

CARMEN WOBETO

**EXTRAÇÃO DE ESQUALENO DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO
ÓLEO DE SOJA MODIFICADO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO
SUPERCRÍTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

W837e
2007

Wobeto, Carmen, 1967-

Extração de esqualeno do destilado da desodorização do óleo de soja modificado utilizando dióxido de carbono supercrítico / Carmen Wobeto. – Viçosa : UFV, 2007. xi, 72f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Júlio Maria de Andrade Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 61-68.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Esqualeno - Separação. 3. Óleo de soja. 4. Desodorização. 5. Cromatografia a gás. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.022

CARMEN WOBETO

**EXTRAÇÃO DE ESQUALENO DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO
ÓLEO DE SOJA MODIFICADO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO
SUPERCRÍTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de março de 2007.

Alexandre Gurgel

Angelita Duarte Corrêa

José Benício Paes Chaves
(Co-Orientador)

Marco Túlio Coelho Silva
(Co-Orientador)

Júlio Maria de Andrade Araújo
(Orientador)

À minha mãe por ser meu porto seguro e pela fé inabalável.
Aos meus irmãos, Haidi, Márcia, Eliane e Elton, pela alegria de tê-los.
Aos meus sobrinhos queridos, Rafael, Roberta, Norton, Ricardo, Dener,
Gabriel, Laura, Luiza e Heitor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de amor, misericórdia e luz.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) por ter permitido meu afastamento para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Júlio Maria de Andrade Araújo, pela orientação e pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos professores Marco Túlio Coelho Silva e José Benício Paes Chaves, pela colaboração, conselhos e incentivo.

A todos os funcionários do DTA, em especial a Geralda, Carlos Antônio (Pio), Thiago, Adão e Juarez pelo convívio e auxílio constante.

Ao Marcondes, pela amizade, pelo privilégio de conhecê-lo e pelos ensinamentos em cromatografia e extração supercrítica

Aos amigos colegas do curso, Cláudia, Fabiana, Érica, Romilda, Ana Cláudia, Alexandre, João Tomaz, Aline, Márcia, Joecy, Omar, Aline Fonseca, Fabrícia, Cida, Selene, Maurício, Baltazar, Júnia, Roberta, Vânia, Carol, Michelle, Susana e Gerusa pelo convívio amigo, pela troca de experiências e auxílio em todas as horas.

À Adriana pelo auxílio nas análises e por sua presença sempre agradável, amável e cooperativa.

Aos amigos colegas da UNEMAT, especialmente a Leonarda, Núbia, Cassiano, Santino, Vanessa e Milton, pela colaboração e apoio.

As amigas da república, Rosimar, Michelle, Elaine e Juliana, por terem me recebido com tanto carinho.

Aos meus amigos, irmãos do coração, Sandra, Oscar, Flávia e Carla, pelo privilégio de tê-los como companheiros de caminhada, pelos momentos felizes e pelo apoio nas dificuldades.

Ao Juliano pelo auxílio na redação deste trabalho, pelas sugestões e, principalmente, por ser meu anjo da guarda.

Aos meus cunhados José Luiz, Soi, Sérgio e minha cunhada Leila, por torcerem por mim.

Aos amigos trabalhadores do centro espírita Camilo Chaves, simplesmente por estarmos lado a lado.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Esqualeno: química, bioquímica e absorção.....	3
2.2. Ação antioxidante e mecanismos anticarcinogênicos do esqualeno.....	5
2.3. Ação hipolesterolemica do esqualeno.....	10
2.4. DDOS: uma fonte alternativa de esqualeno.....	11
2.5. Fundamentos da cristalização.....	14
2.6. Aplicações do processo de cristalização.....	17
2.7. Princípios da extração com fluido supercrítico.....	19
2.8. Processos de separação do esqualeno.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Preparação da matéria-prima.....	30
3.2. Seleção e caracterização química do DDOS centrifugado.....	30
3.2.1. Determinação quantitativa de esqualeno e semi-quantitativa de fitoesteróis e triglicerídios totais no DDOS centrifugado.....	31
3.2.2. Determinação de ácidos graxos livres no DDOS centrifugado.....	32

3.3. Concentração do esqualeno no DDOS por cristalização seguida de tratamento com Na_2CO_3	32
3.3.1. Cristalização.....	32
3.3.1.1. Delineamento experimental.....	34
3.3.2 Tratamento com Na_2CO_3	34
3.4. Extração com CO_2 -SC.....	34
3.4.1. Delineamento experimental.....	37
3.5. Análise cromatográfica do teor de esqualeno.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Seleção e caracterização do DDOS centrifugado.....	39
4.2. Modificações físico-químicas do DDOS.....	40
4.3. Extração do esqualeno com CO_2 -SC.....	45
4.3.1. Efeito da pressão e da temperatura sobre a extração do esqualeno.....	45
4.3.2. Efeito do fluxo do CO_2 , do TEE e do TED sobre a extração do esqualeno.....	50
4.4. Comparação do efeito dos tratamentos na concentração do esqualeno no DDOS.....	56
5. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
APÊNDICE.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

DDOS = destilado da desodorização do óleo de soja

CO₂-SC = dióxido de carbono supercrítico

FS = fluido supercrítico

MNC = massa não cristalizável

Cristalização/Na₂CO₃ = cristalização seguida de tratamento com Na₂CO₃

DDOSM = DDOS modificado por cristalização/Na₂CO₃

AGL = ácidos graxos livres

TG = triglicerídios

T = temperatura (°C)

T_c = temperatura crítica

p = pressão (bar)

p_c = pressão crítica

ESQ = esqualeno

F = fluxo de CO₂

TEE = tempo de extração estática

TED = tempo de extração dinâmica

CG = cromatografia em fase gasosa

RESUMO

WOBETO, Carmen, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007.
Extração de esqualeno do destilado da desodorização do óleo de soja modificado utilizando dióxido de carbono supercrítico. Orientador: Júlio Maria de Andrade Araújo. Co-Orientadores: Marco Túlio Coelho Silva e José Benício Paes Chaves.

Neste trabalho, foi investigada a extração analítica de esqualeno do destilado desodorizado de óleo de soja (DDOS), com dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC). A matriz foi inicialmente submetida a dois processos de modificação físico-químicas: cristalização a baixas temperaturas e tratamento com Na₂CO₃ (cristalização/Na₂CO₃). Foram testadas quatro temperaturas e dois tipos de solvente para a cristalização do DDOS. Verificou-se que a condição de cristalização que acarretou menor massa não cristalizável (MNC) foi a realizada em hexano seguida de acondicionamento em acetona a -40 °C. As modificações físico-química do DDOS reduziram em 41% os teores de fitoesteróis totais, removeram em 98,9% os ácidos graxos livres (AGL) e aumentaram a concentração de esqualeno em 84%. Durante a extração com CO₂-SC foram mantidas constantes as seguintes variáveis: quantidade de amostra (15 mg), solvente de lavagem do coletor (n-hexano), temperatura do

restritor (55 °C), temperaturas do coletor durante a extração (20 °C) e durante a reconstituição da amostra (55 °C). Para a otimização da extração com CO₂-SC, inicialmente foram avaliados os efeitos de três temperaturas (40, 50 e 60 °C) e três pressões (110, 157 e 281 bar). Verificou-se que a pressão mais elevada e a menor temperatura acarretaram o maior teor de esqualeno extraído (7,12 g/100 g), provavelmente devido a mais alta densidade do fluido (0,90 g/mL). Posteriormente, foram testados dois tempos de extração estática (TEE de 0 e 5 min), dois fluxos de CO₂ (1 e 1,5 mL/min) e três tempos de extração dinâmica (TED de 15, 20 e 25 min). Foi observado o maior teor de esqualeno (9,44 g/100 g), empregando-se o mais alto fluxo e os TEE e TED mais longos. Porém, os níveis de esqualeno (9,33 g/100 g) obtidos com, TEE de 5 min, TED de 15 min e fluxo de CO₂-SC de 1,0 mL/min, não diferiram significativamente. Como tempos e fluxos menores são economicamente mais viáveis, os parâmetros otimizadas para a extração com CO₂-SC foram: 40 °C, 281 bar, 0,90 g/mL, 5 min (TEE), 15 min (TED) e fluxo de CO₂ de 1,0 mL/min. A metodologia desenvolvida neste trabalho proporcionou um aumento de 2,8 vezes nos teores de esqualeno, portanto, recomenda-se o estudo da relação custo/benefício, assim como testá-la em escala piloto, para avaliar seu uso industrial.

ABSTRACT

WOBETO, Carmen, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2007.
Extraction of squalene in modified soy oil deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide. Adviser: Júlio Maria de Andrade Araújo.
Co-Advisers: Marco Túlio Coelho Silva and José Benício Paes Chaves.

In this work the analytical extraction of squalene in soy oil deodorization distillate (SODD) by supercritical carbon dioxide (CO₂-SC) was investigated. The matrix was previously submitted to crystallization at low temperatures and treatment with Na₂CO₃ (crystallization/Na₂CO₃). Four temperatures and two types of solvent were tested for crystallization of SODD. It was verified that the crystallization condition that yielded lower mass of non crystallizable (MNC) was storage in hexane and then in acetone, both at -40 °C. The physical-chemistry modifications of the SODD reduced in 41% the content of total phytosterols, also was removed 98,9% of free fatty acid (FFA) and the concentration of squalene increased in 84%. During the extraction with CO₂-SC the following variables were kept constant: amount sample (15 mg), sample reconstitution solvent (n-hexane), temperature of the restrictor (55 °C), temperatures of the collector during the extraction (20 °C) and during the reconstitution of the sample (55 °C). For the optimization of the extraction with CO₂-SC, the effect of three temperatures (40, 50 and 60 °C) and three pressures (110, 157 and 281

bar) was initially evaluated. It could be concluded that the highest pressure and the lowest temperature tested yielded the highest amount of extracted squalene (7.12 g/100 g), probably because of the highest density of the fluid (0.90 g/mL). Subsequently, two static extraction times (SET, 0 and 5 min), two CO₂ flow rates (1 and 1.5 mL/min) and three dynamic extraction times (DET, 15, 20 and 25 min) were tested. The highest squalene amount (9.44 g/100 g) was obtained by using the highest flow rate and longest SET and DET. However the squalene levels (9.33 g/100 g) obtained with 5 min in SET, 15 min in DET and 1.0 mL/min CO₂ flow rate did not differ significantly. Since more reduced times and flow rates are more economically viable, the optimized parameters for the extraction with CO₂-SC were: 40 °C, 281 bar, 0.90 g/mL, 5 min (SET), 15 min (DET) and 1.0 mL/min CO₂ flow rate. The methodology developed in this work provided a concentration of 2.8 times in the squalene content, therefore, a study on the cost/benefit ratio is recommended, as well as testing of pilot scale plant, in order to assess its industrial potential.

