódio (NaOH),

respectivamente, $\overline{M}_{\text{ácido}}$ representa a massa molecular média do ácido oléico e m_{amostra} é a massa de extrato de sementes de uva utilizada, determinada gravimetricamente.

Este teor foi expresso como fração mássica de ácido oléico, considerando a massa molecular média do ácido oleico comercial ($282,47 \text{ kg}\cdot\text{kgmol}^{-1}$);

- O conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis foi determinado de acordo com a Metodologia Oficial Ce 8–89 da A.O.C.S. (2009). Os isômeros α - e γ -tocoferol / α - e γ -tocotrienol foram quantificados utilizando uma curva padrão sob condições idênticas às de análise. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta pressão Perkin Elmer (modelo LC 250, Norwalk, CT, USA), equipado com detector de fluorescência (Kyoto, Japan) com excitação a 290 nm e uma coluna Hibar RT (modelo Li Chrosorb Si 60 column, Merck, Darmstadt, Alemanha) com dimensões de 25 cm, diâmetro interno de 4 mm e 5 μm de filme. Como fase móvel *n*-hexane:propan-2-ol (99:1, v/v), com uma vazão de $1,67 \times 10^{-8} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$;

- A composição em esteróis foi determinada pela Metodologia Oficial Ch 6–91 da A.O.C.S. (2009). A técnica consiste em obter a fração esterólica adicionando a 0,005 kg de extrato, $5 \times 10^{-7} \text{ m}^3$ padrão interno Dihidrocolesterol (5 α -cholestan-3 β -ol; β -cholestanol) com 95 % de pureza (Sigma, D-6128), e submeter à saponificação do extrato. A matéria insaponificável foi diluída em $1 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ de hexano conduzida à Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para posterior extração dos esteróis da sílica e injeção do resíduo sem derivatização em cromatógrafo de fase gasosa Agilent (modelo 6850 Series GC) equipado com coluna capilar ZB-5 (5 % fenil, 95 % dimetilpolisiloxane, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de filme). O gás de arraste foi Hélio, com vazão de $1,67 \times 10^{-8} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$, com temperatura de injeção de 623 K, temperatura da coluna de 573 K pelo período de 1200 s, temperatura de detecção de 623 K e volume de injeção de $1,0 \times 10^{-9} \text{ m}^3$. De tal forma, os componentes puderam ser identificados e quantificados através da relação direta com a área do padrão interno;

- Determinou-se o índice de peróxido por titulometria através do Método Oficial Cd 8b–90 da A.O.C.S. (2009). Como se espera um baixo valor para óleos/extratos, a massa utilizada foi 0,005 kg de extrato em mistura de ácido acético:isooctano (3:2, v/v) e solução saturada de iodeto de potássio. A reação ocorrida é paralisada após 150 s com a adição de água destilada, e submete-se então à titulação com tiosulfato de sódio 0,01 N. O resultado é expresso em termos de miliequivalentes de peróxido por quilogramas de amostra.

4.5 Determinação de umidade do extrato de sementes de uva

Através de titulação por Karl Fischer (DL50 Graphix, Mettler Toledo, Suíça), determinou-se o conteúdo de água no extrato obtido a partir do **Lote 1**, de acordo com o método da A.O.C.S. Ca 2e-84 (2009), em triplicata. Este método utiliza como titulante o Reagente Karl Fischer, que como o próprio nome antecipa, reage quantitativamente com a água presente no extrato. Porém, sua aplicação é limitada a amostras que não possuem impurezas, como compostos alcalinos e peróxidos, que venham a reagir secundariamente com o titulante. Esta técnica mostrou-se necessária quando na determinação dos dados de equilíbrio a altas pressões, apresentados em Resultados e Discussão na seção 5.4 (Equilíbrio de fases a altas pressões).

4.6 Medida de densidade do extrato de sementes de uva

As análises de densidade para o extrato a partir do **Lote 1** foram determinadas experimentalmente em temperaturas de 283 a 343 K, em triplicata, empregando um densímetro digital de tubo oscilatório Anton Paar Physica (modelo DMA–4500, Österreich, Áustria), com precisão de $\pm 0,01 \text{ kg/m}^3$, previamente calibrado com ar e água (destilada e deionizada) nas temperaturas da análise. Um termostato no interior do instrumento permite o controle da temperatura em $\pm 0,01 \text{ K}$. Entre cada medida, o equipamento foi cuidadosamente limpo com etanol e acetona e seco por uma bomba de ar comprimido. Esta

análise é uma das exigências da Comissão Codex Alimentarius para evidenciar a autenticidade de um óleo/extrato de sementes de uva da variedade *Vitis vinifera* L..

4.7 Determinação das temperaturas de fusão e cristalização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC- *Differential Scanning Calorimetry*), foram determinadas as temperaturas de fusão e cristalização do extrato de sementes de uva obtido a partir do **Lote 1**. Esta técnica baseia-se no monitoramento da taxa de fluxo de calor (energia) da amostra em função do tempo ou da temperatura, enquanto a temperatura da amostra, em um ambiente específico, é programada.

O equipamento utilizado foi um calorímetro exploratório diferencial da TA Instruments (modelo MDSC 2920, New Castle, DE, USA), operado entre 204 K e 320 K. Inicialmente calibrou-se em função da temperatura e fluxo de calor com índio (99,999 % de pureza, certificado pela TA Instruments), ciclohexano (99,99 % de pureza) e naftaleno (99 % de pureza), ambos da Merck. Com auxílio de uma balança microanalítica Perkin Elmer (modelo AD6, Norwalk, CT, USA) com precisão de $\pm 2,0 \times 10^{-9}$ kg, (0,002 a 0,005) kg de amostra foram dispostas em cadinhos de alumínio herméticos e pesadas. As amostras foram tratadas termicamente, inicialmente as amostras foram resfriadas de 320 K para 204 K, a uma taxa de 1 K/60 s. Após um período isotérmico de 300 segundos a 204 K, as amostras foram aquecidas até 320 K, novamente a uma taxa de 1 K/60 s. Temperaturas de pico foram definidas e analisadas através de um software da TA Instruments, e consideradas para determinar a temperatura de transição de fases. A análise foi feita em triplicata.

4.8 Solubilidade do extrato de sementes de uva em solventes orgânicos

Os dados de solubilidade do extrato obtido do **Lote 1** em solventes orgânicos foram determinados em células de equilíbrio líquido-líquido (SILVA, COIMBRA e MEIRELLES, 1997). Essas células são de vidro *pyrex*, com capacidade para

aproximadamente 50 mL e dispõem de uma entrada superior para a alimentação do extrato e do solvente. As células são encamisadas, com saída e entrada para conexão do banho termostático para controle de temperatura e vedadas com tampa de teflon, com abertura para a disposição do termômetro para monitoramento da temperatura interna.

O procedimento foi baseado no proposto por Três et al. (2007) para influência de diferentes temperaturas na solubilidade do extrato nos solventes. Trata-se de alimentar à célula, já com temperatura de análise desejada estável, o volume de $4,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ de solvente. Aciona-se o sistema de agitação (agitador e barra magnética) e adiciona-se $5,0 \times 10^{-7} \text{ m}^3$ de extrato de sementes de uva. Mantendo o sistema agitado e vedado por 600 segundos, ao não se observar turvação, característica de formação de duas fases, adicionava-se novamente ao sistema a mesma quantidade de extrato. Ao surgir turvação, o sistema foi mantido agitado por 12 horas, para comprovação da presença de duas fases, caso contrário adiciona-se mais extrato. Depois deste período ocorrido, suspendeu-se a agitação e o sistema foi mantido em repouso por 24 horas antes da coleta da fase sobrenadante.

Realizou-se a amostragem de $5,0 \times 10^{-6} \text{ m}^3$, com uma pipeta volumétrica previamente calibrada. As amostras foram transferidas para placas de petri, já pesadas, e conduzidas à estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, MA-035) a 313 K por 24 horas, para eliminação total do solvente. Após este período, as amostras foram retiradas e alocadas em dessecador por aproximadamente 30 minutos, posteriormente pesadas em balança analítica e repetido o procedimento até massa constante. Determinou-se assim, a solubilidade do extrato reportada em kg de extrato por m^3 de solvente.

Os experimentos foram conduzidos a (293,15 a 308,15) K para o solvente diclorometano (DCM), o qual foi empregado na etapa de encapsulamento, detalhada na seção 4.10 (Obtenção de micro e nano partículas de biopolímero e encapsulamento do extrato de sementes de uva); e para o solvente etanol anidro entre (288,15 e 318,15) K, utilizado na etapa de lavagem das cápsulas, que será explanada nas seções 4.10.1 (Tamanho e morfologia das partículas) e 4.10.2 (Percentual Real de encapsulamento). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os solventes foram escolhidos com base nos resultados obtidos por Franceschi (2009), que reporta a solubilidade de poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) em três solventes, DCM, etanol e acetato de etila, em condições ambientes de temperatura e pressão. O autor observou que o PHBV é solúvel apenas em DCM, nestas condições. De tal forma, por não apresentar solubilidade com o polímero, e por ser comumente utilizado como co-solvente, o etanol foi selecionado como solvente para retirada de extrato possivelmente depositado sobre as cápsulas formadas, ou seja, extrato não encapsulado.

4.9 Determinação do equilíbrio de fases a altas pressões

Foi utilizado o método estático sintético para obtenção dos dados experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões reportados nesta tese. O aparato experimental e os procedimentos estão descritos com riqueza de detalhes em vários estudos (CHARIN, 2010; FRANCESCHI, 2009; ROSSO, 2009; CANZIANI, 2008; NDIAYE, 2004; LANZA, 2004; GRINGS, 2004) e amplamente validado (STUART, DARIVA e OLIVEIRA, 2000; FRANCESCHI et al., 2004; BORGES et al., 2007; ESMELINDRO et al., 2008; NDIAYE et al., 2006; FRANCESCHI et al., 2006; BENAZZI et al., 2006; MICHIELIN et al., 2009; CANZIANI et al., 2009; RODRIGUEZ-REARTES et al., 2009; ROSSO COMIM et al., 2010a; BENDER et al., 2010). Nesta técnica, quantidades precisas de substâncias puras são introduzidas na célula de equilíbrio, de tal forma que a composição global da mistura, no início do experimento, seja conhecida. As condições de pressão e temperatura são então ajustadas, fazendo com que uma solução homogênea se forme (NDIAYE, 2004). Fixadas a composição global e a temperatura do sistema, encontra-se a pressão onde ocorre transição de fases.

Na Figura 18, está representado o diagrama esquemático do aparato experimental, que consiste de um reservatório de solvente, na forma de um cilindro de gás (1), uma bomba de alta pressão do tipo seringa (ISCO, modelo 260L, Lincoln, USA) (4), com temperatura controlada através de banho termostático (3). A bomba do tipo seringa foi empregada, pois permite fácil manipulação de pressão e quantificação da massa deslocada

de solvente, o qual também desempenha a função de fluido de pressurização, transdutor absoluto de pressão para monitoramento (7); uma célula de equilíbrio de volume variável (16), delimitada no diagrama pelo retângulo tracejado, a qual é um cilindro de aço inoxidável 316L com capacidade máxima de $2,8 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ (diâmetro interno de 17,2 mm e comprimento de 146,5 mm), com conexões, remontadas a cada experimento.

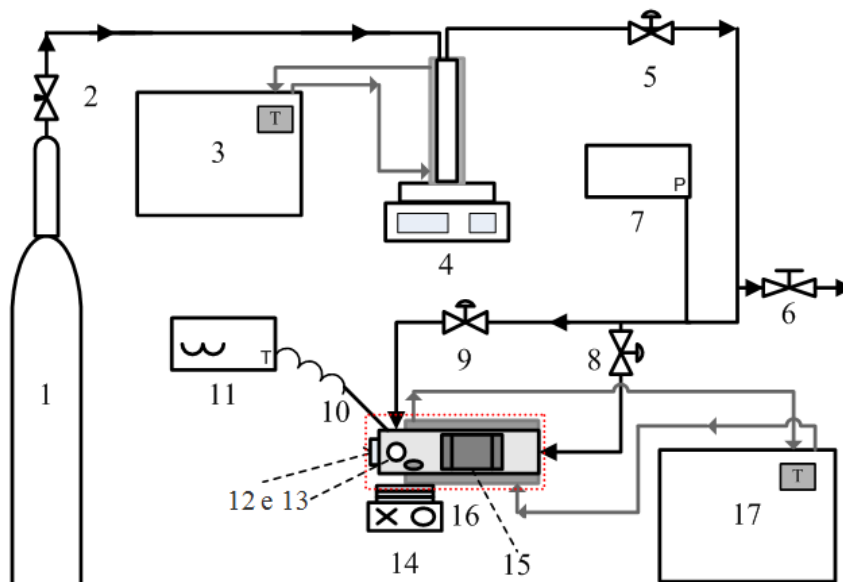


Figura 18. Diagrama esquemático do aparato experimental de equilíbrio de fases a altas pressões.

Em uma conexão frontal da célula, é disposta uma janela de safira (12) para observação das transições de fases, e em outra lateral, mais uma janela de safira (13), porém menor, para a disposição de uma fonte de luz. Com auxílio de dois anéis de vedação, Figura 19, as duas janelas ficam estagnadas. Segundo Lanza (2004), os anéis de vedação podem ser de borracha, teflon ou cobre. Para temperaturas mais baixas (temperatura ambiente) é mais indicado o uso de anéis de teflon e/ou borracha; para temperaturas mais elevadas (superiores a 343,15 K) os anéis de teflon podem deformar e causar vazamentos no sistema e/ou trincas nas janelas, colocando em risco a operação do equipamento. Desta forma, neste trabalho foram utilizados anéis de cobre e de teflon mais resistente.

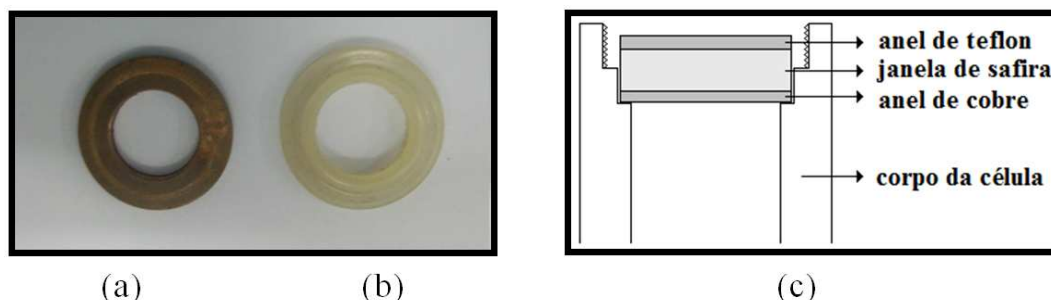


Figura 19. Anéis de vedação. (a): anel de cobre; (b): anel de teflon; (c): posicionamento das janelas de safira na célula de equilíbrio (NDIAYE, 2004; LANZA, 2004).

A célula possui ainda, na parte frontal, conexões também desmontáveis para alimentação dos componentes da mistura e para inserção de um indicador de temperatura tipo “PT 100” (10 e 11) para monitoramento da temperatura de operação, como pode ser visto na Figura 20.



Figura 20. Célula de equilíbrio de volume variável montada para experimento (CANZIANI, 2008).

Um pistão móvel (15), inserido no interior da célula, é responsável pelo controle de pressão dentro dessa. Este pistão (diâmetro interno de 17 mm e comprimento de 28 mm) de aço inoxidável 316L possui dois anéis de Buna- N90 *O-rings* localizados em suas extremidades, como exibido na Figura 21, permitindo-o deslizar pelo interior da célula e garantindo assim, a vedação entre o fundo e a frente da célula que contém os componentes do sistema. Para tanto, a montagem do pistão é uma etapa crítica e que merece grande atenção. Os anéis devem estar em equilíbrio, ou seja, com o mesmo atrito sobre o interior

da célula de equilíbrio. Porém, a compressão extrema dos anéis feita através ajuste dos parafusos não o deslocará em baixas pressões. Entretanto, em altas pressões pode ser forçado a deslocar-se brutalmente pelo rompimento dos anéis e, por consequência, a liberação da passagem para o fundo da célula do conteúdo presente na parte frontal da célula. O contrário, causado pela pouca compressão dos anéis, pode, sem ocorrer o rompimento dos anéis, permitir a passagem e o contato entre fundo e parte frontal da célula.

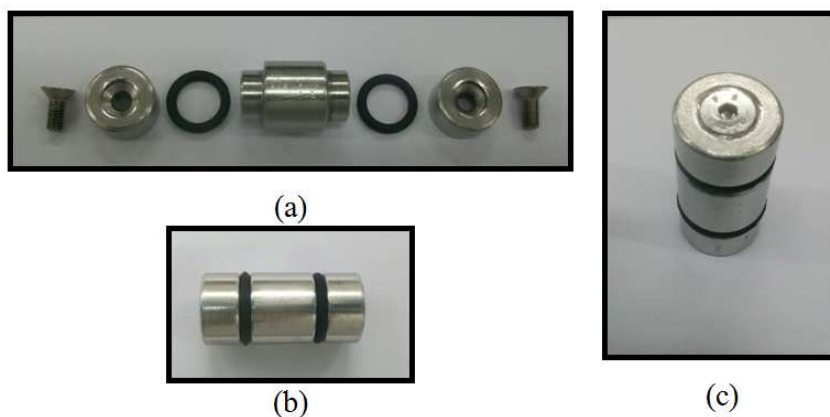


Figura 21. Pistão móvel. (a): pistão desmontado, visão de cada componente; (b e c): pistão montado, vistas lateral e frontal superior, respectivamente.

Após inserir o pistão, deve-se fechar o fundo da célula e em seguida adiciona-se, na parte frontal da célula, um bastão de ferro coberto com teflon para auxiliar a homogeneização do sistema. O bastão é acionado através de agitador magnético (14) inserido logo abaixo da célula. Por fim, é feita a conexão frontal com janela de safira para visualização, como explanado anteriormente.

É considerado ainda, no diagrama esquemático, um sistema de aquecimento da célula de equilíbrio envolta por uma camisa metálica que recebe água à temperatura desejada mantida por um banho termostático (17), válvulas métricas no formato agulha permitindo a alimentação de solvente (9) e descarga do sistema (6); válvulas de esfera para interromper o fluxo na linha que o solvente percorre (5 e 8); a mesma válvula de descarga tem a finalidade de alívio/segurança (6) e uma válvula de uma via (*check-valve*) (2), garantindo que pressões elevadas do sistema não venham retornar solvente ao cilindro.

Conforme a composição desejada, uma quantidade do componente menos volátil, neste caso o extrato, era pesada em uma balança analítica (precisão de 1×10^{-7} kg) e em seguida, carregada à célula através da injeção usando uma seringa com agulha, no orifício de conexão da linha de alimentação do solvente, garantindo assim, que se viesse a ficar qualquer quantidade de extrato na conexão, o co-solvente etanol e o solvente CO_2 alimentados posteriormente o levariam para dentro da célula. O mesmo procedimento de alimentação foi adotado para o etanol, porém, anteriormente à alimentação do solvente, promoveu-se uma troca de atmosfera dentro da célula de equilíbrio através da passagem do solvente a baixa pressão. Após, fixou-se a pressão na bomba em 10 MPa e a temperatura em 278 K, e só então o volume desejado de solvente foi adicionado lentamente, a fim de alcançar a composição global pré-estabelecida. A massa de solvente foi computada com base no decaimento do volume interno da bomba e o conhecimento de sua densidade nessas condições, obtida através do Método de Hankinson-Brost-Thomson (HBT) elaborado por Thomson et al. (1982).

O sistema foi mantido em agitação contínua por 30 minutos para promover a homogeneização, e submetido à temperatura desejada. Estabilizada a temperatura, a pressão da célula foi aumentada pela aplicação de pressão na parte de trás do pistão, com auxílio da bomba seringa, até a observação de uma única fase do sistema. Isotermicamente, a pressão foi vagarosamente reduzida (0,3 a 0,5 MPa/60 s) até a ocorrência de transição de fases, ou seja, dada uma temperatura, a pressão de transição era determinada. Este procedimento foi repetido pelo menos três vezes, para cada temperatura e composição global do sistema. O aparato experimental fornece uma reprodutibilidade média na pressão de transição de fases da ordem de 0,05 MPa.

As transições eram observadas segundo o esquema apresentado na Figura 22, onde cada etapa representa a vista através da janela de safira frontal, no sentido de decréscimo de pressão no sistema isotérmico.

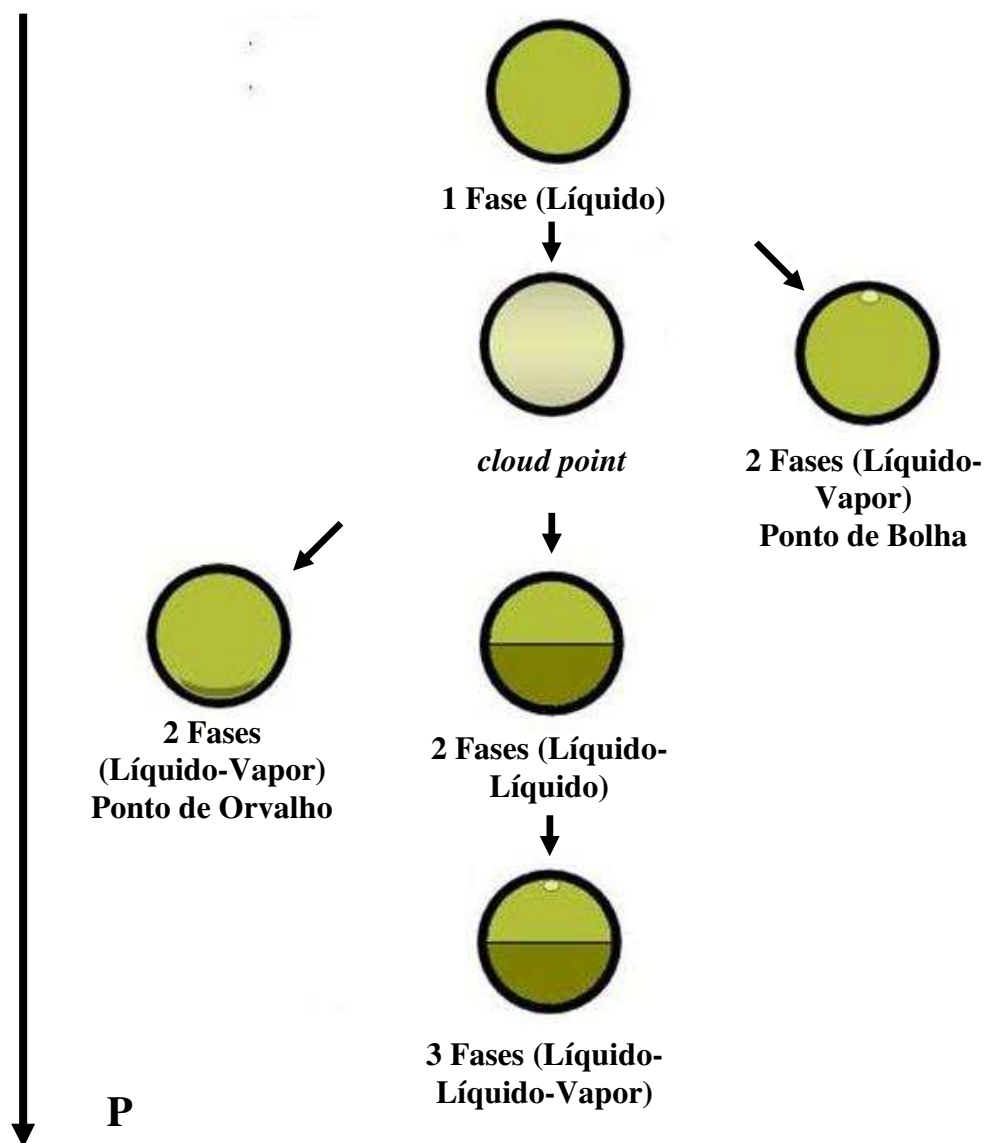


Figura 22. Visualização das transições de fases a altas pressões, isotermicamente - método estático sintético.

Na Figura 23, uma foto da vista frontal da unidade experimental de equilíbrio de fases a altas pressões, com destaque para o cilindro de CO₂ (A), bomba do tipo seringa (B), célula de equilíbrio (C), válvula de esfera para interromper o fluxo na linha que o solvente percorre (D) e válvula de alívio/segurança (E).

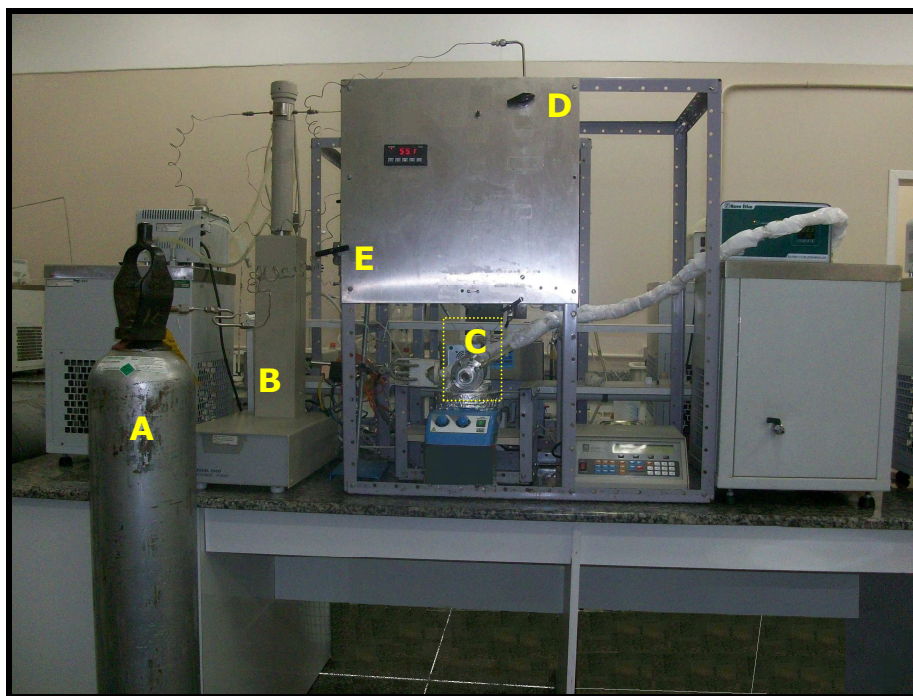


Figura 23. Vista frontal da unidade experimental de equilíbrio de fases a altas pressões.

Foram obtidos dados de equilíbrio de fases para os sistemas:

- CO_2 + extrato de semente de uva (a partir do **Lote 1**) + etanol;

Inicialmente, ensaios para o sistema pseudo-binário (extrato de sementes de uva + CO_2) até o limite de segurança de pressão de operação da unidade (30 MPa) e 343 K, não foram possíveis, pois nestas condições o sistema não encontrava-se em uma fase. Adicionou-se então um terceiro componente, etanol, como co-solvente. A razão molar que proporcionou solubilização do sistema necessária para a visualização de transições de fases foi de 1:3, etanol: CO_2 , mantida constante para todas as determinações experimentais.

- CO_2 + extrato de semente de uva (a partir do **Lote 1**, com teor de água reduzido) + etanol;

A partir de resultados do sistema CO_2 + extrato de semente de uva (a partir do **Lote 1**) + etanol, surgiu a necessidade do estudo da redução do teor de água no extrato para

visualização do efeito no diagrama de fases, visando assim conectar tais informações às etapas industriais de refino necessárias quando a matéria-prima apresenta alto conteúdo inicial de água.

O teor de água inicial do extrato foi reduzido, submetendo-o a vácuo ($< 1 \times 10^{-4}$ MPa), e 313 K por 1 hora. O sistema de vácuo consiste em um vaso cilíndrico de aço inox, com capacidade de aproximadamente $3,0 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, contendo o extrato de sementes de uva, aquecido através de um sistema com banho em óleo térmico sobre uma placa de agitação e aquecimento IKA (modelo C MAG HS 7, Colônia, Alemanha). O vaso é conectado a um condensador horizontal de vidro encamisado com entrada e saída para banho termostático Cole Parmer (modelo 12101-55, Chicago, USA), e operado a vácuo com auxílio de uma bomba Büchi (modelo V-855, AG, Suíça).

- CO_2 + extrato de semente de uva (a partir do **Lote 1**) + diclorometano;

Outros sistemas de interesse já foram reportados por Corazza et al. (2003) e Franceschi et al. (2008b), são os sistemas CO_2 + diclorometano e CO_2 + diclorometano + poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), respectivamente. O PHBV foi utilizado como polímero na etapa de precipitação e encapsulamento, apresentada na seção 4.10 (Obtenção de micro e nano partículas de biopolímero e encapsulamento do extrato de sementes de uva).

