



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA



# **Estudo da extração de carotenoides da casca de maracujá assistida por ultrassom**

*Autor: Patrícia Kuklinski da Silva*

*Orientador: Ligia Damasceno Ferreira Marczak*

*Co-orientadores: Cibele Freitas de Oliveira e Naira Poerner Rodrigues*

Porto Alegre, dezembro de 15

## Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica	3
2.1 Maracujá e suas características	3
2.1.1 A casca do maracujá	5
2.2 Carotenoides	6
2.2.1 Classificação e estrutura molecular	7
2.2.2 Propriedades e importância para a saúde humana	8
2.2.3 Aplicações e produção	9
2.3 Extração convencional de carotenoides	11
2.3.1 Fundamentos e aspectos gerais da extração	11
2.3.2 Extração de carotenoides	12
2.4 Uso de tecnologias emergentes na extração - Ultrassom	13
2.4.1 Modos de operação e tipos de ultrassom	14
3 Materiais e Métodos	16
3.1 Obtenção da farinha da casca do maracujá	16
3.2 Extração de carotenóides da casca do maracujá	17
3.2.1 Determinação do número de extrações exaustivas	17
3.2.2 Extração exaustiva com e sem saponificação	17
3.2.3 Extração saponificada assistida por ultrassom	18
3.3 Quantificação de carotenoides totais	19
3.4 Análise estatística	19
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Determinação do número de extrações exaustivas	20
4.2 Teor de carotenoides totais	20
4.2.1 Extração exaustiva com e sem saponificação	20
4.2.2 Extração assistida por ultrassom	22
4.2.2.1 Extração com acetona	22
4.2.2.2 Extração com etanol	23
4.2.2.3 Discussão dos resultados	24
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	27
6 Referências	28

## **Agradecimentos**

À minha mãe, Rosângela, por todo o apoio, amor e carinho incondicionais sempre dedicados a mim. Alguém cuja simples presença no cômodo ao lado, durante as horas de escrita deste trabalho, conseguiu acalmar o meu coração. Também ao meu pai, Gemelson, que acompanha as minhas conquistas e sempre acreditou no meu sucesso.

Ao meu namorado e melhor amigo Eduardo, pela absoluta parceria, cumplicidade, amor e carinho mesmo nos momentos em que eu talvez não merecesse, por sempre acreditar em mim e ser o meu maior incentivador nos percalços deste trabalho e durante boa parte desta graduação.

Aos meus amigos queridos da UFRGS, colegas 2010/1, por trilharem comigo os árduos passos dessa formação, por todos os momentos de descontração e angústias compartilhadas durante os seis anos de curso. Em especial às que se tornaram minhas irmãs, Carolina e Paola, por cada desafio e conquista divididos, pela cumplicidade nos momentos de desespero, inclusive durante a elaboração deste trabalho, por estarem comigo do início ao fim: obrigada por terem tornado essa jornada mais feliz.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ligia Damasceno Ferreira Marczak, dedico a minha profunda admiração, que data de tempos anteriores à orientação deste trabalho, pela professora e ser humano que é. Pelos ensinamentos, paciência, compreensão e palavras de incentivo nos momentos em que eu estava perdida, o meu sincero obrigada.

Às minhas co-orientadoras e pesquisadoras pós-doutorado Cibele Freitas de Oliveira e Naira Poerner Rodrigues, pela dedicação e conselhos ao longo deste trabalho, mas especialmente pela orientação na etapa inicial de experimentos e pelas correções na escrita.

Aos bolsistas de iniciação científica do LATEPA, Luiza Spolidoro e Paulo Watanabe, registro a minha imensa gratidão pela companhia, esmero e paciência durante as horas de experimentos no laboratório.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo empenho em continuar fazendo deste um dos melhores cursos de engenharia química do Brasil.

## Resumo

O maracujá é um dos mais importantes frutos da economia brasileira, gerando renda em inúmeros municípios e destacando-se pelo forte apelo social, por ser uma cultura que requer uso intensivo de mão de obra. O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) é a espécie mais cultivada no Brasil e a maior importância econômica desse fruto está no produto industrializado sob a forma de sucos concentrados. As cascas e sementes do maracujá, resíduos do processo de corte e extração no processamento da fruta para obtenção de suco, são ainda, em grande parte, descartadas sem um destino apropriado. Como esses resíduos representam inúmeras toneladas de desperdício, agregar valor a esses subprodutos adquire relevância econômica, ambiental e tecnológica. Além disso, a casca do maracujá, que compreende em torno de 60% do peso total do fruto, possui significativas quantidades de compostos bioativos, que podem se tornar aditivos na indústria alimentícia devido a suas propriedades funcionais. Nesse contexto, destaca-se o interesse pelos carotenoides, compostos bioativos encontrados na casca do maracujá, muito conhecidos por suas propriedades corantes, que conferem diferentes colorações a muitas espécies vegetais, mas também por sua ação antioxidante e atividade pró-vitamina A. O objetivo do presente trabalho foi extrair os carotenoides da casca de maracujá, através da extração assistida por ultrassom, uma tecnologia emergente que vem sendo investigada por diversos pesquisadores, visando, principalmente, uma maior eficiência na extração. Além de estudar o comportamento do ultrassom, também foi avaliada a importância da etapa de saponificação na extração de carotenoides e a relevância da extração exaustiva, que é baseada na maceração, frente à convencional. As amostras resultantes das extrações exaustiva, convencional e assistida por ultrassom foram analisadas em espectrofotômetro, para posterior cálculo do teor de carotenoides totais a partir do valor de absorbância lido no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados mostraram que a extração exaustiva pode ser substituída pela extração convencional, pois não houve diferença estatística entre os dois métodos, gerando economia de tempo e financeira. Foi constatado que, nas condições testadas, a técnica de ultrassom não melhora a eficiência da extração. Com base nos dados obtidos, sugere-se que outras condições de tratamento do ultrassom sejam testadas, a fim de investigar possíveis condições que o tornem eficiente na extração de carotenoides da casca do maracujá.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura morfológica do maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> ).....	3
<b>Figura 2.</b> Estruturas moleculares de diferentes carotenoides. (Retirado de <i>Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos, 2008</i> ).....	8
<b>Figura 3.</b> Diferentes tipos de ultrassom. a) Ultrassom tipo banho; b) Ultrassom tipo sonda.....	15
<b>Figura 4.</b> Fluxograma de obtenção da farinha da casca do maracujá.....	16
<b>Figura 5.</b> Solução de carotenoides após concentração em evaporador rotativo.....	18
<b>Figura 6.</b> Solução de carotenoides diluídos em éter de petróleo em balão volumétrico de 10 mL.....	18
<b>Figura 7.</b> Comparação entre os resíduos acetônicos de cada extração.....	20
<b>Figura 8.</b> Espectros de absorção referentes às extrações exaustivas com e sem saponificação.....	21
<b>Figura 9.</b> Espectros de absorção referentes às extrações controle e assistida por ultrassom utilizando acetona como solvente.....	23
<b>Figura 10.</b> Espectros de absorção referentes às extrações controle e assistida por ultrassom utilizando etanol como solvente.....	23
<b>Figura 11.</b> Teores de carotenoides totais para extrações controle e assistida por ultrassom utilizando acetona e etanol.....	26

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Áreas destinada à colheita e colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes de maracujá das Grandes Regiões produtoras no Brasil no ano de 2012.....4

**Tabela 2.** Composição centesimal da farinha da casca do maracujá (g 100g<sup>-1</sup>, base seca) obtida por Cazarin et. al (2014).....6

**Tabela 3.** Teores de carotenoides totais das extrações realizadas.....24

---

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

**ANOVA** – Análise de Variância, *do inglês*, Analysis of Variance

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**FDA** – *American* Food and Drug Administration

**GRAS** - *do inglês*, Generally Recognized As Safe

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**LATEPA** – Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos

**UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## 1 Introdução

Em razão do crescente interesse dos consumidores por produtos de alto valor nutritivo, também referidos como alimentos funcionais, o mercado consumidor de frutas é uma tendência mundial. Estima-se que a produção mundial de frutas tenha alcançado a marca de 540 milhões de toneladas, sendo que o Brasil é o terceiro maior produtor do mundo, somente atrás da China e da Índia (EMBRAPA CERRADOS, 2005).

Das frutas processadas no Brasil, o maracujá-azedo ou amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) se destaca pela enorme importância econômica sob a forma de suco concentrado, tendo quase 40% de sua produção direcionada à indústria de sucos (SILVA *et al.*, 2014). Além de ser um dos maiores centros de diversidade do maracujá no mundo, o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, tendo alcançado uma produção de mais de 700 mil toneladas no ano de 2012 (IBGE, 2013). Ainda, o agronegócio do maracujá no país representa uma excelente oportunidade para a agricultura familiar que, com apenas R\$ 12.000,00 de investimentos, pode gerar 250 mil empregos por até dois anos (LIMA, 2001).

Embora importante sócio e economicamente, o grande volume de processamento de frutas no Brasil contribui para um incremento na geração de resíduos, como as sementes e cascas dos frutos, originados no processamento da matéria-prima. Isso vem se tornando cada vez mais um problema ambiental, além de aumentar os custos operacionais das indústrias. No caso do maracujá, como a quantidade de resíduos gerada é bastante expressiva, podendo chegar a valores entre 65 e 70% do peso total do fruto (OLIVEIRA *et al.*, 2002), é de grande valia que soluções adequadas de reaproveitamento desses subprodutos sejam encontradas. Ainda que parte desses já seja destinada à alimentação animal, recentemente outras rotas de aproveitamento de resíduos têm sido propostas por pesquisadores, no sentido de, mais do que descartá-los de forma apropriada, convertê-los em produtos de valor agregado.

Nesse contexto, destaca-se o fato de que os coprodutos de frutas tropicais contêm elevados níveis de compostos bioativos (como carotenoides, alcaloides, compostos fenólicos e fibras alimentares) que podem funcionar como ingredientes a serem adicionados em produtos da indústria alimentícia, contribuindo para a produção de alimentos mais funcionais e, conseqüentemente, na promoção da saúde humana (LÓPEZ-VARGAS *et al.*, 2013).

Dentre os compostos bioativos presentes na casca do maracujá, destacam-se os carotenoides, que estão entre os constituintes alimentícios mais importantes na alimentação humana, por atuarem como antioxidantes e possuírem atividade pró-vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008). Esses são pigmentos muito difundidos na natureza, presentes em uma enorme variedade de folhas, frutos e flores e responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de muitas espécies vegetais. Devido a suas propriedades corantes, a seus efeitos benéficos à saúde humana e à tendência na indústria alimentícia em reduzir a utilização de corantes sintéticos, substituindo-os por pigmentos naturais, os carotenoides têm sido um recorrente objeto de estudo.

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas no âmbito da extração de carotenoides de coprodutos vegetais, com o intuito de tornar o processo mais eficiente. Por ser bastante

dispendiosa em termos de tempo e quantidade de solvente empregada, diversas tecnologias emergentes de extração vêm sendo testadas por pesquisadores, visando à redução do tempo de processo, ao uso de menores quantidades de solventes orgânicos, além de uma maior eficiência de extração, reduzindo, assim, o impacto ambiental e os custos de processo.

Dentre as tecnologias alternativas para a extração de compostos presentes em tecidos vegetais, destaca-se o ultrassom, por se tratar de uma técnica segura, de simples operação e economicamente acessível. Estudos têm atribuído a eficiência do ultrassom na extração ao fenômeno da cavitação acústica, que aumenta a transferência de massa entre as interfaces sólido e líquido, devido ao rompimento da parede celular, que permite uma maior penetração do solvente na matriz de extração (LUENGO *et al.*, 2014).

Embora diversas pesquisas estejam investigando o efeito do ultrassom na extração de compostos bioativos de resíduos vegetais, há bastante espaço na literatura no que diz respeito especificamente à extração de carotenoides da casca de maracujá. Nesse contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a influência do ultrassom na extração destes compostos, através da comparação do teor de carotenoides totais presentes na farinha da casca do maracujá advindos da extração convencional e assistida por ultrassom, a fim de obter dados que auxiliem na aplicação dessa tecnologia.