1. INTRODUÇÃO

O esqualeno, um triterpeno precursor biossintético do colesterol, é empregado como agente emoliente e umectante em formulações cosméticas e farmacêuticas, além de lubrificante para instrumentos de precisão. Também é proposto o seu uso em formulações nutracêuticas ou como alimento funcional, pois apresenta ação anticarcinogênica, hipocolesterolêmica e antioxidante.

As fontes convencionais de esqualeno são o óleo de fígado de tubarão e baleia. Contudo, fontes vegetais estão sendo amplamente propostas, em virtude da preocupação com a preservação de espécies marinhas ameaçadas de extinção (HE et al., 2002).

Como fontes vegetais destacam-se os óleos de oliva (0,1 a 0,7 g/100 g) e de semente de amaranto - 3,6 a 6,1 g/100 g (HE et al., 2002; HE e CORKE, 2003). Uma alternativa é a utilização do destilado desodorizado de óleo de soja (DDOS), um resíduo da refinação do óleo, pois é uma matriz com teores apreciáveis de esqualeno, variando de 0,65 a 7,8 g/100 g (STOLDT e BRUNNER, 1998; VERLEYEN et al., 2001).

Além disso, este resíduo apresenta baixo custo e ampla disponibilidade, pois a produção nacional do óleo de soja é significativa, estimada na safra de 2006/2007 em 4,1 milhões de toneladas (ABIOVE, 2007), sendo que o percentual produzido de DDOS corresponde de 0,1 a 0,4 % do óleo bruto (MENDES et al., 2002).

Vários métodos de separação do esqualeno de matrizes biológicas foram avaliados. A extração com CO₂ supercrítico (CO₂-SC) é uma técnica de separação viável para as indústrias de alimento e farmacêutica, pois este fluido é inerte, não deixa resíduo no produto final e não gera resíduo ambiental (COUTSIKOS et al., 2003).

A baixa polaridade do esqualeno garante boa solubilidade no CO₂-SC e sua suscetibilidade a oxidação é controlada, pois este processo de extração ocorre na ausência de luz e oxigênio (CATCHPOLE et al., 2000a; KO et al., 2002; BHATTACHARJEE e SINGHAL, 2003; HE et al., 2003).

A separação de esqualeno por CO₂-SC foi investigada a partir de diversas matrizes: óleo de fígado de tubarão, destilado desodorizado do óleo de oliva (CATCHPOLE et al., 1997), óleo de oliva lampante (BONDIOLI et al., 1992), óleo da semente de amaranto (HE et al., 2003) e farelo de arroz (KIM et al., 1999). Contudo, não existem dados na literatura sobre a extração de esqualeno do DDOS com CO₂-SC.

O esqualeno apresenta baixo fator de separação com os ácidos graxos livres (AGL) e fitoesteróis em sistemas de extração com CO₂-SC (BONDIOLI et al., 1992; MENDES et al., 2005). Por isso, neste estudo o DDOS foi submetido a cristalização a baixas temperaturas para redução do teor de fitoesteróis e tratamento com Na₂CO₃ para a remoção de ácidos graxos livres; melhorando deste modo a separação por CO₂-SC do esqualeno no DDOS.

Considerando a importância do esqualeno para as indústrias farmacêuticas e de alimentos em virtude de sua atividade biológica e a necessidade da busca de fontes alternativas deste composto, bem como a investigação de técnicas de separação, propôs-se neste estudo a otimização das condições físico-químicas da extração com CO₂-SC do esqualeno no DDOS, submetido a processos prévios de purificação (cristalização e tratamento com Na₂CO₃), a fim de se obter um extrato com maiores concentrações deste composto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Esqualeno: química, bioquímica e absorção

O esqualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22- tetrahexaneno) é um lipídio hidrocarboneto insaponificável, contendo 6 duplas ligações não conjugadas, pertencente ao grupo dos triterpenos, apresentando 6 unidades de isopreno. Sua estrutura química é mostrada na Figura 1. O esqualeno atua como precursor biossintético de todos os esteróis de plantas e animais (RAO et al., 1998; HE e CORKE, 2003).

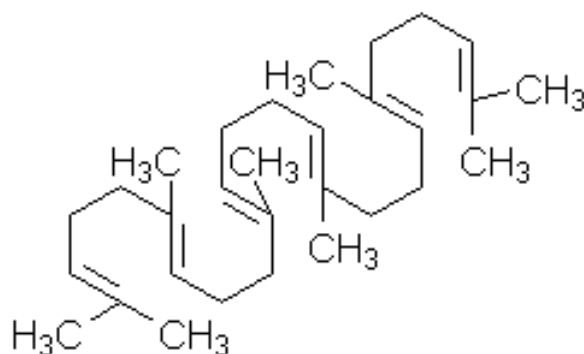


Figura 1 – Estrutura química do esqualeno.

A síntese endógena do esqualeno ocorre pela rota biossintética do mevalonato/acetato e está esquematizada na Figura 2. Inicialmente três moléculas de acetil-CoA condensam-se produzindo 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é reduzido pela HMG-CoA redutase em duas reações acopladas, formando ácido mevalônico. Fosforilações dependentes de ATP do ácido mevalônico e subsequente descarboxilação produzem isopentenil pirofosfato (IPP), a molécula doadora para todos os compostos poliisoprenóides. As enzimas preniltransferase geram os ésters pirofosfato alílicos geranil pirofosfato (GPP) e farnesil pirofosfato (FPP). Duas moléculas de FPP são então unidas enzimaticamente resultando na formação de esqualeno (CROTEAU et al., 2000).

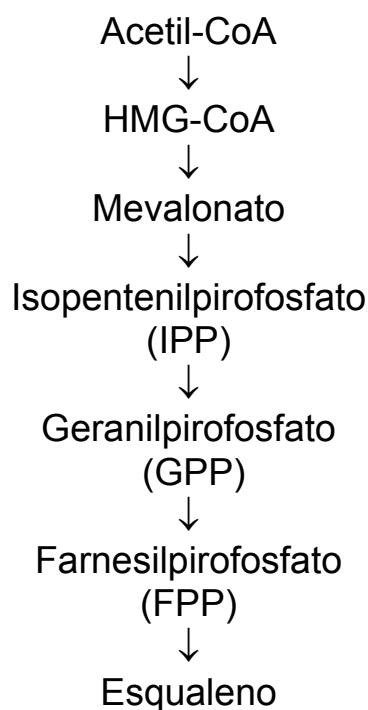


Figura 2 – Esquema simplificado da rota biossintética do esqualeno.

A HMG-CoA redutase é uma enzima regulatória responsável pelo controle da biossíntese do colesterol. Por isso, esta enzima foi investigada para o desenvolvimento de drogas hipocolesterolêmicas (LAAKSONEN et al., 1994). Além disso, alguns estudos concluíram que a ação hipocolesterolêmica do

esqualeno estaria relacionada com a inibição da HMG-CoA redutase (STRANDBER et al., 1989; MIETTINEN e VANHANEN, 1994; SHIN et al., 2004).

Após sua biossíntese, o esqualeno pode ser transportado pelo organismo, incorporando-se aos tecidos ou pode ser metabolizado, resultando na formação de colesterol e outros esteróides (KELLY, 1999).

O esqualeno do plasma origina-se da síntese de colesterol endógena ou de fontes dietárias, principalmente em populações que consomem grande quantidade de óleo de oliva ou óleo de fígado de tubarão. Embora seu metabolismo pós-absorção não tenha sido estudado com detalhes em humanos, as evidências disponíveis indicam um percentual de absorção de 60 a 85% (MIETTINEN e VANHANEN, 1994). Até 90% do esqualeno é transportado no plasma, geralmente em associação com lipoproteínas de baixa densidade e distribuído aos tecidos humanos. O tecido epitelial é o que apresenta a mais alta concentração deste composto, que se constitui no lipídio mais abundante da superfície da pele. Baseado em evidências com animais, a administração oral prolongada pode resultar em acumulação significativa desta substância no fígado - 3 a 6 % da dose oral (GYLLING e MIETTINEN, 1994).

2.2. Ação antioxidante e mecanismos anticarcinogênicos do esqualeno

A ação antioxidante do esqualeno foi investigada empregando-se modelos de reações de seqüestro de oxigênio singlete e de radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (KOHNO et al., 1995; KO et al., 2002). Também foi observado que o esqualeno inibe a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), acarretando diminuição da disponibilidade de grupos farnesil pirofosfato para a prenilação de proteínas oncogênicas e interferência na transdução de gene *ras* (Newmark, 1997, apud KO et al., 2002; RAO et al., 1998; SMITH et al., 1998); além de efeitos hipocolesterolêmicos (MIETTINEN e VANHANEN, 1994; KHOR e CHIENG, 1997) e cardioprotetores (FARVIN et al., 2004).

Os efeitos antioxidantes e anticarcinogênicos do esqualeno dietário têm intensificado seu uso em formulações de nutracêuticos ou alimentos funcionais.

No Japão é comercializado um produto alimentar a base de óleo de fígado de tubarão, que apresenta altos teores de esqualeno, denominado “shinkaizame-ekisu” (KO et al., 2002; REICHERT, 2002).

A ação antioxidante do esqualeno foi estudada e relacionada com mecanismos de defesa ao estresse oxidativo, principalmente em tecidos epiteliais humanos. As altas taxas de seqüestro de oxigênio singlete pelo esqualeno também foram apontadas como possíveis mecanismos de sua ação antimutagênica, pois os radicais livres oxigenados (RLO) interagem com o DNA acarretando mutações.

Depois de ingerido o esqualeno é estocado nos tecidos epiteliais, constituindo-se o lipídio mais abundante deste tecido em humanos, porém normalmente é ausente em outros primatas. A superfície da pele é uma interface biológica com o ambiente, portanto é sensível ao estresse oxidativo ambiental (MIETTINEN e VANHANEN, 1994; KOHNO et al., 1995).

A exposição da pele à radiação causa peroxidação de seus lipídios, podendo levar a destruição de biomembranas, inflamações e até mesmo câncer. Por isso, a pele requer substâncias que previnam estas reações (KOHNO et al., 1995).

Espera-se que a prevenção da peroxidação de lipídios da pele seja muito eficiente em humanos como resultado da evolução, pois, devido à ausência de pêlos, eles são mais suscetíveis a radiação solar do que os demais primatas. Presume-se que o esqualeno na pele humana esteja relacionado com a prevenção da peroxidação de lipídios da pele (KOHNO et al., 1995).