4.9.1 Equação de Peng-Robinson e descrição do equilíbrio de fases a altas pressões

Segundo Prausnitz, Lichtenthaler e de Azevedo (1999), uma das características da ciência moderna é a abstração. Embora o extrato de sementes de uva se trate de uma mistura multicomponente, os diversos triacilgliceróis presentes comportam-se, neste tipo de sistema, de forma muito similar, podendo para fins práticos utilizar uma molécula representativa, o triacilglicerol majoritário. Segundo a FAO - Codex Alimentarius (1999),

para autenticidade de um óleo/extrato de sementes de uva da variedade *Vitis vinifera L.*, o ácido graxo em maior concentração deve ser o ácido linolêico, em coerência com nossos resultados apresentados na seção 5.3 (Caracterização do extrato de sementes de uva). De tal maneira, o triacilglicerol majoritário será aquele que contém a esterificação de 3 moléculas de ácido linolêico (R1, R2 e R3) em uma de glicerol, formando a chamada trilinoleína, como ilustrado na Figura 24.

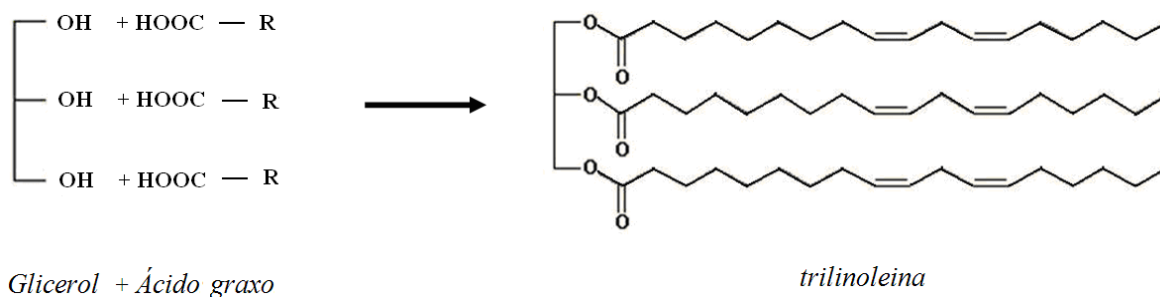


Figura 24. Formação da molécula de trilinoleína.

Para a descrição do equilíbrio de fases a altas pressões do sistema extrato de sementes de uva + CO₂ + etanol, utilizaram-se as características médias a partir da contribuição em fração molar do triacilglicerol e do ácido graxo majoritários. As propriedades críticas utilizadas (Pressão crítica - P_c, Temperatura crítica - T_c e fator acêntrico- ω) corresponderam ao ácido linolêico (DIPPR, 2012) e a massa molecular - M_w à da trilinoleína.

Foi empregada a equação de estado cúbica de Peng-Robinson (PENG e ROBINSON, 1976) com regra de mistura quadrática de van der Waals (vdW2) para o cálculo do equilíbrio de fases. Os parâmetros de interação binária da equação de Peng-Robinson foram ajustados aos dados experimentais obtidos para os sistemas de interesse. Os parâmetros binários da mistura CO₂ (1) + etanol (2) foram fixados, utilizando-se os encontrados por Araújo et al. (2012), em que os valores usados foram $k_{12} : 7,8332 \times 10^{-2}$ e $l_{12} : -3,0999 \times 10^{-2}$. Sendo assim, foram estimados apenas os parâmetros para os pares CO₂ (1) - extrato de sementes de uva (3) e etanol (2) - extrato de sementes de uva (3).

A estimação dos parâmetros de interação binária foi baseada na minimização da função objetivo apresentada na Equação 17, conhecida como função de mínimos quadrados. Foi utilizado o método estocástico *Particle Swarm Optimization*, que independe de estimativa inicial e efetua uma busca randômica dentro da região definida para as variáveis independentes (parâmetros). Por fim, foi feito um refinamento com um método de otimização local, o método Simplex (PRESS et al., 1992).

$$FO = \sum_{i=1}^{NE} (P_i^{\text{exp}} - P_i^{\text{calc}})^2 \quad (17)$$

onde i denota o experimento; j a variável dependente; NE o número total de experimentos; NY o número de variáveis dependentes; y^{cal} e y^{exp} são os vetores com os valores das variáveis dependentes medidos experimentalmente e σ é a matriz do desvio padrão dos pontos experimentais associado à medida da variável j no experimento i .

A precisão do modelo foi descrita pelo erro absoluto (*erro abs*), obtido pela diferença entre os valores calculados e os valores experimentais, e também pela Raiz do Erro Quadrático Médio (*RMSE*). Estes valores expressam a proximidade entre os valores calculados pelo modelo (P^{calc}) e os valores experimentais (P^{exp}). *RMSE* é definido como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{NE} (P_i^{\text{calc}} - P_i^{\text{exp}})^2}{NE}} \quad (18)$$

4.10 Obtenção de micropartículas de polímero e encapsulamento do extrato de sementes de uva

Os experimentos para obtenção de micro e nano partículas de polímero e co-precipitação do extrato de sementes de uva com polímero foram realizados utilizando uma técnica que emprega fluidos pressurizados como antissolventes baseada no método *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS).

O aparato experimental utilizado nesse trabalho é o mesmo empregado por Priamo et al. (2010); Franceschi et al. (2008a;b) e Franceschi et al. (2009) com apenas uma adaptação descrita a seguir. A Figura 25 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental que foi utilizado.

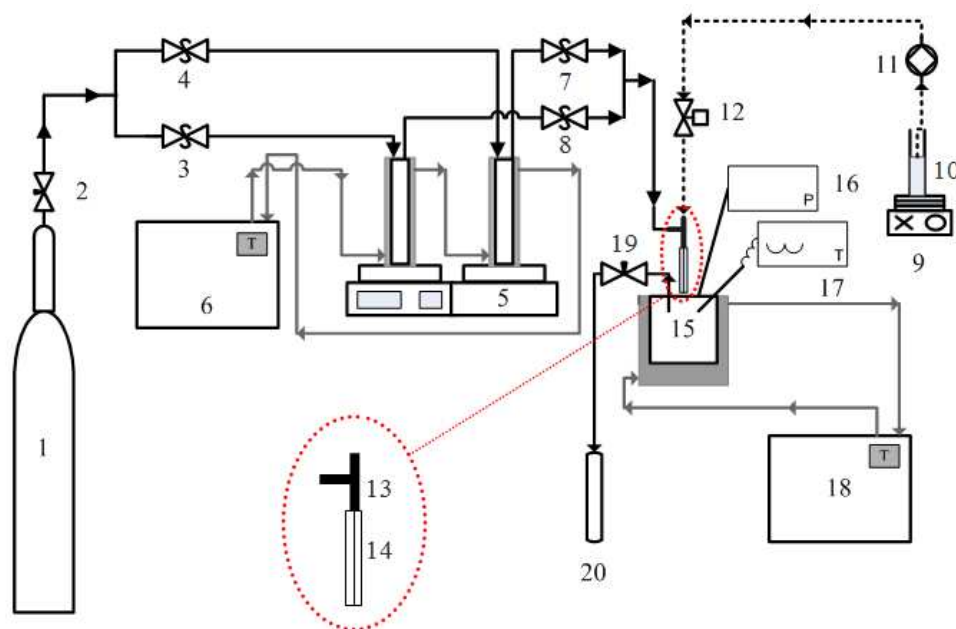


Figura 25. Diagrama esquemático do aparato experimental baseado no método SEDS.

O aparato consiste de um reservatório contendo o antissolvente CO_2 (1); válvula de saída do reservatório contendo o antissolvente (2: *check-valve*); válvulas de esfera (3 e 4) para separar as bombas tipo seringa (ISCO, modelo 500D, Lincoln, USA) do conjunto de bombas que operam continuamente de forma alternada (5); válvulas de esfera (7 e 8) para isolar a linha das bombas até a câmara de precipitação (15) com capacidade de $0,6 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ (diâmetro interno de 0,08 m e altura de 0,12 m); banho ultratermostático de recirculação (18), utilizado para manter a temperatura da câmara de precipitação constante; banho ultratermostático de recirculação (6) utilizado para manter a temperatura constante nos cilindros das bombas tipo seringa; transdutor absoluto de pressão (16); bomba de HPLC (11) utilizada para deslocar para a câmara de precipitação a solução orgânica (10) contendo o soluto a ser precipitado dissolvido no solvente orgânico com auxílio de um sistema de

agitação (**9**: agitador e barra magnética); válvula de regulação de pressão (**12**: *Back Pressure Regulator*); conexão tipo “T” (**13**), à qual estão conectadas a linha de antissolvente e a linha da solução. Até essa união o antissolvente e a solução fluem por linhas separadas e a partir dela até a câmara é feita a junção à mesma linha, porém a solução escoar por dentro do tubo capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 100 μm , conectado e estruturado por um capilar de polieterecetona (*PEEK Tubing*), como encontra-se na Figura 26. O antissolvente, por sua vez, escoar por fora do tubo capilar e por dentro do tubo de aço inox (**14**), ou seja, de forma axial.

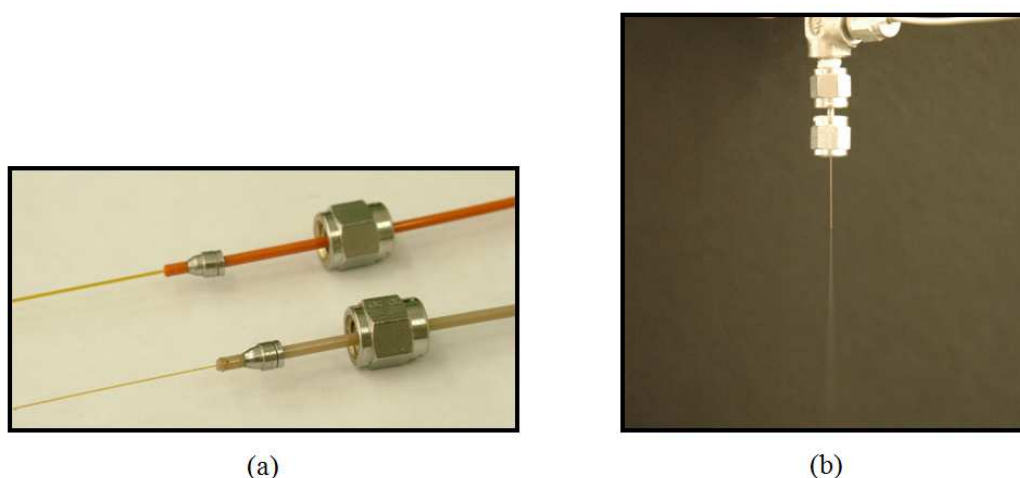


Figura 26. Capilares de sílica fundida e *PEEK Tubing* (FRANCESCHI, 2006). (a): tubos capilares conectados aos *PEEK Tubing* e (b): dispersão do jato da solução no tubo capilar.

Pertencem ao diagrama, ainda, um indicador de temperatura (**17**) e válvula micrométrica tipo agulha (**19**) com sistema de aquecimento para minimizar o efeito Joule-Thomson na expansão do antissolvente. Como mencionado previamente, modificou-se o aparato experimental utilizado por Priamo et al. (2010); Franceschi et al. (2008a;b) e Franceschi et al. (2009), adaptando à saída da câmara de precipitação um *trap* de segurança (**20**) recheado de algodão, com o intuito de observar possíveis arrastes de extrato para fora da câmara de precipitação, já que estes estudos feitos anteriormente empregavam componentes puros como material encapsulado, e no presente trabalho tem-se uma mistura multicomponente suscetível a fracionamento.

No diagrama não está representado, porém é importante ressaltar que, na saída da câmara de precipitação foi disposto um sistema de retenção com o intuito de impedir a saída das partículas formadas, permitindo apenas o deslocamento para fora da câmara de precipitação do antissolvente e do solvente orgânico. Este sistema de retenção é composto por dois filtros de politetrafluoretileno (PTFE). O primeiro com porosidade superficial de aproximadamente 1 μm , diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm, serve de base para o segundo, chamado filtro membrana. Já o segundo possui porosidade de 0,22 μm , espessura de 150 μm e mesmo diâmetro do primeiro filtro, e está ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP, Billerica, USA), permitindo operação até 403 K.

Segundo Franceschi (2009) e Priamo (2011), a escolha do filtro é muito importante, visto que alguns tipos de filtros podem interagir com o solvente orgânico, dissolvendo-se neste e pondo em risco o processo de retenção e coleta das partículas. Porém, os filtros membrana politetrafluoretileno (Teflon[®]) são hidrofóbicos e provêm uma ampla compatibilidade química.

A montagem da célula iniciava-se justamente com o preparo da conexão do sistema de retenção, com cuidado para não “estrangular” ou deformar os filtros, ocasionando rompimento do filtro de menor espessura e porosidade com o aumento da pressão do sistema, e o encaixe de seu suporte na tampa da câmara (**J**), como disposto na Figura 27b. A Figura 27 exibe as vistas externa e interna da tampa da câmara de precipitação e encapsulamento. Destaque para as conexões externas, para termopar (**F**); alimentação dos componentes na câmara (**G**); transdutor de pressão (**H**) e saída da câmara (**I**), e conexão interna com suporte para o sistema de retenção (**J**), citado acima.

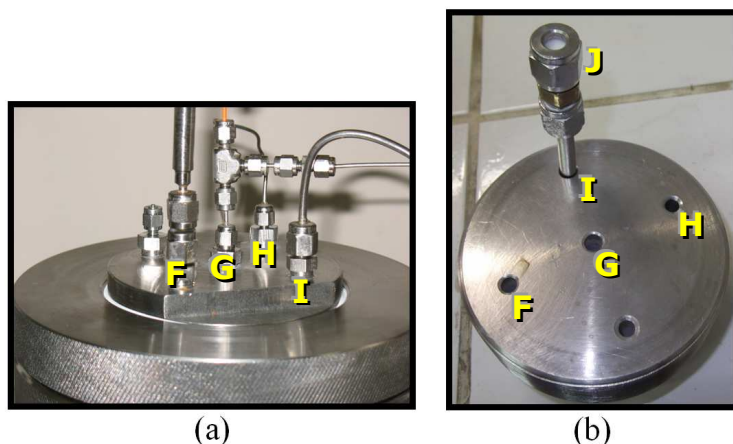


Figura 27. Câmara de precipitação e encapsulamento. (a): vista externa e (b): vista interna.

Em seguida, fechava-se a câmara e conectava-se a entrada e saída do banho (18) para controle de temperatura desejada. Posteriormente, eram feitas as conexões externas da tampa da câmara. Nesta fase, as válvulas (7; 8 e 19) devem estar fechadas e a válvula (12) regulada para a pressão desejada na bomba HPLC, que por sua vez está ajustada para a vazão também desejada de alimentação da solução orgânica.

Para alimentar o antissolvente liquefeito, o banho (6) era mantido a 280 K. Já o banho (18) era ajustado a cada experimento segundo temperatura desejada de operação. Acionava-se então, o sistema de aquecimento da válvula (19) para evitar o efeito Joule-Thomson, como citado anteriormente.

O antissolvente, sem estar pressurizado, apenas com sua pressão de vapor a 280 K, era então liberado para a câmara, ao abrir uma das válvulas que isolam as bombas (7 ou 8). Estabilizada a pressão de vapor dentro da câmara, fechava-se novamente a válvula que isola a bomba em operação e pressurizava-se as bombas à pressão desejada de alimentação do antissolvente. Tornava-se a abrir a válvula e, com pressão de alimentação, o solvente era introduzido na câmara, de tal forma que a pressão dentro da câmara era aumentada até a pressão desejada de operação do sistema e controlada e estabilizada com a regulação de abertura da válvula (19). Só então a bomba HPLC era acionada, conduzindo a solução orgânica à câmara de precipitação e encapsulamento.

Ao atingir o volume desejado de solução orgânica introduzida na câmara, a bomba HPLC era desativada, cessando o fluxo de solução. Porém o antissolvente continuava a escoar, iniciando-se assim a chamada etapa de secagem das partículas, ou seja, a retirada do solvente da câmara por dissolução no antissolvente levado para fora da câmara seguida de passagem pelo *trap* de segurança. Ao término da secagem, interrompia-se o fluxo de antissolvente para a câmara. Despressurizava-se e baixava-se a temperatura desta para 293 K, e assim a câmara era então aberta delicadamente para ser feita a coleta das partículas, com auxílio de um pincel. As partículas foram armazenadas sob refrigeração em recipientes âmbar vedados.

Na Figura 28, uma foto da unidade de precipitação e encapsulamento baseada na técnica SEDS. Em destaque o cilindro de antissolvente CO₂ (A); conjunto de bombas tipo seringa (B); bomba de HPLC (C); câmara de precipitação (D) e *trap* de segurança (E).



Figura 28. Foto real da unidade experimental empregando a técnica SEDS.

Para validação do sistema, dois testes preliminares de precipitação de poli (3-hidroxi-butarato-co-hidroxi-valerato) (PHBV) foram realizados, segundo Franceschi (2009):

Condições de operação:

- *Teste precipitação 1*
Pressão interna da câmara da precipitação: 8 MPa.
- *Teste precipitação 2*
Pressão interna da câmara da precipitação: 12 MPa.

Como variáveis fixas para ambos os testes:

- Temperatura interna da câmara da precipitação: 313 K;
- Pressão de alimentação do antissolvente: 20 MPa;
- Vazão de antissolvente: $4 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$;
- Pressão de alimentação solução orgânica (diclorometano + PHBV): 20 MPa;
- Concentração da solução orgânica: $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$;
- Vazão de solução orgânica: $1 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$;
- Volume de solução: $2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$;
- Vazão de secagem com antissolvente: $2 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$;
- Volume de secagem: $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$.

Com posse dos resultados dos testes de precipitação e da solubilidade do extrato de sementes de uva em diclorometano, optou-se por realizar ensaios iniciais de encapsulamento do extrato em PHBV, a. Nota-se, a seguir, que o fluxo de antissolvente foi diminuído pela metade, baseado em conclusões de Franceschi (2009), evidenciando o pequeno efeito desta variável no tamanho, distribuição e morfologia das partículas.

- *Ensaio encapsulamento 1*
Razão mássica extrato de sementes de uva : polímero na solução orgânica: (1:1).
- *Ensaio encapsulamento 2*
Razão mássica extrato de sementes de uva : polímero na solução orgânica: (1:2).
- *Ensaio encapsulamento 3*
Razão mássica extrato de sementes de uva : polímero na solução orgânica: (1:3).

Como variáveis fixas para os três ensaios de encapsulamento:

- Pressão interna da câmara da precipitação: 8 MPa;
- Temperatura interna da câmara da precipitação: 313 K;
- Pressão de alimentação do antissolvente: 20 MPa;
- Vazão de antissolvente: $2 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$;
- Pressão de alimentação solução orgânica (diclorometano + PHBV): 20 MPa;
- Concentração de extrato de sementes de uva na solução orgânica: $10 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$;
- Vazão de solução orgânica: $1 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$;
- Volume de solução: $2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$;
- Vazão de secagem com antissolvente: $2 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$;
- Volume de secagem: $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$.

Após tais experiências, partiu-se para o estudo da aplicação do extrato de sementes de uva como encapsulado com os seguintes parâmetros de operação variáveis:

- Pressão interna da câmara de precipitação: (8 a 12) MPa;
- Temperatura interna da câmara de precipitação: (308 a 328) K;
- Razão mássica extrato de sementes de uva : PHBV na solução orgânica: (1:1) a (1:3);

- Com concentrações de extrato de 5 a 10 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e concentração de PHBV de 5 a 30 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ em diclorometano.

E como variáveis fixas para o estudo do encapsulamento:

- Pressão de alimentação do antissolvente: 20 MPa;
- Vazão de antissolvente: $2 \times 10^{-5} \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$;
- Pressão de alimentação solução orgânica (diclorometano + PHBV): 20 MPa;
- Vazão de solução orgânica: $1 \times 10^{-6} \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$;
- Volume de solução: $2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$;
- Vazão de secagem com antissolvente: $2 \times 10^{-5} \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$;
- Volume de secagem: $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$.

Na Tabela 1 a seguir, estão sumarizados os experimentos realizados.

Tabela 1. Planejamento experimental do estudo de encapsulamento do extrato de sementes de uva em PHBV pela técnica SEDS.

Experimento	Pressão (MPa)	Temperatura (K)	Razão mássica extrato de sementes de uva : PHBV	Concentração do extrato de sementes de uva ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Concentração do PHBV ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
1	8	308	1:1	5	5
2	8	308	1:3	10	30
3	12	308	1:3	5	15
4	12	308	1:1	10	10
5	8	328	1:3	5	15
6	8	328	1:1	10	10
7	12	328	1:1	5	5
8	12	328	1:3	10	30
9	10	318	1:2	7,5	15

Apenas o experimento 9 foi realizado em triplicata para observação da reprodutibilidade experimental do procedimento baseado na técnica SEDS.

4.10.1 Tamanho e morfologia das partículas

A priori, foi efetuada a lavagem das partículas de polímero com o extrato encapsulado com etanol, pois o mesmo dissolve apenas o extrato e não o polímero, retirando assim, o extrato não encapsulado possivelmente depositado sobre as cápsulas e evitando também a aglomeração das partículas. A quantidade de solvente utilizada foi extrapolada à solubilidade do extrato no solvente, com base em resultados obtidos neste trabalho (APÊNDICE, Tabela A1), garantindo a total dissolução do extrato não encapsulado. Após a lavagem, a solução resultante foi filtrada com auxílio de uma seringa ligada a um suporte de filtração em aço inoxidável (Millipore, Modelo Swinny, Billerica, USA) contendo um sistema de filtração idêntico ao disposto na saída da câmara de precipitação. As partículas retidas no filtro com porosidade de 0,22 μm eram conduzidas a um dessecador por 24 h.

Após esta etapa, as partículas foram recobertas com ouro e paládio e submetidas à fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV-EED – equipamento JEOL JSM, modelo T300, Tóquio, Japão) para observação da morfologia das partículas precipitadas. Ainda, as fotomicrografias foram analisadas com auxílio do *software Size Meter* (versão 1.1) da Universidade Federal de Santa Catarina, desenvolvido por Carlson (2001) e determinadas as medidas de tamanho característico das partículas. O tamanho característico foi adotado como a medida da maior dimensão, em termos de comprimento ou espessura da partícula.

4.10.2 Percentual real de encapsulamento

O percentual real de encapsulamento foi quantificado tomando uma massa conhecida de partículas já submetidas à lavagem, explanada na seção anterior, seguida da extração do material encapsulado (extrato) através da suspensão das partículas em diclorometano. A solução resultante foi então analisada segundo a metodologia empregada por Franceschi (2009) e Priamo (2011), que utilizavam a absorbância obtida por leitura espectrofotométrica na região de UV-visível para a determinação do percentual real de

encapsulamento. Desta forma, a solução contendo extrato de semente de uva + diclorometano + PHBV foi analisada em um espectrofotômetro de UV-visível (DEFEMTO, modelo 800 XI, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 410 nm.

Com base na curva padrão de calibração previamente construída para soluções de concentrações conhecidas de extrato de semente de uva + diclorometano + PHBV, relacionando a concentração de extrato de semente de uva na solução com sua absorbância máxima em um comprimento de onda específico, obteve-se uma equação da reta (APÊNDICE, Tabela A2 e Figura A1). De tal forma, foram obtidos valores de concentração de extrato no volume de solução gerada, ou seja, com o conhecimento do volume de diclorometano utilizado no preparo da solução foi determinada a massa de extrato encapsulado.

Por fim, segundo Kalogiannis, Michailof e Panayiotou (2006), através da Equação 19 determinou-se o Percentual Real de Encapsulamento (PRE %):

$$PRE \% = \frac{massa_{extrato_{encapsulado}}}{(massa_{extrato} + massa_{PHBV})_{após\ filtração}} \times 100 \quad (19)$$

A Equação 19 é a relação entre o valor da massa do extrato encapsulado obtido a partir da equação da reta, e a massa utilizada para o preparo da solução submetida à leitura em espectrofotômetro na região de UV-visível.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima

O resíduo recebido da indústria vinícola posterior ao processo de vinificação estava composto de casca de uva, engaço e sementes. Após maior separação possível das sementes dos outros componentes do resíduo e a secagem, obteve-se a matéria-prima para este trabalho, apresentada na Figura 29a. Do **Lote 1** foi coletado um material total de 260 kg imediatamente à prensagem, e após a separação e secagem foram obtidos 40 kg de sementes, ou seja, aproximadamente 15,5 % do resíduo sólido úmido da vinificação era constituído de sementes.



Figura 29. Sementes de uva utilizadas neste trabalho. (a): após limpeza e secagem e (b): moídas em moinho de facas.

Percebe-se na Figura 29a, que a matéria-prima ainda apresentava algumas cascas remanescentes aderidas às sementes. É possível também notar que as sementes apresentavam coloração bordô, característica das uvas das quais são resíduo. Neste trabalho optou-se por não realizar a lavagem das sementes com água, como efetuado em outras pesquisas (SANTOS, 2012; FERNANDES et al., 2002; FREITAS, 2007; GÓMEZ, LÓPEZ E de la OSSA, 1996), pois este processo além de aumentar a umidade das sementes e, conseqüentemente, a necessidade de intensificar a secagem, pode retirar compostos

desejáveis solúveis em água, providos do contato com a casca durante o processo fermentativo do vinho.

Na Figura 29b, as sementes moídas, com a seguinte distribuição de tamanho localizada na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação por tamanho de partículas e diâmetro médio geométrico.

Distribuição	Lote 1 ^a	Lote 2 ^b
	Massa retida (g)	
Mesh 16	2,78	21,61
Mesh 24	29,39	56,31
Mesh 32	29,48	16,60
Mesh 48	19,82	5,38
Mesh 80	9,28	0,03
Fundo	3,76	-
D _{mg} (m) ^c	$0,755 \times 10^{-3}$	$0,822 \times 10^{-3}$

^aMassa total de matéria prima = 95 g; ^bMassa total de matéria prima = 100 g;

^cDiâmetro médio geométrico através do método ASAE Standards (ASAE, 1998).

Através da Tabela 2, observa-se que, ao se utilizar uma peneira de 10 *Mesh* no moinho, os dois lotes apresentaram valores de diâmetro médio geométrico (D_{mg}) aproximados. Gómez, López e de la Ossa (1996) estudaram em seu trabalho uma faixa de D_{mg} entre $(0,35 \text{ e } 2,83) \times 10^{-3}$ m em consequência ao rendimento de extração, e observaram que quanto menor o tamanho das partículas, maior será o rendimento, uma vez que a modificação da estrutura física das sementes por moagem disponibiliza uma maior área de contato com o solvente (REVERCHON e MARRONE, 2001; de CAMPOS, 2005; FIORI, 2007). Porém, os mesmos autores observam também que, a presença, mesmo que em pequena quantidade, de cascas de uva pode alterar este princípio, justificando as observações em testes primários deste trabalho, quando uma peneira em crivo circular menor no moinho foi testada e ocorreu aglomeração indesejável das partículas formadas.

Segundo Gamse (2002), a umidade do material sólido é um dos fatores necessários à avaliação antes do início de um processo de extração supercrítica. A água pode competir com o solvente pela dissolução do soluto devido à forte interação com a estrutura celulósica, afetando a taxa de transferência de massa. Meireles (2003) recomenda que a

matéria-prima necessita ser seca, tendo umidade máxima de 18 %. Neste trabalho, as sementes moídas do **Lote 1** apresentaram umidade de 12,10 %, em conformidade ao recomendado por Meireles (2003). Já o **Lote 2** apresentou umidade de 5,28 %, através da determinação por Karl Fischer, um valor baixo, se comparado ao primeiro lote. Pela determinação em estufa o valor obtido foi 5,30 %, muito próximo ao valor obtido através da técnica de titulação. Cabe lembrar que, o **Lote 2** foi seco em secador de bandejas em leito fixo com ar forçado, proporcionando maior controle e distribuição homogênea de temperatura, enquanto o **Lote 1** foi seco ao sol durante 7 dias.

Como já mencionado anteriormente, o **Lote 2** foi armazenado, desde a coleta na vinícola, por 10 meses e para avaliação das condições de estocagem foi determinada a atividade de água (a_w), essa resultou em um valor de 0,3. Dentro de um estudo da higroscopicidade de alimentos através das isotermas de sorção, o valor de a_w determinado neste trabalho encontra-se na primeira região, que compreende valores de zero a 0,35 (adsorção de um filme de água monomolecular). Valores nesta região são bastante favoráveis à estabilidade dos alimentos, impedindo o crescimento de microorganismos e as reações físico-químicas responsáveis por deterioração. Entretanto, baixas atividades de água favorecem a oxidação lipídica (TONON, 2009), o que pode representar um problema no caso das sementes de uva, visto que se espera neste trabalho obter um extrato livre de rancidez. Contudo, $a_w = 0,3$ é um valor próximo ao limite da segunda região da isoterma de sorção, e pressupõe-se que ainda não demanda tamanha preocupação.