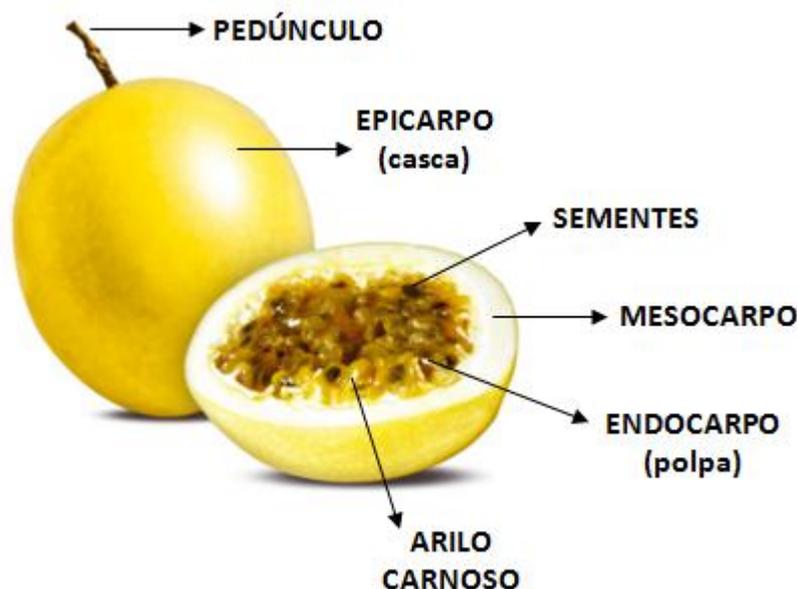
Cinco diferentes experimentos, sendo dois envolvendo a tecnologia de ultrassom, foram realizados no presente trabalho. Primeiramente, foi determinado o número de extrações exaustivas necessário para extrair todo o conteúdo de carotenoides presentes na casca do maracujá. Em seguida, foi realizada a extração exaustiva com e sem saponificação, uma etapa determinante na análise de carotenoides. A terceira e última etapa consistiu nos experimentos com ultrassom, em que dois solventes distintos foram empregados.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Maracujá e suas características

Maracujá é um termo que surgiu da cultura indígena, do tupi *mara kuya*, cuja denominação significa “alimento em forma de cuia”. O maracujá é um fruto produzido pelas plantas da família *Passifloraceae* e também é conhecido como fruto-da-paixão, nome popular pouco utilizado no Brasil, que faz referência à correlação da morfologia da flor da espécie com os símbolos da Paixão de Cristo (SOUZA e MELLETI, 1997). As *Passifloraceae* se desenvolvem predominantemente em regiões tropicais e, de acordo com Vanderplank (1996), englobam 630 espécies divididas em 18 gêneros. O gênero *Passiflora*, que compreende cerca de 500 espécies (DHAWAN *et al.*, 2004), é o maior na família *Passifloraceae* e também o mais importante economicamente (DENG *et al.*, 2009).

O maracujá-azedo ou amarelo, uma das espécies mais conhecidas do gênero *Passiflora*, é um fruto carnoso de formato arredondado, com diâmetro entre 8 e 10 cm e casca amarela na fase madura. Este é constituído por uma grande quantidade de sementes com arilo carnoso envoltas por uma polpa amarela gelatinosa de aroma intenso e sabor doce-ácido (LÓPEZ-VARGAS *et al.*, 2013). A morfologia do fruto é apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura morfológica do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

Fonte: <http://www.n4natural.com.br>

O Brasil é um dos mais importantes centros de diversidade do maracujá, pois abriga em torno de 150 a 200 espécies de *Passiflora* que são nativas, principalmente, no Centro-Norte do país (EMBRAPA CERRADOS, 2005). As espécies brasileiras mais significativas comercialmente são a *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracujá-amarelo ou azedo), a *Passiflora edulis* (maracujá-roxo) e a *Passiflora alata* (maracujá-doce) (SOUZA e MELLETI, 1997). O maracujá-amarelo ou azedo é o mais conhecido e cultivado no país, com quase 40% de sua produção direcionada predominantemente à indústria de sucos (SILVA *et al.*, 2014). Em razão da qualidade nutricional de seus frutos, é também bastante aplicado na produção de polpas, doces, geleias, entre outros produtos alimentares (OLIVEIRA, 2015).

O Brasil atualmente configura o país com a maior produção de maracujá-amarelo do mundo, seguido do Peru e da Venezuela. Os maiores produtores no Brasil são os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Pernambuco, Alagoas e outros estados do Nordeste e Norte (ISHIMOTO *et al.*, 2009). Segundo os dados publicados em 2013 pelo IBGE sobre a Produção Agrícola Municipal, em 2012 o Brasil alcançou uma produção de mais de 700 mil toneladas de maracujá em uma área de quase 60 mil hectares destinados à colheita, gerando um valor total de quase 860 milhões de reais. Essas e outras informações são observadas na Tabela 1. Ainda, segundo Lima (2001), o agronegócio do maracujá no Brasil emprega 250 mil pessoas por até dois anos e pode gerar, com apenas R\$ 12.000,00 de investimentos, de 5 a 6 empregos diretos e indiretos por hectare nesse mesmo período, tornando a cultura do maracujá um excelente negócio para a agricultura familiar.

**Tabela 1.** Áreas destinada à colheita e colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes de maracujá das Grandes Regiões produtoras no Brasil no ano de 2012

Grandes Regiões produtoras	Área (ha)		Quantidade produzida (t)	Rendimento médio (t/ha)	Valor (1 000 R\$)
	Destinada à colheita	Colhida			
Norte	4.482	3.869	45.781	11,83	66.403
Nordeste	45.711	44.932	563.346	12,54	556.282
Sudeste	5.951	5.951	114.796	19,29	146.588
Sul	1.336	1.330	19.382	14,57	27.012
Centro-Oeste	1.766	1.766	32.792	18,57	61.309
<b>Brasil</b>	<b>59.246</b>	<b>57.848</b>	<b>776.097</b>	<b>13,42</b>	<b>857.595</b>

Fonte: IBGE, 2013

O interesse de pesquisadores e produtores pelo maracujá tem sido estimulado pelo alto valor nutricional e presença de compostos bioativos no fruto. Também conhecidos como fitoquímicos, os compostos bioativos são definidos como metabólitos secundários presentes no reino vegetal (como carotenoides, alcaloides, compostos fenólicos e fibras alimentares) e classificados como “não nutrientes”, o que significa que não são essenciais para a saúde humana, mas possuem propriedades benéficas ao nosso organismo, tendo alegação de propriedade funcional aprovada pela ANVISA. O maracujá constitui uma fonte rica de vitaminas do complexo A, C e D, alcaloides, carotenoides, flavonoides, fibras e sais minerais. Devido à presença de compostos fenólicos e carotenoides, o maracujá possui propriedades antioxidantes, que melhoram o funcionamento do nosso organismo, e anti-inflamatórias, devido ao alto conteúdo de polifenóis. Além disso, estudos mostram que o fruto possui propriedades anti-hipertensivas, sedativas e analgésicas quando administrado em doses controladas (PORTO-FIGUEIRA *et al.*, 2015).

Os compostos bioativos de alto valor nutricional constituintes do maracujá explicam muitos dos efeitos benéficos presentes na ingestão dos diferentes tipos de produtos derivados do fruto. De acordo com a ANVISA (Resolução nº 18 de 30 de Abril de 1999), um alimento é considerado funcional quando seu papel metabólico ou fisiológico atua no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. As fibras alimentares, por exemplo, presentes em grande quantidade no maracujá, auxiliam no funcionamento do intestino, o que torna o maracujá apto a ser enquadrado como um alimento funcional (OLIVEIRA, 2015).

### 2.1.1 A casca do maracujá

A procura por alimentos naturais e nutritivos, como por exemplo os sucos de frutas, é uma tendência mundial que vem contribuindo para o aumento da produção industrial de frutas no Brasil. Segundo dados de 2013 do IBGE, a produção brasileira de sucos concentrados de maracujá tem crescido expressivamente, tendo aumentado a marca de 4.4 mil toneladas de suco em 2005 para aproximadamente 11.2 mil toneladas em 2010. Apesar de economicamente importante e desejada, por gerar renda e empregos para milhares de brasileiros, essa expansão na produção industrial de sucos contribui para a geração de material classificado como resíduos ou subprodutos, representados pelas sementes e cascas do fruto, que são produzidos durante o processamento da matéria prima. Com relação às cascas dos frutos, parte dos resíduos já é subutilizada por produtores rurais na alimentação animal, um aspecto positivo em termos de baratear os custos da produção. Porém, a disposição do restante dessa grande quantidade de resíduos no meio ambiente está se tornando cada vez mais um problema ambiental, além de incrementar os custos operacionais das indústrias de polpa e sucos (LOUSADA JÚNIOR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Oliveira *et al.* (2002) afirmaram que a quantidade de resíduos gerada pelo processamento do maracujá pode chegar a valores entre 65 e 70% do peso total do fruto, com variações que ocorrem dependendo da espécie. Por esse motivo, torna-se imprescindível encontrar soluções adequadas de descarte para esses subprodutos ou meios de convertê-los em produtos de valor agregado. Sabe-se que com a aplicação de tecnologia adequada, esses subprodutos podem ser transformados em produtos comercializáveis, servindo tanto como matéria prima em processos secundários de transformação (ingredientes alimentícios intermediários) ou como ingredientes finais a serem adicionados em novos produtos. Os coprodutos de frutas tropicais contêm elevados níveis de compostos bioativos (vitaminas, minerais, compostos fenólicos antioxidantes, fibra dietética, entre outros), que podem oferecer benefícios à saúde e contribuir na prevenção de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes, entre outras (LÓPEZ-VARGAS *et al.*, 2013; SEIXAS *et al.*, 2013).

A casca do maracujá, que compreende em torno de 60 % do peso total do fruto, é composta pelo flavedo (também chamado de epicarpo, que corresponde à camada externa de coloração verde à amarela, rica em fibras insolúveis) e pelo albedo ou mesocarpo, uma camada interna branca rica em fibras solúveis. Em seu estudo sobre a capacidade antioxidante e composição química em base seca da casca da *Passiflora edulis*, Cazarin *et al.* (2014) encontraram um baixo teor de umidade e de atividade da água ( $a_w$ ), indicando um risco mínimo de alterações microbiológicas, uma vez que o crescimento bacteriano ocorre com  $a_w$  entre 0,6 e 0,9. A composição centesimal completa da farinha da casca do maracujá obtida por Cazarin *et al.* (2014) é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição centesimal da farinha da casca do maracujá (g 100g<sup>-1</sup>, base seca) obtida por Cazarin et. al (2014)

Componente	Média ± DP
Atividade de água (a <sub>w</sub> )	0,43 ± 0,02
Umidade	9,48 ± 0,26
Cinzas	6,88 ± 0,02
Proteínas	3,94 ± 0,18
Lipídeos	0,31 ± 0,01
Fibra dietética total	65,22 ± 0,27
Fibra insolúvel	48,12 ± 1,10
Fibra solúvel	17,11 ± 1,36
Carboidratos	79,39

Segundo Seixas *et al.* (2013), estudos recentes mostram que o pericarpo do maracujá (união do epicarpo e mesocarpo, que juntos compõem a casca) poderia ser utilizado na indústria alimentícia como matéria prima para a obtenção de substâncias como fibras dietéticas e outros compostos bioativos. Outros autores também vêm desenvolvendo pesquisas relacionadas às propriedades da casca de maracujá, bem como à sua conversão em ingredientes alimentícios e outros materiais com valor agregado. López-Vargas *et al.* (2013) estudou as características físico-químicas e outras propriedades da casca do maracujá e concluiu que esta tem potencial para ser aplicada no desenvolvimento de alimentos funcionais, por possuir quantidades significativas de fibras dietéticas, compostos fenólicos e boas propriedades antioxidantes e antibacterianas. Outros pesquisadores, por sua vez, realizaram estudos clínicos com a farinha da casca de maracujá e demonstraram a sua eficiência na redução dos níveis de colesterol (RAMOS *et al.*, 2007) e seu potencial como redutor dos níveis de glicemia, auxiliando no tratamento da diabetes mellitus tipo II (GUERTZENTEIN e SABAA-SRUR, 1999).

## 2.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e microrganismos conhecidos por conferirem a cor amarela, laranja ou vermelha de muitas frutas e vegetais. Embora sejam micronutrientes, presentes em baixos níveis de concentração (da ordem de microgramas por grama), os carotenoides estão entre os constituintes alimentícios mais importantes na alimentação humana, já que muitos deles têm atividade pró-vitamina A e outros reconhecidos efeitos benéficos à saúde, como as propriedades antioxidantes e o poder de auxílio no combate a doenças. Além disso, constituem uma importante propriedade tecnológica, uma vez que estão relacionados à percepção sensorial dos alimentos, como por exemplo, a cor e o aroma: atributos que muito influenciam na aceitação pelo consumidor (RODRIGUES-AMAYA *et al.*, 2008).