KOHNO et al. (1995) investigaram as reações do esqualeno como seqüestrante de oxigênio singlete e com modelos de radicais peroxil ($\text{LOO}^\bullet$) em n-butanol, para elucidar o papel do mesmo na pele humana. Foram usados os radicais 2,6-di-t-butil-4-(4-metoxifenil) fenoxil e 5,7-diisopropil tocoferil como modelos de $\text{LOO}^\bullet$, pois trabalhos anteriores demonstraram que a relação reativa não depende do tipo de oxiradical usado. Observou-se que a taxa de seqüestro de oxigênio singlete do esqualeno foi menor do que a do α -tocoferol, maior do que a do hidroxitolueno butilado (BHT) e bem superior a dos demais lipídios encontrados na pele humana. Estes resultados sugerem que o

esqualeno funciona como um eficiente seqüestrante de oxigênio singlete e, portanto, previne a peroxidação de lipídios na pele humana.

Outros trabalhos também demonstraram o efeito antioxidante de extratos vegetais contendo esqualeno. KO et al. (2002) observaram que os extratos de folhas de *T. Catappa*, obtidos por extração com CO₂-SC, com mais alta concentração de esqualeno, exibiram maior potencial antioxidante e atividade seqüestrante de DPPH (1, 1- difenil - 2- picril - hidrazil) mais efetiva.

Por outro lado, FARVIN et al. (2004) observaram efeitos cardioprotetores pela administração oral de esqualeno (2 % por 45 dias), antes da indução de infarto do miocárdio por isoproterenol em ratos albinos machos. Assim, concluíram que estes efeitos devem-se às propriedades antioxidantes desta substância e sua ação na estabilização da membrana das células do tecido cardíaco.

O desenvolvimento do câncer é reconhecido como um processo microevolucionário que requer ações cumulativas e eventos múltiplos. Estes eventos ocorrem em um modelo simplificado de três estágios: a indução de mutação do DNA em células somáticas (iniciação); estimulação da expansão tumorigênica do clone celular (promoção) e conversão maligna do tumor (progressão). Os radicais livres oxigenados (RLO), particularmente os radicais peroxil, podem estimular o desenvolvimento de câncer em todos os três estágios. Em vista da ubiquidade dos RLO em organismos aeróbicos este potencial carcinogênico é preocupante. Alternativamente estes conhecimentos podem abrir novas perspectivas para a prevenção de câncer, especialmente com relação à investigação do potencial antioxidante de algumas substâncias (DREHER e JUNOD, 1996).

Considerando-se que o efeito radioprotetor do esqualeno em camundongos irradiados e a atividade protetora antitumoral de esqualeno na carcinogênese epitelial se devem às suas propriedades antioxidantes, demonstradas por sua eficiência como seqüestrante de oxigênio singlete e na prevenção de peroxidação de lipídios na superfície da pele humana (KOHNO et al., 1995; MURAKOSHI et al., 1992; Van DUUREN e GOLDSCHMIDT, 1976).

O'SULLIVAN et al. (2002) também constataram a relação entre a ação antioxidante do esqualeno e a prevenção de mutações genéticas, ao investigarem os efeitos da suplementação de ácido eicosapentaenóico, ácido

docosahexaenóico ou esqueleno, por 24 horas, em células fibroblásticas V79 de hamster, contra danos ao DNA induzidos por oxidação com peróxido. Estes autores observaram que o pré-tratamento com esqualeno acarretou decréscimos significativos destes danos, sendo este composto mais efetivo do que os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico.

Algumas modificações das bases de DNA relacionadas aos RLO podem induzir pontos de mutação pelo erro de leitura durante a replicação. Uma das modificações oxidativas de bases do DNA mais observadas é a formação de 8-hidroxi-guanina (8-OH-Gua), ocorrendo em aproximadamente um em cada 100.000 resíduos de guanina em células humanas normais. A 8-OH-Gua pode produzir substituição de guanina-citosina (GC) por tiamina-adenina (TA), o que é freqüentemente detectado no oncogene *ras*, representando um possível mecanismo de iniciação de tumor por RLO (DREHER e JUNOD, 1996). O oncogene *ras* foi observado em vários tipos de cânceres nos quais o esqualeno teve efeito supressivo.

A substituição de GC por TA, no gene supressor de tumor *TP53* foi observada em cânceres de pulmão e fígado. Através da ativação do oncogene ou da inativação do gene supressor de tumor, estes pontos de mutação podem conduzir à iniciação de carcinogênese, assim como ter participação na progressão do tumor em um estágio posterior (DREHER e JUNOD, 1996).

Os efeitos antitumorais do esqualeno em câncer de pulmão foram investigados por SMITH et al. (1998), que induziram tumores nos pulmões de camundongos fêmeas pela administração de dose única (103 mg/kg de peso corpóreo) de 4-metilnitrosamino-1-3-piridil-1-butanona e analisaram os efeitos da dieta com altos teores de óleo de oliva (19,61 %) ou esqualeno (2 %). Para todos os grupos de animais analisados, inclusive o controle, foram formuladas dietas com a mesma composição química de nutrientes e administradas por 3 semanas anteriores à dosagem da nitrosamina e mantida por um período de 16 semanas. Os pesquisadores observaram que as dietas com óleo de oliva e esqualeno diminuíram significativamente a multiplicação de tumores nos pulmões em 46 e 58%, respectivamente. Além disso, com a dieta contendo esqualeno foi identificado um decréscimo de 70% na hiperplasia dos pulmões.

A nitrosamina 4-metilnitrosamino-1-3-piridil-1-butanona é formada durante o processamento do tabaco para produzir os cigarros, comprovou-se

em animais experimentais, ser a nitrosoamina mais potente na carcinogênese de pulmões. Esta nitrosamina é ativada pelo complexo enzimático citocromo P450, o que leva a formação de espécies altamente reativas capazes de acarretar danos no DNA celular, induzindo a ativação do ongene *K-ras* que é responsável pela proliferação e progressão de tumores malignos em pulmões (HECHT, 1994; HOFFMANN et al., 1994).

RAO et al. (1998) constataram o efeito inibitório do esqualeno na formação de lesões pré-neoplásicas no colo intestinal de ratos F344, induzidas por azoximetano (15mg/kg de peso corpóreo, 2 vezes por semana, durante 2 semanas). Este efeito foi observado pela ingestão de 1% de esqualeno por 10 semanas, e, como resultado, o número total de lesões decresceu entre 40 e 50% quando comparado com o grupo de animais alimentados com a dieta controle. Lesões pré-neoplásicas podem expressar mutações no gene *APC* e no oncogene *ras*.

Os mecanismos exatos envolvidos na ação anticarcinogênica do esqualeno em vários tipos de cânceres não são completamente conhecidos. Porém, além de sua ação no seqüestramento de radicais livres, também foi citado ser devido à modulação com a rota biossintética do colesterol através de inibição enzimática (RAO et al., 1998).

Alguns estudos relataram o efeito inibitório do esqualeno na atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) Este efeito estaria relacionado a um mecanismo de retro-alimentação (“feedback”), pois, conforme esquematizado na Figura 2, o esqualeno é produzido pela redução de HMG-CoA, produzindo mevalonato, uma seqüência de várias reações que produzem FPP, culminando com a condensação de duas destas moléculas (STRANDBERG et al., 1989; MIETTINEN e VANHANEN, 1994; SHIN et al., 2004). Portanto, a inibição da HMG-CoA redutase pode levar à redução de uma série de intermediários tais como mevalonato, FPP e GPP, estes últimos são essenciais para a ativação de várias proteínas intracelulares (GRAAF et al., 2004).

A prenilação de proteínas é uma adição covalente do grupo farnesil (15 C) ou geranil (20 C) ao resíduo cisteína na carboxila terminal de várias proteínas G, que estão envolvidas em processos de sinalização celular. Como exemplos destas proteínas têm-se as oncogênicas *ras*, transdução γ , quinase e

rodopsina, que são dependentes da prenilação para serem ativadas (ADJEI, 2003; GRAAF et al., 2004).

A translocação da proteína ras do citosol para a membrana celular somente ocorre após sua farnesilação. A união das proteínas ras farnelizadas, com ligantes apropriados para receptores tirosina quinase, resulta na interação entre ras associadas a GDP inativas e receptores de membrana. Subseqüentemente, o GDP é trocado por GTP e a sinalização em cascata é ativada. Proteínas ras farnelizadas estão associadas com sinal de transdução na resposta para a estimulação do fator de crescimento celular e supressão de apoptose (GRAAF et al., 2004). Portanto, o efeito anticarcinogênico do esqualeno poderia estar relacionado com a inativação da enzima HMG-CoA redutase, devido ao decréscimo na síntese de compostos farnesil pirofosfato (RAO et al., 1998; SMITH et al., 1998).

A ação anticarcinogênica do esqualeno pode estar também relacionada à sua interação metabólica com xenobióticos carcinogênicos. SMITH et al. (1998) investigaram os efeitos do esqualeno dietário sobre o metabolismo de 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)1-butanona (NNK) no microsomo de tecidos hepáticos e pulmonares de camundongos, e observaram que dietas contendo 2% de esqualeno, por 3 semanas, aumentaram significativamente a formação de NNK-N-óxido, um produto de desintoxicação. Estes resultados sugerem que o esqualeno, ou seu metabólito, esteja envolvido na ativação de NNK pelo citocromo P450. Contudo, a contribuição destas mudanças no metabolismo de NNK sobre a tumorigênese não é clara e necessita de investigações posteriores.

Estudos específicos do efeito antitumoral do esqualeno em câncer de colo intestinal apontam também para a hipótese de que dietas com esqualeno possam inibir a biossíntese de ácidos biliares, que foram apontados como promotores de tumores de colo (RAO et al., 1998).

2.3. Ação hipocolesterolêmica do esqualeno

O papel do esqualeno dietário na regulação da concentração de colesterol sérico, na síntese e eliminação do colesterol, assim como na cinética de proteínas de baixa densidade (LDL) e apolipoproteínas B foi investigado e apresentou resultados contraditórios.

STRANDBERG et al. (1989) dosaram os níveis dos precursores do colesterol em ratos alimentados com 1% de esqualeno e observaram inibição significativa da atividade da enzima HMG-CoA redutase, portanto, com efeito específico na redução da síntese de colesterol endógeno. Enquanto que, SHIN et al. (2004) observaram que o esqualeno, extraído de sementes de amaranto, inibiu apenas ligeiramente a atividade da HMG-CoA redutase.