Hatzidimitriou, Nenadis e Tsimidou (2007) estudaram a efeito do armazenamento em temperatura ambiente e a diferentes condições de atividade de água (0,33; 0,53 e 0,75), sobre o conteúdo de compostos fenólicos e potencial antioxidante de sementes de uva (inteiras e moídas), obtidas após o processo fermentativo de vinho tinto. Os autores observaram que o teor de fenóis totais diminuiu durante o armazenamento, e também, em alto valor de atividade de água ($a_w = 0,75$) houve uma aceleração da degradação resultando em uma redução de ~ 50 % do teor de fenóis totais. Este estudo mostra a importância do acompanhamento da atividade de água, durante o armazenamento na indústria vinícola,

deste resíduo rico em compostos antioxidantes, o qual pode ser utilizado futuramente como matéria-prima para extração do óleo.

5.2 Extração por fluido supercrítico (SFE)

Neste trabalho utilizou-se uma unidade de extração supercrítica em escala piloto possuindo um cilindro extrator com capacidade de aproximada de 5,0 litros. O leito do cilindro foi preenchido com sementes de uva moídas resultando em uma densidade aparente média de $949,42 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e rendimento de extração médio de 11,88 % (base úmida, b.u), para as extrações feitas com as sementes do **Lote 1**. Já para o **Lote 2**, a densidade aparente do leito média foi de $869,40 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e o rendimento global de extração (separador 1 + separador 2 + separador 3) médio foi de 9,78 % (b.u).

Para a comparação dos dois lotes cabe ressaltar que o **Lote 2** possui uma terceira variedade, Cabernet Sauvignon, que corresponde a 50 % da matéria-prima, modificando a natureza do substrato. Ainda, retornando à Tabela 2 (página 72), percebe-se que os lotes apresentaram diferença no D_{mg} , de $(0,755 \text{ para } 0,822) \times 10^{-3} \text{ m}$, do **Lote 1** para o **Lote 2**, respectivamente. Esta diferença pode parecer não significativa, porém, Fiori (2007) observou que pequenas variações do D_{mg} das partículas das sementes de uva moídas de $(0,49 \text{ para } 0,51) \times 10^{-3} \text{ m}$ resultaram em considerável mudança na curva de extração e consequente diminuição no rendimento, embasando os resultados encontrados neste trabalho.

Para o **Lote 2** o óleo das sementes de uva foi também extraído através do método convencional (Soxhlet). Após o experimento ser conduzido por 20 h, obteve-se 10,65 % de óleo, aproximadamente 1 % a mais de óleo foi extraído pelo método clássico em relação à SFE. Gómez, López e de la Ossa (1996) obtiveram um resultado semelhante para o óleo de sementes de uva (cultivar Airen) nas mesmas condições de temperatura e pressão. Dióxido de carbono é considerado um solvente mais seletivo para triacilgliceróis, ao contrário do hexano utilizado no método convencional. O solvente orgânico extrai, juntamente aos triacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolípidos, pigmentos e substâncias não

saponificáveis. Por isso, a quantidade extraída com solventes orgânicos é maior do que utilizando fluidos supercríticos. Alguns trabalhos utilizam a adição de solventes orgânicos ao CO₂ supercrítico, em busca do aumento do rendimento de extração (FREITAS, 2007). Estes solventes são chamados de modificadores de polaridade e permitem a extração de compostos pouco ou não solúveis em CO₂.

Foi determinado também para o **Lote 2** o rendimento médio de extração para cada separador, onde obteve-se 7,30 %, 2,37 % e 0,11 %, para o separador 1, separador 2 e separador 3, respectivamente. Compete ao decréscimo da pressão de despressurização a diminuição da massa encontrada, ou seja, maior massa no separador 1 operado a 10 MPa, e menor massa no separador 3 operado a 3 MPa. Percebe-se que do total de extração, em torno de 74 % encontra-se no separador 1.

Após a extração, com o auxílio da célula de *nylon*, foi possível retirar todo leito empacotado e, a fim de comparar visualmente o tamanho do leito. A Figura 30 apresenta o leito ao lado de um frasco de reagente e um cilindro de gás. As dimensões do leito empacotado foram 60 cm de altura e 10,30 cm de diâmetro, totalizando o volume máximo do vaso extrator, $5 \times 10^3 \text{ cm}^3$.



Figura 30. Comparação visual de tamanho do leito empacotado após extração com frasco de solvente e cilindro de gás.

Ao final de cada extração, analisava-se visualmente todo o leito, desmanchando-o delicadamente, para verificação de formação de caminhos preferenciais ou não esgotamento, ou seja, se não houve distribuição homogênea das partículas no leito, mas tais características indesejáveis não foram encontradas. A Figura 31 apresenta também uma comparação, entre as partículas de sementes de uva antes e depois da obtenção do extrato.

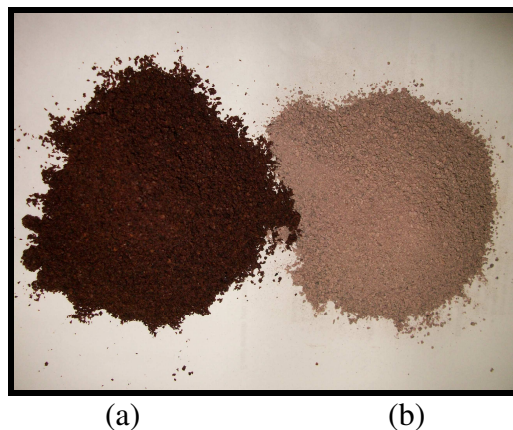


Figura 31. Partículas de sementes de uva. (a): antes da extração e (b): após a extração.

Através da Figura 31, percebe-se que as partículas após a extração encontram-se secas, sem resíduo de solvente, sendo esta uma das vantagens da SFE. Este único resíduo da SFE pode posteriormente ser utilizado como matéria-prima para reações em meio supercrítico, como hidrólise e polimerização. O resíduo de extração pode ainda ser simplesmente utilizado como complemento em farinhas de alimentação animal.

5.3 Caracterização do extrato de sementes de uva

A composição em ácidos graxos do extrato de sementes de uva obtido a partir das sementes do **Lote 1**, formado de duas variedades de uvas, Malbec e Cabernet Franc, na proporção 1:1, é apresentada na Tabela 3, a seguir. Nesta tabela encontram-se também valores de referência segundo padrões exigidos da Comissão do *Codex Alimentarius*, coordenada pela FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, com sede em Roma/Itália.

Tabela 3. Composição em ácidos graxos do extrato de sementes de uva obtido a partir das sementes do **Lote 1**.

Ácidos Graxos			Composição		
Nome usual	Nomenclatura IUPAC	C _{x:y} ^a	100x	100w	100w ^b
Láurico	dodecanóico	C _{12:0}	0,04	0,03	ND ^c
Mirístico	tetradecanóico	C _{14:0}	0,13	0,11	< 0,3
Palmítico	hexadecanóico	C _{16:0}	8,84	8,14	5,5-11,0
Palmitoléico	<i>cis</i> -9-hexadecanóico	C _{16:1}	0,18	0,16	< 1,2
Margárico	heptadecanóico	C _{17:0}	0,07	0,07	< 0,2
Margaroléico	<i>cis</i> -heptadeca-9-enoico	C _{17:1}	0,03	0,03	< 0,1
Estearico	octadecanóico	C _{18:0}	3,97	4,05	3,0-6,5
Oléico	<i>cis</i> -9-octadecenóico	C _{18:1}	14,92	15,12	12,0-28,0
Linoléico	<i>cis</i>-9, <i>cis</i>-12-octadecadienóico	C_{18:2}	70,79	71,20	58,0-78,0
Linolênico	all- <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	C _{18:3}	0,57	0,57	< 1,0
Araquídico	eicosanóico	C _{20:0}	0,20	0,22	< 1,0
Gadoléico	<i>cis</i> -9-eicosanóico	C _{20:1}	0,15	0,17	< 0,3
Behênico	docosanóico	C _{22:0}	0,07	0,08	< 0,5
Lignocérico	tetracosanóico	C _{24:0}	0,04	0,05	< 0,4

^a C_{x:y}, x = número de carbonos e y = número de duplas ligações,^b Codex Alimentarius – FAO/WHO^c ND – não detectado, definido como menor que 0,05 %,

100w e 100x denotam porcentagens mássicas e molares, respectivamente.

Percebe-se, na Tabela 3, que o extrato de sementes de uva obtido por extração supercrítica apresenta composição dentro dos padrões da FAO, que atesta que o extrato foi obtido a partir de sementes de uva da espécie *Vitis vinifera* L sem adulterações. O extrato de sementes de uva tem como ácido majoritário o ácido insaturado linoléico (C_{18:2}), seguido do oléico (C_{18:1}), e também os saturados palmítico (C_{16:0}) e esteárico (C_{18:0}). Gómez, López e de la Ossa (1996) compararam a composições de extratos obtidos a partir de SFE (CO₂) e soxhlet (hexano), e não encontraram diferença significativa entre os extratos obtidos com as duas técnicas estudadas. Entretanto, no mesmo trabalho, os autores estudaram a composição em ácidos graxos em diferentes tempos de extração (0,5; 1; 2 e 3) horas, e observaram o fracionamento do extrato obtido, onde houve diminuição linear da concentração ao longo do tempo dos ácidos palmítico, palmitoléico, oléico e linolênico, e aumento apenas na concentração do majoritário linoléico. Esta constatação indica a

possibilidade de produção de extratos de sementes de uva com diferentes conteúdos de ácidos graxos, apenas alterando a variável tempo do processo.

A Tabela 4 apresenta a caracterização do extrato de sementes de uva obtido a partir das sementes do **Lote 2**, formado de três variedades de uvas, Malbec, Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, na proporção 1:1:2, quanto à sua composição em ácidos graxos. Porém, para estes ensaios com o segundo lote estudou-se o fracionamento utilizando separadores em série na saída do extrator.

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do extrato de sementes de uva obtido por SFE a partir das sementes do **Lote 2**.

Ácidos Graxos		Composição				Desvio absoluto entre separadores (w)	Desvio relativo entre separadores (100w)
		Separador 1		Separador 2			
		(313 K/10 MPa)	(313 K/6 MPa)	(313 K/10 MPa)	(313 K/6 MPa)		
Nome usual	C _{x:y} ^a	100w	100x	100w	100x		
Láurico	C _{12:0}	0,02	0,03	0,07	0,10	0,05	71,43
Mirístico	C _{14:0}	0,07	0,09	0,11	0,13	0,04	36,36
Palmítico	C _{16:0}	7,78	8,46	8,59	9,33	0,81	9,43
Palmitoléico	C _{16:1}	0,10	0,11	0,14	0,15	0,04	28,57
Estearico	C _{18:0}	3,94	3,86	3,92	3,84	-0,02	-0,51
Oléico	C _{18:1}	14,04	13,87	13,55	13,37	-0,49	-3,62
Linoléico	C _{18:2}	72,86	72,46	72,25	71,78	-0,61	-0,84
Linolênico	C _{18:3}	0,64	0,64	0,78	0,78	0,14	17,95
Araquídico	C _{20:0}	0,25	0,22	0,25	0,23	0,00	0,00
Gadolêico	C _{20:1}	0,19	0,17	0,18	0,16	-0,01	-5,56
Behênico	C _{22:0}	0,11	0,09	0,16	0,13	0,05	31,25

^a C_{x:y}, x = número de carbonos e y = número de duplas ligações.

Da mesma forma que para o **Lote 1**, os componentes em maiores concentrações foram os ácidos palmítico (C_{16:0}), oléico (C_{18:1}), linoléico (C_{18:2}) e estearico (C_{18:0}), para ambos os separadores.

O maior desvio relativo entre separadores, ou seja, o maior fracionamento, foi obtido para o ácido láurico (C_{12:0}), com incremento na composição no separador 2 em relação ao separador 1. Entre os ácidos presentes no extrato de sementes de uva, o ácido

láurico é o de menor cadeia de carbonos, consequentemente de menor massa molar. CO_2 é facilmente solubilizado em compostos de baixa massa molar (PARAJÓ et al., 2009), ou seja, ao ocorrer a despressurização para 6 MPa, o ácido láurico permaneceu solúvel no solvente e foi conduzido ao segundo separador, aumentando sua concentração no extrato devido à diminuição dos outros ácidos de maiores cadeias. No que diz respeito à polaridade, por ser um ácido graxo saturado apresenta menor polaridade, fator a somar em sua solubilidade no solvente apolar (CO_2).

Nota-se, que na Tabela 4 não estão dispostos resultados para o Separador 3 (313 K/3 MPa) pois, como é possível observar na Figura 32, neste último separador obteve-se um extrato aquoso, com forte odor agradável, rico em compostos voláteis estudados em análises apresentadas posteriormente.

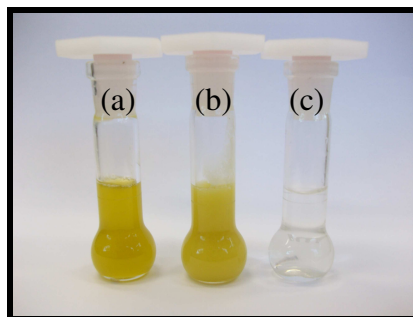


Figura 32. Extratos de sementes de uva obtidos nos separadores em série. (a): Separador 1; (b): Separador 2 e (c): Separador 3.

Na Tabela 5, encontram-se os resultados da composição provável em triacilgliceróis para os extratos obtidos para ambos os lotes, através do cálculo por método computacional a partir da composição em ácidos graxos e também estimado por análise em cromatógrafo gasoso capilar.

Foram obtidos 257 triacilgliceróis (TAGs), que são gerados pelas possíveis combinações dos ácidos graxos nas três posições da molécula de glicerol, no extrato contido no separador 1, e 274 TAGs no extrato do separador 2. Porém, como pode ser visto na Tabela 5, e explanado anteriormente na seção 4.4 (Caracterização do extrato de sementes de uva, página 46) foram consideradas somente aquelas combinações que

apresentavam valores acima de 0,5 %, e somados os isômeros *trans* aos seus respectivos *cis*, resultando em 10 combinações, em ambos os casos.

Tabela 5. Composição provável em triacilgliceróis do extrato de sementes de uva.

TAG ^a	Grupo ^b	Massa molar (g·mol ⁻¹)	Fração mássica (100w)					
			Lote 1 (análise)	Lote 2				Desvio relativo entre separadores (análise)
				Separador 1 (313 K/10 MPa)		Separador 2 (313 K/6 MPa)		
				calc	análise	calc	análise	
POP	50:1	833,37	1,18	-	0,97	-	-	-
PLP	50:2	831,35	2,02	1,41	1,83	1,74	1,94	5,67
PSO	52:1	861,42	0,45	-	-	-	-	-
POO	52:2	859,41	1,99	0,55	1,96	0,57	2,11	7,11
PLS	52:2	859,41	0,87	1,29	-	1,43	-	-
PLO	52:3	857,39	6,42	5,72	6,71	6,12	6,85	2,04
PLL	52:4	855,38	14,97	14,96	16,19	16,43	17,46	7,27
SOO	54:2	887,46	0,38	-	-	-	-	-
OOO	54:3	885,44	1,00	-	-	-	-	-
SLO	54:3	885,44	2,43	2,61	2,11	2,52	2,17	2,76
OLO	54:4	883,43	3,89	4,35	3,86	4,03	3,74	-3,21
SLL	54:4	883,43	7,53	6,83	7,70	6,76	7,52	-2,39
OLL	54:5	881,41	19,10	22,71	18,94	21,65	19,19	1,30
LLL	54:6	879,40	37,79	39,57	39,73	38,76	39,02	-1,82

^a Grupos com composição de triacilglicerol (TAG) menor que 0,5 % foram ignorados; ^b x:y, x = número de carbonos (exceto carbonos da molécula de glicerol) e y = número de duplas ligações; ^f L = ác. linoléico, O = ác. oléico, P = ác. palmítico e S = ác. Esteárico; calc: valores estimados através do método computacional recomendado por Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995); análise: valor estimado por cromatografia.

Como esperado, visto que o extrato de sementes de uva apresenta como ácido graxo majoritário o ácido linoléico, o triacilglicerol predominante foi aquele formado por três moléculas deste ácido esterificadas em uma molécula de glicerol, resultando no triacilglicerol conhecido como trilinoleína (LLL).

Comparando os dois lotes, mesmo acrescentando ao segundo lote a variedade Cabernet Sauvignon correspondente a 50 % da mistura, o perfil de triacilgliceróis foi semelhante. Entre os separadores do **Lote 2** a maior variação foi para o triacilglicerol PLL com 52 carbonos e 4 duplas ligações, mesmo assim foi uma variação menor que 10 %,

diferente da acentuada variação encontrada entre o perfil de ácidos graxos presentes nos extratos coletados nos separadores, como pode ser observado na Tabela 4 (página 78).

Observa-se que o método computacional, para a maioria dos triacilgliceróis, subestimou os valores em comparação aos encontrados através da cromatografia, porém com valores próximos e com as mesmas possíveis combinações de ácidos graxos esterificados para a formação dos triacilgliceróis. O grupo predominante foi aquele formado por triacilgliceróis de 54 carbonos, seguido do grupo de 52 carbonos.

Através da Tabela 5, percebe-se que o extrato de sementes de uva contém consideráveis teores de triacilgliceróis com ácido oléico na posição 1 ou 3 (altamente susceptíveis à hidrólise), como PLO e OLL, sugerindo uma significativa presença de ácidos graxos livres (GONÇALVES e MEIRELLES, 2004). Com o intuito de confrontar esta observação, o extrato de sementes de uva, para ambos os lotes, foi analisado pela técnica *High-Performance Size-Exclusion Chromatography* (HPSEC) e os resultados das composições em acilgliceróis e ácidos graxos livres estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Composições em acilgliceróis e ácidos graxos livres do extrato de sementes de uva.

HPSEC	Lote 1	Lote 2	
		Separador 1 (313 K/10 MPa)	Separador 2 (313 K/6 MPa)
TAG + DAG (%)	98,27	97,69	93,71
MAG + AGL (%)	1,73	2,31	6,29

TAG: triacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; MAG: monoacilgliceróis e AGL: ácidos graxos livres.

Como pode ser visto na Tabela 6, infelizmente a análise HPSEC resultou em apenas dois picos cromatográficos distintos, ou seja, o primeiro pico correspondente à soma TAG+DAG e o segundo à soma MAG+AGL. De tal forma, optou-se por realizar a análise de teor de ácidos graxos livres, com resultados dispostos na Tabela 7. A partir destes resultados, constatou-se que para o **Lote 1** não ocorreu a presença significativa de MAG, já para o **Lote 2**, a concentração de AGL correspondeu a aproximadamente 50 % da soma

MAG+AGL. Observa-se também que o separador 2 apresentou alto percentual de ácidos graxos livres, acima do recomendado pela FAO. Tal resultado é condizente à observação feita a partir da provável composição em triacilgliceróis. Este fato mostra também, que é possível através de separadores em série obter um extrato com baixo teor de AGL (separador 1), e para o extrato com alto teor (separador 2), apesar de pouca massa, se desejável pode ser tratado através de extração líquido-líquido por exemplo, com solventes que possuam afinidade com os AGL, removendo-os e assim adequando este extrato aos limites permitidos pela legislação vigente.

Com posse da provável composição em triacilgliceróis, calculou-se a massa molar média dos extratos, feito pela ponderação das massas molares dos triacilgliceróis que compõem o extrato em razão das respectivas frações molares. Optou-se aqui por utilizar as informações obtidas a partir das análises feitas em cromatografia. Os resultados obtidos para o **Lote 1** e para os separadores do **Lote 2** estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7. Características físico-químicas do extrato de sementes de uva.

Determinação	Lote 1	Codex Alimentarius FAO/WHO	Lote 2	
			Separador 1	Separador 2
Massa molar média (gmol^{-1})	853,25	-	873,29	873,32
Índice de iodo	137,35	128-150	139,34	138,13
Teor de ácidos graxos livres (%) ^a	1,76	<2,00	0,93	3,40
Índice de peróxido ($\text{meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$)	5,00	<10,00	4,31	1,72

^a expresso como porcentagem mássica de ácido oléico.

Na Tabela 7 também constam os resultados para índice de iodo. Para ambos os lotes os resultados estão dentro do recomendado pela legislação. Valores elevados podem indicar maior propensão à ocorrência de processos oxidativos. Os ácidos graxos contendo ligações duplas carbono-carbono reagem com iodo, de modo que, quanto maior o número de insaturações maior é o índice de iodo.

Encontram-se ainda na Tabela 7 valores de índice de peróxido para os extratos obtidos neste trabalho. A presença de peróxidos pressupõe processos de degradação da

matéria graxa, resultando em alterações nas características sensoriais e físicas. Os resultados para o extrato de sementes de uva demonstram baixa degradação e coerência com os limites permitidos pela FAO, com destaque para o baixo valor encontrado no extrato a partir do **Lote 2** contido no separador 2.

Índices de iodo e de peróxido são comumente utilizados como indicadores de qualidade da matéria-prima, ou seja, uma forma de avaliar condições de armazenamento e manipulação, visto que, os processos de degradação térmica e oxidação iniciam-se com a formação de compostos como peróxidos e voláteis responsáveis pelo forte odor.

Por outro lado, óleos e extratos vegetais apresentam antioxidantes naturais, com alto valor vitamínico, os quais exercem o papel de inibir tais processos, agindo de forma a interromper a reação em cadeia dos radicais livres pela doação de um átomo de seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos. O radical resultante é relativamente estável e cessa a reação em cadeia (RAMALHO e JORGE, 2006). Para os extratos de sementes de uva obtidos neste trabalho, os antioxidantes presentes em quantidades significativas são os tocoferóis e tocotrienóis, ou tocóis, como pode ser visto na Tabela 8 disposta a seguir.

Tabela 8. Conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis no extrato de sementes de uva.

Tocoferóis e Tocotrienóis	Conteúdo (mg.100g ⁻¹)				
	Lote 1	Codex Alimentarius FAO/WHO	Lote 2		
			Separador 1 (313 K/10 MPa)	Separador 2 (313 K/6 MPa)	Separador 3 (313 K/3 MPa)
α-tocoferol	3,90	1,60 – 3,80	6,16	8,65	0,35
β-tocoferol	-	ND – 8,90	0,21	0,25	-
γ-tocoferol	1,50	ND – 7,30	4,52	5,64	-
δ-tocoferol	-	ND – 0,40	0,43	0,56	-
α-tocotrienol	3,40	1,80 – 10,70	14,81	17,48	0,40
γ-tocotrienol	7,80	11,50 – 20,50	22,68	25,04	-
δ-tocotrienol	-	ND – 3,20	0,39	0,41	-

Nota-se na Tabela 8 que o extrato de sementes de uva obtido, para ambos os lotes, tem como tocoferol predominante o isômero α -. Embora a legislação aponte como componente em maior concentração o γ -tocoferol, cabe observar que não se recomenda um valor específico e sim uma faixa de valores, visto que estes podem variar dependendo de fatores climáticos do local de cultivo e da variedade da semente. Outro ponto relevante é que as sementes utilizadas neste trabalho ficaram em contato com a casca da uva, rica em compostos antioxidantes, durante o processo de fermentação alcoólica, o que possivelmente contribuiu para o aumento deste isômero no extrato. Desta forma, o extrato de sementes de uva mostra-se como uma importante fonte de α -tocoferol, naturalmente com alta atividade de vitamina E (DE GREYT e KELLENS, 2005).

Para os tocotrienóis, o **Lote 1** apresentou baixo valor para o isômero γ -tocotrienol comparado ao esperado pela FAO. Já para os separadores 1 e 2 do **Lote 2**, altos valores foram encontrados. Segundo Beveridge et al. (2005), sementes da variedade Cabernet Sauvignon apresentam grande quantidade de γ -tocotrienol comparada com outras castas *Vitis vinifera*. Assim, visto que o segundo lote possui 50 % desta variedade, é plausível atribuir estes altos valores encontrados à adição das sementes de Cabernet Sauvignon na mistura da matéria-prima.

No separador 3, embora visualmente não seja possível encontrar traços de fase oleosa (vide Figura 32, página 79), constatou-se a presença dos isômeros α -tocoferol e α -tocotrienol no extrato, mostrando-se relevantes, visto que estão na ordem de grandeza dos isômeros δ -tocoferol e δ -tocotrienol presentes no separador 2.

Extratos vegetais possuem outros importantes constituintes minoritários conhecidos como esteróis, com propriedades nutracêuticas, os quais em processos tradicionais de extração são reduzidos na etapa de refino. Entretanto, a legislação indica uma faixa a ser respeitada para que se evidencie a idoneidade do extrato vegetal e também para que estes compostos ao serem ingeridos possam assim desempenhar suas atividades biológicas, como redução de colesterol no plasma sanguíneo, produção de hormônios e também ação antioxidante (BEVERIDGE et al., 2005; FIORI, 2007; MURGA et al., 2000). Na Tabela 9,

encontram-se os resultados para a quantificação dos esteróis presentes no extrato de sementes de uva obtido através de extração supercrítica e os valores recomendados pela FAO.

Tabela 9. Conteúdo de esteróis presentes no extrato de sementes de uva ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Esteróis	Conteúdo ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)			
	Lote 1	Codex Alimentarius FAO/WHO	Lote 2	
			Separador 1	Separador 2
<i>Colesterol</i>	0,22	ND-0,50	0,38	0,49
Brassicasterol	ND	ND-0.20	ND	ND
24-Metilencolesterol	ND	-	ND	ND
Campesterol	9,29	7,50-14,00	12,06	13,18
Campestanol	2,02	-	0,41	0,34
Estigmasterol	12,06	7,50-12,00	16,32	17,16
δ -7-campesterol	0,24	-	-	-
δ -5-23-Estigmastadienol	0,41	-	0,36	0,35
Clerosterol	1,07	-	0,78	0,79
β-sitosterol	61,01	64,00-70,00	67,27	65,08
Sitostanol	4,04	-	0,50	0,64
δ -5-avenasterol	0,54	1,00-3,50	0,33	0,42
δ -5-24-estigmastadienol	0,57	-	-	-
δ -7-estigmasterol	1,63	0,50-3,50	1,75	1,65
δ -7-avenasterol	0,53	0,50-1,50	0,50	0,47
Outros	ND	ND-5,10	ND	ND
β -sitosterol + outros*	68,00	-	69,24	67,28
Esteróis totais ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ amostra)	4043	2000-7000	2954	3199

* δ -5-23-Estigmastadienol + Clerosterol + Sitostanol + δ -5-avenasterol + δ -5-24-estigmastadienol.

Como pode ser visto na Tabela 9, o extrato de semente de uvas é rico em β -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Estes são de fato os fitosteróis principais de óleos e extratos vegetais. É comum também encontrar, como neste trabalho, traços do esterol de origem animal, o colesterol. Entre os lotes não foi encontrada diferença significativa, apenas a observação de que para o **Lote 1** depara-se com a concentração de β -sitosterol ligeiramente abaixo do recomendado pela FAO, porém, assim como os tocóis, a quantidade é variável dependendo da origem e composição da matéria-prima.

Entre os separadores do **Lote 2**, os valores que chamam a atenção são para o Estigmasterol, apresentando em torno de 40 % a mais do esperado pela legislação. Tais resultados apontam um potencial de conservação de minoritários através da extração por fluido supercrítico, visto que o extrato não passa por processos de refino, os quais, segundo Bortolomeazzi et al. (2003) são responsáveis por degradar esteróis altamente sensíveis ao calor, luz e oxigênio, através de reações que podem até gerar compostos causadores de efeitos patológicos.

5.4 Equilíbrio de fases a altas pressões

Os dados experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões, determinados para as quatro temperaturas estudadas (313,15; 323,15; 333,15 e 343,15) K, encontram-se representados na forma de diagramas Pressão *versus* Temperatura (P-T) e Pressão *versus* fração mássica na mistura (P-w). Os componentes dos sistemas receberam as seguintes notações: Dióxido de Carbono (1); Etanol (2); Extrato de Sementes de Uva (3) e Diclorometano (4).

5.4.1 Sistemas contendo CO₂; Extrato de Sementes de Uva e Etanol

Tentativas preliminares de determinação de equilíbrio de fases para o pseudo-binário Extrato de Sementes de Uva (ESU) + CO₂ não foram bem sucedidas. Não foi possível obter um sistema solúvel/homogêneo, nos limites operacionais do aparato utilizado (30 MPa e temperaturas de até 343,15 K).