Estes compostos são um dos pigmentos lipossolúveis mais difundidos e onipresentes na natureza (encontrados em folhas, frutos, flores, tegumentos...) e, até então, mais de 750 tipos de carotenoides naturais já foram identificados (BRITTON *et al.*, 2004). Em razão de suas propriedades corantes, de seu potencial como promotor da saúde humana e do crescente apelo à substituição dos corantes sintéticos pelos naturais na indústria alimentícia, os carotenoides têm sido objeto de estudo de diversas pesquisas, que

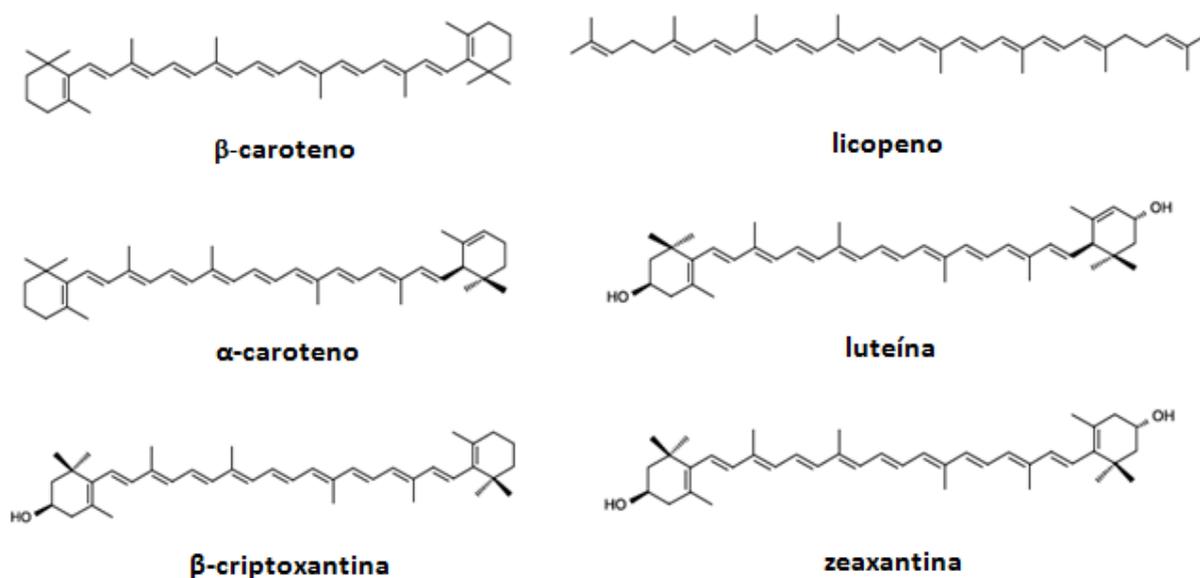
buscam investigar novas propriedades e possivelmente tornar a sua produção por microrganismos industrialmente praticável.

Mais do que compostos bioativos, necessários na dieta dos animais como antioxidantes ou precursores de vitaminas, os carotenóides atuam na construção de seus tecidos para conferir pigmentação, como no caso das penas de aves como o flamingo e o canário, de alguns insetos e do exoesqueleto de crustáceos, como o camarão, a lagosta e o salmão. Comparados a outros pigmentos vegetais como as antocianinas ou betalainas, eles exercem múltiplos papéis na atividade fotossintética das plantas, funcionando como coletores de energia, fotoprotetores contra danos oxidativos e ainda são responsáveis pela síntese de elementos do aparato fotossintético. Também exercem função fundamental nas interações planta-meio ambiente, servindo como fornecedores de intermediários necessários para a biossíntese de fito hormônios vegetais e de sinais visuais para atrair polinizadores de flores e dispersores de sementes. (ESTEBAN *et al.*, 2015; UENOJO *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Classificação e estrutura molecular

Os carotenoides pertencem à família dos terpenos, enorme grupo de substâncias encontradas em óleos essenciais de plantas que são classificadas de acordo com o número de unidades isopreno (monômero de cinco carbonos) que compõe sua estrutura. Por estarem arranjados em cadeias de 40 átomos de carbono, os carotenoides são chamados tetraterpenos. A principal característica dessas moléculas é a multiplicidade de duplas ligações conjugadas, às quais se atribuem as propriedades e funções peculiares dos carotenoides, como por exemplo, suas diversas colorações. (ARVAYO-HENRÍQUEZ *et al.*, 2013; DEY & RATHOD, 2013; RODRIGUES-AMAYA *et al.*, 2008). O tamanho da cadeia poliênica pode variar de 3 a 15 insaturações duplas e o comprimento do cromóforo é determinante no espectro de absorção e na cor da molécula. Todas as cadeias são fundamentadas em sete diferentes grupos terminais, dos quais somente quatro ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$  e  $\psi$ ) são encontradas em carotenoides de vegetais superiores (UENOJO *et al.*, 2007).

Os carotenoides são subdivididos em dois grandes grupos, de acordo com as diferenças na estrutura molecular de seus compostos. Os carotenos, que são hidrocarbonetos puros e, portanto, apolares (por exemplo, o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e o licopeno); e as xantofilas, que representam a classe de carotenoides com maior polaridade, cuja estrutura possui grupos funcionais oxigenados (como a hidroxila, grupos ceto e epóxi), tais como a luteína, a zeaxantina e a  $\beta$ -criptoxantina. Na Figura 2, são apresentadas as estruturas moleculares dos exemplos citados. Os carotenoides podem ser encontrados na forma acíclica (como o licopeno), monocíclica ou ainda bicíclica (como o  $\alpha$  e o  $\beta$ -caroteno). Na natureza, se apresentam majoritariamente na forma trans, que é mais estável, embora pequenas quantidades de isômeros *cis* também possam ser encontradas (ARVAYO-HENRÍQUEZ *et al.*, 2013; RODRIGUES-AMAYA *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Estruturas moleculares de diferentes carotenoides. (Retirado de *Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos*, 2008).

### 2.2.2 Propriedades e importância para a saúde humana

Os carotenoides β-caroteno, α-caroteno, β-criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina são os mais estudados por seus efeitos promotores da saúde. Além de serem os principais carotenoides presentes no sangue, são também, com exceção da zeaxantina, os mais comumente encontrados nos alimentos, sendo o β-caroteno o mais abundante entre eles (GODOY e RODRIGUES-AMAYA, 1993).

Dentre os efeitos benéficos à saúde, os carotenoides parecem desempenhar importante papel para a visão. Embora já existam muitas hipóteses comprovadas, suas funções ainda não foram completamente elucidadas *in vivo*, pois as condições de reação são muito difíceis de serem controladas (UENOJO *et al.*, 2007). O β-caroteno e outros carotenoides foram reconhecidos no século XX como os principais precursores de vitamina A e, por isso, desempenham um importante papel nutricional, visto que a deficiência nessa vitamina causada por dietas pouco nutritivas é um problema de saúde global. Este fato é especialmente relevante nos países subdesenvolvidos, onde a vitamina A é raramente ingerida pela maior parte da população (OLSON, 1989; SOUZA *et al.*, 2012; WHO, 2009).

A Vitamina A é essencial para a promoção do crescimento, desenvolvimento embrional e função visual (SCHWARTZ, 2010), sendo que o β-caroteno é o carotenoide de maior potência com relação a essa vitamina. A exigência mínima para um carotenoide possuir atividade pró-vitamina A é a presença de um anel β não substituído, em uma cadeia poliênica de pelo menos 11 carbonos. Assim, o α-caroteno e a β-criptoxantina têm cerca de 50% da atividade do β-caroteno, ao passo que a luteína, a zeaxantina e o licopeno não possuem atividade (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Pesquisadores têm mostrado as novas funções não relacionadas à atividade pró-vitamínica dos carotenoides, como a redução do risco de doenças cardiovasculares e degenerativas, cânceres, degeneração macular e a prevenção na formação de catarata (ESTEBAN *et al.*, 2015; SILVA e MERCADANTE, 2002).

A prevenção de doenças atribuída aos carotenoides está diretamente associada à atividade antioxidante desses compostos, propriedade que consiste na capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e eliminar os radicais livres das moléculas. Essa descoberta vem gerando um interesse ainda maior do ser humano nos carotenoides, visto que a ação antioxidante tem comprovada relação com a redução do estresse oxidativo das células, atuando na prevenção de danos ao DNA, na redução da peroxidação de lipídios e na manutenção da função imunológica. Estudos epidemiológicos associam a ingestão de  $\beta$ -caroteno com a prevenção de certos tipos de câncer e, além disso, o potencial antioxidante dos carotenoides pode ser útil na inibição de outras doenças provocadas pela ação dos radicais livres (PERTUZATTI *et al.*, 2015, UENOJO *et al.*, 2007).

A estrutura dos carotenoides exerce influência sobre a atividade antioxidante. Estudos revelam que a capacidade de um determinado carotenoide em isolar o oxigênio singlete está relacionada com o número de ligações duplas conjugadas e aos grupos ligados às extremidades da cadeia. A atividade antioxidante aumenta com o número de ligações duplas e com a presença de grupos cetona e anéis ciclopentano em sua estrutura (UENOJO *et al.*, 2007).

Existem também indícios de que os carotenoides podem ter seus efeitos benéficos potencializados através da associação com outros componentes. Uma vez que estes estão sempre associados com outros sistemas biológicos de óxido-redução, a interação com outros antioxidantes poderá gerar efeitos sinérgicos. Por exemplo, a interação entre o  $\beta$ -caroteno e as vitaminas C e E foi observada na proteção celular, possivelmente em razão da capacidade do  $\beta$ -caroteno de destruir os radicais livres e reparar os radicais de tocoferol produzidos pela ação do  $\alpha$ -tocoferol (DELGADO-VARGAS, 2000).

### 2.2.3 Aplicações e produção

Além de apresentarem as propriedades e benefícios mencionados anteriormente, os carotenoides atuam como corantes naturais de grande utilização industrial e têm despertado interesse pelo seu potencial em substituir os aditivos químicos muito utilizados nos alimentos (SCHWARTZ, 2010). Além de corantes alimentícios, utilizados para conferir maior apelo visual aos alimentos, são também empregados em suplementos nutricionais e nas indústrias cosmética e farmacêutica, com um mercado global estimado em US\$ 1,2 bilhões/ano (CHAGAS, 2014).

Dentre as aplicações dos carotenoides como corantes alimentícios, destacam-se as preparações oleosas e aquosas, que são preparadas para produzir emulsões, suspensões coloidais e complexos com proteínas. Essas preparações são amplamente utilizadas em margarinas, manteigas, sucos de frutas e bebidas, sopas, laticínios, sobremesas e misturas, xaropes e medicamentos, açúcar, molhos para saladas, carnes, massas, ovos, maioneses, entre outros (GOUVEIA *et al.*, 2006). Além disso, os carotenoides são também direcionados como aditivos na ração animal, com o intuito de conferir a cor adequada ao tecido animal ou aos seus produtos derivados (por exemplo, astaxantina, para o salmão; luteína e zeaxantina, para a gema de ovos e a pele de galinhas e  $\alpha$ , $\beta$ -caroteno, para rebanho bovino, na coloração de nata ou gordura) (BRITTON *et al.*, 1995).

Os carotenoides mais consumidos são o  $\beta$ -caroteno, com 32% do mercado, e a astaxantina, com 28%. Estima-se que a produção total de carotenoides na natureza gire em torno de 100.000.000 toneladas/ano, sendo que a procura pelo  $\beta$ -caroteno atingiu um

valor comercial de aproximadamente 40 milhões USD/ano (FALKOWSKI e RAVEN, 1997). Mais de 90% do mercado mundial dos carotenoides corresponde à síntese química, porém a crescente demanda por aditivos naturais vem tornando a produção microbológica um mercado promissor (VILA *et al.*, 2008).

O crescente número de consumidores conscientes e preocupados com a ingestão de alimentos saudáveis e funcionais tem causado um aumento na demanda por carotenoides na indústria alimentícia. Dados mostram que a demanda global por carotenoides tem crescido 2,9% ao ano. Contudo, calcula-se que em torno de 90% dos carotenoides atualmente aplicados na indústria sejam derivados de síntese química; logo, não atendem o desejo dos consumidores por carotenoides naturais (VILA *et al.*, 2008).

Nesse contexto, os pigmentos sintetizados por rota biológica têm se revelado um crescente segmento do mercado industrial. Desde o início da década de 80, várias companhias biotecnológicas têm desenvolvido métodos para produzir pigmentos em culturas bacterianas, de algas e fungos. Embora tenham apelo de mercado por suas atraentes funcionalidades, os biopigmentos se inserem em mercados existentes para aditivos químicos e, portanto, para serem competitivos, devem oferecer vantagens como custo reduzido e/ou conformidade com as normas. Os biopigmentos com mais habilidade para competir com os pigmentos de síntese química são os carotenoides (especialmente as xantofilas) e a melanina (MARKET FORECAST, 1992).

A demanda do mercado consumidor por produtos naturais e saudáveis também abre espaço para a síntese microbiana de compostos de aroma derivados de carotenoides. As legislações norte-americana e europeia definem compostos de aroma naturais como aqueles obtidos por processos físicos (por exemplo, a maceração de suas fontes naturais) ou por processos enzimáticos e microbianos que abrangem precursores isolados na natureza. Ainda, determinam que, para serem qualificados como “naturais”, os compostos obtidos devem ser idênticos aos compostos existentes na natureza. (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001; SERRA *et al.*, 2005; UENOJO *et al.*, 2007).