A ação hipocolesterolêmica do esqualeno, em combinação com a administração de tocotrienóis, foi observada por KHOR e CHIENG (1997). Porém, MIETTINEN e VANHANEN (1994) demonstraram que o uso somente do esqualeno foi efetivo no decréscimo dos níveis de colesterol sérico. Já, NAKUMURA et al. (1997), testando dosagem crônica de esqualeno (8,62-86,22 mg/dia durante 25 dias) ou única (86,22 mg) em ratos, observaram que a administração oral de esqualeno não teve efeito sobre lipídios hepáticos ou séricos, porém acarretou aumento na excreção de esteróides neutros e ácidos biliares.

SHIN et al. (2004) avaliaram, em ratos, o efeito hipocolesterolêmico de esqualeno extraído de óleo de fígado de tubarão e de amaranto. Eles observaram que o esqualeno extraído de óleo de semente de amaranto reduziu os teores de colesterol no sangue e no fígado, além de provocar aumento de excreções fecais de colesterol e ácidos biliares. Enquanto que, na administração de esqualeno de origem animal não foi observado nenhum destes efeitos. Os resultados sugerem que a redução de níveis de colesterol, por ação do esqualeno de amaranto, pode estar relacionada ao aumento da eliminação fecal de esteróides e à interferência na absorção do colesterol.

2.4. DDOS: uma fonte alternativa de esqualeno

No processamento do óleo de soja inicialmente os grãos são laminados, o óleo bruto é extraído com hexano e o refino posteriormente. Na Figura 3 estão identificadas as etapas do processamento (MENDES et al., 2002).

O refino do óleo é necessário para a remoção de substâncias que são prejudiciais à qualidade do produto. As etapas do refino são a degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização (ERICKSON, 1995).

A desodorização é realizada para a remoção de compostos voláteis e coloridos, que poderiam produzir cheiro, cor ou sabor desagradáveis ao produto final. Trata-se de uma destilação por arraste a vapor com temperaturas variando de 240 a 260 °C e pressões na faixa de 2 a 6 mbar. Durante a condensação do vapor de água uma fase lipofílica precipita, constituindo-se um resíduo do processamento, o DDOS (MORETTO e FETT, 1998; BUCZENKO et al., 2002).

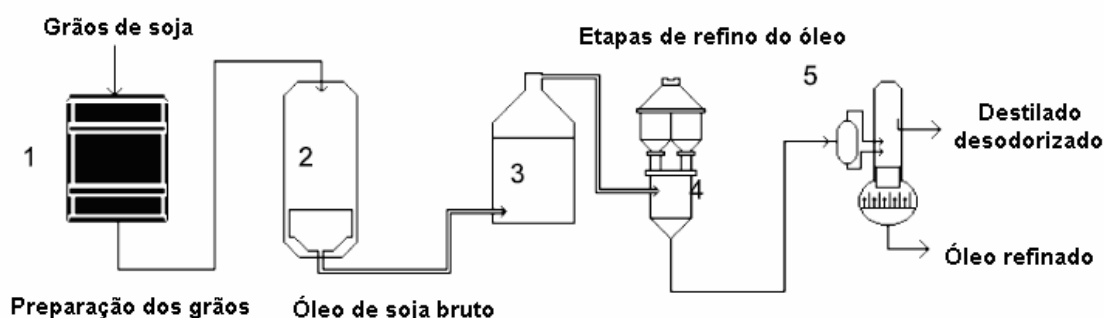


Figura 3 – Etapas do processamento de óleo de soja: prensagem (1), extração com hexano (2), refino (3), branqueamento (4) e desodorização (5). Adaptado de MENDES et al. (2002).

O aproveitamento dos subprodutos ou resíduos do refino do óleo de soja é de relevância econômica para a indústria, pois este é um dos mais consumidos no mundo, representando 54% do consumo de óleos no mercado mundial (MENDES et al., 2002). No Brasil, destaca-se a produção significativa de grãos de soja, estimada em 2006 em 52 milhões de toneladas (IBGE, 2006). Além disso, a produção nacional do óleo de soja foi avaliada na safra de 2006/2007 em 4,1 milhões de toneladas (ABIOVE, 2007). O DDOS gerado varia de 0,1 a 0,4% do peso do óleo bruto original (WOERFEL, 1981).

O DDOS apresenta em sua composição substâncias biologicamente ativas, como fitoesteróis, tocoferóis e esqualeno. Por isso, essa matriz já foi investigada para a extração de tocoferóis e fitoesteróis (ARAÚJO et al., 2000; CHANG et al., 2000). Contudo, ainda não existem dados com relação ao seu uso para a extração de esqualeno.

As fontes convencionais de esqualeno são o óleo de fígado de tubarão e baleia, com concentrações variando de 40 a 75 % em massa (CATCHPOLE et al., 1997; HE et al., 2002). Contudo, sua disponibilidade a partir destas fontes é limitada devido à preocupação mundial com a proteção de animais marinhos ameaçados de extinção. Além disso, a presença de compostos similares ao colesterol pode dificultar a extração do esqualeno. Há interesse em buscar outras fontes potenciais deste composto, e as fontes vegetais estão sendo amplamente propostas (HE et al., 2002; KO et al., 2002; MATEOS et al., 2003).

O conteúdo de esqualeno em óleo de oliva, germe de trigo e farelo de arroz varia de 0,1 a 0,8 g/100 g, enquanto que o óleo de semente de *Amarantthus* apresenta níveis de esqualeno de 3,6 a 6,1 g /100 g (HE et al., 2002; MATEOS et al., 2003). O DDOS é uma fonte alternativa de esqualeno, apresentando níveis desta substância de 0,65 a 7,8 g/100 g (STOLDT e BRUNNER, 1998; VERLEYEN et al., 2001).

Na Tabela 1 é descrita a composição química aproximada do DDOS obtida de diversas fontes da literatura. Verifica-se a complexidade do DDOS devido à diversidade de substâncias encontradas e a ampla faixa de variação nos teores destas substâncias, que ocorre devido as diferenças inerentes a matéria-prima empregada para o processamento do óleo e as condições físicas da destilação, tais como: temperatura, pressão e tempo (WOERFEL, 1981; STOLDT e BRUNNER, 1998; VERLEYEN et al., 2001).

Além disso, a técnica de refino também altera a concentração dos constituintes do DDOS. No refino físico, os ácidos graxos livres são vaporizados durante o processo de desodorização, conseqüentemente o DDOS contém maior quantidade de ácidos graxos livre (> 80%) com pequena quantidade de insaponificáveis (5 -10%). No refino químico os ácidos graxos livres são neutralizados por uma solução cáustica e removidos do óleo antes da desodorização, portanto, contém uma menor concentração de ácidos graxos livres (30 – 50%) e níveis mais elevados de insaponificáveis (25 a 33%). Os níveis de esqualeno nos DDOS obtidos no refino por processos químicos variaram de 1,28 g/100 g a 2,09 g/100 g, enquanto que, no DDOS oriundo de processo físico de refino o teor desta substância foi de 0,65 g/100g (VERLEYEN et al., 2001).

Tabela 1- Composição química aproximada do DDOS.

Substâncias	Variação de teores (g/100 g)
Compostos voláteis	0,10 – 9,30 ^a
Esqualeno	0,65 -7,80 ^{a, b, c, d}
AGL	25,30- 89,30 ^{d, e, f}
δ-Tocoferol	2,01 – 5,59 ^{c, d}
β-Tocoferol	0,18 – 0,52 ^{c, d}
γ-Tocoferol	4,96 – 11,26 ^{c, d}
α-Tocoferol	0,54– 2,2 ^{a, c, d, h}
Tocoferóis totais	4,1 – 14,7 ^{d,e,g,h,i}
Triglicerídios	1,70 – 5,91 ^{a, c}
Diacilglicerídios	1,70 – 8,06 ^{a, c}
Monoacilglicerídios	1,24 -9,2 ^{a, c}
Campesterol	1,20 – 5,2 ^{a, c, d, h}
Estigmaesterol	1,38-5,2 ^{c, d, h}
β-sitosterol	3,03-13,30 ^{c, d, h}
Esteróis totais	4,1 – 22,6 ^{a, d, e, g,h}

^aBRUNNER et al. (1991)

^bSTOLDT e BRUNNER (1998)

^cVERLEYEN et al. (2001)

^dRAMAMURTHI e McCURDY (1993)

^eNAGESHA et al. (2003)

^fCHANG et al. (2000)

^gQUANCHENG et al. (2004)

^hWOERFEL (1981)

ⁱARAUJO et al. (2000).

2.5. Fundamentos da cristalização

O processo de cristalização refere-se à formação de cristais a partir de uma solução homogênea. É essencialmente uma técnica de separação sólido-líquido com ampla aplicação nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia (PAUL et al., 2005).

As moléculas no estado cristalino apresentam-se como uma matriz tridimensional ordenada, exibindo periodicidade e simetria. Todas as moléculas são equivalentes em relação à sua energia de ligação, o que faz com que a

mudança do estado cristalino ocorra em uma temperatura fixa. No estado não-cristalino (amorfo ou vítreo) também ocorre a formação de uma rede tridimensional, porém não apresentando periodicidade ou simetria. Portanto, nem todas as moléculas encontram-se igualmente ligadas à rede e a mudança de estado ocorre em uma faixa de temperatura. O estado cristalino corresponde à forma estável do material, isto é, aquela que se desenvolve em condições de equilíbrio. Os materiais não cristalinos são instáveis, existindo em um estado metaestável. A transição para a forma cristalina ocorre em uma determinada faixa de tempo (SCHMIDT, 2004).

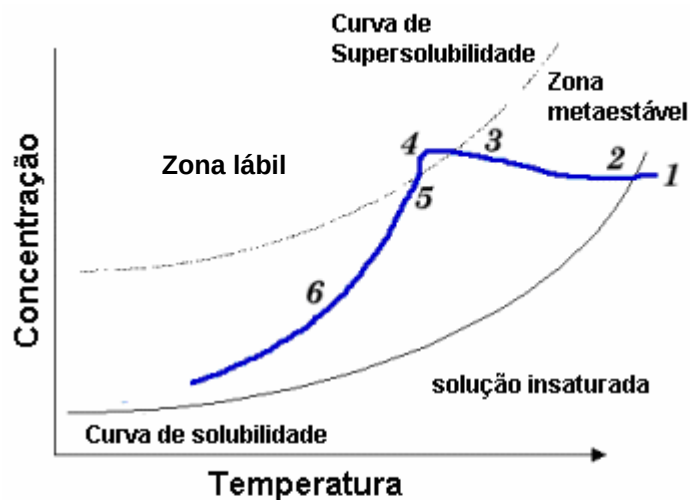
A compreensão da transição do estado amorfo para o cristalino envolve os conceitos de solubilidade, saturação e supersaturação. Quando uma solução contém a quantidade total de sólido que é capaz de dissolver, diz-se que está “saturada”. A saturação é um estado de equilíbrio termodinâmico estável entre as fases sólida e líquida, e corresponde ao ponto em que o potencial químico do soluto na solução é idêntico ao potencial químico de um cristal puro de tamanho infinito. A solubilidade varia com o tipo de soluto, solvente e temperatura. A maioria das substâncias exibe um aumento de solubilidade com a elevação da temperatura (MONTES, 2004).