Rosso (2009) utilizou o mesmo aparato experimental de determinação de dados de equilíbrio de fases aplicado nesta tese e também não conseguiu determinar o sistema pseudo-binário CO₂ + óleo de casca de banana obtido por extração supercrítica. A autora optou então pela adição de etanol, com relação molar de 1:4 (etanol:CO₂) para o sucesso do procedimento.

Com base no trabalho de Rosso (2009), adicionou-se etanol como um terceiro componente à mistura pseudo-binária ESU + CO₂. Vários ensaios foram realizados até que com a razão molar de 1:3 (etanol:CO₂) proporcionou-se total solubilização do sistema necessária para a visualização de transições de fases.

Os dados experimentais determinados da mistura pseudo-ternária CO₂ (1) + ESU (3) + Etanol (2) encontram-se na Tabela 10. Os valores das pressões de transição são médios de triplicatas, com desvio padrão (σ) e respectivo tipo de transição para cada temperatura e composição estudada, expressas em fração mássica de cada componente (w_1 ; w_2 e w_3).

Tabela 10. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO₂ (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2).

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$w_1=0,7340$ $w_2=0,2558$ $w_3=0,0102$				$w_1=0,6678$ $w_2=0,2325$ $w_3=0,0997$			
313,15	7,89	0,01	ELV-PO	313,15	14,13	0,01	ELL
323,15	9,35	0,01	ELV-PO	313,15	7,95	0,04	ELLV
333,15	10,70	0,01	ELV-PO	323,15	14,41	0,04	ELL
343,15	12,37	0,01	ELV-PO	323,15	9,54	0,06	ELLV
$w_1=0,7263$ $w_2=0,2535$ $w_3=0,0202$				333,15	15,32	0,07	ELL
313,15	7,90	0,01	ELV-PO	333,15	11,14	0,01	ELLV
323,15	9,44	0,03	ELV-PO	343,15	17,01	0,03	ELL
333,15	11,07	0,02	ELV-PO	343,15	12,82	0,07	ELLV
343,15	12,65	0,02	ELV-PO	$w_1=0,5923$ $w_2=0,2074$ $w_3=0,2003$			
$w_1=0,7196$ $w_2=0,2504$ $w_3=0,0300$				313,15	18,76	0,05	ELL
313,15	7,96	0,01	ELV-PB	313,15	8,00	0,01	ELLV
323,15	9,53	0,03	ELV-PB	323,15	18,38	0,03	ELL
333,15	11,08	0,02	ELV-PB	323,15	9,49	0,01	ELLV
343,15	12,76	0,00	ELV-PB	333,15	18,59	0,00	ELL
$w_1=0,7121$ $w_2=0,2483$ $w_3=0,0396$				333,15	11,42	0,01	ELLV
313,15	7,86	0,03	ELV-PB	343,15	20,00	0,01	ELL
323,15	9,28	0,01	ELV-PB	343,15	12,70	0,01	ELLV
333,15	10,77	0,00	ELV-PB	$w_1=0,5187$ $w_2=0,1813$ $w_3=0,3000$			
343,15	12,56	0,02	ELV-PB	323,15	19,89	0,01	ELL
$w_1=0,7042$ $w_2=0,2457$ $w_3=0,0501$				323,15	11,12	0,03	ELLV
313,15	9,62	0,05	ELL	333,15	19,49	0,01	ELL
313,15	7,91	0,01	ELLV	333,15	12,95	0,01	ELLV
323,15	11,34	0,02	ELLV	343,15	20,56	0,02	ELL
323,15	9,49	0,03	ELLV	343,15	12,35	0,01	ELLV
333,15	13,09	0,00	ELLV				
333,15	10,91	0,01	ELLV				
343,15	15,18	0,01	ELL				
343,15	12,38	0,03	ELLV				

* T - temperatura (K); p - pressão (MPa); σ - desvio padrão (MPa); w - fração mássica na mistura para os componentes 1, 2 e 3; V - fase vapor; L - fase líquida; E - equilíbrio; PB - ponto de bolha e PO - ponto de orvalho.

Na Tabela 10 é possível notar que as pressões de transição foram observadas entre (7,85 a 20,57) MPa, com transições bifásicas do tipo Líquido-Vapor Ponto de Orvalho (LV-PO), Líquido-Vapor Ponto de Bolha (LV-PB) e Líquido-Líquido (LL), e trifásicas tipo Líquido-Líquido-Vapor (LLV). Porém, a determinação dos dados foi limitada a

composições com frações mássicas de (CO_2 + Etanol) superiores a 70 %, como pode ser visualizado no diagrama isotérmico exposto na Figura 33.

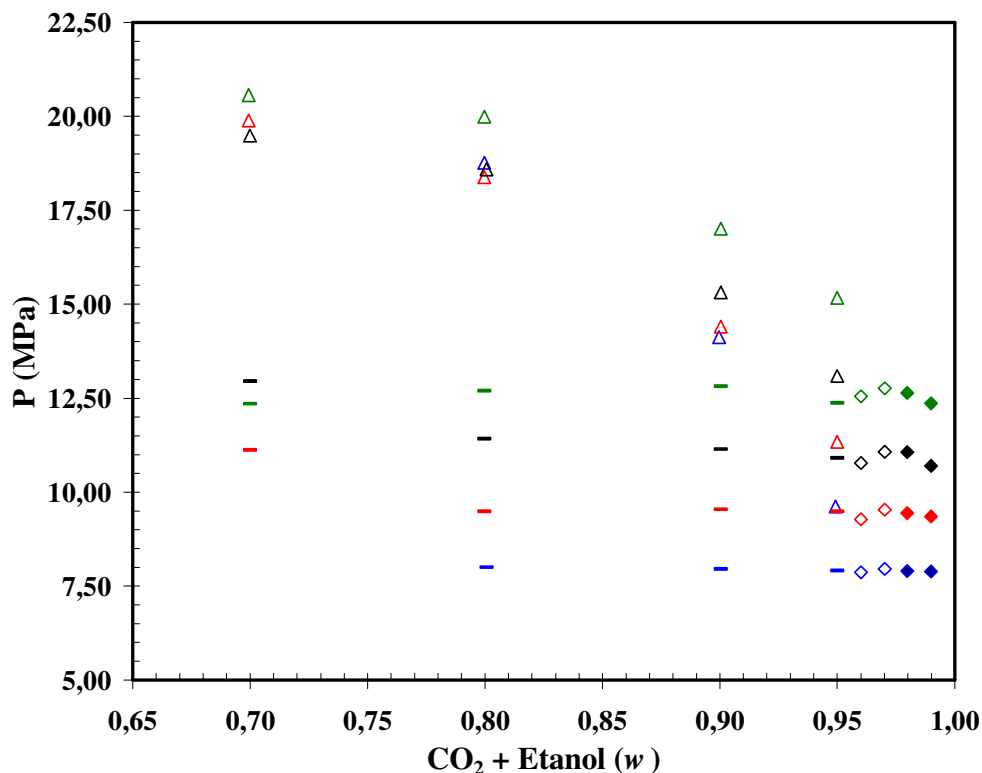


Figura 33. Diagrama pressão *versus* composição para o sistema CO_2 + Extrato de Sementes de Uva + Etanol. Transições de fases a 313,15 K ($\blacklozenge$: LV-PO; $\blue{lozenge}$: LV-PB; $\blue{\triangle}$: LL; $-$: LLV); 323,15 K ($\blacklozenge$: LV-PO; $\red{lozenge}$: LV-PB; $\red{\triangle}$: LL; $-$: LLV); 333,15 K ($\blacklozenge$: LV-PO; $\blacklozenge$: LV-PB; $\blacktriangle$: LL; $-$: LLV) e 343,15 K ($\blacklozenge$: LV-PO; $\blacklozenge$: LV-PB; $\blacktriangle$: LL; $-$: LLV).

A Figura 33 revela um diagrama similar aos diagramas do tipo V para misturas binárias contendo álcoois. Exemplos clássicos deste tipo de diagrama são os apresentados por Brunner (1985) e Zeck e Knapp (1986) para o binário eteno + metanol. Visualiza-se no diagrama a ocorrência da zona de imiscibilidade LL delimitada pela curva de coexistência trifásica LLV e a altas composições globais de (CO_2 + Etanol) a região bifásica LV com transições ponto de bolha e ponto de orvalho.

Depara-se com certa dissonância da curva LLV, que poderia ser explicada em termos das incertezas experimentais envolvidas, todavia, considerando que o extrato de sementes de uva é na verdade uma mistura multicomponente, de fato, tem-se uma mistura complexa resultando em um sistema de difícil determinação. Portanto, sistemas, os quais, pertencem extratos, são chamado de pseudo-ternários e não ternários.

Apresenta-se na Figura 34 o diagrama Pressão versus Temperatura para altas composições globais de (CO_2 + Etanol), com ocorrência de transições bifásicas LV-PB e LV-PO. Enquanto na Figura 35, as transições LL e LLV para as 4 menores composições onde a determinação experimental foi possível.

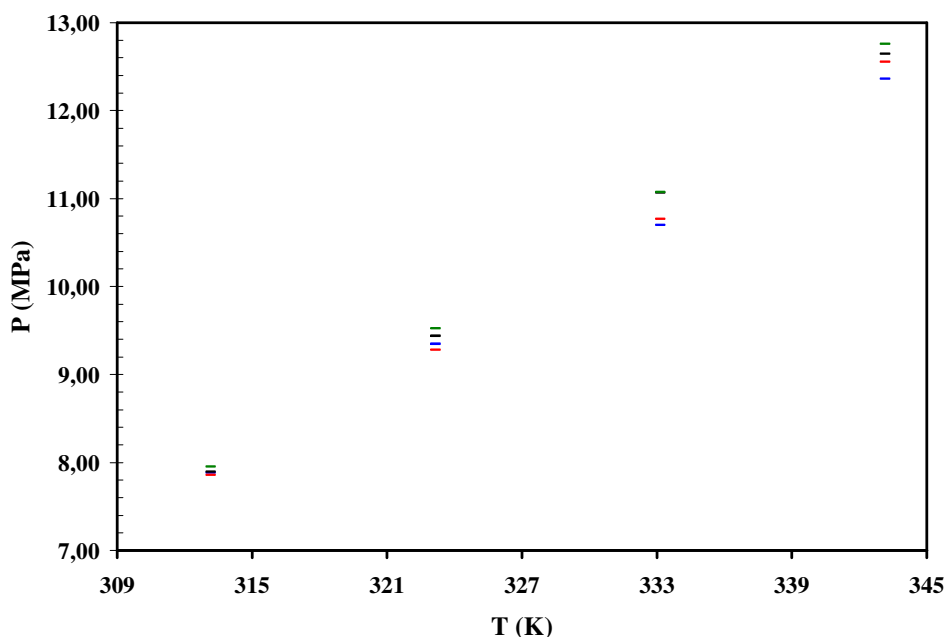


Figura 34. Diagrama pressão *versus* temperatura para o sistema CO_2 (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2). Transições de fases para $w_3=0,0102$ (—: LV-PB); $w_3=0,0202$ (—: LV-PB); $w_3=0,0300$ (—: LV-PO) e $w_3=0,0396$ (—: LV-PO).

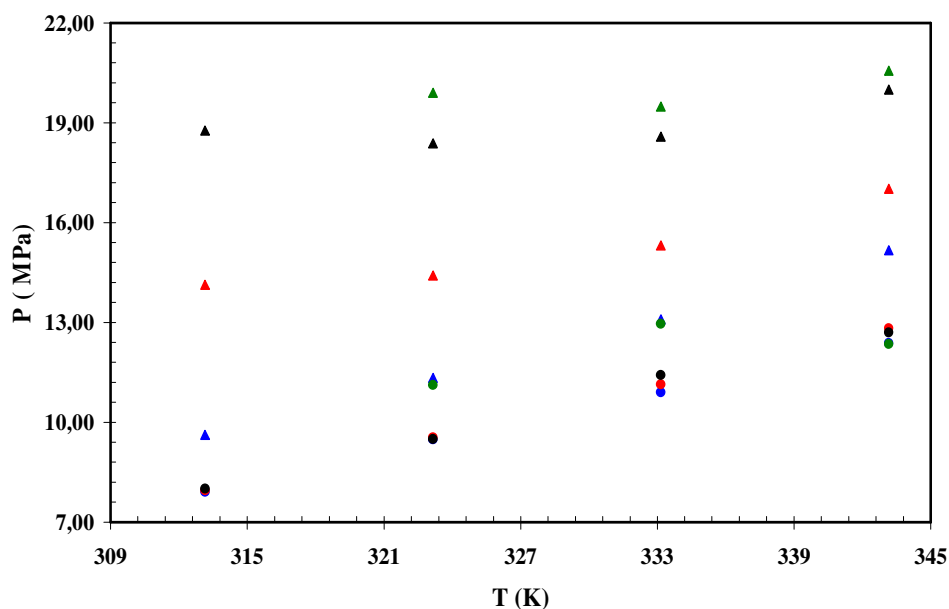


Figura 35. Diagrama P versus T para o sistema CO_2 (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2). Transições de fases para $w_3=0,0501$ (▲: LL e ●: LLV); $w_3=0,0997$ (▲: LL e ●: LLV); $w_3=0,2003$ (▲: LL e ●: LLV) e $w_3=0,0997$ (▲: LL e ●: LLV).

Para melhor visualização o diagrama apresentado na Figura 35 foi desmembrado em quatro diagramas, Figura 36, referentes às composições globais de (CO_2 + Etanol) na mistura que apresentaram transições LL, curva superior no plano P - T , e LLV, curva inferior. O comportamento das curvas apresentadas assemelha-se ao encontrado por Ndiaye et al. (2006) para o sistema CO_2 + óleo de mamona + etanol e por Rosso Comim et al. (2010b) para o sistema CO_2 + óleo de casca de banana + etanol.

O sistema pseudo-ternário aqui estudado caracteriza um típico sistema de extração supercrítica utilizando cossolvente polar etanol. O aumento do rendimento e/ou modificação da seletividade do processo de extração supercrítica é comumente feito mediante o uso de cossolventes, pois o CO_2 é um ótimo solvente para solutos apolares. Na literatura encontram-se vários trabalhos voltados à indústria de alimentos utilizando como cossolvente etanol ou água (LEE et al., 2000; SARRAZIN et al., 2000; PAVIANI et al., 2012; KITZBERGER et al., 2007; CAMPOS et al., 2005). Parajó et al. (2009) apresentam

uma abundante relação dos comuns cossolventes (modificadores) utilizados em pesquisas com SFE para a extração e fracionamento de compostos antioxidantes.

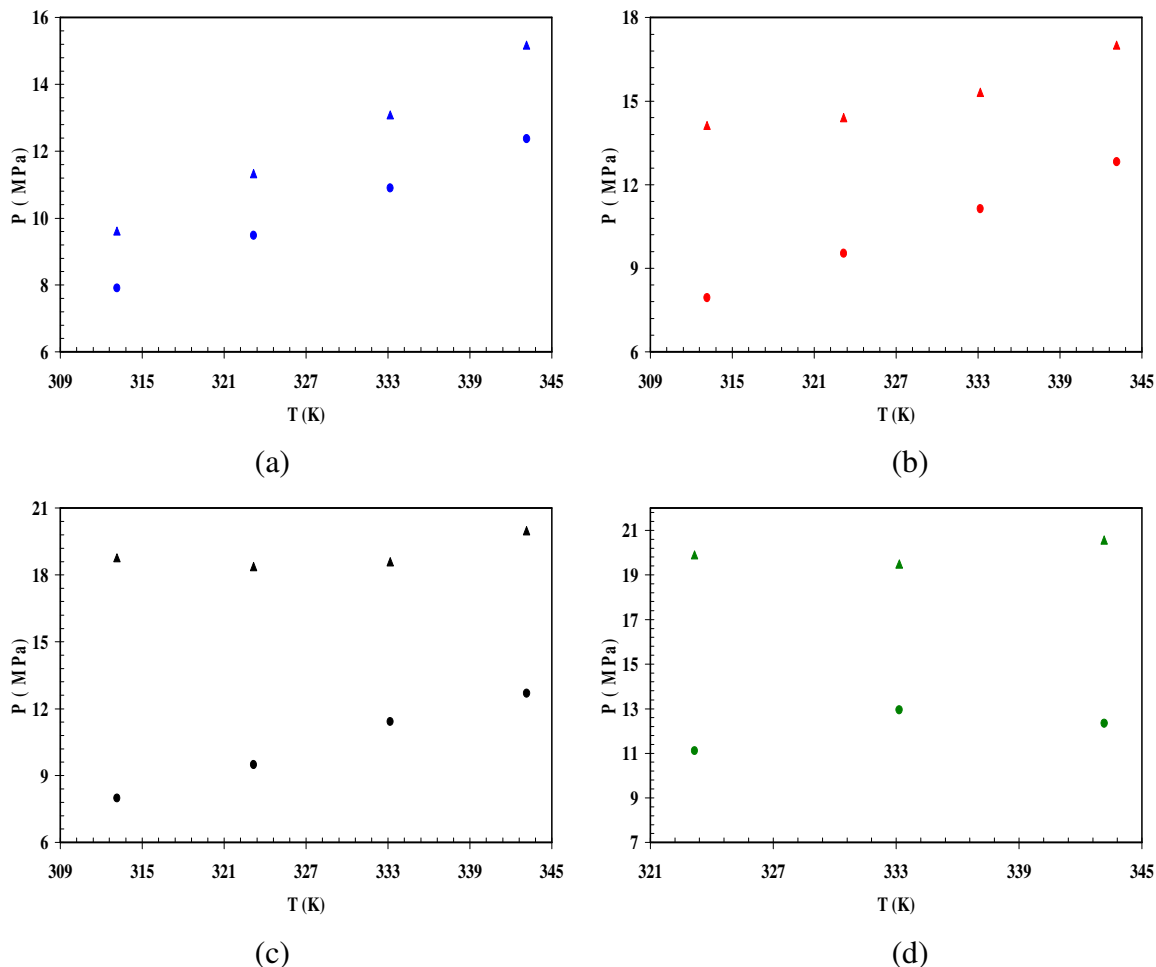


Figura 36. Diagramas *P versus T* para o sistema CO₂ (1) + ESU (3) + Etanol (2). Transições de fases para (a): $w_3=0,0501$ (▲: LL e ●: LLV); (b): $w_3=0,0997$ (▲: LL e ●: LLV); (c): $w_3=0,2003$ (▲: LL e ●: LLV) e (d): $w_3=0,0997$ (▲: LL e ●: LLV).

Diante dos resultados encontrados para o sistema pseudo-ternário anteriormente explanado, buscou-se justificar a lenta transferência de massa entre as fases, observada durante as medidas experimentais de equilíbrio de fases, e a limitação na determinação dos dados com frações mássicas de (CO₂ + Etanol) superiores a 70 %. Frente à projeção de que as sementes, das quais foi obtido o extrato, apresentavam 12,10 % de água (vide página

73), e que possivelmente houve a sua co-extração, houve a necessidade de conhecer o conteúdo de água no extrato. O valor encontrado foi 5,536 %, bastante expressivo para um extrato vegetal, comprometendo a sua qualidade e tornando-o mais favorável à oxidações.

A partir do conhecimento do teor de água, determinou-se a densidade do extrato a 298,15 K, para conferir possíveis alterações físicas. O valor obtido foi $0,923 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, resultado que condiz com as recomendações da Codex Alimentarius FAO/WHO, (0,920 a $0,926 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Por tanto, apesar do alto conteúdo de água presente, essa não afetou a qualidade física do extrato.

Visto que, o sistema contém moléculas de tamanhos tão diferentes, surgiu a necessidade de investigar o efeito da redução do teor de água do ESU no equilíbrio de fases a altas pressões. A redução foi feita através da submissão do extrato a vácuo e o conteúdo final de água atingido foi 0,135 %. Na Figura 37, fotos dos extratos antes e depois da redução do conteúdo de água. É possível notar uma leve diferença de coloração, porém não expressiva, dada, provavelmente, pela maior concentração do extrato após a retirada da água.

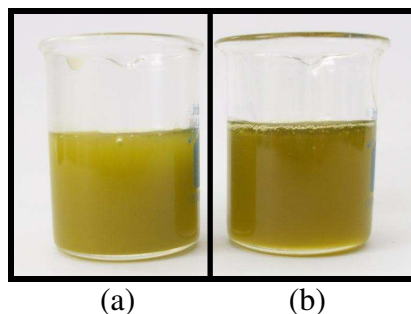


Figura 37. Extrato de sementes de uva obtido a partir do **Lote 1**. (a): com conteúdo de água de 5,536 %; (b): com conteúdo de água reduzido para 0,135 %.

As medidas experimentais determinadas para mistura pseudo-ternária CO_2 (1) + ESU - com conteúdo de água reduzido para 0,135 % (3) + Etanol (2) encontram-se na Tabela 11. Assim como para o sistema anterior, os valores das pressões de transição são médios de triplicatas, com desvio padrão (σ) e respectivo tipo de transição para cada temperatura e composição estudada.

Tabela 11. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO₂ (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2). ESU com conteúdo de água reduzido para 0,135 %.

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$w_1=0,7334$ $w_2=0,2555$ $w_3=0,0111$				$w_1=0,6677$ $w_2=0,2323$ $w_3=0,1000$			
313,15	7,43	0,00	ELV-PB	313,15	15,14	0,01	ELL
323,15	8,81	0,01	ELV-PB	313,15	7,52	0,01	ELLV
333,15	10,34	0,01	ELV-PB	323,15	16,04	0,01	ELL
343,15	11,89	0,01	ELV-PB	323,15	9,02	0,01	ELLV
$w_1=0,7267$ $w_2=0,2534$ $w_3=0,0199$				333,15	17,38	0,01	ELL
313,15	7,55	0,01	ELV-PB	333,15	10,81	0,01	ELLV
323,15	9,04	0,01	ELV-PB	343,15	18,90	0,01	ELL
333,15	10,76	0,01	ELV-PB	343,15	12,39	0,01	ELLV
343,15	12,08	0,03	ELV-PB	$w_1=0,5933$ $w_2=0,2066$ $w_3=0,2001$			
$w_1=0,7191$ $w_2=0,2504$ $w_3=0,0305$				313,25	20,51	0,02	ELL
313,15	7,85	0,01	ELL	313,15	7,43	0,00	ELLV
313,15	7,45	0,03	ELLV	323,15	20,69	0,03	ELL
323,15	9,82	0,01	ELL	323,15	9,06	0,01	ELLV
323,15	8,99	0,01	ELLV	$w_1=0,5936$ $w_2=0,2066$ $w_3=0,1998$			
333,15	11,92	0,00	ELL	333,15	21,57	0,03	ELL
333,15	10,75	0,01	ELLV	333,15	10,78	0,02	ELLV
343,15	13,77	0,00	ELL	343,15	22,53	0,01	ELL
343,15	12,29	0,01	ELLV	343,15	12,16	0,01	ELLV
$w_1=0,7105$ $w_2=0,2478$ $w_3=0,0417$				$w_1=0,5192$ $w_2=0,1810$ $w_3=0,2998$			
313,15	8,78	0,04	ELL	313,15	18,85	0,03	ELL
313,15	7,33	0,03	ELLV	313,15	7,37	0,01	ELLV
323,15	10,54	0,02	ELL	323,15	19,22	0,02	ELL
323,15	8,91	0,01	ELLV	323,15	9,05	0,02	ELV
333,15	12,58	0,01	ELL	333,15	20,32	0,01	ELL
333,15	10,59	0,01	ELLV	333,15	10,82	0,03	ELLV
343,15	14,48	0,02	ELL	343,15	21,90	0,03	ELL
343,15	12,23	0,01	ELLV	343,15	12,19	0,03	ELLV
$w_1=0,7045$ $w_2=0,2456$ $w_3=0,0499$				$w_1=0,4444$ $w_2=0,1550$ $w_3=0,4006$			
313,15	9,47	0,02	ELL	313,15	15,41	0,01	ELL
313,15	7,26	0,01	ELLV	313,15	7,49	0,01	ELLV
323,15	11,34	0,03	ELL	323,15	16,81	0,01	ELL
323,15	8,87	0,03	ELLV	323,15	9,15	0,02	ELLV
333,15	12,91	0,03	ELL	333,15	18,56	0,01	ELL
333,15	10,49	0,03	ELLV	333,15	10,71	0,02	ELLV
343,15	14,99	0,01	ELL	343,15	20,50	0,02	ELL
343,15	12,19	0,01	ELLV	343,15	12,41	0,02	ELLV

* T - temperatura (K); p - pressão (MPa); σ - desvio padrão (MPa); w - fração mássica na mistura para os componentes 1, 2 e 3; V - fase vapor; L - fase líquida; E - equilíbrio; PB - ponto de bolha e PO - ponto de orvalho.

Tabela 11. (Continuação) Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO₂ (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Etanol (2). ESU com conteúdo de água reduzido para 0,135 %.

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$w_1=0,3714$ $w_2=0,1284$ $w_3=0,5002$				$w_1=0,2965$ $w_2=0,1033$ $w_3=0,6002$			
313,15	9,59	0,00	ELL	313,15	7,72	0,01	ELV-PB
313,15	7,70	0,03	ELLV	323,15	9,19	0,01	ELV-PB
323,15	12,25	0,01	ELL	333,15	11,14	0,01	ELV-PB
323,15	9,27	0,01	ELLV	343,15	12,89	0,01	ELL
333,15	14,64	0,01	ELL	343,15	12,65	0,01	ELLV
333,15	10,87	0,01	ELLV	$w_1=0,2233$ $w_2=0,0773$ $w_3=0,6994$			
343,15	16,91	0,03	ELL	313,15	6,89	0,02	ELV-PB
343,15	12,5	0,03	ELLV	323,15	8,18	0,03	ELV-PB
				333,15	9,27	0,01	ELV-PB
				343,15	10,55	0,01	ELV-PB

* T - temperatura (K); p - pressão (MPa); σ - desvio padrão (MPa); w - fração mássica na mistura para os componentes 1, 2 e 3; V - fase vapor; L - fase líquida; E - equilíbrio; PB - ponto de bolha e PO - ponto de orvalho.

Através da Tabela 11, nota-se que para a faixa de temperatura de (313,15 a 343,15) K houve um aumento nas regiões de transição para os limites de (6,89 e 22,53) MPa, em relação ao primeiro sistema com maior conteúdo de água, com reprodutibilidade média na pressão de transição de fases na ordem de 0,02 MPa. Ainda, em comparação ao sistema anterior, foram visualizadas transições bifásicas do tipo LV-PB e LL, e trifásicas LLV, porém ocultaram-se as transições líquido-vapor ponto de orvalho (LV-PO) para ambas as temperaturas estudadas.

Uma vez determinados os dados de equilíbrio de fases, estes foram representados na Figura 38, através do diagrama de fases pressão *versus* composição (fração mássica). O diagrama evidencia que a redução do teor de água do extrato de semente de uva possibilitou a descrição do envelope de fases do sistema, extrapolando as medidas experimentais para concentrações de (CO₂ + Etanol) inferiores a 70 %. Desta forma, os dados foram determinados para as composições globais de (CO₂ + Etanol) entre (30 e 99) %.

Desta forma, fundamentou-se o estudo da influência da redução do teor de água do ESU no diagrama de fases do sistema pseudo-ternário ESU + CO₂ + Etanol. Dados de

equilíbrio de fases obtidos neste trabalho fornecem informações para suporte e desenvolvimento das etapas de encapsulamento de óleos vegetais empregando CO_2 supercrítico.