A maioria dos compostos de aromas utilizados no mundo são classificados como aditivos químicos, pois estes são produzidos por processos químicos. Segundo Uenojo *et al.* (2007), são vantagens dos bioprocessos frente à síntese química: a utilização de condições brandas de processo, a baixa geração de resíduos, a seletividade das reações enzimáticas (CHATTERJEE e BHATTACHARYY, 2001) e, principalmente, o fato de os produtos gerados serem considerados naturais (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001).

Wintherhalter e Rouseff (2002) apontaram que compostos de aroma derivados de carotenoides têm sido detectados em produtos folhosos (como tabaco, chá e mate), em óleos essenciais, em uma ampla variedade de frutos (uva, maracujá, carambola, marmelo, maçã, nectarina, melão e tomate), vegetais, condimentos (como açafrão e páprica) e em outras fontes, como vinho, rum, café, carvalho, mel e algas marinhas. Estes são alguns exemplos que ilustram a importância e ocorrência na natureza dos compostos de aroma e fragrâncias obtidos a partir de carotenóides.

Ainda, nota-se que o maracujá é um dos frutos com maior potencial para tornar-se matéria-prima como precursor de compostos de aroma, visto que é uma fonte natural de três importantes compostos de aroma. São estes: a  $\beta$ -ionona (presente também em chá preto, framboesa, cenoura, tabaco, damasco, carambola, cereja e manga), a  $\beta$ -damascenona (também observada em damasco, rosa, carambola, uva, kiwi, manga,

tomate, vinho, rum, framboesa e amora) e o teaspirano (também responsável pelos odores de chá preto e tabaco).

## **2.3 Extração convencional de carotenoides**

### **2.3.1 Fundamentos e aspectos gerais da extração**

A extração é uma das operações unitárias mais utilizadas na indústria alimentícia (PINELO *et al.*, 2005). Essa operação é baseada no processo de difusão, na qual um ou mais componentes de um material são transferidos para uma fase fluida, com a posterior separação entre soluto e solvente. No processamento de alimentos, a extração envolve a separação de componentes específicos inicialmente retidos em uma matriz biológica, em sua maioria de origem vegetal. Essa operação é importante em uma ampla variedade de aplicações, como a produção de óleos de cozinha, aromatizantes e óleos essenciais, café, açúcar, entre outras substâncias (FELLOWS, 2006).

Os processos de extração mais conhecidos são a extração sólido-líquido e a extração líquido-líquido e os principais tipos de solventes empregados são a água, solventes orgânicos ou dióxido de carbono supercrítico (FELLOWS, 2006). A extração sólido-líquido baseia-se na remoção de um componente de interesse (soluto) por um líquido (solvente) que tenha afinidade molecular com o soluto, ou seja, capaz de dissolvê-lo. A extração do presente trabalho é uma extração sólido-líquido, uma vez que envolve a remoção dos carotenoides da casca de maracujá, que se encontra na forma sólida, utilizando um solvente.

A extração sólido-líquido compreende a mistura do sólido com o solvente por um tempo pré-determinado, para, posteriormente, separar o solvente. O princípio básico da extração envolve a transferência de massa dos solutos do alimento para o solvente, que ocorre em três etapas distintas: i) o soluto é dissolvido no solvente; ii) a solução penetra na superfície do alimento através de suas partículas; iii) a solução torna-se dispersa no volume total do solvente. Isso significa que o tempo de contato entre soluto e solvente durante a extração deve ser suficiente para que o solvente dissolva a quantidade necessária de soluto, de forma que as mudanças na composição atinjam o equilíbrio. O tempo de extração requerido irá depender da solubilidade do referido soluto no solvente selecionado, além de fatores como a temperatura de extração, a área superficial dos sólidos e a viscosidade do solvente (que deve ser suficientemente baixa a fim de possibilitar a fácil penetração do solvente no leito de partículas sólidas) (FELLOWS, 2006).

O objetivo de uma extração deve ser proporcionar o máximo de rendimento e a maior qualidade possível dos compostos de interesse no extrato final (SPIGNO *et al.*, 2007). A eficiência da extração é função das condições de processo, e diversos fatores afetam a concentração dos componentes desejados no extrato final: temperatura, razão soluto/solvente, taxa de fluxo do solvente e tamanho da partícula são alguns deles (PINELO *et al.*, 2005). No processamento de alimentos, o efeito positivo ou negativo de cada fator na transferência de massa nem sempre é óbvio e é frequentemente condicionado por fatores como a saturação do solvente ou a degradação térmica dos compostos (TULBENTCI, 1986).

Um dos fatores cruciais de uma extração é o solvente utilizado, uma vez que este tem a habilidade de separar compostos de interesse oriundos de uma mistura de

componentes de acordo com a afinidade do soluto com o solvente. As características químicas do solvente e sua estrutura, associadas com a estrutura e composição do soluto de interesse, podem alterar a forma como a extração é realizada (PINELO *et al.*, 2006; LLOYD e WYK, 2012).

Novas leis regulamentárias que regem as indústrias vêm requerendo um menor consumo de solventes petroquímicos e compostos orgânicos voláteis. Além disso, a preocupação com os riscos durante a extração e com a segurança dos ingredientes utilizados tem atraído atenção para a necessidade de se usar solventes “verdes”. Solventes verdes alternativos, que são recursos renováveis obtidos de fontes biomássicas como madeira, amido, óleos vegetais ou frutas são altamente potentes, biodegradáveis, de baixa toxicidade e baixa inflamabilidade. Estudos têm mostrado a importância e o potencial desses solventes ecológicos, que poderiam ser alternativamente empregados no lugar de solventes petroquímicos (BUNDEESOMCHOK *et al.*, 2015; ROMBAUT *et al.*, 2014).

### 2.3.2 Extração de carotenoides

Existe uma grande variabilidade de conteúdo e genótipos de carotenoides encontrados nas diversas espécies de frutos e vegetais que contêm esses compostos bioativos, havendo variações na composição dentro de uma mesma espécie, ou entre diferentes partes de um mesmo alimento. Esse é o principal motivo para a inexistência de um método padrão para a extração de carotenoides em bancada (RIVERA e CANELA, 2012; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Contudo, a maioria dos métodos de extração segue um caminho comum, que inclui a retirada dos componentes por rompimento dos tecidos das matrizes alimentícias, seguido da remoção dos componentes indesejados e por fim uma extração líquido-líquido ou sólido-líquido (ISHIDA e CHAPMAN, 2012).

Na extração de carotenoides, a remoção dos compostos presentes na matriz vegetal é geralmente realizada por um solvente orgânico. Diferentes solventes orgânicos têm sido aplicados no estudo de carotenoides, porém, a seleção do mais apropriado nem sempre é fácil. Além das dificuldades causadas pela variabilidade inerente a esses biocompostos, as diferenças de polaridade dos carotenoides existentes, bem como as estruturas das diferentes matrizes e de seus componentes também exercem papel importante na escolha do solvente para a extração. Normalmente, solventes apolares, como o hexano, são boas opções para carotenoides apolares (carotenos) ou esterificados; solventes polares, por sua vez, como etanol e acetona, são mais apropriados para carotenoides polares (xantofilas) (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos sobre extração de carotenoides de alimentos tem abrangido como principais solventes o hexano, a acetona, o metanol e o tetrahydrofurano. Menos frequentemente, é citada a utilização de éter de petróleo, dietil-éter, diclorometano, acetato de etila e etanol (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014). Como muitos desses solventes são classificados como tóxicos e não cumprem com as normas para consumo humano, muitos estudos tem buscado a redução no uso desses solventes através da combinação destes com solventes considerados menos tóxicos. Segundo Amorim-Carrilho *et al.* (2014), uma vasta gama de misturas de solventes tem sido investigada por pesquisadores: acetona/diclorometano, acetona/etanol, acetona/hexano, acetona/éter de petróleo, hexano/dietil-éter, hexano/etanol/acetona/tolueno/metanol/THF e hexano/acetato de

etila. Porém, etanol/hexano tem sido uma das combinações mais comuns para amostras alimentícias.

Sarkar *et al.* (2012) recomendou a aplicação de sistemas de metanol e etanol em combinação com acetona no lugar de utilizar somente a acetona. Em um estudo recente em tomates, Ranveer *et al.* (2013) observou que a mistura de hexano, acetona e etanol (50:25:25) alcançou o maior rendimento de licopeno dentre todos os solventes testados individualmente. De forma similar, Carrilho *et al.* (2012) analisou  $\beta$ -caroteno, luteína e fucoxantina extraídos de algas marinhas usando uma combinação de metanol, hexano e diclorometano (50:25:25) e uma segunda extração com acetona.

Além da escolha apropriada do solvente, uma série de fatores torna a extração de carotenoides uma análise inerentemente difícil, devido: i) ao grande número de carotenoides existentes, ii) à variabilidade qualitativa e quantitativa da composição dos alimentos, iii) à distribuição não uniforme de carotenoides entre amostras e ainda dentro de uma mesma amostra e iv) à natureza variável das matrizes alimentícias (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989, 1999; RODRIGUEZ-AMAYA & AMAYA-FARFAN, 1992).

Entretanto, o principal problema na análise de carotenoides surge da sua instabilidade e suscetibilidade à oxidação e isomerização, que podem culminar na degradação dos compostos. Essas moléculas são satisfatoriamente estáveis na matriz do alimento, porém, quando em solução, podem ser sensíveis a uma série de condições; logo, a fim de se evitar perdas por degradação, medidas preventivas devem ser rotineiramente adotadas no laboratório. Nesse sentido, a extração de carotenoides deve ser conduzida no menor tempo possível, evitando-se a exposição ao oxigênio, à incidência de luz e a altas temperaturas, protegendo-se do contato com ácidos e empregando-se solventes de alta pureza, livres de impurezas danosas (AMAN *et al.*, 2005; AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014; LIMBO *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

#### **2.4 Uso de tecnologias emergentes na extração – Ultrassom**

Uma extração deve fornecer elevado rendimento e prezar pela economia de tempo (ROMBAUT *et al.*, 2014). A técnica de extração convencional no processamento de alimentos é geralmente bastante demorada e requer o uso de grandes quantidades de solventes. Por motivos pertinentes às novas legislações ambientais e ao impacto econômico, as indústrias farmacêutica e alimentícia têm buscado intensificar o uso de diferentes tecnologias de extração com a finalidade de obter um produto final de alta qualidade (CHEMAT *et al.*, 2012).

Segundo González-Centeno *et al.* (2015), muitas pesquisas realizadas nas últimas décadas têm permitido o desenvolvimento de técnicas de extração mais eficientes e ambientalmente corretas. A habilidade de diversas tecnologias emergentes como a extração fluida supercrítica, a extração líquida pressurizada e a extração assistida por micro-ondas ou ultrassom (KRISHNASWAMY *et al.*, 2013; PÉRINO-ISSARTIER *et al.*, 2011) tem sido avaliada na extração de compostos bioativos a fim de melhorar o rendimento, diminuir o tempo de extração e/ou reduzir o uso de solventes orgânicos (WIJNGAARD *et al.*, 2012). Dentre essas novas tecnologias, a extração assistida por ultrassom pode ser uma das técnicas mais exploradas tanto em escala laboratorial quanto industrial, pelo fato de utilizar um equipamento relativamente barato, de simples operação e de alta

eficiência em razão dos efeitos mecânicos que gera no material em que é aplicado (AHMAD-QASEM *et al.*, 2013).

O ultrassom é uma tecnologia não térmica cuja ação se dá pela energia de ondas sonoras que se propagam com frequência superior a 20 kHz e que não são detectadas pelo ouvido humano. Os efeitos positivos do ultrassom na extração sólido-líquido são atribuídos ao fenômeno da cavitação acústica, uma espécie de vibração que altera a pressão da fase líquida através da formação e colapso de microbolhas que são transmitidas pelas ondas de alta frequência. Esse colapso é acompanhado de pontos localizados de alta pressão, temperatura e tensão de cisalhamento perto das paredes das bolhas, devido à intensa turbulência gerada no meio reacional (LUENGO *et al.*, 2014 apud FENG e YANG, 2010 e SUSLICK, 1988).