Mesmo em concentrações superiores à da saturação, os cristais podem não aparecer imediatamente. O sólido pode continuar dissolvido, em uma situação de equilíbrio metaestável, e diz-se que a solução é “supersaturada”. Na realidade, na zona metaestável as taxas de nucleação são muito pequenas e o aparecimento de cristais pode levar anos (TERAN-ORTIZ, 2004).

A cristalização a partir de soluções envolve as seguintes etapas fundamentais: o estabelecimento da força motriz, a formação do núcleo ou nucleação (centro) do cristal e o seu crescimento. A primeira etapa do processo de cristalização é a geração de um potencial suficiente para que a mesma ocorra, o que está associado à estrutura da solução e ao desenvolvimento da supersaturação (YU et al., 2004).

Existe uma correlação definida entre a concentração e a temperatura na qual se formarão espontaneamente cristais em uma solução pura. Esta correlação é representada graficamente na Figura 4 pela curva de supersolubilidade, deslocada em relação à curva de solubilidade praticamente por um mesmo fator constante. A formação espontânea de cristais ocorre

acima de um determinado coeficiente de supersaturação, indicado pela zona lábil na Figura 4 (TERAN-ORTIZ, 2004).



- 1 - Solução não saturada (alimentação do sistema).
- 2 - Saturação da solução por resfriamento.
- 3 - Zona metaestável início da nucleação.
- 4 - Nucleação rápida.
- 5 - Decréscimo da concentração devido ao crescimento dos cristais.
- 6 - Crescimento dos cristais durante um ciclo de resfriamento.

Figura 4 - Etapas da cristalização por resfriamento (adaptado de PAUL et al., 2005).

Em uma solução, a supersaturação pode ser criada de três formas distintas: pelo resfriamento de uma solução não-saturada até um ponto onde a concentração da solução exceda a concentração de solubilidade naquela temperatura; ou pela evaporação de parte do solvente, acarretando um aumento na concentração; e também pela adição de um segundo solvente, no qual o soluto é insolúvel (Hartel, 1992, apud MONTES, 2004).

O processo de nucleação pode ser homogêneo ou heterogêneo. A nucleação homogênea ocorre em sistemas puros, no qual os núcleos são exclusivamente formados pela fase sólida pura e atuam como sítios para a formação do cristal. Por sua vez, a nucleação heterogênea ocorre quando partículas sólidas atuam como sítios catalíticos para a formação do cristal. Este

último é comum em cristalizadores, cujas partículas introduzidas são denominadas sementes.

O crescimento dos cristais é dependente da superação do chamado tamanho crítico, que representa uma barreira de energia a ser superada pelo núcleo antes de tornar-se estável. Assim que os agregados ordenados atinjam um tamanho mínimo necessário, sua solubilidade torna-se menor do que dos grupos menores transitórios, portanto seu crescimento é favorecido absorvendo o soluto circundante e estes funcionarão como núcleo de cristalização. Quanto mais elevada a saturação, menos transitórios são estes grupos e alguns deles podem orientar-se com uma maior probabilidade (TERAN-ORTIZ, 2004).

O mecanismo de nucleação compreende duas fases: primária e secundária. A nucleação primária é caracterizada pelo nascimento dos cristais na ausência de cristais anteriores. No processo de nucleação secundária o crescimento dos cristais é iniciado pelo contato com a solução, outros cristais ou com as paredes do recipiente. Em cristalizadores, sob violenta agitação, desencadeia-se o desprendimento de fragmentos que formarão novos núcleos. (PAUL et al., 2005).

2.6. Aplicações do processo de cristalização

Os fitoesteróis fazem parte da porção insaponificável de óleos vegetais, sendo que nestas fontes geralmente são encontrados estigmaesterol, brasicaesterol, β -sitosterol e campesterol. Conforme observado na Figura 5 os mesmos apresentam estruturas químicas similares, porém com variação no número e localização das insaturações e no número de átomos de carbono que compõem a cadeia principal. Portanto, apresentam propriedades físicas muito semelhantes, como por exemplo, sua solubilidade (XU et al., 2005).

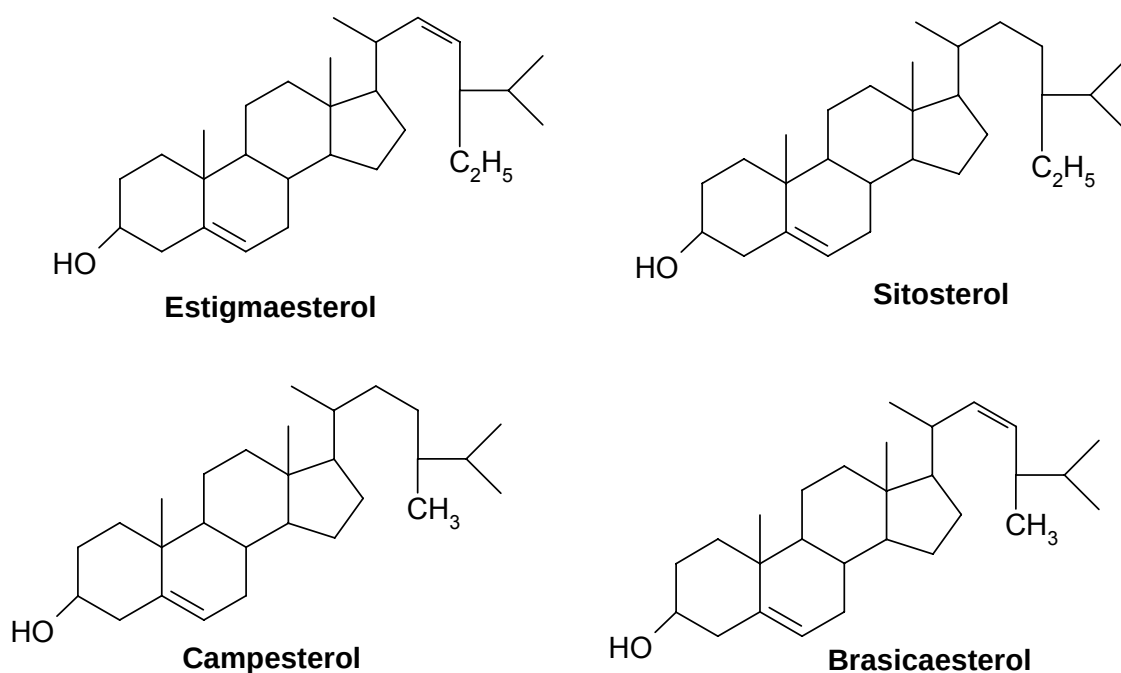


Figura 5 - Fitoesteróis encontrados em óleos vegetais.

XU et al. (2005) investigaram a separação de β -sitosterol e estigmaesterol em mistura de fitoesteróis baseando-se na diferença de solubilidade destes compostos com a redução da temperatura usando n-pentanol e ciclohexanona como solventes. Eles obtiveram uma concentração de β -sitosterol de 85% após três estágios de operações de recristalização em ciclohexanona e estigmaesterol com pureza de 90% após cinco estágios de cristalização fracionada em n-pentanol ou ciclohexanona.

Outra aplicação da cristalização é no refino de óleos comestíveis. A versatilidade da aplicação de óleos, em formulações de alimentos, pode ser significativamente aumentada pela disponibilidade de processos para modificar o balanço sólido-líquido dos triglicerídios, em uma variação de temperatura de interesse para aplicações específicas (HAMM, 1995).

A “winterização” é um processo de cristalização a baixas temperaturas, usualmente 6 °C por 24 horas, que utiliza acetona ou hexano como solventes, com o objetivo de remover compostos de alto ponto de fusão, prevenindo deste

modo a turbidez do óleo devido a solidificação de algumas substâncias (HAMM, 1995).

Também é possível o emprego de cristalização fracionada, na qual são utilizadas diferentes temperaturas, a fim de se obter um produto com uma composição de triglicerídios com propriedades específicas, como solubilidade, ponto de fusão ou composição de ácidos graxos

LÓPES-MARTÍNEZ et al. (2004) empregaram a winterização no refino de óleo de sementes de *Echium fastuosum*, para obter um produto com altos teores de ácido γ -linolênico. Testaram diferentes concentrações do óleo (10%, 20% e 40%), em diferentes solventes (hexano, acetona, éter dietílico, isobutanol e etanol), nas temperaturas de cristalização de 4 °C, -24 °C e -70 °C. A mais alta concentração de γ -linolênico foi obtida usando a concentração de óleo de 10% em hexano e acondicionamento a -24 ou -70 °C, pois não foram observadas diferenças significativas para estas temperaturas.

2.7. Princípios da extração com fluido supercrítico

O estado supercrítico foi descrito pela primeira vez em 1822 pelo Barão Gagniard de la Tour. Em 1879 Hannay e Hogarth demonstraram o poder solvente dos fluidos supercríticos. Porém, as primeiras aplicações industriais e analíticas somente ocorreram na década de 1970 (SIHVONEN et al., 1999). A primeira planta industrial de extração com CO₂-SC foi instalada em 1978, para descafeinização de grão verdes de café (Kaffe HAG AG – Alemanha). Dois anos mais tarde surge outra indústria (Carlton & Breweries - Austrália), para a extração de flavour de lúpulo (RAVENTÓS et al., 2002).

O estado supercrítico é alcançado quando a temperatura e a pressão de uma substância pura são aumentadas acima do seu ponto crítico (Figura 6). A temperatura crítica é definida como a temperatura máxima, na qual um gás pode ser convertido em um líquido, pelo aumento de pressão. Da mesma forma a pressão crítica é a pressão máxima, na qual um líquido pode ser convertido em um gás, mediante o aumento da temperatura (LEITNER, 2000).