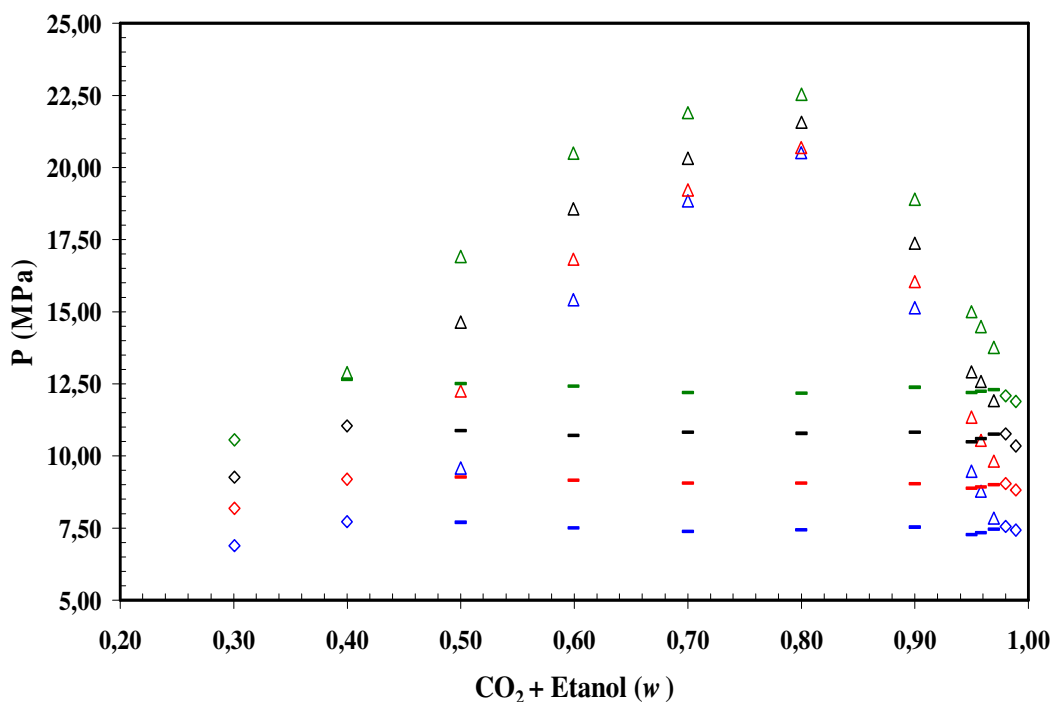


Figura 38. Diagrama P versus w para o sistema ternário Extrato de Semente de Uva (0,135 % de teor de água) + CO_2 + Etanol. Transições de fases a 313,15 K ($\diamond$: LV-PB; $\triangle$: LL; $-$: LLV); 323,15 K ($\diamond$: LV-PB; $\triangle$: LL; $-$: LLV); 333,15 K ($\diamond$: LV-PB; $\triangle$: LL; $-$: LLV) e 343,15 K ($\diamond$: LV-PB; $\triangle$: LL; $-$: LLV).

Com o auxílio da Figura 38, é possível inferir que o ponto de máximo da mistura, o qual separa a curva da fase rica em solvente da curva que apresenta a fase rica em extrato, para as temperaturas (313,15; 323,15; 333,15 e 343,15) K, localizam-se em torno de (22,5; 21,6; 20,7 e 20,5) MPa, respectivamente, e composição mássica de (CO_2 + Etanol) dentre (0,70 e 0,80) %.

Na Figura 39, estão representados em diagrama P - T os dados para as composições extremas de (CO_2 + Etanol), para as quais apenas a transição bifásica LV-PB foram

encontradas, enquanto na Figura 40, os dados do sistema que apresentaram transições bifásicas LL e também trifásicas LLV.

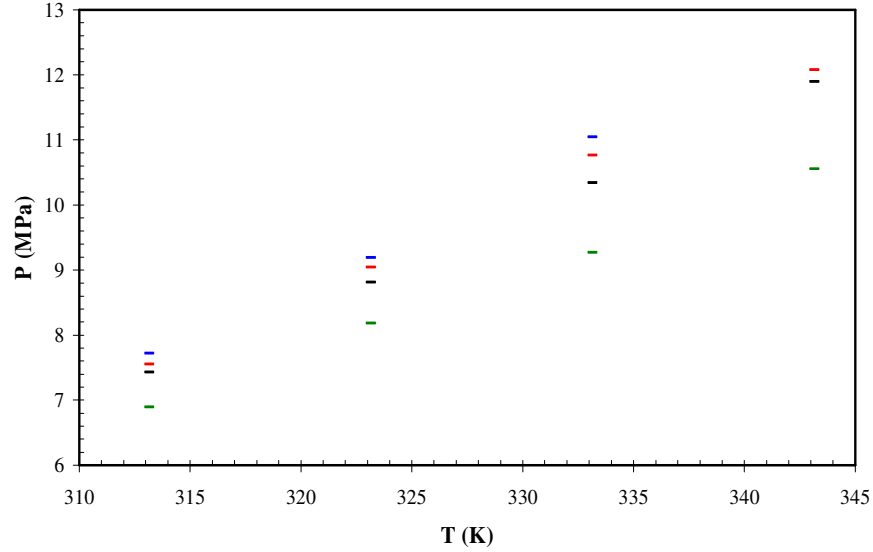


Figura 39. Diagrama P versus T para o sistema ternário Extrato de Semente de Uva (0,135 % de teor de água) (3) + CO_2 (1) + Etanol (2). Transições de fases para $w_3=0,0111$ (—: LV-PB); $w_3=0,0199$ (—: LV-PB); $w_3=0,6002$ (—: LV-PB) e $w_3=0,6994$ (—: LV-PB).

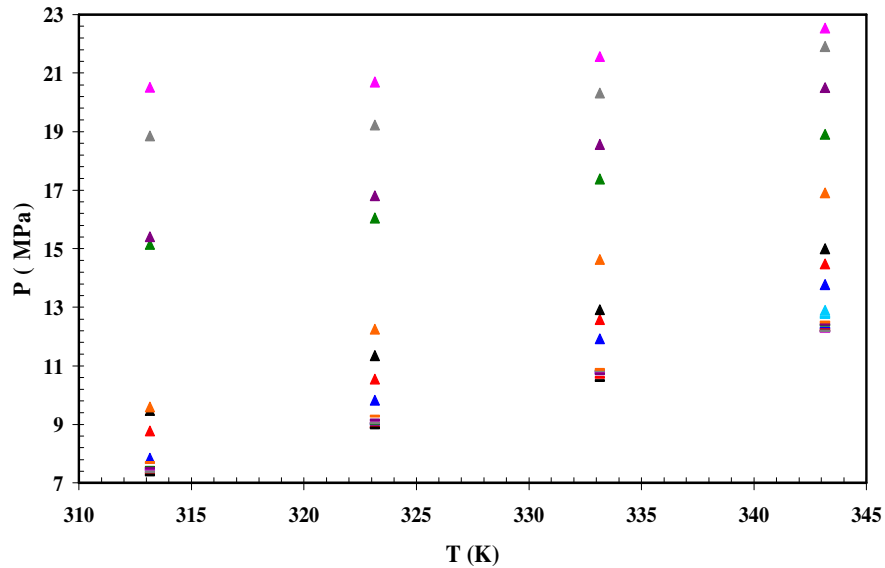


Figura 40. Diagrama P versus T para o sistema ternário Extrato de Semente de Uva (0,135 % de teor de água) (3) + CO_2 (1) + Etanol (2). Transições de fases para $w_3= 0,0305$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,0417$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,0499$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,1000$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,2001$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,2998$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,4006$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV); $w_3= 0,5002$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV) e $w_3= 0,6002$ ($\blacktriangle$: LL e --- : LLV).

Dado o grande número de dados expostos na Figura 40, essa foi separada em 4 diagramas contendo duas composições estudadas cada, configurando a Figura 41 a seguir.

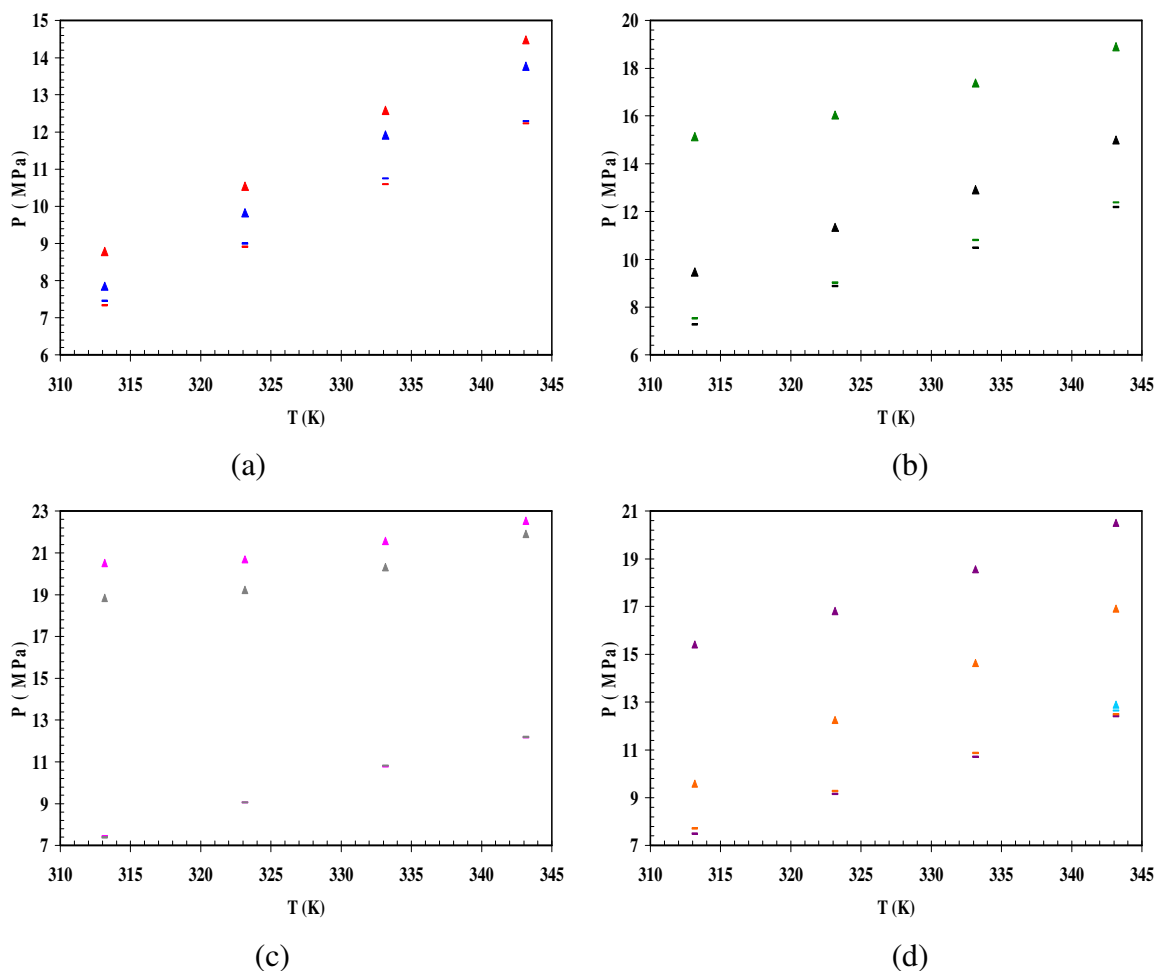


Figura 41. Diagramas P versus T para o sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) (3) + CO_2 (1) + Etanol (2). Transições de fases para (a): $w_3 = 0,0305$ (▲: LL e —: LLV) e $w_3 = 0,0417$ (▲: LL e —: LLV); (b) $w_3 = 0,0499$ (▲: LL e —: LLV) e $w_3 = 0,1000$ (▲: LL e —: LLV); (c) $w_3 = 0,2001$ (▲: LL e —: LLV) e $w_3 = 0,2998$ (▲: LL e —: LLV) e (d) $w_3 = 0,4006$ (▲: LL e —: LLV), $w_3 = 0,5002$ (▲: LL e —: LLV) e $w_3 = 0,6002$ (▲: LL e —: LLV).

Mesmo com a retirada parcial da água contida no extrato de sementes de uva, como pode ser visto nos diagramas anteriores apresentados no plano P - T , o sistema conservou seu comportamento típico de sistemas com extratos ou óleos vegetais em mistura com solventes de menores tamanhos de molécula.

Com posse da descrição do sistema CO₂ + Extrato de Sementes de Uva + Etanol a altas pressões e da detalhada caracterização do pseudo-componente extrato de sementes de uva, os dados experimentais foram correlacionados através da equação de estado de Peng-Robinson (PR). Utilizou-se como estratégia assumir características médias para uso do extrato como pseudo-componente. De tal forma, as propriedades críticas utilizadas foram **Pc = 0,998 MPa** (Pc do ácido graxo majoritário, linoléico × sua fração molar no extrato), **Tc = 775 K** e fator acêntrico **$\omega = 1,18$** (Tc e ω do ácido graxo majoritário) e **Mw = 879,40 kg/kgmol** (Mw do triacilglicerol majoritário, trilinoleína). Na Tabela 12, encontram-se os parâmetros de interação estimados e também os parâmetros já disponíveis na literatura (ARAÚJO et al., 2012) fixados na correlação.

Tabela 12. Parâmetros de interação do sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) (3)+ CO₂ (1) + etanol (2) para a equação de Peng-Robinson.

T (K)	$i = j$	k_{ij}	l_{ij}	$RMSE/MPa$	$erro\ abs/MPa$
313,15 a 343,15	1 = 2 ^a	7,8332×10 ⁻²	-3,0999×10 ⁻²	0,4328	0,3628
	1 = 3	4,9912×10 ⁻²	9,0027×10 ⁻²		
	2 = 3	-3,4432×10 ⁻¹	-2,2132×10 ⁻¹		

^a parâmetros extraídos de Araújo et al. (2012).

Nota-se, na Tabela 12, que se utilizou apenas um conjunto de parâmetros para todas as isotermas. Ainda assim, o modelo conseguiu correlacionar adequadamente o equilíbrio de fases, com erro absoluto e Raiz do Erro Quadrático Médio ($RMSE$) menores que 0,5 MPa, demonstrando que os valores de pressão de transição calculados pelo modelo foram próximos aos experimentais. Tal fato pode ser evidenciado através da Figura 42, onde três composições globais foram escolhidas para representar o emprego da equação de Peng-Robinson. Pontos representam dados experimentais e as linhas cheias os dados calculados. Para confrontar os dados experimentais com os dados calculados, na Figura 43 encontra-se a projeção de ambos. Percebe-se que não há discrepância entre os dados, demonstrando que o modelo e as estratégias adotadas foram adequadas.

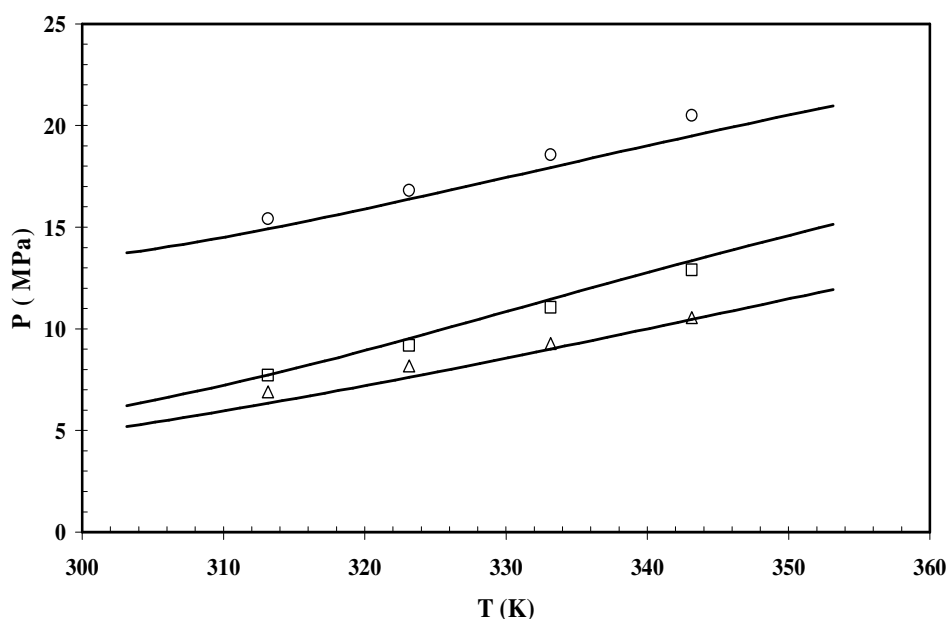


Figura 42. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) (3) + CO₂ (1) + Etanol (2). Transições de fases experimentais Δ: w₃= 0,6994; □: w₃= 0,6002 e ○: w₃= 0,4006 e —: modelo de Peng-Robinson.

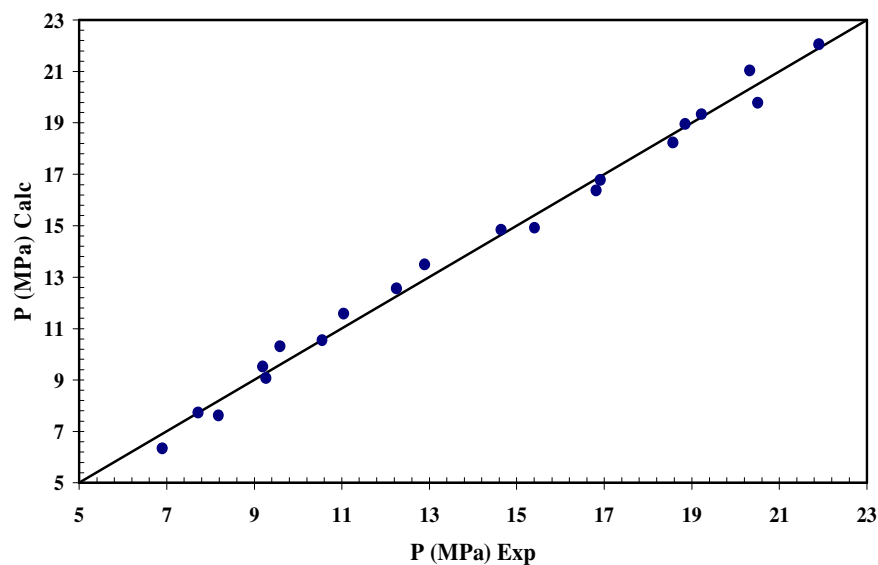


Figura 43. Diagrama Pressão de transição calculada *versus* Pressão de transição experimental para o intervalo de temperatura (313,15 – 343,15) K para o sistema ternário ESU (0,135 % de teor de água) + CO₂ + Etanol.

Rosso Comim et al. (2010a) utilizaram a equação de Peng-Robinson, com parâmetros de interação binária disponíveis na literatura, para correlacionar os dados experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões para sistemas contendo CO_2 + Ácido Palmítico + Etanol. Os autores observaram que a equação descreve bem o comportamento do sistema para transições LV, tanto para o ponto de bolha quanto para o ponto de orvalho. No entanto, notaram desvios acentuados no equilíbrio sólido-líquido (SL) encontrado no sistema, aumentando com o aumento da pressão. Estes altos desvios foram atribuídos pelos autores às aproximações de propriedades de componentes puros e simplificações no modelo.

Ndiaye et al. (2006) utilizaram também o modelo de Peng-Robinson para a descrição do sistema a altas pressões composto por CO_2 + Óleo de Mamona + Etanol, porém compararam seu desempenho com o da equação SAFT (*Statistical Associating Fluid Theory*) apresentada por Huang e Radosz (1990 e 1991), a qual é um modelo de perturbação onde as moléculas são interpretadas como uma mistura de segmentos esféricos e possui apenas um parâmetro de interação binária. Concluíram que, de modo geral, a equação SAFT apresenta uma performance igual ou superior à equação de PR. Os mesmos autores ressaltaram que, com base em sistemas CO_2 e óleos vegetais, ou, ainda seus respectivos etilésteres, os desempenhos das duas equações ficam cada vez mais semelhantes conforme diminui a assimetria molecular solvente-soluto.

Em concordância ao descrito acima, anteriormente, Tochigi et al. (1998) já haviam observado que a precisão de equações cúbicas de estado, tais como a de Peng-Robinson, para o cálculo do equilíbrio de fases a altas pressões, é limitada aos sistemas contendo substâncias não-polares e/ou substâncias fracamente polares. De tal forma, modelos de perturbação aplicados a sistemas semelhantes aos deste trabalho, vêm ganhando atenção da comunidade científica.

5.4.2 Sistemas contendo CO₂; Extrato de Sementes de Uva e Diclorometano

Os dados experimentais apresentados a seguir se referem a sistemas de interesse na etapa de aplicação do extrato de sementes de uva como material encapsulado. Previamente, foi necessário o conhecimento dos sistemas à pressão ambiente, com a determinação da solubilidade do extrato de sementes de uva em diclorometano (DCM). Através dos resultados notou-se que uma variação de 5 K, de (293,15 para 298,15) K, não ocasionou grande incremento na solubilidade do ESU em DCM, apenas de (17,45 para 17,76) kg·m⁻³. Os dados de solubilidade do ESU em solventes orgânicos, para várias temperaturas, encontram-se sumarizados no Apêndice desta tese.

De tal forma, embora a solubilidade do ESU em diclorometano para a faixa de variação local de temperatura ambiente onde os experimentos de encapsulamento foram realizados, resultou em média 17,60 kg·m⁻³, as concentrações das soluções estudadas foram no máximo 10 kg·m⁻³, como apresentadas na Tabela 1 (página 68), garantindo a não saturação. Porém, para o estudo do equilíbrio de fases do sistema de interesse para a etapa de encapsulamento, extrapolou-se este valor para 15 kg·m⁻³, a título de verificação do efeito do aumento do componente extrato no comportamento de fases do sistema.

Dados de solubilidade do extrato em diclorometano foram considerados na escolha das concentrações das soluções orgânicas utilizadas na etapa de encapsulamento do extrato. Soluções de alimentação à câmara de precipitação não podem estar saturadas, caso contrário tornam-se sujeitas à formação de fase sólida depositada na bomba e linha de alimentação, o que pode causar obstruções e perda da informação de concentração inicial necessária para cálculos de percentual de encapsulamento.

Com base nos trabalhos de Franceschi et al. (2008b) e Corazza et al. (2003), o primeiro sistema estudado foi o pseudo-ternário CO₂ (1) + [Extrato de Sementes de Uva (5,536 % de teor de água) (3) + Diclorometano (4)], com ESU em solução de DCM na concentração de 5 kg·m⁻³. Os dados deste sistema encontram-se na Tabela 13, seguindo a mesma conformação dos sistemas apresentados na seção anterior desta tese, onde os

valores das pressões de transição são médios de triplicatas, com desvio padrão (σ) e respectivo tipo de transição para cada temperatura e composição estudada, porém, como a mistura (ESU + DCM) foi mantida em concentração constante, as composições sumarizadas foram expressas em fração mássica de CO_2 (w_1) apenas.

Tabela 13. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO_2 (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Diclorometano (4). ESU em solução com DCM na concentração de $5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$w_1=0,9600$				$w_1=0,7998$			
313,15	7,56	0,01	ELV-PO	313,15	6,41	0,01	ELV-PB
$w_1=0,9500$				323,15	7,79	0,01	ELV-PB
313,15	7,64	0,02	ELV-PB	333,15	8,95	0,01	ELV-PB
$w_1=0,9397$				343,15	10,22	0,02	ELV-PO
313,15	7,46	0,01	ELV-PB	$w_1=0,7002$			
$w_1=0,9200$				313,15	5,87	0,01	ELV-PB
313,15	7,25	0,02	ELV-PB	323,15	6,86	0,02	ELV-PB
$w_1=0,9100$				333,15	8,20	0,00	ELV-PB
313,15	7,18	0,01	ELV-PB	343,15	9,63	0,01	ELV-PB
323,15	8,20	0,01	ELV-PO	$w_1=0,4999$			
$w_1=0,8970$				313,15	4,91	0,02	ELV-PB
313,15	7,11	0,02	ELV-PB	323,15	5,89	0,02	ELV-PB
323,15	8,38	0,00	ELV-PO	333,15	6,98	0,00	ELV-PB
$w_1=0,8504$				343,15	8,01	0,01	ELV-PB
313,15	6,88	0,01	ELV-PB	$w_1=0,3007$			
323,15	8,17	0,01	ELV-PB	313,15	3,56	0,01	ELV-PB
333,15	9,36	0,03	ELV-PO	323,15	4,18	0,01	ELV-PB
$w_1=0,8201$				333,15	5,04	0,01	ELV-PB
313,15	6,60	0,01	ELV-PB	343,15	5,76	0,02	ELV-PB
323,15	7,84	0,02	ELV-PB				
333,15	9,03	0,02	ELV-PB				
343,15	10,18	0,01	ELV-PO				

* T - temperatura (K); p - pressão (MPa); σ - desvio padrão (MPa); w - fração mássica do componente 1 na mistura; V - fase vapor; L - fase líquida; E - equilíbrio; PB - ponto de bolha e PO - ponto de orvalho.

Observa-se que os dados de equilíbrio de fases a altas pressões dispostos na Tabela 13 compreendem pressões de transição entre (3,55 e 10,23) MPa, com transições bifásicas

do tipo Líquido-Vapor Ponto de Orvalho (LV-PO) e Líquido-Vapor Ponto de Bolha (LV-PB). Os dados foram determinados para as composições globais de CO_2 entre (30 e 96) %, como pode ser visualizado no diagrama isotérmico apresentado na Figura 44, a seguir.

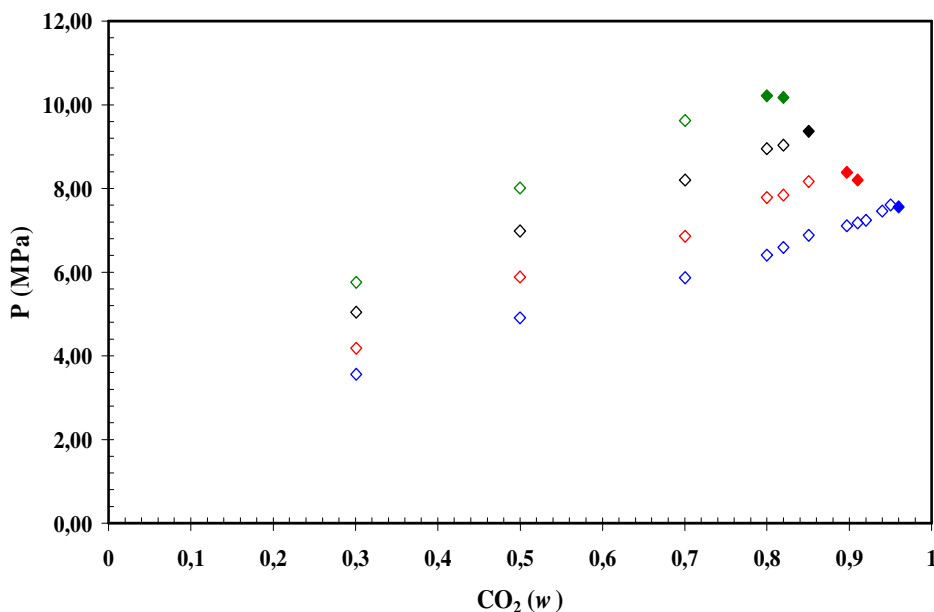


Figura 44. Diagrama P versus w para o sistema ternário CO_2 + Extrato de Sementes de Uva + Diclorometano. ESU em solução com DCM na concentração de $5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Transições de fases a 313,15 K (♦: LV-PO e ♦: LV-PB); 323,15 K (♦: LV-PO e ♦: LV-PB); 333,15 K (♦: LV-PO e ♦: LV-PB) e 343,15 K (♦: LV-PO; ♦: LV-PB).

Como pode ser visto na Figura 44, a altas composições globais de CO_2 , para ambas as temperaturas estudadas, tem-se o limite entre as regiões bifásicas LV com transições ponto de bolha e com ponto de orvalho, indicando a região com o valor máximo de pressão onde o ponto crítico de mistura se localiza.

Em diagrama Pressão versus Temperatura, foram representados na Figura 45 os dados de equilíbrio de fases para o sistema CO_2 (1) + [Extrato de Sementes de Uva (3) + Diclorometano (4)], com ESU em solução de DCM na concentração de $5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Devido ao grande número de dados exposto na Figura 45, esta foi dividida em dois diagramas, altas e baixas concentração de CO_2 , sequencialmente apresentados na Figura 46.

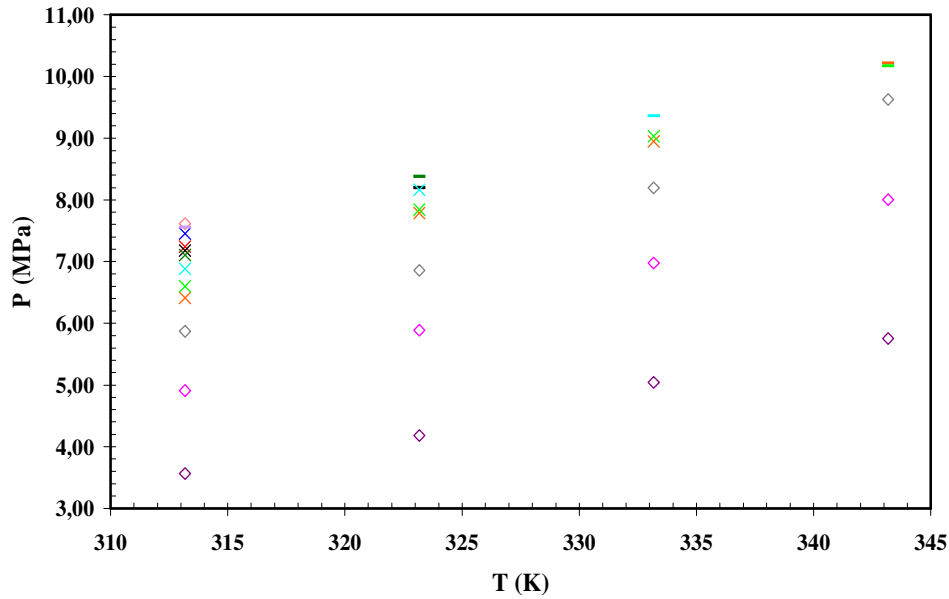


Figura 45. Diagrama *P versus T* para o sistema ternário CO₂ (1) + ESU (3) + DCM (4).