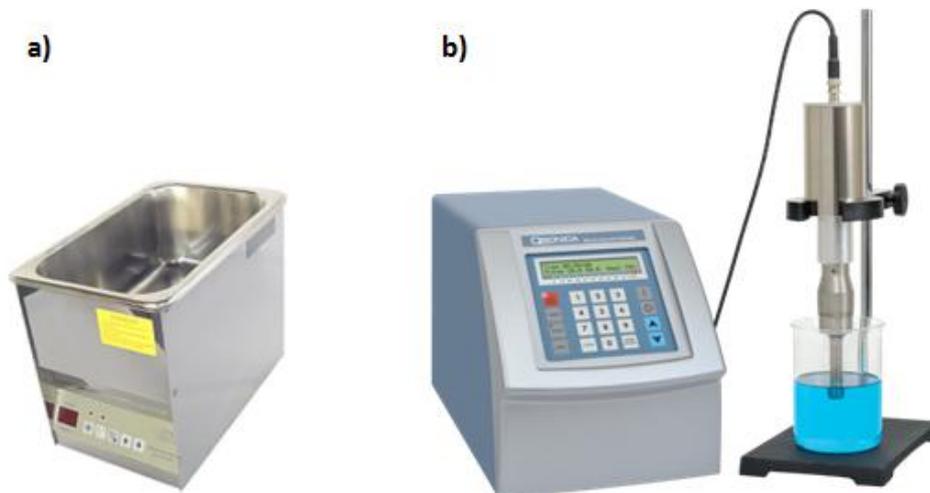
Os efeitos mecânicos provocados pelo ultrassom podem sucessivamente acelerar a transferência de calor e massa entre as partículas (LI *et al.*, 2012 apud CHEMAT *et al.*, 2011), facilitando a extração dos componentes desejados através do rompimento dos tecidos da parede celular e permitindo uma maior penetração do solvente na matriz do material celular (LUENGO *et al.*, 2014). Diversos estudos tem investigado o efeito do ultrassom na extração de compostos bioativos, como os polifenóis ou carotenoides, de diferentes coprodutos de plantas. Khan *et al.* (2010) mostrou que a aplicação do ultrassom durante a etapa de maceração na extração de polifenóis de cascas de laranja aumentou em 40% o rendimento em relação à extração convencional. Tabaraki *et al.* (2012), por sua vez, observou até 100% de ganho na extração de carotenoides de cascas de tomate, utilizando o ultrassom.

#### 2.4.1 Modos de operação e tipos de ultrassom

No processamento de alimentos, dois métodos diferentes são aplicados: o ultrassom de baixa e alta intensidade. O ultrassom de baixa intensidade caracteriza-se por valores de intensidade do som menores que  $1 \text{ W.cm}^{-2}$  e é empregado como método analítico não invasivo para determinação da composição, estrutura ou taxa de fluxo de alimentos. O ultrassom de alta potência, por sua vez, utiliza valores que podem variar entre 10 e  $1000 \text{ W.cm}^{-2}$  e frequências mais altas, de até 2,5 MHz, e é comumente aplicado para causar o rompimento físico de tecidos, criar emulsões, limpar equipamentos ou desencadear reações químicas. Entre as vantagens apresentadas pelo ultrassom está a redução no tempo e na temperatura do processo, a necessidade mínima de adaptação da planta de processamento existente e a possibilidade de operação em batelada ou contínua. Podem ser citadas como limitações o possível dano por radicais livres gerados no processo de cavitação e a modificação, por vezes indesejada, da estrutura e textura do alimento processado (FELLOWS, 2006).

Existem basicamente dois tipos de equipamentos geradores de ondas ultrassônicas: o tipo sonda e o tipo banho. O ultrassom tipo banho, apresentado na Figura 3a, é o mais utilizado, porém possui restrições em razão de seu mecanismo de funcionamento. Nesse modelo, o transdutor de energia atua através de um líquido (geralmente água) e, em razão do grande volume, as ondas emitidas acabam tendo uma maior dispersão, o que resulta em uma baixa faixa de potência, limitando seu uso (DOLATOWSKI e STASIAK, 2012; MASON *et al.*, 1996; McCLEMENTS, 1995).

O ultrassom tipo sonda (Figura 3b), por sua vez, tem a vantagem de poder ser utilizado a quaisquer intensidades de potência e em recipientes de qualquer tamanho, podendo concentrar suas ondas ultrassônicas em um volume menor. Como desvantagens, pode ser citada a necessidade de uma frequência fixa e a dificuldade de controle da temperatura (DOLATOWSKI & STASIAK, 2012).



**Figura 3.** Diferentes tipos de ultrassom. a) Ultrassom tipo banho; b) Ultrassom tipo sonda  
*Retirado de a) [www.ciencor.com.br](http://www.ciencor.com.br) b) [www.sonicator.com](http://www.sonicator.com)*

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Obtenção da farinha da casca do maracujá

A farinha da casca do maracujá utilizada no presente trabalho foi previamente obtida por Oliveira (2015) durante os experimentos da sua tese de doutorado e sua obtenção está descrita no fluxograma da Figura 4. As amostras de maracujá foram adquiridas em comércio local (Porto Alegre/RS) e, inicialmente, foram lavadas e cortadas. Após a remoção da polpa e das sementes, a casca (composta do epicarpo e mesocarpo) foi submetida a um processo de branqueamento por três minutos, na temperatura de 100°C, e em seguida triturada. A casca foi seca em estufa a 60 °C por 72 h. Após o processo de desidratação, a amostra foi novamente triturada e peneirada até a obtenção de uma farinha em pó com granulometria de 60 *mesh*.



**Figura 4.** Fluxograma de obtenção da farinha da casca do maracujá

### 3.2 Extração de carotenoides

A extração de carotenoides da casca do maracujá foi dividida em três diferentes etapas. A primeira teve por finalidade determinar o número de extrações exaustivas necessárias para a extração de todo o conteúdo de carotenoides da casca do maracujá. Na segunda etapa, após a determinação do número de extrações, a extração exaustiva foi realizada com e sem saponificação. A terceira e última etapa consistiu nos ensaios com ultrassom. A seguir, é apresentada a descrição detalhada das etapas experimentais.

#### 3.2.1 Determinação do número de extrações exaustivas

Com o objetivo de determinar a máxima quantidade de carotenoides a ser extraída da casca do maracujá, o primeiro procedimento experimental consistiu em uma extração exaustiva, realizada de acordo com protocolo proposto por Mercadante *et al.* (1998).

Uma amostra de 3 g de farinha da casca do maracujá foi pesada em almofariz, e a ela foi adicionada celite, para auxílio no rompimento das células e aumento da superfície de contato. Foram então adicionados 20 mL de acetona e a amostra foi macerada por dois minutos com o uso de um pistilo. O extrato acetônico foi filtrado sob vácuo em funil de Buchner e coletado em kitassato. O resíduo foi recolhido para o almofariz e procedeu-se novamente à extração. O processo de extração e filtração foi repetido até que o resíduo se tornasse o mais claro possível (indicativo de total remoção dos carotenoides), o que totalizou 14 extrações.

#### 3.2.2 Extração exaustiva com e sem saponificação

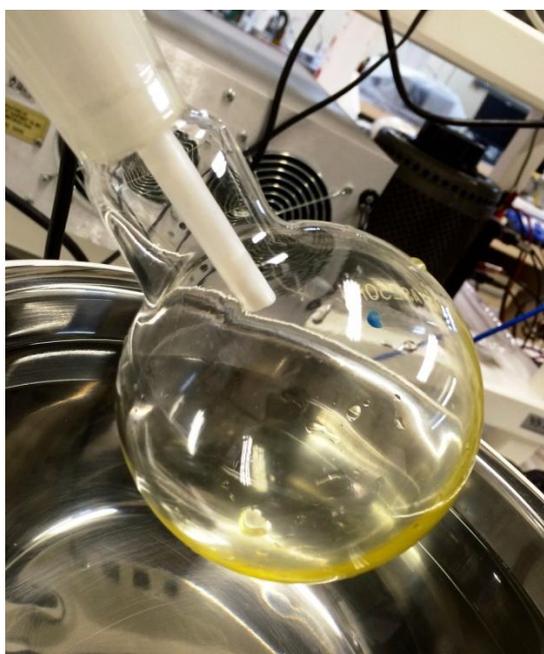
A extração exaustiva é um processo bastante minucioso composto por várias etapas. Inicialmente, procedeu-se como descrito no item 3.2.1, com a realização de 10 extrações via maceramento de uma amostra de 3g da farinha da casca de maracujá. Foram realizados os experimentos de extração exaustiva, com e sem saponificação, a fim de comparar a influência desta no teor total de carotenóides. O procedimento experimental descrito nos próximos parágrafos é referente à extração com saponificação, visto que a outra segue o mesmo protocolo, apenas com a exclusão desta etapa intermediária. Cada um dos ensaios de extração foi realizado em duplicata.

A etapa posterior à extração exaustiva consiste em um processo de partição, em que o extrato acetônico resultante das 10 extrações foi vagarosamente transferido para funil de separação contendo pequena quantidade de água destilada e 150 mL de uma mistura de éter de petróleo/éter etílico na proporção de (50:50), permitindo a partição dos carotenoides para o éter. Todo o conteúdo de extrato (aproximadamente 200 mL) foi adicionado em porções de 10 mL com pipeta Pasteur de vidro pela parede do funil e em seguida lavado com água destilada, a fim de aumentar a polaridade do sistema e evitar a migração dos carotenoides para a fase aquosa. Após descarte da fase inferior contendo água e acetona, o procedimento foi repetido até todo o extrato acetônico ter sido transferido para o funil de separação. Posteriormente, a solução de carotenoides em éter foi lavada mais cinco vezes, para garantir a remoção total da acetona, e recolhida em erlenmeyer.

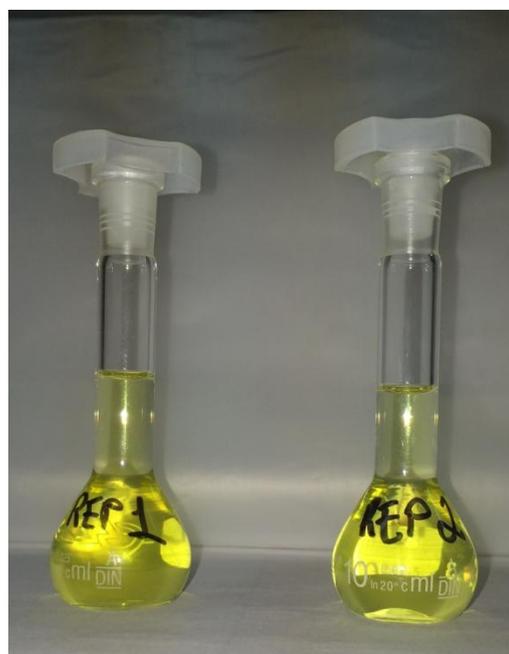
A etapa seguinte consistiu na saponificação da amostra com volume igual de solução metanólica de KOH (10%), durante aproximadamente 16h, à temperatura ambiente e coberta com papel alumínio para proteção contra a luz.

Após essa etapa, foi conduzido um novo procedimento de partição de forma similar ao anteriormente descrito. Todo o extrato saponificado foi lentamente adicionado a um funil de separação contendo volume adicional de éter de petróleo e lavado com água até a remoção completa do álcali (pH próximo da neutralidade, medido com fita de pH a cada lavagem com água). O extrato saponificado livre de KOH foi concentrado em evaporador rotativo, em temperatura próxima de 30°C, monitorada de forma a não exceder 37°C, temperatura a partir da qual ocorre degradação dos carotenoides.

Os aspecto final da solução concentrada em rota-evaporador pode ser observado na Figura 5. O balão de fundo redondo foi lavado com éter de petróleo e os carotenoides foram ressuspensos em balão volumétrico de 10 mL (Figura 6) para posterior leitura a 450 nm em espectrofotômetro.



**Figura 5.** Solução de carotenoides após concentração em evaporador rotativo  
*Fonte: acervo do autor*



**Figura 6.** Solução de carotenoides diluídos em éter de petróleo em balão volumétrico de 10 mL  
*Fonte: acervo do autor*

### 3.2.3 Extração saponificada assistida por ultrassom

Para avaliação da influência do ultrassom na extração de carotenoides, foi utilizado um equipamento do tipo sonda (Sonics e Materials, Inc., modelo VCX750, Newtown, Estados Unidos). Dois solventes diferentes foram empregados. O primeiro solvente, acetona, foi utilizado com a finalidade de comparar os teores totais de carotenoides resultantes da extração com e sem a aplicação do ultrassom. Em um segundo momento, foi investigado o comportamento do etanol, com o objetivo de estudar a eficiência de um solvente menos tóxico que a acetona na extração de carotenoides convencional e assistida por ultrassom.

A extração assistida por ultrassom ocorreu da seguinte forma: uma amostra de 9 g da farinha da casca de maracujá foi pesada em béquer, vertida para uma célula de vidro encamisada e posicionada sobre um agitador magnético (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, modelo 752A, São Paulo, Brasil). Após a adição de 90 mL de solvente, a amostra foi submetida a dez minutos de extração assistida por ultrassom, na temperatura próxima de 30 °C, utilizando um banho termostático (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, modelo Alpha RA 12, Lauda-Königshofen, Alemanha).