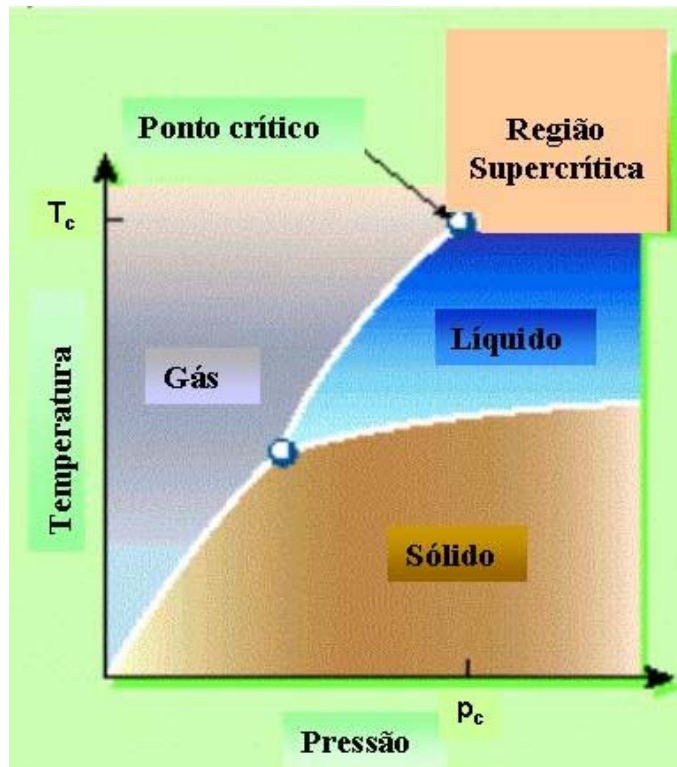


Figura 6 – Diagrama de fases para uma substância pura (T_c = temperatura crítica e p_c = pressão crítica). Fonte: POLIAKOFF e KING (2001).

No estado supercrítico desaparece a distinção entre as fases líquida e gasosa e o fluido não pode mais ser liquefeito, pelo aumento de pressão e nem pode tornar-se gasoso, pelo aumento de temperatura. Assim, propriedades físico-químicas, tais como densidade, difusividade, constante dielétrica e viscosidade podem ser facilmente controladas pelas alterações de pressão e/ou temperatura, sem cruzar os limites de fases (DEL VALLE e AGUILERA, 1999).

Conforme observado na Tabela 2 os fluidos supercríticos (FS) exibem propriedades físico-químicas intermediárias entre um gás e um líquido. A densidade dos FS é semelhante à dos líquidos típicos, enquanto que, a difusividade e a viscosidade assemelham-se mais aos gases. Estas características peculiares conferem aos mesmos, propriedades químicas (solvatação) e físicas (de transporte) favoráveis, tornando-os solventes em potencial (LANG e WAI, 2001).

Tabela 2 – Comparação das propriedades físico-químicas de fluidos supercríticos, gases e líquidos.

Estado físico	Densidade (g/cm³)	Difusividade (cm²/s)	Viscosidade (g/cm.s)
Gás P = 1 atm, T= 15 –30 °C	0,6 – 2,0 x 10 ⁻³	0,1 – 0,4	1 – 3 x 10 ⁻⁴
Líquido P = 1 atm, T= 15 –30 °C	0,6 – 1,6	0,2 – 2,0 x 10 ⁻⁵	0,2 – 3,0 x 10 ⁻²
Supercrítico P = P _C ; T = T _C	0,2 – 0,5	0,7 x 10 ⁻³	1 – 3 x 10 ⁻⁴
P = 4P _C ; T = T _C	0,4 – 0,9	0,2 x 10 ⁻³	3 – 9 x 10 ⁻⁴

Fonte: ENGELHARDT e GROSS (1991).

Devido à alta compressibilidade dos FS, pequenas alterações de temperatura e, principalmente pressão, acarretam grandes alterações na densidade do fluido, sendo que esta tendência é mais acentuada em temperaturas mais próximas ao ponto crítico. Estas características são observadas na Figura 7, na qual a densidade do CO₂-SC varia drasticamente nas isotermas 32,1 e 40,15 °C, enquanto que, esta mesma tendência não é tão acentuada nas isotermas 70,15 e 120,15 °C (SIHVONEN et al., 1999).

O desenvolvimento dos processos de extração com FS é dependente do poder solvente do fluido e da volatilidade do soluto. O poder solvente do FS está diretamente relacionado com sua densidade, que aumenta à medida que a pressão aumenta ou a temperatura diminui. Ambos os fatores (densidade e volatilidade) interagem de forma complexa, de modo que, quando a temperatura aumenta isobaricamente, existem duas tendências opostas: o poder solvente do FS diminui com o decréscimo da densidade ou aumenta com a volatilidade do soluto (DEL VALLE e AGUILERA, 1999).

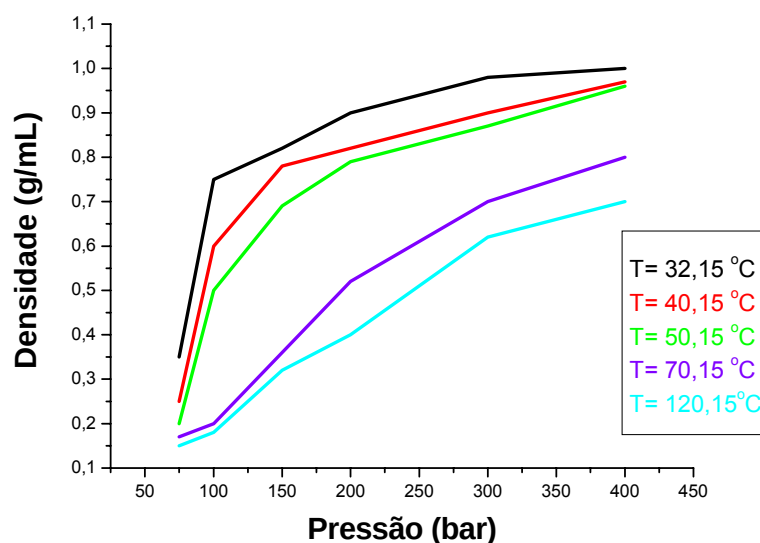


Figura 7 – Relação da pressão e densidade do CO₂-SC em várias temperaturas. (Adaptado de ISMADJI e BHATIA, 2002).

Na Figura 8 é mostrada a solubilidade de triglicerídios (substância com baixa volatilidade) em CO₂-SC, observa-se que a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura e da pressão, devido ao aumento da volatilidade do soluto. Contudo, em temperaturas mais elevadas (80 °C) a solubilidade diminui drasticamente com o decréscimo da pressão, em virtude do decréscimo da densidade do solvente. Na verdade, quando a substância a ser extraída por CO₂-SC apresentar maior pressão de vapor, sua solubilidade irá aumentar em temperaturas menores (mais próximas à temperatura crítica) e pressões mais elevadas (ISMADJI e BHATIA, 2002).

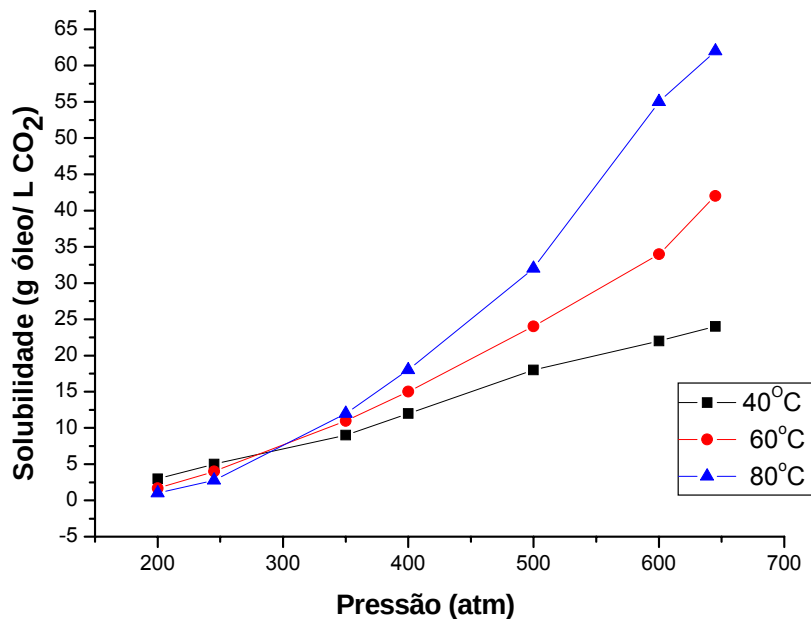


Figura 8 – Solubilidade de triglicerídios em CO₂-SC em várias pressões e temperaturas. Adaptado de DEL VALLE e AGUILERA (1999).

A extração e o fracionamento de produtos nos FS são realizados em duas etapas operacionais: a extração seletiva e a separação seletiva. A primeira envolve a manipulação das condições termodinâmicas de temperatura e pressão e/ou da modificação do solvente pela adição de um cosolvente. A segunda etapa é obtida por meio da despressurização, aquecimento ou resfriamento gradual do extrato, permitindo deste modo um fracionamento controlado dos produtos extraídos (MOHAMED, 1997; BRUNNER, 2005).

A maioria das aplicações com FS utilizam o dióxido de carbono como solvente devido à fácil manipulação, uma vez que sua pressão (73,8 bar) e temperatura críticas (31,1 °C) são relativamente mais baixas do que outras substâncias (Tabela 3). Além disso, este fluido é quimicamente inerte, não inflamável, não tóxico, disponível a custos baixos com pureza elevada e não gera resíduos ambientais (o CO₂ após despressurizado pode ser filtrado e recuperado). Ressalta-se também seu emprego para a extração de produtos termolábeis ou suscetíveis a oxidação, pois sua temperatura crítica é próxima a

do ambiente e o processo extrativo ocorre na ausência de luz e oxigênio (COUTSIKOS et al., 2003).

Contudo, as altas pressões envolvidas em processos de extrações com FS dificultam a introdução contínua de sólidos no extrator, assim como requerem equipamentos e processos otimizados. Portanto, apresentam custos elevados de instalação e manutenção, sendo viáveis somente para a recuperação de compostos com alto valor agregado (JOHNSTON et al., 1989; BRUNNER et al., 2005).

Na Tabela 3 constam os parâmetros, temperatura crítica (T_c), pressão crítica (P_c) e densidade crítica (d_c) de algumas substâncias que poderiam ser usadas como FS. O dióxido de carbono pelas características acima citadas é empregado na maioria das extrações com FS. Porém, possui limitações em decorrência de sua baixa polaridade, sendo, portanto um solvente mais eficiente para compostos apolares (CASTRO e JIMÉNEZ-CARMONA, 2000).