ESU em solução com DCM na concentração de 5 kg·m⁻³. Transições de fases para w₁=0,9600 (—: LV-PO); w₁=0,9500 (◇: LV-PB); w₁=0,9397 (×: LV-PB); w₁=0,9200 (×: LV-PB); w₁=0,9100 (×: LV-PB e —: LV-PO); w₁=0,8970 (×: LV-PB e —: LV-PO); w₁=0,8504 (×: LV-PB e —: LV-PO); w₁=0,8201 (×: LV-PB e —: LV-PO); w₁=0,7998 (×: LV-PB e —: LV-PO); w₁=0,7002 (◇: LV-PB); w₁=0,4999 (◇: LV-PB) e w₁=0,3007 (◇: LV-PB).

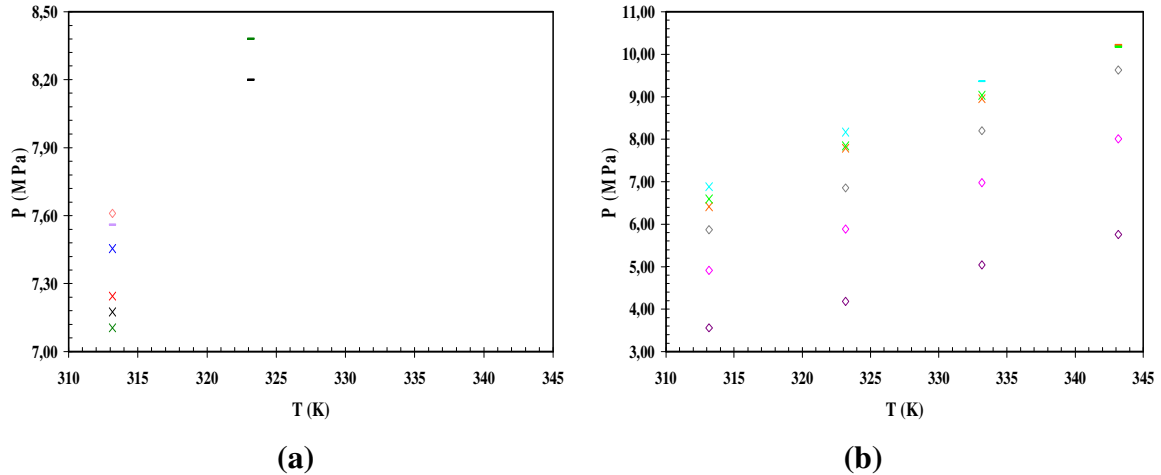


Figura 46. Diagramas *P versus T* para o sistema ternário CO₂ (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de 5 kg·m⁻³. Transições de fases (a): entre w₁=0,9600 e w₁=0,8970 e (b): entre w₁=0,8504 e w₁=0,3007. Legenda idêntica a Figura 45.

O comportamento encontrado para o sistema pseudo-ternário aqui exposto é idêntico ao binário CO_2 + DCM determinado por Corazza et al. (2003), negligenciando a presença do extrato (na concentração estudada) no sistema. Semelhante caso foi observado por Franceschi et al. (2008b) com a adição ao sistema binário do polímero PHBV em solução com DCM, na concentração de $40 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

Franceschi et al. (2008b) também estudaram a adição de β -caroteno ao sistema binário CO_2 + DCM, e da mesma forma, com soluções de β -caroteno em DCM na concentração de $8 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, não notaram significativas diferenças no sistema. Estes autores buscavam descrever sistemas de interesse para o encapsulamento de β -caroteno em PHBV, utilizando, como nesta tese, a técnica *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS), com solvente DCM e como antissolvente CO_2 .

Por fim, o segundo sistema foi determinado e estudado, buscando-se observar a influência do aumento da concentração do Extrato de Sementes de Uva em solução com Diclorometano.

Encontram-se, na Tabela 14, os dados experimentais para as quatro temperaturas estudadas, do sistema pseudo-ternário CO_2 (1) + [Extrato de Sementes de Uva (3) + Diclorometano (4)], com ESU em solução de DCM na concentração de $15 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Mais uma vez, a mesma conformação de apresentação dos dados do sistema anterior foi mantida.

Os dados foram determinados para composições globais de CO_2 entre (30 e 96) %, assim como no sistema com menor concentração de extrato. Através da Tabela 14, percebe-se que transições bifásicas do tipo Líquido-Vapor Ponto de Orvalho (LV-PO) e Líquido-Vapor Ponto de Bolha (LV-PB) foram também encontradas, compreendendo pressões de transição entre (3,54 e 10,42) MPa, como podem ser visualizadas na Figura 47.

Para evidenciar a semelhança entre os sistemas ternários aqui apresentados e também ao binário (CORAZZA et al., 2003), encontram-se na Figura 48 os diagramas com tais comparações. Nota-se na Figura 48a, que não houve diferença pronunciada entre

sistemas quanto a localização do ponto crítico de mistura, para ambas as temperaturas estudadas.

Tabela 14. Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema CO₂ (1) + Extrato de Sementes de Uva (3) + Diclorometano (4). ESU obtido a partir de sementes do **Lote 1** em solução com DCM na concentração de 15 kg·m⁻³.

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$w_1=0,9600$				$w_1=0,7999$			
313,15	7,76	0,01	ELV-PO	313,15	6,69	0,02	ELV-PB
$w_1=0,9500$				323,15	7,90	0,01	ELV-PB
313,15	7,87	0,02	ELV-PB	333,15	9,21	0,01	ELV-PB
$w_1=0,9300$				343,15	10,37	0,00	ELV-PO
313,15	7,79	0,02	ELV-PB	$w_1=0,7799$			
$w_1=0,9200$				313,15	6,54	0,01	ELV-PB
313,15	7,56	0,01	ELV-PB	323,15	7,85	0,01	ELV-PB
$w_1=0,9000$				333,15	9,14	0,01	ELV-PB
313,15	7,31	0,01	ELV-PB	343,15	10,42	0,01	ELV-PO
323,15	8,36	0,01	ELV-PO	$w_1=0,6997$			
$w_1=0,8801$				313,15	6,04	0,01	ELV-PB
313,15	7,30	0,01	ELV-PB	323,15	6,91	0,01	ELV-PB
323,15	8,45	0,01	ELV-PB	333,15	8,12	0,01	ELV-PB
$w_1=0,8701$				343,15	9,37	0,01	ELV-PB
313,15	7,10	0,02	ELV-PB	$w_1=0,6001$			
323,15	8,42	0,01	ELV-PB	313,15	5,46	0,01	ELV-PB
333,15	9,48	0,02	ELV-PO	323,15	6,51	0,01	ELV-PB
$w_1=0,8500$				333,15	7,58	0,01	ELV-PB
313,15	6,86	0,01	ELV-PB	343,15	8,85	0,02	ELV-PB
323,15	8,13	0,02	ELV-PB	$w_1=0,4997$			
333,15	9,55	0,00	ELV-PO	313,15	5,01	0,01	ELV-PB
$w_1=0,8200$				323,15	5,81	0,01	ELV-PB
313,15	6,80	0,01	ELV-PB	333,15	6,74	0,02	ELV-PB
323,15	7,99	0,01	ELV-PB	343,15	7,86	0,01	ELV-PB
333,15	9,28	0,01	ELV-PB	$w_1=0,3001$			
343,15	10,28	0,01	ELV-PO	313,15	3,55	0,01	ELV-PB
				323,15	4,13	0,03	ELV-PB
				$w_1=0,3005$			
				333,15	5,06	0,02	ELV-PB
				343,15	5,74	0,01	ELV-PB

* T - temperatura (K); p - pressão (MPa); σ - desvio padrão (MPa); w - fração mássica do componente 1 na mistura; V - fase vapor; L - fase líquida; E - equilíbrio; PB - ponto de bolha e PO - ponto de orvalho.

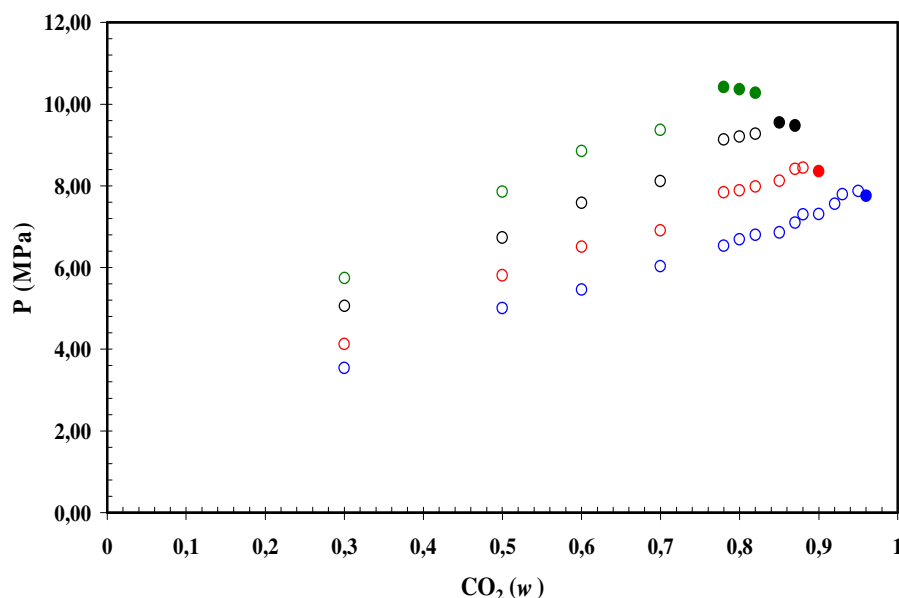


Figura 47. Diagrama P versus w para o sistema ternário CO_2 + Extrato de Sementes de Uva + Diclorometano. ESU em solução com DCM na concentração de $15 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Transições de fases a 313,15 K (●: LV-PO e ○: LV-PB); 323,15 K (●: LV-PO e ○: LV-PB); 333,15 K (●: LV-PO e ○: LV-PB) e 343,15 K (●: LV-PO; ○: LV-PB).

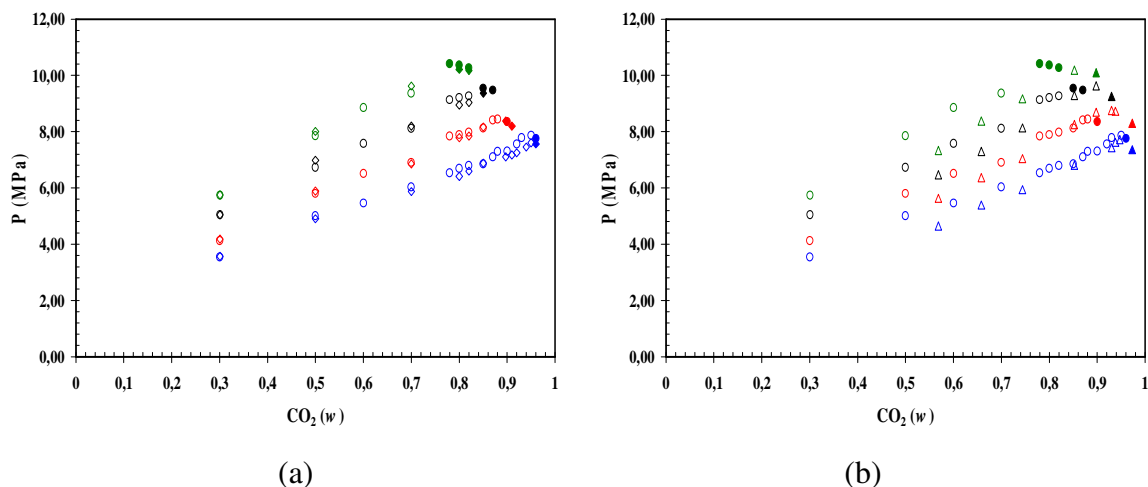


Figura 48. Diagramas P versus w para o sistema ternário CO_2 + ESU + DCM contendo ESU em solução com DCM a $15 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (legenda idêntica a Figura 47) (a): comparado ao sistema contendo ESU em solução com DCM a $5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (legenda idêntica à Figura 44) e (b): comparado ao sistema binário CO_2 + DCM (CORAZZA et al., 2003) com transições de fases a 313,15 K (▲: LV-PO e △: LV-PB); 323,15 K (▲: LV-PO e △: LV-PB); 333,15 K (▲: LV-PO e △: LV-PB) e 343,15 K (▲: LV-PO; △: LV-PB).

Enquanto na Figura 48b, confirma-se que a adição de Extrato de Sementes de Uva (ESU) ao sistema binário, mesmo na concentração de $15 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, não promoveu deslocamento significativo da região de transição de fases.

Assim como observado por Franceschi (2009) para a adição de PHBV ao sistema binário, e a partir dos dados dos sistemas ternários aqui expostos, na escolha de condições adequadas para o encapsulamento de extrato em PHBV, utilizando DCM e CO_2 como solvente e antissolvente, respectivamente, o comportamento de fases do sistema binário somente, pode ser considerado.

Os dados para o sistema pseudo-ternário CO_2 (1) + [Extrato de Sementes de Uva (3) + Diclorometano (4)], com ESU em solução de DCM na concentração de $15 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, encontra-se também representado no plano P-T, na Figura 49, a seguir.

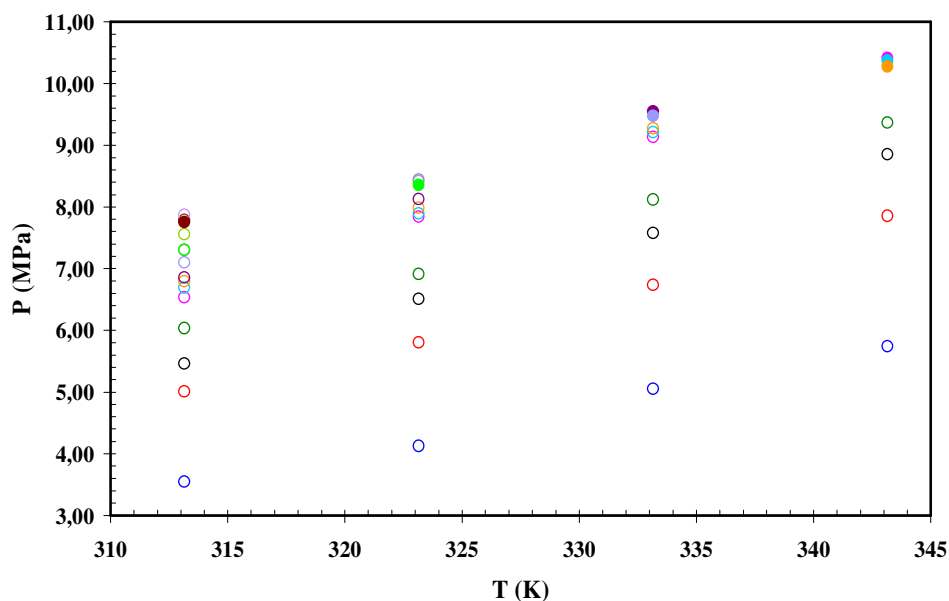


Figura 49. Diagrama P *versus* T para o sistema ternário CO_2 (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de $15 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Transições de fases para $w_1 \cong 0,3000$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,4997$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,6001$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,6997$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,7799$ ($\bullet$: LV-PO; $\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,7999$ ($\bullet$: LV-PO; $\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,8200$ ($\bullet$: LV-PO; $\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,8500$ ($\bullet$: LV-PO; $\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,8701$ ($\bullet$: LV-PO; $\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,8801$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,9000$ ($\bullet$: LV-PO; $\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,9200$ ($\bullet$: LV-PB); $w_1 = 0,9300$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,9500$ ($\circ$: LV-PB); $w_1 = 0,9600$ ($\bullet$: LV-PO).

Com intuito de melhor visualização dos dados, a Figura 49 foi desmembrada resultando a Figura 50, com dois diagramas P-T, onde as transições para as maiores porcentagens mássicas de CO_2 na mistura encontram-se na Figura 50a e das menores na Figura 50b.

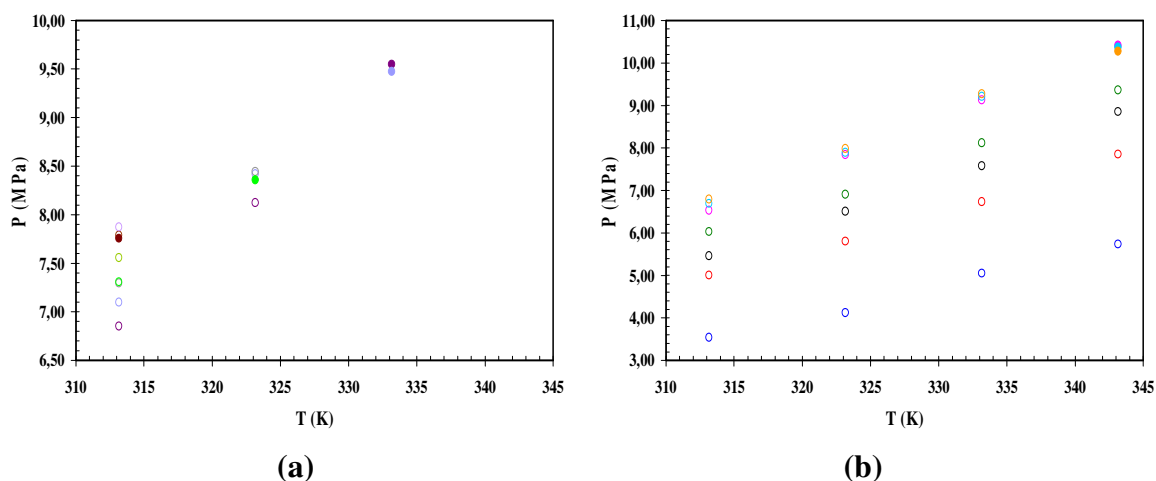


Figura 50. Diagramas P versus T para o sistema ternário CO_2 (1) + ESU (3) + DCM (4). ESU em solução com DCM na concentração de $15 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Transições de fases entre (a): $w_1 = 0,8500$ e $w_1 = 0,9600$ e entre (b): $w_1 \approx 0,3000$ e $w_1 = 0,8200$. Legenda idêntica a Figura 49.

Dada a semelhança dos sistemas ternários contendo CO_2 + ESU + DCM apresentados nesta tese, como o também ternário CO_2 + PHBV + DCM (FRANCESCHI et al., 2008b), com o binário CO_2 + DCM (CORAZZA et al., 2003), não foi realizada a descrição do sistema através de modelo termodinâmico, visto que o sistema binário já encontra-se representado através da equação de Peng-Robinson, na mesma faixa de temperatura estudada neste trabalho, e também adotando apenas um conjunto de parâmetros para todas as isotermas.

5.5 Micropartículas de biopolímero e encapsulamento do extrato de sementes de uva

Uma vez que as informações sobre os sistemas de interesse ao encapsulamento através de dados de equilíbrio de fases a altas pressões foram desenvolvidas apenas com o extrato de sementes de uva obtido a partir do **Lote 1**, somente o extrato deste lote foi encapsulado.

Embora o extrato em condições ambientes apresentava-se no estado líquido, ponderou-se o estudo das temperaturas de fusão e cristalização desse. O termograma para o extrato de sementes de uva encontra-se na Figura 51.

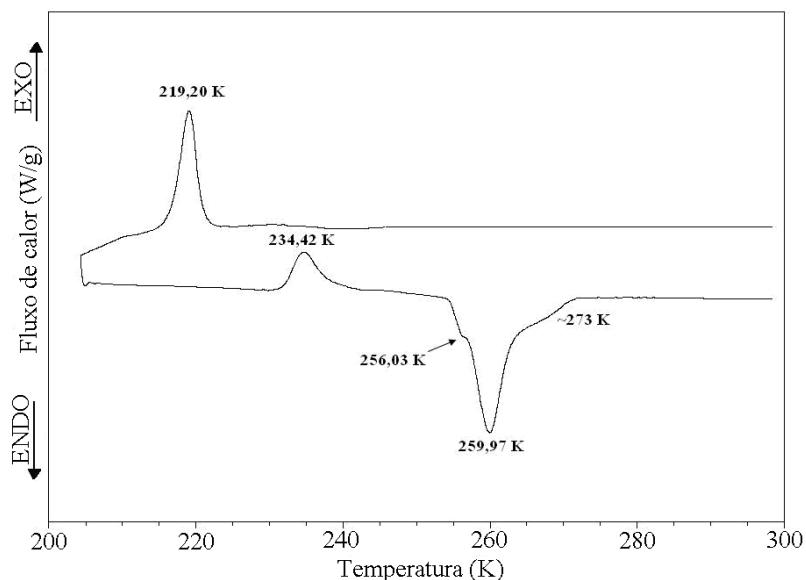


Figura 51. Termograma do extrato de sementes de uva obtido a partir de sementes do **Lote 1**.

Através do termograma, observa-se que o pico que representa a temperatura de cristalização encontra-se a 219,20 K, com entalpia de 29,7 J·g⁻¹. Nota-se também, que o extrato apresenta uma transição polimórfica, típica de ácidos graxos e triacilgliceróis. Após a fusão, em torno de 230 K, uma cristalização adicional como um pico exotérmico a 234,42 K foi encontrado. O extrato de sementes de uva apresenta transição de fases a 256,03 K,

referente a uma mudança polimórfica. A 259,97 K, outro pico associado a fusão do extrato pronuncia-se, com entalpia de $65,0 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$.

Termogramas similares foram observados para óleo de sementes de uva por Kaisersberger (1990), o qual atribui o primeiro pico endotérmico, a aproximadamente 230,0 K, à fusão da forma cristalina instável α , seguida da cristalização na forma instável β , o qual foi caracterizado por um pico exotérmico.

Com base nestes resultados, nas condições experimentais de operação do aparato da técnica SEDS, acredita-se que o extrato encapsulado encontrar-se-á no núcleo da cápsula na forma líquida.

Como forma de treinamento, dois testes de precipitação do polímero PHBV foram conduzidos em iguais condições experimentais utilizadas por Priamo (2011) descritas na seção 4.10 (Obtenção de micropartículas de biopolímero e encapsulamento do extrato de sementes de uva, página 66). Através de fotomicrografias obtidas por MEV-EED e com auxílio do *software Size Meter* determinou-se o tamanho médio característico das partículas formadas, bem como os valores de tamanho máximo e mínimo encontrados e a distribuição do tamanho de partículas através do cálculo do desvio padrão e variância. Tais resultados para os testes iniciais de precipitação de PHBV encontram-se na Tabela 15.

Ressalta-se que os experimentos de precipitação foram conduzidos a (8 e 12) MPa, teste 1 e teste 2, respectivamente, com demais variáveis fixas. Os resultados expostos na Tabela 15 reproduzem os dados de Priamo (2011), com valores de tamanho médio de partículas na condição de 8 MPa idêntico e a 12 MPa próximo, porém, com discrepância entre os valores de tamanho máximo encontrados.

Quanto à morfologia das partículas, através da Figura 52 pode-se perceber que para ambos os testes foram obtidas partículas esféricas, assim como observado por Priamo (2011). Porém, o autor não notou formação de partículas aglomeradas para estas condições

experimentais, apenas para experimentos conduzidos a 20 MPa. Já neste trabalho, como pode ser encontrado na Figura 52a, deparou-se com a formação de aglomerados no experimento conduzido a 8 MPa. Possíveis explicações para esta discordância podem ser dadas por manipulação excessiva da amostra ou mal preparo dessa para a análise em MEV-EED, resultando na aglomeração das partículas formadas.

Tabela 15. Tamanho e distribuição de tamanho de partículas e percentual de encapsulamento.

Experimento	Diâmetro médio característico (µm)	Diâmetro máximo (µm)	Diâmetro mínimo (µm)	Desvio Padrão	Variância	PRE ^a (%)
Teste precipitação 1	1,15	4,04	0,32	0,51	0,26	-
Teste precipitação 2	1,05	2,99	0,24	0,45	0,21	-
Ensaio encapsulamento 1	-	-	-	-	-	49,10
Ensaio encapsulamento 2	-	-	-	-	-	48,03
Ensaio encapsulamento 3	-	-	-	-	-	37,01
1	0,95	2,16	0,24	0,39	0,16	-
2	1,04	2,20	0,31	0,37	0,14	31,19
3	0,74	1,96	0,19	0,33	0,11	29,16
4	0,66	2,33	0,15	0,34	0,12	22,54
7	-	-	-	-	-	71,94
8	-	-	-	-	-	32,61
9 ^b	-	-	-	-	-	38,69

^a PRE = Percentual Real de Encapsulamento, dado pela Equação 19 (pág. 70); ^b experimento realizado em triplicata.

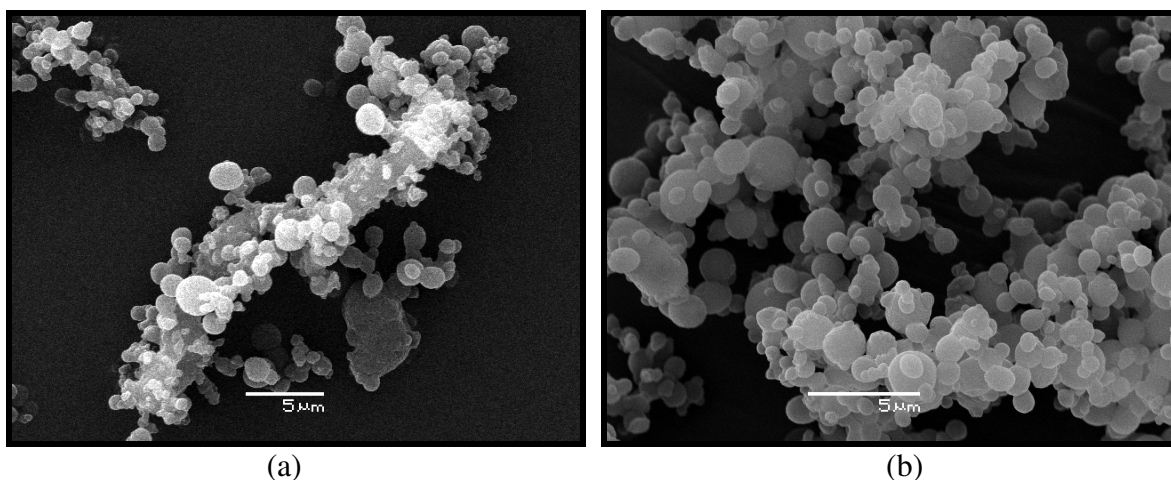


Figura 52. Precipitação de PHBV. Fotomicrografias para (a): Teste de precipitação 1 (8 MPa) e (b): Teste de precipitação 2 (12 MPa).

Devido à carência de informações na literatura aberta sobre encapsulamento de extratos vegetais utilizando a técnica SEDS, foram definidos três ensaios iniciais, apenas para título de conhecimento do sistema e verificação da influência da variável razão extrato:polímero. Este estudo foi definido a partir de observações feitas por Varona et al. (2010) para avaliar a influência desta variável na aglomeração das partículas formadas no encapsulamento de óleo essencial de lavanda, e também na morfologia e eficiência do encapsulamento de β -caroteno, segundo Mattea, Martin e Cocero (2008).

Cabe recordar que, as cápsulas formadas passaram por uma etapa prévia de lavagem em etanol anidro, com intuito de retirar possíveis depósitos de extrato sobre essas. Os resultados para estes ensaios também se encontram na Tabela 15, anteriormente apresentada. Observa-se que, para os três ensaios, não foi possível avaliar o tamanho das partículas formadas, pois estas se apresentavam na forma de aglomerados, como é possível visualizar na Figura 53.

Embora Priamo (2010) não tenha observado aglomeração de partículas de PHBV nas condições de 313,15 K e 8 MPa, fundamentando os resultados contrários deste trabalho, nos ensaios de encapsulamento nas mesmas condições, com apenas variação da razão extrato:polímero, foi verificada a aglomeração das partículas. De tal forma, descartam-se as

considerações feitas anteriormente quanto à manipulação e preparação das amostras para fotomicrografias em MEV-EED, e assumem-se aceitáveis os resultados apresentados neste trabalho.