Após a extração, a amostra foi centrifugada (Eppendorf AG, modelo MiniSpin®, Hamburgo, Alemanha) a 13.400 rpm por cinco minutos. Em seguida, 10 mL do sobrenadante foi recolhido e particionado em funil de separação com éter de petróleo, em procedimento análogo à partição realizada na extração exaustiva. Da mesma forma, o extrato final foi saponificado durante uma noite, submetido novamente à partição em éter e concentrado em evaporador rotativo. Após ser ressuspenso em éter de petróleo em balão volumétrico de 5 mL, foi feita a leitura por espectrofotometria a 450 nm.

### 3.3 Quantificação dos carotenoides totais

As soluções de carotenoides foram analisadas em espectrofotômetro (PG Instruments Limited, modelo T80, Leicestershire, Reino Unido) através de varredura entre 350 e 700 nm, utilizando éter de petróleo como referência. Os carotenoides totais foram expressos em microgramas por grama de amostra e determinados segundo a Equação 1, com coeficiente de absorvidade igual a 2592 ( $E_{1cm}^{1\%}$ ) referente ao  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo, conforme proposto por DAVIES (1976).

$$CT (\mu g. g^{-1}) = \frac{Abs.Vol.10^4}{E_{1cm}^{1\%}.m} \quad (\text{Equação 1}),$$

onde  $CT$  = Carotenoides totais;  $Abs$  = Absorbância a 450 nm; Volume = Volume final da diluição (mL);  $E_{1cm}^{1\%}$  = coeficiente de absorvidade do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo a 450 nm correspondente a 2592;  $m$  = massa da amostra

Após o cálculo pela Equação 1, as concentrações finais foram convertidas para concentração de carotenoides em base seca, utilizando a umidade da farinha da casca de maracujá, previamente determinada por gravimetria no Laboratório de Tecnologia e Processos em Alimentos (LATEPA) da UFRGS, no valor de 5,73 % (m/m).

### 3.4 Análise estatística

Os valores de concentração obtidos nas diferentes extrações realizadas foram submetidos à análise estatística com auxílio do Microsoft Excel. Os valores médios obtidos para cada experimento, que foram realizados em duplicata ou triplicata, foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey com um grau de significância de 95 %. Com essas análises, foi possível determinar a significância estatística dos resultados e obter uma comparação entre os experimentos.

## 4 Resultados e Discussões

### 4.1 Determinação do número de extrações exaustivas

A determinação do número de extrações exaustivas foi possível através da comparação visual do resíduo acetônico de todas as extrações realizadas, que iam sendo transferidos para béquer e comparados até que houvesse a perda total de cor (indicativo de total remoção dos carotenoides). Foram realizadas 14 extrações no total, cujos resíduos acetônicos recolhidos, a título de comparação, podem ser observados na Figura 7.

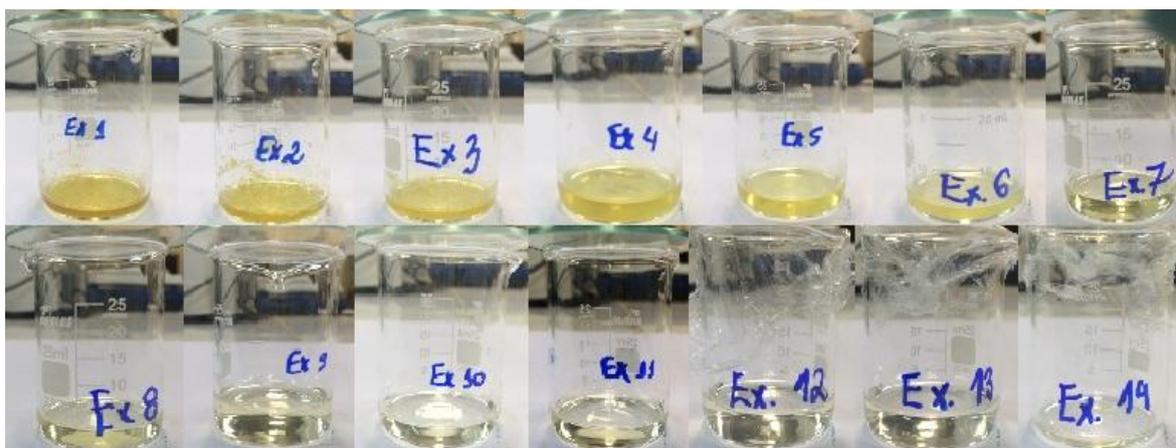


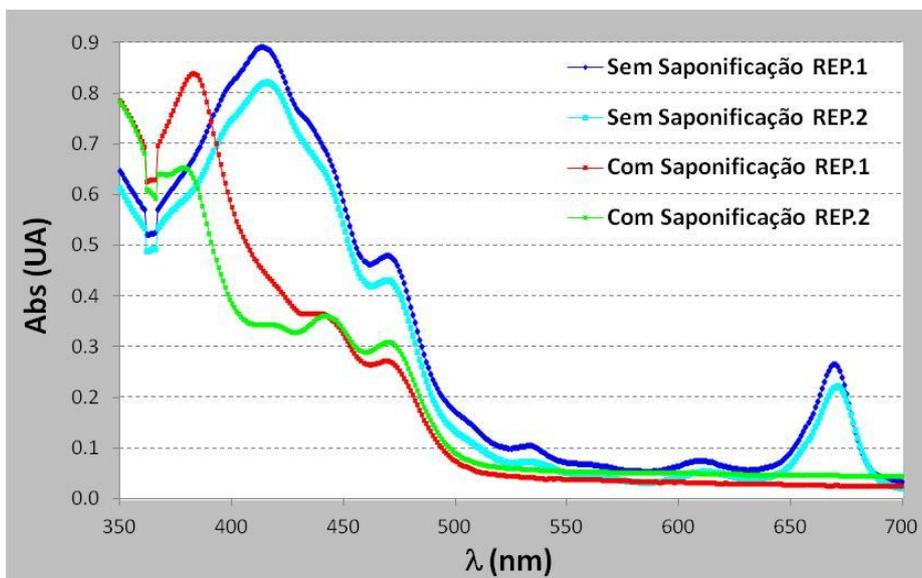
Figura 7. Comparação entre os resíduos acetônicos de cada extração

Foi então estabelecido o número de dez extrações exaustivas para a próxima etapa experimental, pois foi observado que a partir da décima extração não havia mais mudança significativa de cor do extrato acetônico, indicando que todos os carotenoides já haviam sido extraídos.

### 4.2 Teor de carotenoides totais

#### 4.2.1 Extração exaustiva com e sem saponificação

A Figura 8 apresenta os espectros de absorção, na faixa de comprimento de onda entre 350 e 700 nm, gerados nas análises das amostras referentes à extração exaustiva com e sem saponificação, realizados em duplicata. Observa-se que os espectros representativos das extrações não saponificadas (curvas azul escuro e turquesa) apresentam maiores valores de absorbância em comparação com as amostras saponificadas (curvas verde e vermelha). Diante destes resultados, observou-se a presença de interferentes nas amostras sem saponificação. Utilizando o valor de absorbância no comprimento de onda de 450 nm, para a extração exaustiva sem saponificação, foi encontrado o valor médio de  $7,68 \pm 0,43$   $\mu\text{g}$  de carotenoides por grama de farinha da casca de maracujá em base seca. Na extração com saponificação, por sua vez, obteve-se uma concentração de carotenoides de  $4,48 \pm 0,1$   $\mu\text{g}$   $\beta$ -caroteno/g farinha (bs).



**Figura 8.** Espectros de absorção referentes às extrações exaustivas com e sem saponificação

Muitos autores retratam a etapa de saponificação como necessária para remoção de compostos interferentes na análise no comprimento de onda de quantificação dos carotenoides. Esses compostos consistem em lipídios e clorofilas hidrolisadas, que estão presentes nas amostras sem saponificação devido à liberação do grupo fitol. Dessa forma, o objetivo é extrair somente os carotenoides e deixá-los livres de formas conjugadas, ácidos graxos e lipídios que dificultam a análise (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014 apud MURILLO *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos para a extração exaustiva de carotenoides demonstram que a etapa de saponificação é, de fato, importante para um resultado consistente na análise de carotenoides. O teor de carotenoides totais encontrado na extração exaustiva sem saponificação foi significativamente maior que o da amostra saponificada, indicando que existem compostos indesejados sendo contabilizados naquela, o que geraria uma quantificação equivocada de carotenoides da casca do maracujá se a etapa de saponificação fosse suprimida. Esse resultado confirma o que já concluíram estudos anteriores a respeito da interferência da etapa de saponificação. Em um estudo recente sobre azeitonas, Sagratini *et al.* (2013) encontrou menores valores de  $\beta$ -caroteno após saponificação. De forma similar, Divya *et al.* (2012) comparou a concentração de  $\beta$ -caroteno em coentro antes e após saponificação e observou a redução de 20 a 30% no conteúdo de  $\beta$ -caroteno e de 50% no teor de outros carotenoides presentes.

Em um estudo sobre a composição de carotenoides em cinco lotes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) *in natura*, Silva e Mercadante (2002) apresentaram valores entre 15,36 e 27,14  $\mu\text{g/g}$  para o teor total de carotenoides extraídos com saponificação. Esses valores, contudo, não podem ser equiparados ao resultado deste trabalho, pois representam o teor de carotenoides para a totalidade do fruto maracujá, ou seja, polpa e casca. No que tange à quantificação de carotenoides da casca de maracujá, não foram encontrados trabalhos na literatura que tenham abrangido todas as condições descritas neste trabalho, porém existem registros do teor de carotenoides extraídos em similares condições. Oliveira (2015), por exemplo, estudou a composição e realizou a caracterização de diferentes amostras de farinha da casca do maracujá, encontrando valores que variaram entre  $5,29 \pm 0,19$  e  $8,03 \pm 0,51$   $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/g

para a extração de carotenoides sem saponificação de amostras de casca de maracujá desidratadas a 25°C por 72h. Essa faixa de valores é representativa do resultado encontrado no presente trabalho para a extração sem saponificação, que consiste em  $7,7 \pm 0,4$  µg de β-caroteno por grama de farinha da casca de maracujá (base seca).

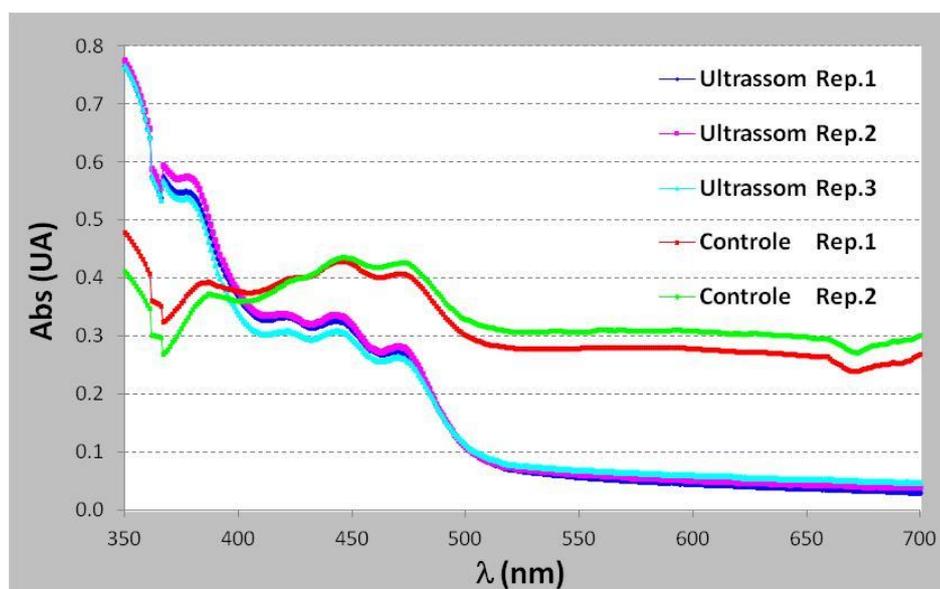
#### 4.2.2 Extração assistida por ultrassom

Após a experiência com a extração exaustiva, em razão do grande número de etapas experimentais e possíveis perdas de carotenoides na execução destas, os experimentos com ultrassom utilizando acetona como solvente foram conduzidos em triplicata, para evitar ensaios com coeficiente de variação muito alto entre si. Em um segundo momento, optou-se por realizar a extração com etanol assistida por ultrassom em duplicata, a fim de otimizar o tempo dos experimentos, pois se entendeu que duas repetições eram suficientes para uma análise consistente.

Em um estudo sobre a influência das condições do ultrassom no rendimento da extração de *all-trans*-β-caroteno de cascas de frutas cítricas, Sun *et al.*, (2011) investigaram diversos parâmetros como a intensidade ultrassônica do aparelho, o tempo e temperatura de extração e a razão soluto:solvente. De forma similar, Dey e Rathod (2013) utilizaram os mesmos e outros parâmetros de estudo na extração assistida por ultrassom do β-caroteno da cianobactéria *Spirulina platensis*. Com base nestes estudos, as condições fixadas para a realização dos experimentos com ultrassom foram: tempo de extração e aplicação do ultrassom de dez minutos, com intensidade de potência de 90% da capacidade do equipamento (equivalente a 510 W/cm<sup>2</sup>), temperatura mantida em torno de 30°C e razão soluto:solvente de 1:10.