Devido aos seus baixos parâmetros críticos o óxido nitroso também poderia ser empregado, porém é tóxico e explosivo na presença de altas concentrações de compostos orgânicos (ARAÚJO, 2004). Por outro lado, a água, devido a sua polaridade, poderia ser empregada para extração de substâncias com propriedades químicas semelhantes, porém sua temperatura e a pressão críticas muito elevadas comprometem o seu uso como FS. Além disso, a água se torna corrosiva acima de seu ponto crítico (CASTRO e JIMÉNEZ-CARMONA, 2000).

Uma das estratégias empregadas para alterar a polaridade do $\text{CO}_2\text{-SC}$ é a adição de pequenas quantidades de cossolvente. Os mais utilizados são o metanol e o etanol (YANG et al., 1995). O esqualeno, no entanto, é um hidrocarboneto poliinsaturado ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$) e, como tal, apresenta baixa polaridade, logo é solúvel em $\text{CO}_2\text{-SC}$ descartando a necessidade de adição de cossolvente (CATCHPOLE et al., 1997; HE et al., 2003).

Tabela 3 – Parâmetros críticos de algumas substâncias

Substância	T _c (°C)	P _c (bar)	Densidade (g/mL)
Dióxido de carbono	31,1	73,8	0,47
Óxido nitroso	36,5	73,4	0,45
Clorodifluorometano	112	41,2	0,56
Hexafluoreto de enxofre	45,5	37,5	0,74
Água	374	229,9	0,34
n-Pentano	197	33,7	0,23
n-Butano	152	37,9	0,23
Amônia	132,5	113,9	0,24
Trifluoreto de carbono	25,9	47,5	0,52

Fonte: CLIFFORD (2000).

2.8. Processos de separação do esqualeno

As aplicações do esqualeno nas indústrias cosmética e farmacêutica e o uso potencial em formulação de alimentos funcionais têm intensificado o estudo de técnicas de separação deste composto de diversas matrizes biológicas (REICHERT, 2002; KO et al., 2002; HE et al., 2003).

A separação do esqualeno foi realizada através de vários métodos: fracionamento por cromatografia líquida (HE et al., 2002); separação preparativa em cromatografia contra-corrente de alta velocidade (LU et al., 2003); extração com CO₂-SC em escala analítica com misturador estático e fluxo contínuo de fluido supercrítico (KO et al., 2002; BHATTACHARJEE e SINGHAL, 2003), em sistema contínuo de fracionamento com colunas empacotadas em escala analítica e planta piloto de extração (CATCHPOLE et al., 1997) e, ainda, empregando equipamento contracorrente de extração contínua em coluna empacotada com três regiões de controle de temperatura (BONDIOLI et al., 1993).

HE et al. (2002) isolaram e purificaram esqualeno de óleo de semente de *Amaranthus*, através do fracionamento da porção insaponificável, em coluna

empacotada com sílica gel e obtiveram o composto com 94% de pureza. Já LU et al. (2003) separaram esqualeno (96 % de pureza) de microalgas (*Thaustochitrium* ATTC 26185), por cromatografia contra-corrente de alta velocidade, empregando um sistema solvente de duas fases composto de n-hexano:metanol (2:1, v/v). Constatou-se a eficácia destes dois métodos de purificação, porém com relativa complexidade e requerendo muito tempo de execução. Enquanto que, a extração com CO₂-SC é uma técnica rápida, permite certa seletividade através do monitoramento dos parâmetros físicos do fluido, além de não gerar resíduos ambientais, eliminar o uso de grandes quantidades de solvente e ser desnecessária a etapa de concentração do extrato (RAVENTÓS et al., 2002; COUTSIKOS et al., 2003).

HE et al. (2003) avaliaram a extração do esqualeno de semente de *Amaranthus*, com solvente líquido no sistema soxtec e com CO₂-SC. Observaram concentrações de esqualeno no extrato de 6 e 15,3%, respectivamente. Comparando-se estes dois métodos de separação, observa-se a maior seletividade da extração com CO₂-SC.

Nos solventes líquidos a densidade é dificilmente modificada, enquanto que, nos FS pequenas alterações de temperatura e pressão, próximas ao ponto crítico, acarretam grandes mudanças na densidade, o que modifica a sua capacidade de solvatação, tornando-o mais seletivo para determinado analito (SIHVONEN et al., 1999).

KO et al. (2002) avaliaram a extração do esqualeno de folhas de *T. catappa* pelo CO₂-SC. Testaram vários parâmetros físicos e verificaram maior concentração deste composto, nas seguintes condições: 15 min de tempo de extração estática (TEE) e tempo de extração dinâmica (TED), fluxo de CO₂ de 3 mL/min., 40 °C e 206,8 bar. Já BHATTACHARJEE e SINGHAL (2003) realizaram a separação de esqualeno da biomassa liofilizada de sepas de *Torulaspor delbrueckii*, e as condições otimizadas no processo foram: 60°C, 250-255 bar, fluxo de CO₂ de 0,2 L/min, TEE de 30 min e TED de 2 h. As diferenças observadas na otimização dos parâmetros podem ter ocorrido devido a natureza físico-química da matriz ou ainda ao sistema termodinâmico empregado.

CATCHPOLE et al. (1997) realizaram a extração contínua de esqualeno do óleo de fígado de tubarão, usando CO₂-SC e colunas empacotadas, em

escala analítica e planta piloto. Investigaram a influência da pressão, temperatura, relação do fluxo de CO₂ e óleo de alimentação, tipo e tamanho do material de empacotamento. Dos parâmetros avaliados nos dois sistemas extrativos, a pressão e a temperatura otimizadas apresentaram diferenças: em escalas analítica e piloto foram de 200 bar, 40 °C e 250 bar, 60 °C, respectivamente. Constata-se a influência da escala e do modelo termodinâmico do equipamento na extração do composto de uma mesma matriz.

Na Tabela 4 observam-se diferenças nos parâmetros físicos, para a extração com CO₂-SC do esqualeno, em função das diferentes matrizes e do sistema termodinâmico empregado. Observa-se que, independentemente da matriz e das diferenças operacionais do sistema extrativo, constata-se uma faixa de variação de temperatura e pressão de 40 a 60 °C e de 150 a 260 bar, respectivamente (HE et al., 2003; KO et al., 2002; BHATTACHARJEE e SINGHAL, 2003; BONDIOLI et al., 1993; CATCHPOLE et al., 1997).

O analito pode estar ligado a sítios orgânicos e/ou inorgânicos ativos da matriz. Contudo, a complexidade destas interações, aliada à diversidade entre matrizes, comprometem sua compreensão e é um dos fatores que acarretam alterações nas condições físicas de extração, para a remoção do analito de uma determinada matriz (YANG et al., 1995). Verifica-se na Tabela 4 que o esqualeno já foi extraído de diversas matrizes biológicas. Porém, não existem trabalhos com relação à otimização dos parâmetros para extração supercrítica do esqualeno de DDOS.

BONDIOLI et al. (1992) refinaram óleo de oliva lampante com CO₂-SC em sistema contracorrente contínuo e observaram baixo fator de separação do esqualeno e ácidos graxos livres (AGL), mas, por outro lado, o primeiro composto foi satisfatoriamente separado de glicerídios. Devido a estas observações, BONDIOLI et al. (1993) testaram a recuperação de esqualeno, do destilado da desodorização do óleo de oliva (DDOO) pelo CO₂-SC, submetendo a matriz previamente a saponificação e esterificação com glicerol. Nas condições de pressão, temperatura e fluxo de FS otimizadas obtiveram extrato com concentração de esqualeno de 90%.

Tabela 4 – Condições otimizadas de extração supercrítica do esqualeno de diversas matrizes empregando diferentes modelos termodinâmicos.

Matriz		Parâmetros físicos otimizados	Especificações da extração
Semente	Amaranto ¹	50 °C, 200 bar, 2 L de CO ₂ /min., 2 horas de extração	Extração preparativa semicontínua.
Folhas	<i>Temilia catappa</i> ²	40 °C; 206,8 bar; TEE eTED de 15 min., 3mL de CO ₂ -SC/min	Extração analítica
Biomassa	sepas <i>Torulaspora delbrueckii</i> ³	60 °C, 250-255 bar, fluxo de CO ₂ de 0,2 L/min., TEE 30 min e TED 2 h	Extração preparativa
Destilado da Desodorização do óleo de oliva ⁴		50 – 40 – 30 °C (base, meio e topo da coluna de extração); 150 bar; 30 Kg de CO ₂ / kg de óleo	Extração preparativa contracorrente contínua, em coluna de 3 m x 30 mm de diâmetro interno, com controle de temperatura em três regiões (base, meio e topo)
Óleo de fígado tubarão ⁵		200 bar; 40 °C	Extração analítica contínua em coluna empacotada. Capacidade de produção 5 mL/min
Óleo de fígado tubarão ⁵		250 bar; 60 °C	Extração contínua em coluna empacotada em planta piloto, com capacidade de produção de 30 mL/min

¹HE et al., 2003;

²KO et al., 2002;

³BHATTACHARJEE & SINGHAL, 2003;

⁴BONDIOLI et al., 1993;

⁵CATCHPOLE et al., 1997.

CATCHPOLE et al. (2000b) fracionaram o DDOO por CO₂-SC em misturador estático e colunas empacotadas em escala piloto e avaliaram a recuperação do esqualeno. No misturador estático foram empregadas as seguintes variáveis: pressões de 100 a 250 bar, temperaturas de 40 a 60 °C e relação do fluxo de óleo de alimentação e CO₂ de 0,014 a 0,043. No fracionamento contra-corrente, em colunas empacotadas, foram avaliadas as

seguintes variáveis: pressões de 160 a 250 bar, temperaturas de 40 a 60 °C e relação do fluxo de óleo de alimentação e CO₂ de 0,035 a 0,075. Observaram concentrações de esqualeno ligeiramente mais altas na extração em colunas empacotadas, porém o fator de separação do esqualeno e dos AGL foi muito baixo. Portanto, para recuperar esqualeno de DDOO são necessários vários estágios de processamento, ou a remoção dos AGL, antes da extração, ou ainda, a sua conversão em triglicerídios.