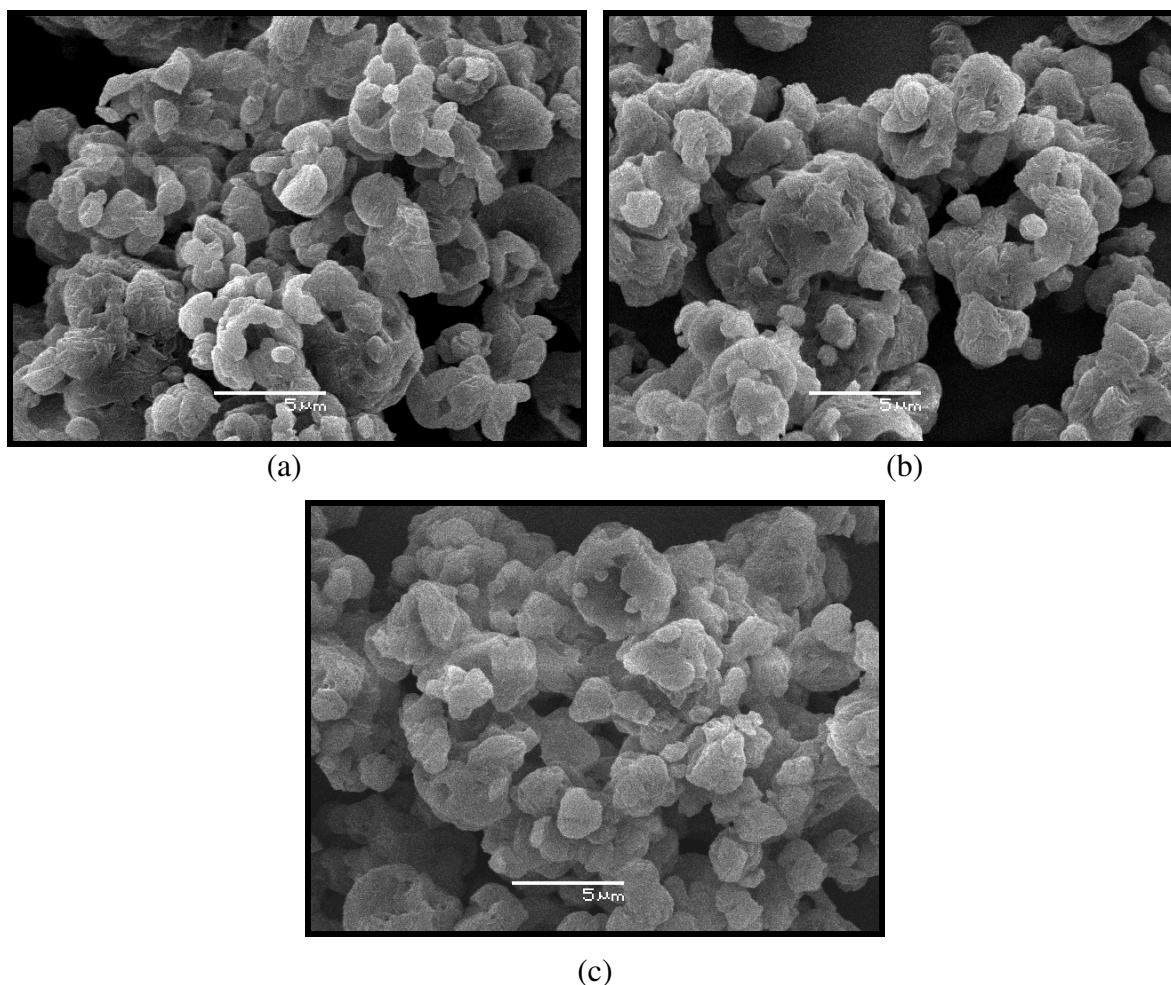


Figura 53. Encapsulamento do ESU em PHBV. Fotomicrografias para (a): Ensaio de encapsulamento 1 (1:1); (b): Ensaio de encapsulamento 2 (1:2) e (c): Ensaio de encapsulamento 3 (1:3).

Quanto à determinação do percentual real de encapsulamento (PRE), o ensaio 1 apresentou maior valor, porém próximo ao ensaio 2. Varona et al. (2010) verificaram através da técnica PGSS que com o aumento da razão óleo:polímero ocorreu a diminuição da quantidade de óleo de lavanda encapsulado e também resultou em aglomerados de partículas. Neste trabalho, aglomerados foram encontrados, porém o efeito inverso quanto

ao aumento da razão extrato:polímero foi observado. Aglomerados de partículas sujeitam a um aumento de superfície, onde o extrato possivelmente ficou envolvido pelo emaranhado de polímero. Somado ao extrato livre presente, cogita-se relacionar também uma quantidade de extrato incorporado ao polímero, aumentando sua massa na determinação de PRE.

Com posse destes resultados, elaborou-se um planejamento de experimentos apresentado na Tabela 1 (página 68) com respectivos resultados expostos na Tabela 15. Nota-se nesta tabela que o experimento 1 não apresenta resultado para PRE, pois acidentalmente perdeu-se a relativa amostra. Outro detalhe é a ausência de informações para os experimentos 5 e 6, explanada a seguir. As fotomicrografias obtidas através de MEV-EED para todos os experimentos do planejamento encontram-se dispostas na Figura 54.

Neste trabalho utilizou-se como ferramenta de determinação de percentual real de encapsulamento a leitura em UV-visível, baseado nos trabalhos de Priamo (2010) e Franceschi (2009). Esta técnica utiliza informações iniciais fornecidas sobre a região de abrangência. Assim, se torna mais precisa ao passo que se conhece com domínio a faixa de concentração possível de trabalho. Este fato denota uma maior sensibilidade na interpretação das amostras na análise, e possivelmente assim ocasionou a superestimação da massa de extrato de sementes de uva encapsulado, acarretando em PRE maiores que 100 %, resultados obtidos para os experimentos 5 e 6, portanto, estes resultados não encontram-se expostos. O mesmo princípio refletiu em impossibilidade da comum determinação de eficiência de encapsulamento.

As partículas formadas nos experimentos 5 e 6 encontram-se na Figura 54e e Figura 54f, respectivamente. Nota-se que também não foi possível determinar o tamanho das partículas, pois estas encontravam-se na forma de grandes aglomerados fibrosos. Estes dois experimentos, assim como nos ensaios de encapsulamento, são diferentes experimentalmente quanto à razão extrato : polímero, demonstrando que, não houve influencia predominante desta variável na morfologia das partículas.

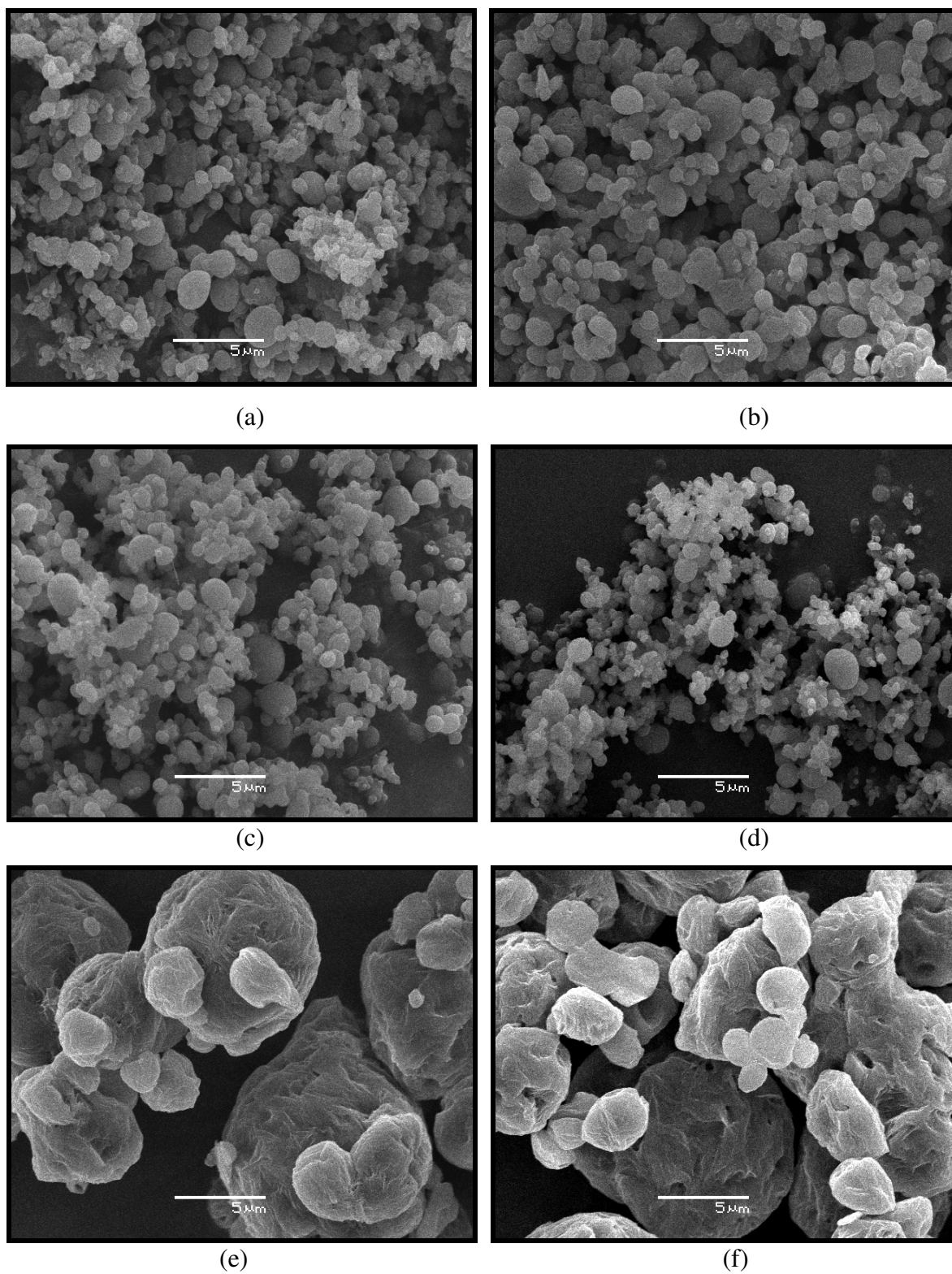


Figura 54. Encapsulamento do ESU em PHBV. Fotomicrografias para os Experimentos (a): 1; (b): 2; (c): 3; (d): 4; (e): 5 e (f): 6. Condições experimentais vide Tabela 1, página 68.

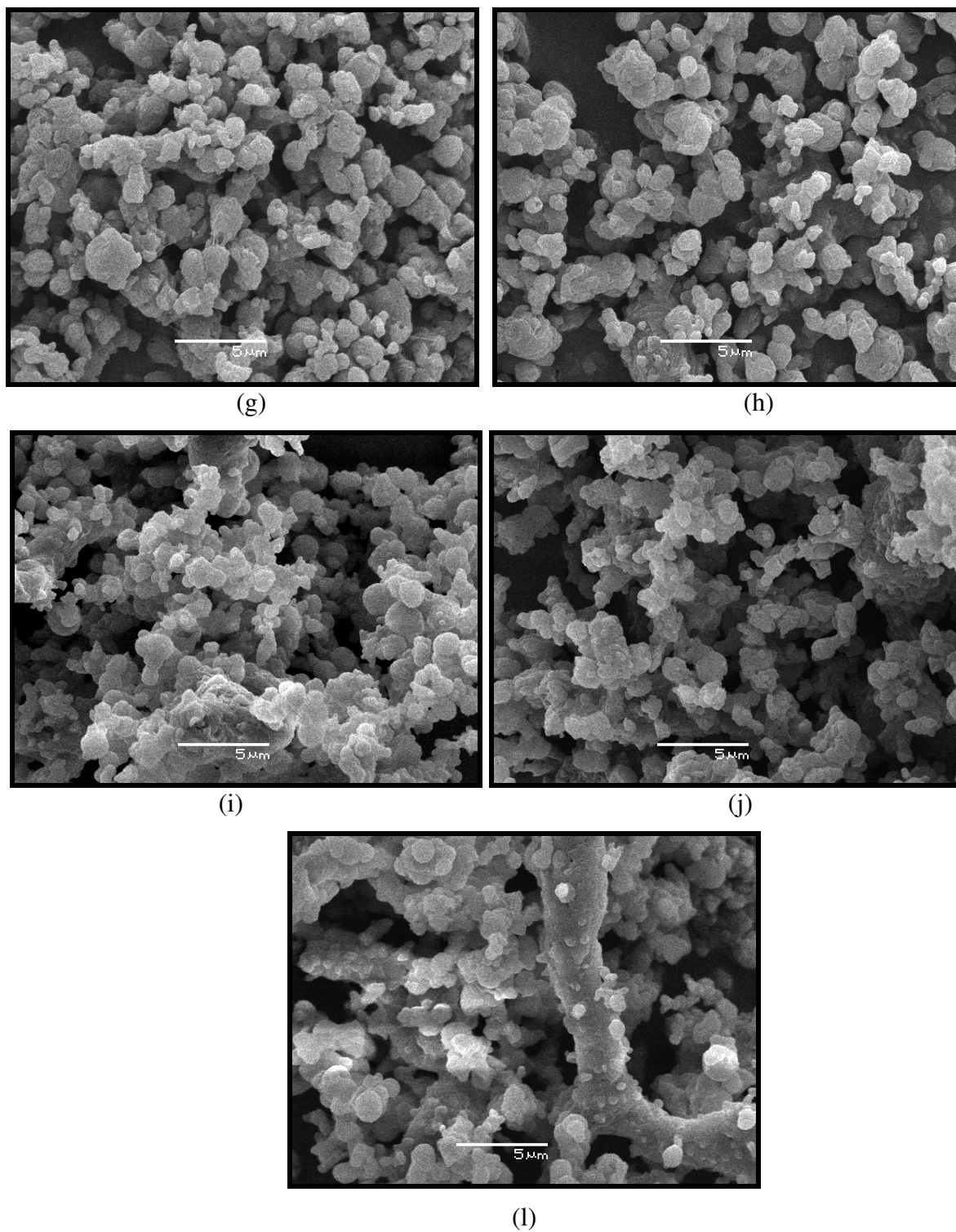


Figura 54. (Continuação). Fotomicrografias para os Experimentos (g): 7; (h): 8; (i; j e l): 9 (em triplicata). Condições experimentais vide Tabela 1, página 68.

Através da Figura 54 é possível perceber que apenas os quatro primeiros experimentos apresentaram partículas esféricas, e estes têm em comum a mesma temperatura de operação. Os outros experimentos foram conduzidos a temperaturas mais altas, as quais foram 318,15 K e 328,15 K. Desta forma, a temperatura se mostrou o parâmetro com maior influência na morfologia das partículas.

Estes resultados estão em concordância com observações feitas por Müller et al. (2000) para recristalização de compostos orgânicos, e também com os resultados obtidos por Cocero e Ferrero (2002) para a precipitação de β -caroteno, ambos os trabalhos realizados através da técnica GAS. Kalogiannis, Michailof e Panayiotou (2006) também relataram tal efeito para o encapsulamento de amoxicilina em poli ácido-l-láctico (PLLA) através da técnica SAS. Os autores atribuem a aglomeração das partículas ao fato de que em altas temperaturas os fenômenos de redissolução e coalescência das partículas formadas são favorecidos.

Esta constatação é de grande importância, tendo em vista a sensibilidade de extratos vegetais à temperatura. De tal forma, baixas temperaturas de operação não levam a degradação dos compostos termossensíveis presentes no extrato, e conseqüentemente a desejável redução do calor fornecido ao processo, diminuindo custos operacionais.

Quanto ao tamanho de partículas, o experimento 4 apresentou o menor tamanho, 0,66 μm , seguido do experimento 3 com tamanho médio igual a 0,74 μm , porém com desvios de (0,34 e 0,33) μm , respectivamente. Estas partículas apresentam tamanhos maiores que 0,1 μm e, portanto, segundo a Comissão Europeia, não podem ser consideradas nanopartículas. Os dois experimentos foram conduzidos na maior pressão estudada, 12 MPa. Comportamento semelhante foi descrito por Priamo et al. (2010), Franceschi et al. (2008b) e Chen et al. (2005), todos utilizando técnicas que empregam fluidos supercríticos como antissolvente. Nestes trabalhos, foi verificado que o aumento da pressão isotermicamente acarreta em aumento na densidade do CO_2 , levando a uma melhor dispersão da solução orgânica no antissolvente e conseqüente diminuição no tamanho das gotículas líquidas formadas.

Entre os experimentos 1 e 2, é possível avaliar o efeito da concentração de (ESU + PHBV) em diclorometano. O aumento da concentração do soluto, à pressão e à temperatura constantes, levou ao aumento do tamanho das partículas. Tal efeito foi também constatado para o encapsulamento de β -caroteno por Franceschi et al. (2008b) e por Priamo et al. (2010) utilizando o polímero PHBV e por Mattea, Martin e Cocero (2008) com o polímero PEG, nos três estudos foram utilizadas técnicas de encapsulamento baseadas em fluidos supercríticos.

Em relação ao percentual real de encapsulamento (PRE), o maior valor foi determinado para o experimento 7, porém este valor quando comparado aos demais encontrados se distancia. Este experimento foi conduzido com a maioria das condições extremas de pressão e temperatura, ou seja, 12 MPa, 328,15 K e razão extrato:polímero de 1:1, apenas a concentração de extrato foi a menor, $5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

Assim como para os ensaios iniciais de encapsulamento, o experimento 7 resultou em partículas aglomeradas, como visualizado na Figura 54g. Novamente, remete-se ao trabalho de Varona et al. (2010), onde os autores afirmaram o efeito positivo do aumento da razão óleo:polímero com a formação de aglomerados. Neste trabalho, atribui-se o aumento da porcentagem de extrato encapsulado determinado à soma de possíveis formações de maiores áreas entre os emaranhados de polímero para o acondicionamento do extrato e a incorporação de extrato ao polímero.

Observando apenas os primeiros experimentos onde ocorreu a formação de partículas esféricas desejáveis, embora a ausência de resultados para o experimento 1, nota-se que a maior porcentagem foi determinada para o experimento 2, conduzido a 8 MPa, menor pressão estudada. Desta forma, a pressão foi a variável com maior efeito para o PRE, assim como foi verificado por Varona et al. (2010). Estes autores consideram o aumento de solubilidade do extrato no antissolvente com o aumento da pressão, reduzindo a quantidade de extrato disponível para o encapsulamento e alertam para um possível fracionamento do extrato.

De fato, a adição de um *trap* de segurança na saída da câmara, após a válvula micrométrica, apontou que o fracionamento deve ser considerado, visto que em algumas condições experimentais uma leve coloração amarelada, característica do extrato de sementes de uva, foi encontrada no algodão de recheio do *trap* e também evidenciada no filtro disposto anteriormente à válvula micrométrica. Por outro lado, pode-se ponderar que parte deste extrato não tenha sido encapsulado, ficou disposto sobre as cápsulas formadas ou paredes da câmara, e tenha sido arrastado, juntamente ao diclorometano, na etapa de secagem com CO₂.

Uma observação experimental constatada foi que, pequenas quedas na temperatura do sistema levavam ao deslocamento para a região de equilíbrio Líquido-Vapor, o que pode ser vislumbrado através dos dados de equilíbrio de fases. Com a presença de duas fases na câmara de precipitação ocorreu a formação de um filme no fundo da câmara, enquanto na parte superior da parede e tampa a formação de partículas.

O intuito desta última etapa foi o estudo da aplicação do extrato como encapsulado, visto suas propriedades nutracêuticas encontradas na caracterização química e sua natural sensibilidade a condições adversas de luz, temperatura e oxigênio. Deparando-se com resultados positivos aqui encontrados, abre-se uma perspectiva para futuros trabalhos com foco no aprofundamento do estudo das variáveis do processo, tendo em vista a eficiência do encapsulamento e ainda a liberação deste extrato aplicado em um alimento.

Como comentários gerais em relação ao encapsulamento de extratos vegetais utilizando técnicas baseadas em fluidos supercríticos, embora poucos trabalhos na literatura relatem a sua aplicação, estas técnicas mostram-se promissoras (MARTÍN et al. 2010). O estudo do efeito da manipulação das variáveis de processo é de grande importância para suporte do desenvolvimento desta tecnologia aplicada à indústria de alimentos em alta escala.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Aplicaram-se nesta tese, com sucesso, técnicas baseadas em fluidos supercríticos para obtenção de extratos vegetais bem como seu acondicionamento na forma de encapsulados.

Das sementes de uva, resíduo da indústria vinícola, foi possível obter um extrato rico em compostos antioxidantes e ácidos graxos insaturados.

A secagem da matéria-prima, previamente à extração, mostrou-se uma etapa crítica, pois a extração por fluidos supercríticos utiliza pressões capazes de arrastar o conteúdo de água presente, o qual forma uma emulsão estável com o extrato e o deixa suscetível à oxidação.

Separadores em série dispostos na saída do extrator são de fácil adaptação e manuseio, possibilitando, através de manipulação da pressão de despressurização, adquirir extratos com diferentes composições. Entretanto, para escolha das condições dos separadores, faz-se necessário a posse de informações sobre o comportamento do sistema frente à diferentes temperatura e pressões.

O comportamento de fases dos sistemas de interesse à extração, Extrato de Sementes de Uva + CO₂ + Etanol em diferentes temperaturas, mostrou-se complexo, característico dos diagramas do Tipo V, com pressões de transição relativamente altas (23 MPa), apresentando uma grande sensibilidade em relação à composição e à temperatura.

O efeito da água no sistema Extrato de Sementes de Uva + CO₂ + Etanol foi evidenciado quando se tomou a decisão de sua retirada parcial, e só então, foi possível alcançar a descrição do sistema com baixas concentrações de CO₂, nas condições permitidas de operação da unidade experimental de equilíbrio de fases utilizada neste trabalho.

A equação de estado de Peng-Robinson utilizada para correlacionar os dados obtidos foi capaz de prever, de forma qualitativa, o diagrama de fases do sistema Extrato de Sementes de Uva + CO₂ + Etanol, em diferentes temperaturas.

A adição de Extrato de Sementes de Uva no sistema binário CO₂ + Diclorometano (DCM), com extrato em solução com DCM na concentração de até 15 kg·m⁻³, não exerceu influencia no comportamento de fases do sistema binário.

A técnica *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS) se mostrou eficiente para o encapsulamento de extratos em polímeros. Temperatura foi o parâmetro de operação com maior influência na morfologia das partículas, enquanto pressão foi o parâmetro considerável para o tamanho de partículas e percentual real de encapsulamento.

Entre as sugestões, a parte experimental evidencia-se:

- Para a obtenção dos dados de equilíbrio de fases a altas pressões, a mudança da técnica para o método estático analítico se mostra interessante, a fim de identificar as composições das fases em equilíbrio, fornecendo maior suporte para o equacionamento termodinâmico e cálculo dos desvios do balanço de massa;

- Descrever o equilíbrio termodinâmico através de outras equações de estado, tais como a equação *Perturbed Chain - Statistical Associating Fluid Theory* (PC-SAFT), a qual pertence a um grupo de modelos de perturbação que leva em consideração a configuração da formação das moléculas;

- Desenvolver um novo método de quantificação de extrato encapsulado através, por exemplo, de técnicas cromatográficas e/ou espectrometria de infra-vermelho próximo, as quais necessitam de pequena quantidade de amostra para realização das análises, porém são precisas, e concomitantemente analisar possível fracionamento do extrato vegetal.

CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS

ACAVITIS–Associação Catarinense dos Produtores de Vinhos Finos de Altitude. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: <<http://www.acavitis.com.br>>. Acesso em: novembro. 2012.

AHN, J.H.; KIM, Y.P.; LEE, Y.M.; SEO, E.M.; LEE, K.W.; KIM, H S. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 107, p. 98-105, 2008a.

AHN, J.H.; KIM, Y.P.; SEO, E.M.; CHOI, Y.K.; KIM, H.S. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*. v. 84, p. 327-334, 2008b.

ANTONIOSI FILHO, N. R., MENDES, O. L., LANÇAS, F. M. Computer prediction of triacilglicerol composition of vegetable oils by HRGC. *Journal of Chromatografy*, v. 40, p. 557-562, 1995.

AOCS – American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 6th ed, AOCS Press, Champaign, 2009.

ARAÚJO, O.A.S., SILVA, F.R., RAMOS, L.P., LENZI, M.K., NDIAYE, P.M., CORAZZA, M.L. Phase behaviour measurements for the system (carbon dioxide + biodiesel + ethanol) at high pressures. *J. Chem. Thermodynamics*, v. 47, p. 412-419, 2012.

ARCE, P.F. Modelagem do Equilíbrio Multifásico e de Fenômenos Críticos em Sistemas Ternários Contendo Dióxido de Carbono + Polímero + Co-Solvente Usando Equações de Estado. Tese, FEQ/UNICAMP, Campinas/SP, 2005.

ASAE – American Society of Agricultural Engineers. Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. In *American Society of Agricultural Engineers Standards S319.3*, p. 547-550, 1998.

ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T. Sequential Fractionation of Grape Seeds into Oils, Polyphenols, and Procyanidins via a Single System Employing CO₂-Based Fluids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p. 2440-2444, 2004.

AYALA-ZAVALA, J.F., SOTO-VALDEZ, H., GÓNZALEZ-LEÓN, A., ÁLVAREZ-PARRILLA, E., MARTÍN-BELLOSO, O., GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *J. Inclusion. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 60, p. 359-368, 2008.

- BARAN, E.T.; OZER, N.; HASIRCI, V. Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, p. 363-376, 2002.
- BENAZZI, T.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C. High-pressure multiphase equilibria in the system glycerol+olive oil+propane+AOT. *Fluid Phase Equilibria*, v. 244, p. 128-136, 2006.
- BENDER, J.P. Equilíbrio de Fases de Polímeros Biocompatíveis e Monômeros: Dados Experimentais e Modelagem. Dissertação, URI-Campus Erechim, Erechim/RS, 2008.
- BENDER, J.P.; FEITEIN, M.; MAZUTTI, M.A.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V. Phase behaviour of the ternary system poly (ϵ -caprolactone)+carbon dioxide+dichloromethane. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 42, p. 229-233, 2010.
- BERCHE, B., HENKEL, M., KENNA, R. Fenômenos críticos: 150 anos desde Cagniard de la Tour. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 31, p. 2602-1 – 2602-4, 2009.
- BEVERIDGE, T.H.J.; GIRARD, B.; KOPP, T.; DROVER, J.C.G. Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1799-1804, 2005.
- BORGES, G.R.; JUNGES, A.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C. High-Pressure Vapor-Liquid Equilibrium Data for Systems Involving Carbon Dioxide + Organic Solvent + β -Carotene. *J. Chem. Eng. Data*, v. 52, p. 1437-1441, 2007.
- BORTOLOMEAZZI, R., CORDARO, F., PIZZALE, L., CONTE, L.S. Presence of Phytosterol Oxides in Crude Vegetable Oils and Their Fate during Refining. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 2394-2401, 2003.
- BRUNNER, E. Fluid mixtures at high pressures III. Isothermal phase equilibria of (ethene + methanol) at 284.15 and 298.15 K. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 17, p. 985-994, 1985.
- BRUNNER, G. Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. 1ª ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, p. 387, 1994.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 21-33, 2005.
- BUCCI, D.Z.; TAVARES, L.B.B.; SELL, I. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, v. 24, p. 564-571, 2005.

- CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M.Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R.S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *J. of Supercritical Fluids*, v.34, p.163-170, 2005.
- CANZIANI, D. Comportamento de fases a alta pressão de frações pesadas do petróleo em propano e n-butano. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2008.
- CANZIANI, D.; NDIAYE, P.M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.M. Phase behaviour of heavy petroleum fractions in pure propane and n-butane and with methanol as co-solvent. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 41, p. 966-972, 2009.
- CARLSON, L.H.C.; BOLZAN, A. Size Meter, Versão 1.1. Laboratório de Controle de Processos (LCP). Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- CHARIN, R.M. Equilíbrio de Fases do DMF e NMP em Propano. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2010.
- CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, v. 26, p.6565-6578, 2005.
- CHEN, J.; DAVIS, S.S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, p. 191-201, 2002.
- CHEN, K.; ZHANG, X.; PAN, J.; YIN, W. Recrystallization of andrographolide using the supercritical fluid antisolvent process. *Journal of Crystal Growth*, v. 274, p. 226-323, 2005.
- CHOI, M.J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S.G.; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method, *Food Res. Int.*, v. 42, p. 148-156, 2009.
- CNPUV–Embrapa Uva e Vinho. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: novembro. 2012.
- COCERO M.J., FERRERO S. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch. Effect of operating conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 22, p. 237-245, 2002.
- COCERO, M.J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *J. Supercrit. Fluids*, v. 47, p.546-555, 2009.
- CORAZZA, M.L.; FILHO, L.C.; ANTUNES, O.A.C.; DARIVA, C. High Pressure Phase Equilibria of the Related Substances in the Limonene Oxidation in Supercritical CO₂. *J. Chem. Eng. Data*, v. 48, p.354-358, 2003.