##### 4.2.2.1 Extração com Acetona

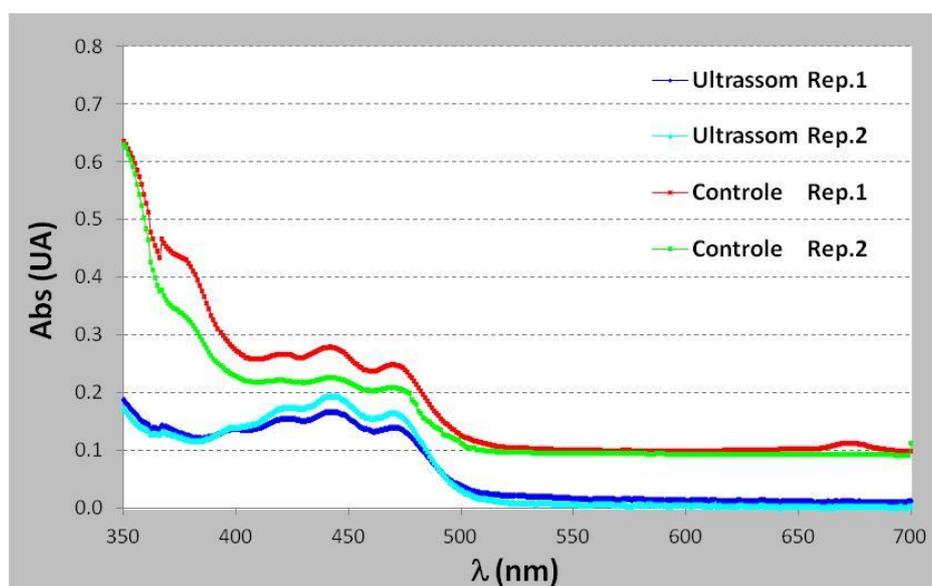
Com o objetivo de avaliar a influência do ultrassom na extração de carotenoides da casca de maracujá, primeiramente foi utilizado o mesmo solvente empregado na extração exaustiva: a acetona. A Figura 9 apresenta os espectros de absorção da extração controle, feita com o ultrassom desligado (curvas verde e vermelha), e da extração assistida por ultrassom (curvas azul escuro, turquesa e rosa). A partir dos valores de absorção a 450 nm, foram encontrados os valores médios de  $4,37 \pm 0,07$  µg/g para os experimentos controle e  $3,16 \pm 0,13$  µg/g para os ensaios com ultrassom. Os resultados obtidos revelaram que o ultrassom, nas condições testadas, não melhora o rendimento da extração, visto que a quantidade de carotenoides extraída foi maior no experimento controle do que no experimento sob efeito do ultrassom.



**Figura 9.** Espectros de absorção referentes às extrações controle e assistida por ultrassom utilizando acetona como solvente

#### 4.2.2.2 Extração com Etanol

Com a finalidade de investigar o comportamento de um solvente menos tóxico que a acetona, a segunda etapa da extração de carotenoides assistida por ultrassom foi realizada utilizando etanol, que é classificado pela FDA (American Food and Drug Administration) como um solvente GRAS (do inglês, “generally recognized as safe”). A Figura 10 apresenta os espectros de absorção gerados nas análises da extração controle, feita com o ultrassom desligado (curvas verde e vermelha), e da extração assistida por ultrassom (curvas azul escuro e turquesa). A partir dos valores de absorção a 450nm, foram encontrados os valores médios de  $2,06 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$  para os experimentos controle e  $1,72 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$  para os ensaios com ultrassom. O resultados obtidos revelaram um menor teor de carotenoides totais, em comparação com a acetona, para a extração convencional com etanol, e a confirmação de um valor ainda menor para a extração assistida por ultrassom.



**Figura 10.** Espectros de absorção referentes às extrações controle e assistida por ultrassom utilizando etanol como solvente

## 4.2.2.3 Discussão dos resultados

Os resultados de todos os experimentos de extração realizados estão apresentados na Tabela 3, que contém o valor médio entre a duplicata de cada experimento (triplicata para a extração com acetona assistida por ultrassom), o desvio padrão e a indicação das diferenças significativas entre as médias.

**Tabela 3.** Teores de carotenoides totais das extrações realizadas

<b>Tipo de Extração</b>	<b>Teor de carotenoides (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Exaustiva sem Saponificação	7,68 <sup>a</sup> $\pm$ 0,43 <sup>*</sup>
Exaustiva com Saponificação	4,48 <sup>b</sup> $\pm$ 0,10 <sup>*</sup>
Controle com Acetona	4,37 <sup>b</sup> $\pm$ 0,075
Ultrassom com Acetona	3,16 <sup>c</sup> $\pm$ 0,13 <sup>**</sup>
Controle com Etanol	2,06 <sup>d</sup> $\pm$ 0,11 <sup>*</sup>
Ultrassom com Etanol	1,72 <sup>d</sup> $\pm$ 0,18 <sup>*</sup>

\*Valores médios  $\pm$  desvio padrão de 2 repetições

\*\*Valores médios  $\pm$  desvio padrão de 3 repetições

\*\*\*Diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Inicialmente, pode-se ressaltar que os valores de concentração encontrados para a extração controle e exaustiva com saponificação utilizando acetona como solvente não diferem significativamente entre si, indicando que o processo exaustivo, baseado na maceração da farinha da casca do maracujá, pode ser substituído pela extração convencional, que se baseia no simples contato entre soluto e solvente sob agitação. Esse fato é bastante relevante, pois a extração exaustiva é experimentalmente mais dispendiosa em termos de tempo e de quantidade de solvente utilizada.

No processo de extração, diversos fatores podem afetar a eficiência da extração de carotenoides, como: a temperatura em que a extração é conduzida, a razão sólido:líquido e a natureza do solvente utilizado (PINELO *et al.*, 2005). O método convencional de extração apresenta alguns aspectos inconvenientes como a larga quantidade de solvente utilizada e o longo tempo de extração. Por isso, muitos autores têm testado novas técnicas para a extração de carotenoides, destacando-se entre elas o ultrassom (DEY e RATHOD, 2012). Assim como na extração convencional, os parâmetros utilizados na extração assistida por ultrassom também afetam significativamente o rendimento final e, nesse caso, outros fatores exercem influência, como: a potência do equipamento, o tempo de aplicação do ultrassom e também o comprimento de sonda que é colocado em contato com a solução.

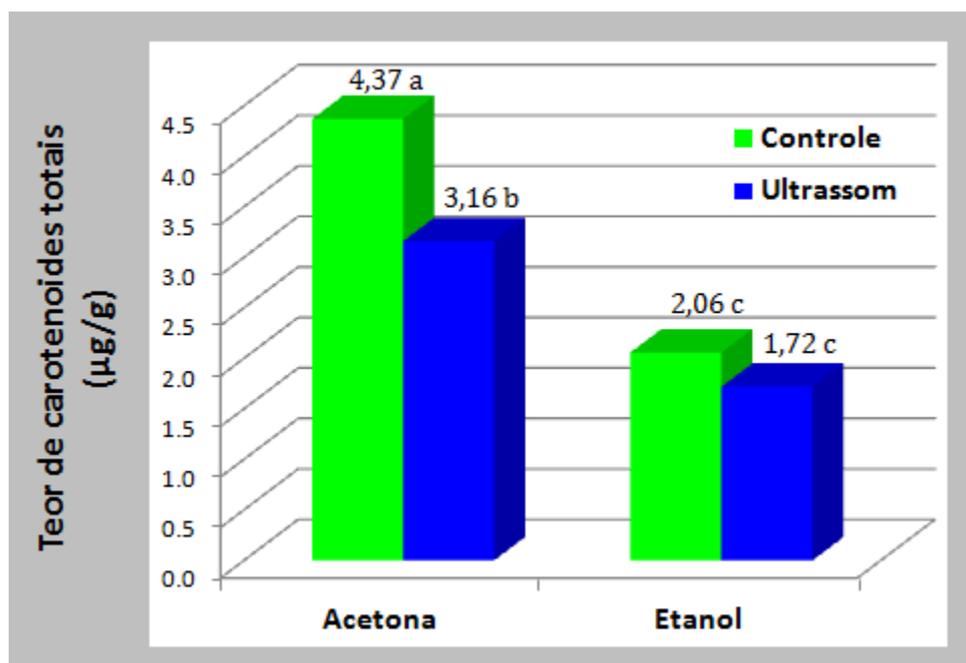
Muitos estudos vêm avaliando o comportamento do ultrassom na extração de material nutritivo, como lipídios, proteínas, condimentos, óleos essenciais e compostos bioativos (flavonoides, carotenoides, polissacarídeos, entre outros) (SUN *et al.*, 2011). Na literatura, a maioria dos estudos atribui ganhos positivos à aplicação do ultrassom na extração. No entanto, as diferenças de complexidade e de estrutura dos diversos materiais encontrados na natureza, bem como os diversos parâmetros que podem ser

variados na realização da técnica e o próprio mecanismo complexo de ação do ultrassom, são hipóteses que podem explicar as diferenças de comportamento deste na extração.

Diferentemente da extração convencional, cuja energia térmica atua do meio externo sobre a solução, a extração por ultrassom opera de dentro para fora, através da cavitação acústica, que gera microbolhas que provocam mudanças internas na matriz biológica. Com a atuação contínua do campo acústico, as bolhas se tornam instáveis e entram em colapso resultando em efeitos mecânicos e condições extremas de temperatura e pressão (MASON *et al.*, 2005).

Embora a cavitação ultrassônica seja citada como o principal fator atribuído à melhoria da eficiência de extração (SUN *et al.*, 2011), como limitações deste fenômeno já foram descritos o possível dano pelos radicais livres gerados e a modificação, por vezes indesejada, da estrutura e composição do material processado (FELLOWS, 2006). Ainda, Kadam *et al.* (2015), em estudo sobre proteínas alimentares e peptídeos bioativos, descreveu que a utilização de altas potências no tratamento com ultrassom (como no presente trabalho, em que foi utilizado 90% da capacidade máxima do equipamento) pode causar condições de altíssimas temperatura e pressão que, por sua vez, podem alterar a natureza estrutural dos compostos. Essas podem ser possíveis explicações para o reduzido teor de carotenoides – que podem ter sofrido mudanças de estrutura ou mesmo degradação – resultante da extração assistida por ultrassom com ambos solventes do presente estudo. Assim, é primordial que pesquisas continuem a ser desenvolvidas, a fim de avaliar as condições de tratamento do ultrassom nas suas diferentes aplicações para que resultados ótimos sejam alcançados.

Na Figura 11 podem ser observadas as diferenças nos teores de carotenoides resultantes dos dois solventes estudados no presente trabalho. As propriedades físico-químicas (como tensão superficial, viscosidade, pressão de vapor e temperatura de ebulição), além da afinidade do soluto com o solvente, são fatores que afetam significativamente o rendimento final de extração, sendo a pressão de vapor o fator mais importante dentre esses (SUN *et al.*, 2011 apud HEMWIMOL, 2006). Ainda, Dey e Rathod (2012) afirmaram que geralmente se observa uma menor eficiência em extrações com solventes de maior pressão de vapor, e que a contribuição de fatores como a polaridade e viscosidade do solvente também devem ser considerada. Na extração assistida por ultrassom de  $\beta$ -caroteno de *Spirulina platensis*, Dey e Rathod (2012) constataram que solventes mais polares aumentam a permeabilidade da parede celular da microalga, assim como a baixa viscosidade incrementa a difusão do solvente através da matriz celular e não dificulta o fenômeno da cavitação ultrassônica. Por esses motivos, poderia se esperar um alto teor de carotenoides na extração com etanol, pois este possui pressão de vapor menor que a da acetona (5,95 kPa versus 24,6 kPa) e também menor viscosidade (0,32 cP em comparação a 1,2 cP). Entretanto, por serem diferentes materiais biológicos em avaliação, não é possível garantir esse comportamento. Com relação à extração convencional de *all-trans*- $\beta$ -caroteno de cascas de frutas cítricas, por exemplo, Sun *et al.* (2011) atribuíram ao etanol o menor rendimento comparado a outros quatro solventes, conferindo a ele uma fraca afinidade com *all-trans*- $\beta$ -caroteno.



**Figura 11.** Teores de carotenoides totais para extrações controle e assistida por ultrassom utilizando acetona e etanol  
*Diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )*

No geral, não existe uma seleção de solvente que esteja isenta de falha no que diz respeito à extração de carotenoides, porém é importante o conhecimento da polaridade dos carotenoides que estão sendo extraídos, a fim de direcionar a escolha do solvente. Em razão do grande volume de solvente que é geralmente utilizado na extração, a toxicidade do solvente selecionado também deve ser considerada. A influência do tempo e número de extrações, a estabilidade dos componentes no extrato e o solvente utilizado na extração são tópicos recorrentes na análise de carotenoides. Além disso, em razão da ampla variabilidade de conteúdo e composição de carotenoides em alimentos e suas diferentes polaridades, uma otimização contínua para as diferentes matrizes e analitos se faz necessária (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014).