CPATSA–Embrapa Semi-Árido. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: <<http://www.cpatssa.embrapa.br>>. Acesso em: abr. 2012.

DARIVA, C. Equilíbrio de Fases a Altas Pressões em Sistemas contendo Polipropilenos. Dados Experimentais e Modelagem SAFT. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro/RJ, 2000.

DE CAMPOS, L.M.A.S. Obtenção de extratos de bagaço de uva cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2005.

DE GREYT, W.; KELLENS, M., Deodorization. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6 ed., v. 5, New Jersey: John Wiley & Sons, p. 341-383, 2005.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, v. 23, p.1361-1394, 2005.

DIPPR - The Design Institute for Physical Properties. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível na Internet: <http://www.dippr.byu.edu/students>. Acesso em outubro de 2012.

ESMELINDRO, M.C.; FRANCESCHI, E.; ANTUNES, O.A.C.; BORGES, G.R.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; LINHARES, W.; DARIVA, C. Phase Behavior of the Reactant and Products of Cyclohexane Oxidation in Compressed CO₂. *J. Chem. Eng. Data*, v. 53, p. 2050-2055, 2008.

ESPINOSA S.N. Procesamiento Supercrítico de Productos Naturales. Modelado análisis y optimización. Tesis, Universidad Nacional del Sur, Planta Piloto de Ingeniería Química, Bahía Blanca/Argentina 2001.

European Commission- EC. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível na Internet: <http://ec.europa.eu/environment>. Acesso em novembro de 2012.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em: nov. 2012.

FERNANDES, J.B., DAVID, V., FACCHINI, DA SILVA, P.H.F.G.F., RODRIGUES FILHO, E., VIEIRA, P.C. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Quim. Nova*, v. 25, p. 1091-1095, 2002.

FIORI, L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 43, p. 43-54, 2007.

FRANCESCHI, E. Precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2009.

FRANCESCHI, E.; De CESARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. *Journal of Food Engineering*, v.95, p. 656-663, 2009.

FRANCESCHI, E.; De CESARO, A.M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S.R.S.; DARIVA, C.; KUNITA, M.H.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*, v. 47, p. 259-269, 2008b.

FRANCESCHI, E.; GRINGS, M.B.; FRIZZO, C.D.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C. Phase behavior of lemon and bergamot peel oils in supercritical CO₂. *Fluid Phase Equilib.*, v. 226, p. 1-8, 2004.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M.H.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C. Phase Behavior of Binary and Ternary Systems Involving Carbon Dioxide, Propane, and Glycidyl Methacrylate at High Pressure. *J. Chem. Eng. Data*, v. 51, p. 686-690, 2006.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M.H.; TRES, M.V.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; CORAZZA, M.L.; DARIVA, C.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids*, v. 44, p. 8-20, 2008a.

FREITAS, L.S. Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Porto Alegre/RS, 2007.

FREITAS, L.S.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B. Extraction of Grape Seed Oil Using Compressed Carbon Dioxide and Propane: Extraction Yields and Characterization of Free Glycerol Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 2558-2564, 2008.

GAMSE, T. Liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction. *Institute of Thermal Process and Environmental Engineering, Graz University of Technology*. p.80, 2002.

GÓMEZ, A.M., LÓPEZ, C.P., de la OSSA, E.M. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction, *Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, v. 61, p. 227-231, 1996.

GONÇALVES, C. B.; MEIRELLES, A. J. A. Liquid-Liquid Equilibrium Data for the System Palm Oil + Fatty Acids + Ethanol + Water at 318.2 K. *Fluid Phase Equilibria*, v. 221, p. 139-150, 2004.

GRINGS, M.B. Estudo do comportamento de fases dos óleos essenciais de limão Taiti e bergamota em CO₂ supercrítico. Dissertação, URI-Campus Erechim, Erechim/RS, 2004.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Lipids. *Laboratory Practice*. London, v. 22, p. 475-476, 1973.

HATZIDIMITRIOU, E., NENADIS, N., TSIMIDOU, M.Z. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1504-1511, 2007.

HUANG S.H., RADOSZ M., Equation of state for small, large, polydisperse, and associating molecules, *Ind. Chem. Eng. Res.*, v. 29, p. 2284, 1990.

HUANG S.H., RADOSZ M., Equation of state for small, large, polydisperse, and associating molecules: extension to fluid mixtures, *Ind. Chem. Eng. Res.*, v. 30, p. 1994-2005, 1991.

HUSSAIN, M.R.; MAJI, T.K. Preparation of genipin cross-linked chitosan-gelatin microcapsules for encapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) using salting-out method, *J. Microencapsulation*, v. 25, p. 414-420, 2008.

IBGE–Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: < www.ibge.gov.br >. Acesso em: novembro 2012.

IBRAVIN–Instituto Brasileiro do Vinho. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: < <http://www.ibravin.org.br> >. Acesso em: novembro 2012.

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry, PAQUOT, C. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6.ed. Oxford: Pergamon Press, p.170, 1979.

JACOBS, M.B. Determination of moisture, in: *The Chemical Analysis of Food and Products*. 3th ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 22-23, 1973.

JOHNSON, H. A história do vinho. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.

KAISERSBERGER, E. Application of heat-flux DSC for the characterisation of edible fats and oils. *Analytical Proceedings*, v. 27, p. 64-65, 1990.

KALOGIANNIS, C.G.; MICHAILOF, C.M.; PANAYIOTOU, C.G. Microencapsulation of amoxicillin in poly(L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 45, p. 8738-8743, 2006.

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNICA JÚNIOR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 631-638, 2007.

KLAYPRADIT, W., HUANG, Y.W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT (Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie)-Food Science and Technology*, v. 41, p. 1133-1139, 2008.

KLINKESORN, U., MCCLEMENTS, D.J. Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, v. 114, p. 1308-1315, 2009.

KOLANOWSKI, W., LAUFENBERG, G., KUNZ, B. Fish oil stabilization by microencapsulation with modified cellulose. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 55, p. 333-343, 2009.

LANÇAS, F.M. Fluidos Supercríticos. Desenvolvimento de instrumentação para fluidos supercríticos - uma experiência brasileira bem sucedida. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 16, p. 12-15, 2000.

LANZA, M. Comportamento de Fases dos Óleos de Oliva, Soja e Mamona em n-Butano e Propano a Alta Pressão. Dissertação, URI-Campus de Erechim, Erechim/RS, 2004.

LEE, W.Y.; CHO, Y.J.; OH, S.L.; PARK, J.H.; CHA, W.S.; JUNG, J.Y.; CHOI, Y.H. Extraction of grape seed by supercritical CO₂ and ethanol modifier. *Food Science Biotechnology*, v. 9, p. 174-178, 2000.

LEIMANN, F.V., GONÇALVES, O.H., MACHADO, R.A.F., BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 2, pp. 430-436, 2009.

MALTINI, E.; TORREGGIANI, D.; VENIR, E.; BERTOLO, G. Water activity and the preservation of plant foods. *Food Chemistry*, v. 82, n.1, p.79-86, 2003.

MARTÍN, Á., COCERO, M.J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 339-350, 2008a.

MARTÍN, Á., COCERO, M.J. Precipitation processes with supercritical fluids: patents review. *Recent Patents Eng.*, v. 2, p. 9-20, 2008b.

MARTÍN, Á., VARONA, S., NAVARRETE, A., COCERO, M.J. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chem. Eng. J.*, v. 4, p. 31-41, 2010.

MATTEA, F., MARTIN, M., COCERO, M.J. Co-recipitation of β -carotene and polyethylene glycol with compressed CO₂ as an antisolvent: effect of temperature and concentration. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 47, p. 3900-3906, 2008.

MCHUGH, M. A., KRUKONIS, V. J. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, 2^a ed., Butterworth-Heinneman, 1994.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 7, p. 321-330, 2003.

MICHIELIN, E.M.Z.; ROSSO, S.R.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G.R.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; FERREIRA, S.R.S. High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 41, p. 130-137, 2009.

MÜLLER, M., MEIER, U., KESSLER, A., MAZZOTTI, M. Experimental study of the effect of process parameters in the recrystallization of an organic compound using compressed carbon dioxide as antisolvent, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 39, p. 2260-2268, 2000.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *J. Agric. Food Chem.* v. 48, p. 3408-3412, 2000.

MURGA, R.; SANZ, M. T.; BETLTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, v. 23, p. 113-121, 2002.

NDIAYE, P.M. Equilíbrio de Fases de Óleos Vegetais e de Biodiesel em CO₂, Propano e n-Butano. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro/RJ, 2004.

NDIAYE, P.M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F.W.; OLIVEIRA, J.V. Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures. *J. Supercrit. Fluids*, v. 37, p. 29-37, 2006.

OMAR, K.A., SHAN, L., ZOU, X., SONG, Z., WANG, X. Effects of two emulsifiers on yield and storage of flax oil powder by response surface methodology. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, p. 1316-1324, 2009.

- PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., MOURE, A. DÍAZ-REINOSO, B. Obtaining Antioxidants by Supercritical Fluid Extraction. In: M. A. A. Meireles (Ed.). Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Boca Raton: CRC Press, p. 288, 2009.
- PASSOS, C.P.; SILVA, R.M.; DA SILVA, F.A.; COIMBRA, M.A.; SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal*, v. 160, p. 634-640, 2010.
- PASSOS, C.P., YILMAZ, S., SILVA, C.M., COIMBRA, M.A. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail, *Food Chemistry*, v. 115, p. 48-53, 2009.
- PAVIANI, L. C., SAITO, E., DARIVA, C., MARCUCCI, M.C., SÁNCHEZ-CAMARGO, A.P., CABRAL, F.A. Supercritical CO₂ Extraction of Raw Propolis and its Dry Ethanolic Extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, p. 243-251, 2012.
- PENG S.Y., ROBINSON D.B. A new two constant equation of state. *Ind. Eng. Chem. Fund.*, v. 8, p. 59-64, 1976.
- PRADO, J. M. Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leiteo fixo. Campinas, Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2010.
- PRAUSNITZ J.M., LICHTENTHALER R.N., de AZEVEDO E.G. *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 3rd Ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, N. J., 1999.
- PRESS, W. H.; FLANNERY, B. P.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T. *Numerical Recipes in FORTRAN: The Art of Scientific Computing*, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge, England, 1992.
- PRIAMO, W.L. Encapsulamento de β -caroteno em PHBV com dióxido de carbono e avaliação da liberação in vitro. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2011.
- PRIAMO, W.L.; de CEZARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids*, v. 54, p. 103-109, 2010.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006.

REVERCHON, E., MARRONE, C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 161–175, 2001.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 146-166, 2006.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, v. 16, p.1195-1236, 1998.

RODRIGUES, M., PEIRIÇO, N., MATOS, H., GOMES DE AZEVEDO, E., LOBATO, M.R., ALMEIDA, A.J. Microcomposites theophylline/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems. *J. of Supercritical Fluids*, v. 29, p.175-184, 2004.

RODRIGUEZ-REARTES, S.B.; CISMONTI, M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; ZABALOY, M.S. High-pressure phase equilibria of systems carbon dioxide+n-eicosane and propane+n-eicosane. *J. Supercrit. Fluids*, v. 50, p. 193-202, 2009.

ROWLINSON J.S.; SWINTON F.L. *Liquids and liquid mixtures*, 3 ed., Butterworths, London, 1982.

ROSA, P. T. V., MEIRELES, M. A. A. Fundamentals of Supercritical Extraction from Solid Matrices. In: M. A. A. Meireles (Ed.). *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*. Boca Raton: CRC Press, p. 272, 2009.

ROSSO, S.R. Aproveitamento do Resíduo da Agroindústria da Banana: Caracterização Química e Levantamento de Parâmetros Termodinâmicos. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2009.

ROSSO, S.R., FRANCESCHI, E., BORGES, G.R., CORAZZA, M.L., OLIVEIRA, J.V., FERREIRA, S.R.S. Phase equilibrium measurements of ternary systems formed by linoleic and linolenic acids in carbon dioxide/ethanol mixtures. *J. Chem. Thermodynamics*, v. 41, p. 1254-1258, 2009.

ROSSO COMIM, S.R.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G.R.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; FERREIRA, S.R.S. Phase equilibrium measurements and modelling of ternary system (carbon dioxide+ethanol+palmitic acid). *J. Chem. Thermodyn.*, v. 42, p. 348-354, 2010a.

ROSSO COMIM, S.R., MADELLA, K., OLIVEIRA, J.V., FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa* spp., genomic group AAB): Extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria. *J. of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 30-37, 2010b.

SANDLER, S. I. Chemical and Engineering Thermodynamics. 4^a ed. New York, EUA: John Wiley & Sons, 2006.

SANTOS, D.N. Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia iniflora* L.). Dissertação, USP, Pirassununga/SP, 2012.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. Biotec. Ciência e Desenv., v. 16, p. 26-390, 2000.

SARRAZIN, C., LE QUÉRE, L.L., GRETSCH, C., LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: A comparison of different extraction methods. Food Chemistry, v. 70, p.99-106, 2000.

SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oils and Fat Products. 6^aed., New York: John Wiley & Sons, p. 465-490, 2005.

SILVA, L. H. M., COIMBRA, J. S. R., MEIRELLES, A. J. A. Equilibrium Phase Behavior of Poly(ethylene glycol) + Potassium Phosphate + Water Two Phase Systems at Various pH and Temperatures. Journal Chemical Engineering Data, v. 42, p. 398-401, 1997.

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

SOUSA, E. M. B. D., CHIAVONE-FILHO, O., MORENO, M. T., SILVA D. N., MARQUES, M. O. M., MEIRELES, M. A. A. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. using pressurized carbon dioxide. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 19, p. 229-241, 2002.

STUART, G.R.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. High-pressure vapor-liquid equilibrium data for CO₂-orange peel oil. Brazilian J. Chem. Eng., v. 17, p. 181-189, 2000.

THOMSON G.H., BROBST K.R., HANKINSON R.W. A improved correlation for density of compressed liquids and liquids mixtures, AIChE Journal, v. 28, p. 671-676, 1982.

TOCHIGI, K.; IIZUMI, T.; SEKIKAWA, H.; KURIHARA, K.; KOJIMA, K. High-Pressure Vapor-Liquid and Solid-Gas Equilibria Using a Peng-Robinson Group Contribution Method. Industrial & Engineering Chemistry Research, v 37, p 3731-3740, 1998.

TONON, R.V. Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2009.

TRÊS, M.V., FRANCESCHI, E., BORGES, G.R., DARIVA, C., CORAZZA, F.C., OLIVEIRA, J.V., CORAZZA, M.L. Influência da temperatura na solubilidade de β -caroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 737-743, 2007.

VALDUGA, V. O processo de desenvolvimento do enoturismo no Vale dos Vinhedos. Dissertação Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS, 2007.

VAN KONYNENBURG, P.H., SCOTT, R.L. Critical lines and phase equilibria in binary van der Waals mixtures. *Philos. Trans. Roy. Soc. London A*, v. 298, p. 495-540, 1980.

VARONA, S.; KARETH, S.; MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 369-377, 2010.

WANG J.L., WU G.W., SADUS R.J. Closed-loop liquid-liquid equilibria and the global phase behaviour of binary mixtures involving hard-sphere + van der Waals interactions. *Mol. Phys.*, v. 98, p. 715-723, 2000.

YELASH, L.V., KRASKA T. Closed-loops of liquid-liquid immiscibility in binary mixtures of equal sized molecules predicted with a simple theoretical equation of state. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, v. 102, p. 213-223, 1998.

YEO, S.D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *J. Supercrit. Fluids*, v. 34, p. 287-308, 2005.

ZECK, S., KNAPP, H. Vapor - liquid and vapor - liquid - liquid phase equilibria of binary and ternary systems of nitrogen, ethene and methanol: Experiment and data evaluation. *Fluid Phase Equilib.*, v. 26, p. 37-58, 1986.

APÊNDICES

APÊNDICE I. Dados de solubilidade do Extrato de Sementes de Uva em solventes orgânicos

São apresentados na Tabela A 1 os dados de solubilidade do Extrato de Sementes de Uva, obtido a partir do **Lote 1**, em solventes orgânicos, a pressão ambiente, para temperaturas entre (288,15 e 318,15) K.

Tabela A 1. Solubilidade de Extrato de Sementes de Uva obtido a partir do **Lote 1** em solventes orgânicos.

Solvente	Temperatura	Solubilidade (kg·m ⁻³)	Desvio Padrão (kg·m ⁻³)
Diclorometano	293,15	17,45	0,29
	298,15	17,67	0,01
	303,15	20,39	0,03
	308,15	22,21	0,26
Etanol anidro	288,15	3,74	0,10
	298,15	4,65	0,04
	308,15	7,07	0,04
	318,15	9,43	0,01

APÊNDICE II. *Construção da curva padrão de calibração em espectrofotômetro de UV-visível*

A quantificação do Extrato de Sementes de Uva (ESU) encapsulado foi realizada através de espectrofotometria de UV-visível. Para tanto, foram construídas duas curvas padrão relacionando a concentração de ESU na solução orgânica com a absorbância a 410 nm. Tal comprimento de onda foi escolhido após ser verificado que neste comprimento de onda ocorre a absorbância máxima do ESU, com base nos espectros de absorbância obtidos experimentalmente para o ESU e para a mistura ESU e o polímero poli-(hidroxibutirato-cohidroxivalerato) (PHBV).

Encontram-se na Tabela A 2 as concentrações e absorbâncias média (obtida por triplicatas de medidas) em espectrofotômetro de UV-visível do ESU e da mistura (ESU + PHBV), em diclorometano.

Tabela A 2. Valores de concentração de ESU e da mistura (ESU + PHBV) em diclorometano e absorbância em espectro de UV-Visível a 410 nm, utilizados para a construção da curva de calibração.

ESU		ESU + PHBV	
Absorbância (410 nm)	kg·m ⁻³	Absorbância (410 nm)	kg·m ⁻³
0,01	4,43	0,025	4,27
0,03	6,31	0,047	6,01
0,049	8,22	0,075	8,19
0,072	10,32	0,098	10,28
0,086	12,02	0,121	12,1
0,115	14,08	0,152	14,21
0,141	16,38	0,175	16,42
0,157	18,07		

Os resultados da tabela acima estão dispostos n diagrama apresentado na Figura A 1, onde se evidencia a diferença considerável entre os valores de absorbância do extrato de

sementes de uva em diclorometano e os valores da mistura (ESU + PHBV) em diclorometano.

Dada esta diferença, ocasionada pela adição do polímero, foi adotada a curva padrão que relaciona a concentração da mistura em diclorometano com sua absorvância em 410 nm. Portanto, a concentração de extrato em cada uma das amostras dos experimentos de encapsulamento foi determinada pela equação da reta que representa os dados experimentais de concentração de (ESU + PHBV) em diclorometano em função de sua absorvância, ou seja, **concentração = 80,327·absorvância + 2,2591**, a qual apresentou bom ajuste através do coeficiente de correlação linear (R^2) próximo a um.

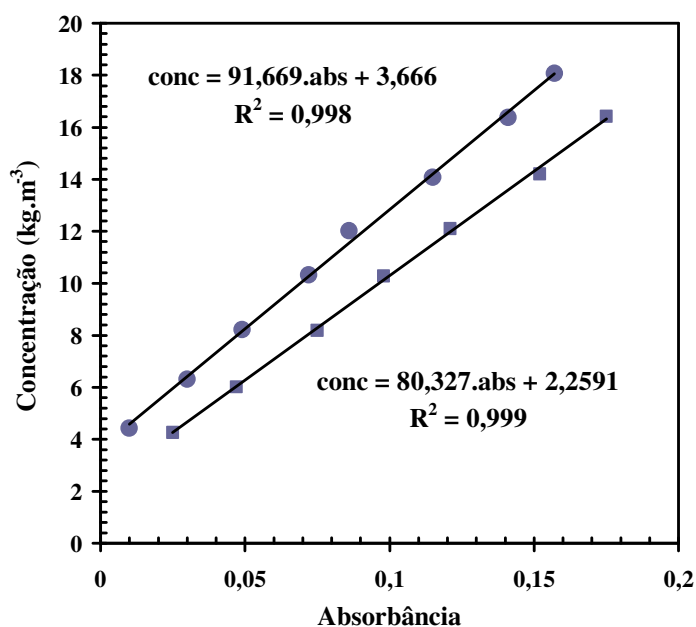


Figura A 1. Curva padrão de absorvância do Extrato de Sementes de Uva (●) e da mistura Extrato de Sementes de Uva + PHBV (■), em 410 nm, em função da concentração em Diclorometano.

APÊNDICE III. Construção e interpretação de diagramas isotérmicos a altas pressões

Para a construção dos diagramas isotérmicos, com o procedimento experimental explanado na seção 4.9 (Determinação do equilíbrio de fases a altas pressões, página 51):

1. Inicia-se com a escolha da composição global da mistura, representada no diagrama da Figura A2 como w_1 ;
 - 1.1 As quantidades precisas das substâncias puras da mistura são introduzidas na célula de equilíbrio (pressão ambiente);
 - 1.2 Com a célula fechada, o fundo da célula isolado, e agitação constante, submete-se o sistema à temperatura mais baixa escolhida para o experimento.
2. Estabilizada a temperatura desejada, abre-se a válvula que isola o fundo, liberando a passagem do fluido de pressurização, e com auxílio da bomba seringa, aplica-se pressão na parte de trás do pistão, lentamente, até a observação de uma única fase (líquida) do sistema, representada na Figura A2 por .
3. Vagarosamente, a pressão foi reduzida (0,3 a 0,5 MPa/60 s) até a ocorrência de transição de fases, ou seja, dada uma temperatura, a pressão de transição era determinada. No entanto, deve-se considerar que:
 - 3.1 Em todas as observações de transições do tipo *cloud point*, denotadas Figura A2 por , deve-se induzir o sistema a uma leve queda de pressão para se verificar à qual tipo de transição corresponde, como explanada na Figura 22 (página 56);
 - 3.1.1 Na observação de duas fases líquidas, região de imiscibilidade Líquido-Líquido (LL), como nas composições globais

representadas por w_1 , w_4 e w_5 , na Figura A2, deve-se continuar reduzindo a pressão do sistema (0,3 a 0,5 MPa/60 s) até a ocorrência de transição de fases Líquido-Líquido-Vapor (LLV), representada na Figura A2 por $\odot$;

3.1.2 Ou cessar ao constatar a transição Líquido-Vapor Ponto de Orvalho (LV-PO), como na composição global representada por w_3 , e no diagrama por $\odot$.

3.2 Visualizada a formação da primeira bolha, tem-se a transição Líquido-Vapor Ponto de Bolha, representada na Figura A2 pela composição global w_2 , e simbolizada por $\odot$.

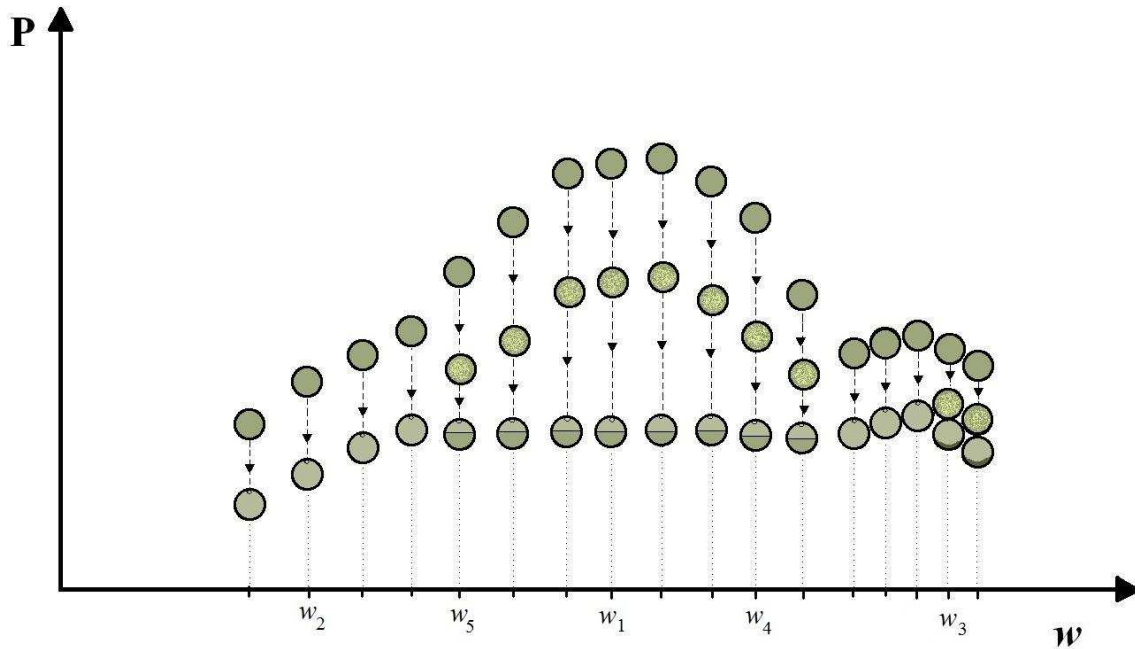


Figura A 2. Construção do diagrama P versus w através do método estático sintético, por meio de visualizações das transições de fases. Única fase líquida: $\odot$; *cloud point*: $\odot$; Líquido-Líquido-Vapor: $\odot$; Líquido-Vapor Ponto de Bolha: $\odot$ e Líquido-Vapor Ponto de Orvalho: $\odot$.

4. Com esta mesma composição, submete-se o sistema a uma nova temperatura, mais alta, escolhida para a determinação de transições de fases. Repete-se, então, os procedimentos explanados nos itens 2 e 3 acima. E assim, para cada temperatura de estudo.

Após a determinação da pressão de transição para várias composições globais escolhidas, tantas quantas forem necessárias para descrever o sistema, unem-se as transições para a formação das curvas de transição, delimitando as regiões de imiscibilidade Líquido-Líquido (LL) ou Líquido-Vapor (LV), como apresentado na Figura A3.

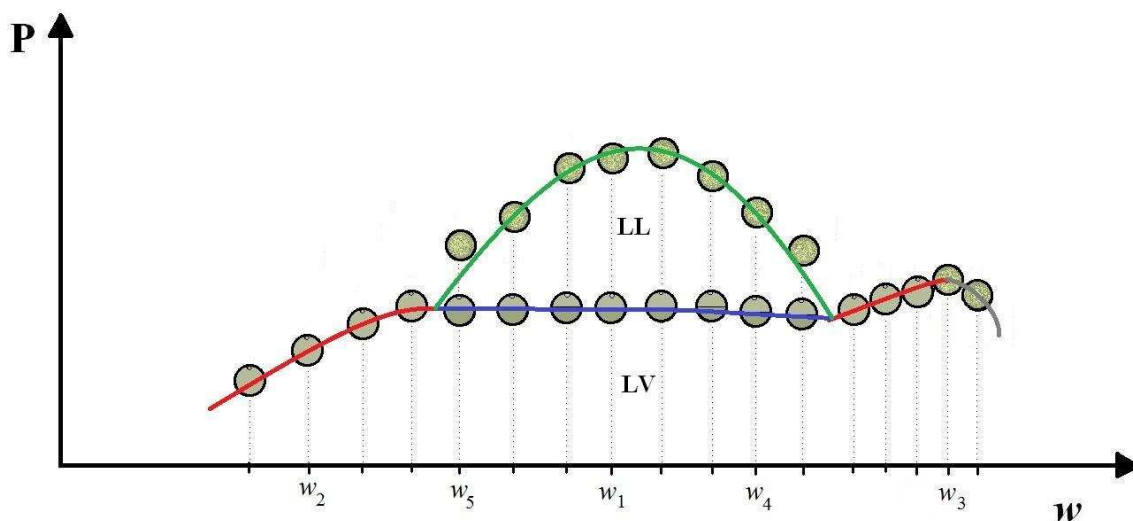


Figura A 3. União dos pontos de pressão de transição correspondentes às composições determinadas para a construção das curvas de transição, —: Líquido-Vapor Ponto de Bolha; —: Líquido-Vapor Ponto de Orvalho; —: Líquido-Líquido e —: Líquido-Líquido-Vapor. Regiões bifásicas, LL: Líquido-Líquido e LV: Líquido-Vapor.

Como neste trabalho, com os componentes dos sistemas estudados, transições com ocorrência de fases sólidas não foram observadas, optou-se por não expená-las aqui, e focar apenas nas transições entre as fases líquida e vapor.