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho estudou a extração de carotenoides da farinha da casca do maracujá assistida por ultrassom. Com base nos resultados, é possível afirmar que a casca do maracujá contém carotenoides e que eles podem ser extraídos para um uso futuro, representando uma solução para o aproveitamento desse resíduo agroindustrial.

Com relação à comparação entre os métodos de extração com e sem saponificação, foram encontrados, respectivamente, os valores de  $4,48 \pm 0,1$  e  $7,68 \pm 0,43$   $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno por grama de farinha da casca de maracujá, corroborando o fato de que a etapa de saponificação é necessária para uma análise consistente de carotenoides.

Por apresentarem valores de concentração sem diferença estatística entre si ( $4,48 \pm 0,10$  e  $4,37 \pm 0,075$   $\mu\text{g/g}$ ), foi concluído, ainda, que o processo de extração exaustiva com acetona pode ser substituído pela extração convencional, promovendo otimização do tempo demandado no procedimento experimental e diminuição do volume de solvente utilizado.

Foi possível observar que, dentre os solventes estudados, a acetona possui melhor eficiência na extração, gerando um teor de carotenoides de  $4,37 \pm 0,07$   $\mu\text{g/g}$  para os experimentos controle e  $3,16 \pm 0,13$   $\mu\text{g/g}$  para os ensaios assistidos por ultrassom. Em contrapartida, os valores observados na extração com etanol foram de  $2,06 \pm 0,11$   $\mu\text{g/g}$  para os experimentos controle e  $1,72 \pm 0,18$   $\mu\text{g/g}$  para os ensaios com ultrassom, indicando que o ultrassom não exerce influência significativa na extração com etanol. Esses dados obtidos evidenciaram que a técnica de ultrassom, nas condições testadas, não promove melhoria no rendimento da extração de carotenoides, para ambos solventes empregados.

Uma sugestão para trabalhos futuros é a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação qualitativa dos carotenoides presentes na casca do maracujá. Adicionalmente, por exercer influência no teor de carotenoides extraídos, outros parâmetros de extração poderiam ser estudados a fim de se buscar maiores concentrações de carotenoides, como: a razão entre soluto:solvente, tempo e temperatura de extração, além do uso de outros solventes individuais ou combinados. Também seria interessante investigar o tratamento com ultrassom em condições diferentes das estudadas no presente trabalho, como uma menor intensidade de potência em um menor intervalo de tempo, a fim de encontrar os parâmetros ótimos na extração de carotenoides da casca do maracujá assistida por ultrassom.

## 6 Referências

AHMAD-QASEM, M.H. et al. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 120-129, 2013.

AMAN, R., SCHIEBER, A., REINHOLD, C. J. *Agric. Food Chem.*, 53, 9512–9518, 2005.

AMORIM-CARRILHO, K.T. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, pp.49–73, 2014.

ARVAYO-ENRÍQUEZ et al. Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5(12), p.2916, 2013.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal* v. 9, p. 1551- 1558, 1995.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. *Carotenoids Hand Book*. Birkhäuser, Basel, Switzerland, 2004.

BUNDEESOMCHOK, K., FILLY, A., RAKOTOMANOMANA, N. Extraction of a-mangostin from *Garcinia mangostana* L. using alternative solvents : Computational predictive and experimental studies. *LWT - Food Science and Technology*, 65, pp.297–303, 2015.

CARRILHO, K.T.A, YUSTY, M.A.L., HERNANDEZ, J.L. Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing, *CyTA J. Food* 10. 321–324, 2012.

CAZARIN et al. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.9, p.1699-1704, 2014.

CHAGAS, A.L. Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizando CO<sub>2</sub> de fermentação de cerveja. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil, 2014.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K.; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 541, 2001.

CHEMAT et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 813–835, 2011.

CHEMAT, F., VIAN, M. A., CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627, 2012.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. (Ed.). 2. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. London: Academic, p.38-65, 1976.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O.; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11, 265, 2001.

DENG et al. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), pp.148–153, 2010.

DEY, S., RATHOD, V.K. Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), pp.271–276, 2013.

DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), pp.1–23, 2004.

DIVYA, P., PUTHUSSERI, B., NEELWARNE, B., Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. *Food Research International*, 45(1), pp.342–350, 2012.

DOLATOWSKI, Z. J.; STASIAK, D. M. Ultrasonically Assisted Diffusion Processes. In: LEBOVKA, N.; VOROBIEV, E., *et al* (Ed.). *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. Estados Unidos: CRC Press, cap. 4, p.123 – 143, 2012.

EMBRAPA CERRADOS – Maracujá: germoplasma e melhoramento genético/editado por Fábio Gelape Faleiro, Nilton Tadeu Vilela Junqueira, Marcelo Fideles Braga. – Planaltina, DF, 2005.

ESTEBAN et al. Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119, pp.63–75, 2015.

FALKOWSKI, P.G.; RAVEN, J.A. *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Sci., Malden, Mass. USA, 1997.

FELLOWS, P. J. *Tecnologia do processamento de alimentos*: Woodhead Publishing Ltd. 602 p, 2006.

FENG, H., YANG, W. *Ultrasonic Processing*, in: *Nonthermal Processing Technologies for Food*, Wiley-Blackwell, 2010, pp. 135–154, 2010.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação das metodologias para determinação de pró-vitamina A. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 29, p. 17-24, 1993.

GONZÁLEZ-CENTENO et al. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, pp.506–514, 2015.

GOUVEIA, L., RAYMUNDO, A., BATISTA, AP., SOUSA, I., EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *Eur Food Res Technol* 222: 362–367, 2006.

GUERTZENSTEIN, S.M.J., SABAA-SRUR, A.U.O. Uso da casca do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) cv amarelo como fonte de fibra na alimentação de ratos (*Rattus norvegicus*) normais e diabéticos. Anais do III Simpósio Latino Americano, 1999.

HEMWIMOL, S., PAVASANT, P., SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrason. Sonochem.* 13, 543–548, 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Produção Agrícola Municipal de 2012, Rio de Janeiro, v. 39, p.1-101, 2013.

ISHIDA, B.K., CHAPMAN, M.H. Effects of a hydrodynamic process on extraction of carotenoids from tomato. *Food Chemistry*, 132(3), pp.1156–1160, 2012.

ISHIMOTO, F. Y. et al. Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, V. 9, n. 2, 2007.

KADAM, S.U. et al. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), pp.60–67, 2015.

KHAN et. al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel, *Food Chem.* 119, 851–858, 2010.

KRISHNASWAMY, K., ORSAT, V., GARIÉPY, Y., THANGAVEL, K. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 441–455, 2013.

LI et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, pp.12–18, 2013.

LIMA, M. M. Competitividade da cadeia produtiva do maracujá na região integrada de desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno-Ride. 2001. 171 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2001.

LIMBO, S., TORRI, L., PIERGIOVANNI, L. J. *Agric. Food Chem.*, 55, 5238–5245, 2007.

LLOYD, P. J.; VAN WYK, J. Introduction to Extraction in Food Processing In: LEBOVKA, N.; VOROBIEV, E., et al (Ed.). *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* Estados Unidos: CRC Press, cap. 1, p.1 – 24, 2012.

LÓPEZ-VARGAS et al. Chemical, Physico-chemical, Technological, Antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, 51(2), pp.756–763, 2013.

LOUSADA JÚNIOR, J. E. et al. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agronômica*, Ceará, v. 37, n. 1, p. 70 -76, 2006.

LUENGO et al. Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Separation and Purification Technology*, 136, pp.130–136, 2014.

MARKET FORECAST. Biopigments: biotech pigments poised to challenge synthetic colors; biopigment market could reach \$350 million by 2000. *Industrial Bioprocessing*, 1992.

MASON, T. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), pp.S253–S260, 1996.

MASON et al. Application of ultrasound. *Emerging technologies for food processing*, pp.323–351, 2005.

MCCLEMENTS, D.J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6(9), pp.293–9, 1995.

MERCANDANTE, A. Z., BRITTON, G., RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B., Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (grade III), pp.4102–4106, 1998.

MURILLO et al., Native carotenoids composition of some tropical fruits, *Food Chem.* 140, 825–836, 2013.

OLIVEIRA et al. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 22, n. 3, p.259-262, 2002.

OLIVEIRA, C.F. Aplicação de diferentes tecnologias na extração de pectina presente na casca do maracujá. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil, 2015.

OLSON, J.A. Biological actions of carotenoids. **Journal of Nutrition**, v. 119, p 94-95, 1989.

PÉRINO-ISSARTIER, S., ZILL-E, H., ABERT-VIAN, M., CHEMAT, F. Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaerhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1020–1028, 2011.

PERTUZATTI et al. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), pp.259–263, 2015.

PINELO et al. Optimization of continuous phenol extraction from byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), pp.109–117, 2005.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. A. J. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, v. 77, n. 1, p. 57-63, 2006.

PORTO-FIGUEIRA et al. Profiling of passion fruit volatiles: An effective tool to discriminate between species and varieties. *Food Research International*, 2015.

RAMOS, A.T., CUNHA, M.A.L., SABAA-SRUR, A.U.O., Pires, V.C.F., Cardoso, M.A.A., Diniz, M.F.M, Medeiros, C.C.M. Uso de *Passiflora edulis flavicarpa* na redução do colesterol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 592-597, 2007.

RANVEER, R.C., PATIL, S.N., SAHOO, A.K. Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste, *Food Bioprod. Process.* 91. 370–375, 2013.

RIVERA, S., CANELA, R. Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. *Molecules*, 17(12), pp.11255–11268, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), pp.726–740, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington DC: International Life Sciences Institute (ILSI) Press, 1999. 64 p, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *Journal of Micronutrient Analysis*, v. 5, p. 191-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; AMAYA-FARFAN, J. Estado actual de los metodos analiticos para determinar provitamina A. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 42, p.180-191, 1992.

RODRIGUES-AMAYA, D. B., KIMURA, M., AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos /Brasilia: MMA/SBF, 2008.

ROMBAUT, N., TIXIER, A. S., BILY, A., CHEMAT, F. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2014.

SAGRATINI et al. Simultaneous Determination of Squalene,  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -Carotene in Table Olives by Solid Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), pp.54–60, 2012.

SARKAR, C.R., LIMA, B. B., GOSWAMI, B.C. A comparative study of carotenoid extraction from algae in different solvent system, *Asian J. Plant Sci.* 546–549, 2012.

SCHWARTZ, C.R.M. Otimização da produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. Dissertação (Mestrado). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, RS, Brasil, 2010.

SEIXAS et al. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, 38, pp.186–192, 2014.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNAN, E.; *Trends in Biotechnology*, 23, 193, 2005.

SILVA et al. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) byproduct intake in antioxidant status of Wistar rats tissues. *LWT - Food Science and Technology*, 59, pp.1213–1219, 2014.

SILVA, S.R., MERCADANTE, A.Z. Composição de carotenoides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22(3), pp.254–258, 2002.

SOUZA et al. Carotenoides totais e vitamina A de cucurbitáceas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. *Ciência Rural*, 42(5), pp.926–933, 2012.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997.

SPIGNO, G., TRAMELLI, L., DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), pp.200–208, 2007.

SUN, Y. et al. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- $\beta$ -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), pp.243–249, 2011.

SUSLICK, K.S. Homogeneous sonochemistry, in: K.S. Suslick (Ed.), *Ultrasound. Its Chemical, Physical, and Biological Effects*, VCH Publishers, New York, pp. 123–163, 1988.

TABARAKI, R., HEIDARIZADI, E., BENVIDI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.* 98, 16–23, 2012.

TULBENTCI, H. S. Extraction of rapeseed, linseed, safflowerseed and tobaccoseed with a new laboratory extractor. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63, 1465–1469, 1986.

UENOJO, M. et al. Carotenoides: Propriedades, Aplicações E Biotransformação Para Formação De Compostos De Aroma. *Química Nova*, 30(3), pp.616–622, 2007.

VANDERPLANK, J. *Passion flowers*. Massachusetts: MIT Press, p. 224 , 1996.

VILA, M.; COUSO, I.; LEO, N. R. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochemistry* v. 43, p. 1147–1152, 2008.

WHO, 2009. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. World Health Organization, Geneva.

WIJNGAARD, H.H., BALLAY, M., BRUNTON, N. The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids, *Food Chem.* 133, 1123–1130, 2012.

WINTHERHALTER, P.; ROUSEFF, R. Carotenoid-Derived Aroma Compounds. American Chemical Society: Washington D. C., cap. 1, 2002.