MENDES et al. (2005) avaliaram a separação de misturas ternárias envolvendo compostos presentes nos destilados desodorizados de óleos vegetais (tocoferóis, esqualeno e estigmaesterol). Empregaram extrator supercrítico em sistema semi-batelada com variações de pressão e temperatura. O esqualeno e os tocoferóis foram separados com eficiência de 91 %, em temperatura de 40 °C e pressão de 350 bar. Porém, para o esqualeno e o estigmaesterol a melhor eficiência da separação foi de 76,1% (40 °C, 150 bar) e o fator de concentração foi 1, ou seja, nas condições testadas estes compostos não foram separados com eficiência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Análise de Alimento e de Extração Supercrítica do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1. Preparação da matéria-prima

Foram utilizados como matérias-primas os DDOS cedidos pelas indústrias Cargill Agrícola S/A (São Paulo, SP) e pela Olvebra Industrial S/A (Eldorado do Sul, RS). O material foi centrifugado a 15.000 g por 30 minutos a 15 °C, para remover sedimentos, o sobrenadante foi armazenado em frasco âmbar a -20 °C, a fim de evitar sua oxidação.

3.2. Seleção e caracterização química do DDOS centrifugado

Os DDOS centrifugados oriundos das duas indústrias foram submetidos às análises de esqualeno, fitoesteróis e triglicerídios por cromatografia de fase gasosa e os ácidos graxos livres (AGL) por titulação. Nesta fase foi selecionado o DDOS com maior potencial de concentração de esqualeno, sendo posteriormente submetido à cristalização e ao tratamento com Na₂CO₃.

3.2.1. Determinação quantitativa de esqualeno e semi-quantitativa de fitoesteróis e triglicerídios totais no DDOS centrifugado

Os compostos foram separados por cromatografia de fase gasosa (CG), em coluna capilar (Cromopack CP- TAP CB de 25 m x 0,25 mm x 0,1 μ m), com gradiente de temperatura. Utilizou-se o cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890, série II, com detector de ionização de chama.

As condições de análise empregadas foram: temperatura do injetor a 360 °C; temperatura da coluna inicialmente a 135°C por 1 min, aumento de 15 °C/min até 165 °C, permanecendo por 2 min, aumento a uma taxa de 5 °C/min até 225 °C por 7 min e finalmente aumento a 10 °C/min até 345 °C, permanecendo isotérmica por 15 min; temperatura do detector a 370 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão de 16 psi e velocidade de 51,7 cm/s. A injeção de 1,5 μ L foi realizada no modo split, na razão de 70:1.

A quantificação de esqualeno foi realizada através do método de padronização externa. A curva de calibração foi preparada a partir de solução-estoque de esqualeno (97 % Fluka Riedel-de Haën, Seelze, Germany), cujas diluições forneceram concentrações da curva padrão variando de 0,836 μ g/ μ L a 4,459 μ g/ μ L Tanto o padrão como o DDOS (40 mg/mL) foram diluídos em n-hexano grau cromatográfico.

As determinações de fitoesteróis totais foram realizadas por normalização da área total do cromatograma. Para identificar os fitoesteróis foram empregados os padrões de estigamaesterol (90% Sigma Chemical Co., St. Louis, NO, USA) e β -sitosterol (40% Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sendo que o último apresentava em sua formulação campesterol e dihidrobrasicaesterol, conforme informado pelo fabricante.

Os triglicerídios totais também foram determinados por normalização de área, empregando-se, para identificação dos picos, cromatograma característico de óleo de soja, conforme consta em GEERAERT e SANDRA (1985).

3.2.2. Determinação de ácidos graxos livres no DDOS centrifugado

Os ácidos graxos livres no DDOS centrifugado foram determinados por titulação, segundo o método oficial da AOAC nº. 940.28, com modificações (AOAC, 1997).

A amostra (1 g) foi dissolvida em 4 mL de solução éter etílico:álcool etílico (2:1), adicionada de 2 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e titulada com NaOH (0,1 N) até o “ponto de viragem”. Os teores de ácidos graxos livres foram expressos em função do ácido oléico.

3.3. Concentração do esqualeno no DDOS por cristalização seguida de tratamento com Na₂CO₃

Inicialmente foram testados 2 solventes e 4 temperaturas de cristalização, para reduzir os teores de fitoesteróis no DDOS. O tratamento com Na₂CO₃ é uma saponificação a frio e tem a finalidade de remover AGL. O monitoramento da remoção dos AGL foi realizado por titulação (AOAC, 1997).

3.3.1. Cristalização

Segundo LEHMAN e EMBREE (1951) os esteróis podem ser isolados por cristalização com solventes apolares a baixas temperaturas.

Para reduzir os teores de fitoesteróis no DDOS por cristalização foram testadas duas formas de armazenagens, em hexano e em hexano seguido de acondicionamento em acetona (hexano/acetona); nas seguintes temperaturas: -20 °C, -30 °C, -40 °C e -50 °C.

No fluxograma da Figura 9 é descrito o processo de cristalização. O DDOS centrifugado (10 g) foi dissolvido em hexano (60 mL) e armazenado por 24 horas, nas temperaturas citadas anteriormente. Após, o extrato foi filtrado a vácuo em papel filtro Whatman nº 1, para remover os cristais e o filtrado submetido a armazenagem por mais 24 horas. Foram realizadas armazenagens consecutivas até não ser mais possível visualizar a formação de cristais. Observou-se que à -20 °C foram necessárias 4 armazenagens consecutivas de 24 horas. Nas demais temperaturas também foram realizadas o mesmo número de armazenagens seguidas de filtrações. O solvente do

último filtrado foi eliminado no evaporador rotatório a 60 °C. O sólido não cristalizável foi pesado e ressuspenso em acetona na mesma proporção, ou seja, 1:6 e armazenado nas mesmas temperaturas. Novamente, após testar a temperatura de -20 °C, observou-se que foram necessárias duas armazenagens de 24 horas, portanto para as demais temperaturas também foram padronizadas 2 armazenagens de 24 horas. Após cada armazenagem, procedeu-se como já descrito para o hexano. O solvente do último filtrado foi removido no evaporador rotatório a 40 °C. A variável analisada foi a massa não cristalizável (MNC), obtida pela diferença entre a massa do DDOS centrifugado e após a cristalização.

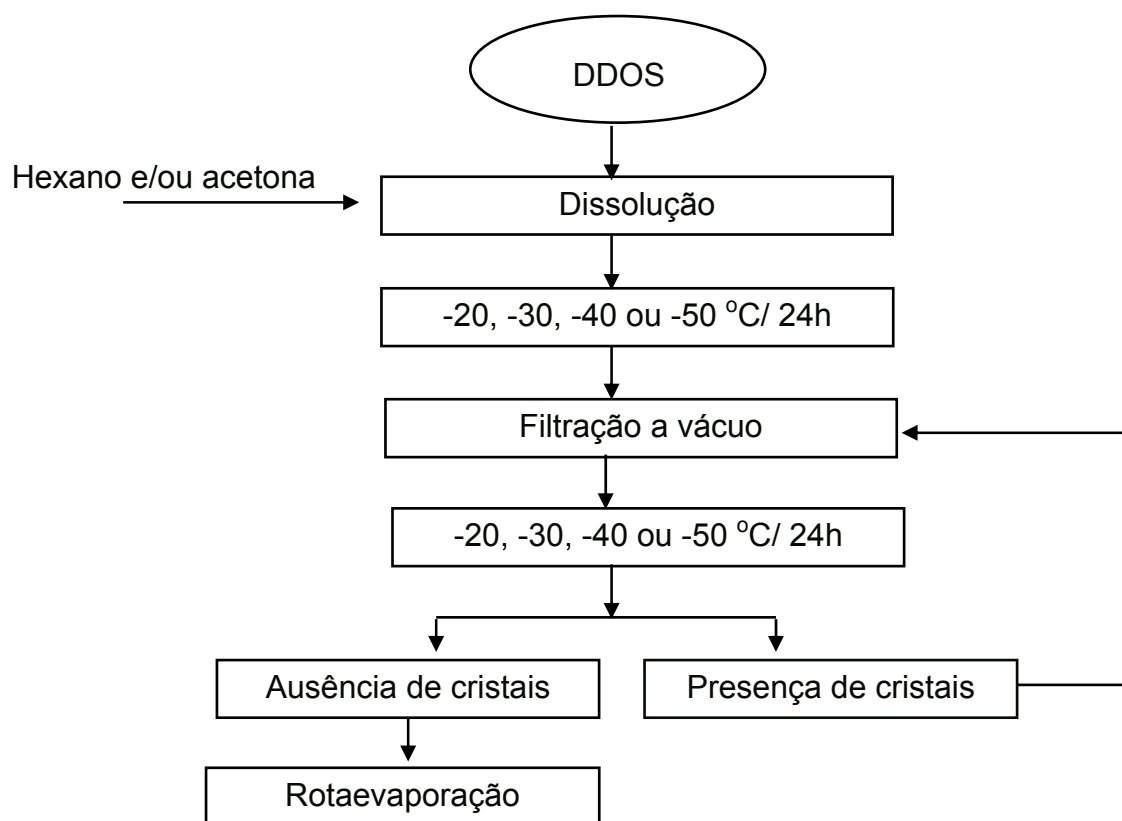


Figura 9 – Fluxograma dos testes de cristalização.

Com estes testes escolheu-se a condição de cristalização que acarretou a menor MNC, ou seja, temperatura de -40 °C e armazenagem em

hexano/acetona. Porém, foram empregadas 2 armazenagens consecutivas de 24 horas em hexano e uma em acetona. O critério empregado para estabelecer o número de armazenagens de 24 horas foi a impossibilidade da visualização de cristais. A MNC foi submetida às análises de esqualeno, AGL, fitoesteróis e TG totais.

3.3.1.1. Delineamento experimental

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2, ou seja, 4 temperaturas e 2 tipos de solvente (hexano, hexano/acetona), com 4 replicatas. Foi realizada análise de regressão para avaliar o efeito da temperatura, em cada solvente, sobre a MRNC. Os dados foram analisados segundo os procedimentos do Statistical Analysis System (SAS), versão 9.1.

3.3.2 Tratamento com Na₂CO₃

Foram utilizados 2 g da MNC obtida após a cristalização em hexano/acetona a -40 °C, dissolvido em 10 mL de hexano, transferido para funil de separação, adicionou-se 10 mL de Na₂CO₃ (1,0 mol/L), agitando-se por 1 min. Após a separação das fases, a fase aquosa foi recolhida e lavada com hexano por 3 vezes consecutivas. As frações apolares foram reunidas e lavadas com solução água:etanol (2:1), por duas vezes, seguidas de lavagem com ácido ascórbico (1,0 mol/L), a fim de reduzir o pH, e o excesso de ácido foi removido com água. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotatório (60 °C) e o sólido pesado e utilizado para as análises de esqualeno, AGL, fitoesteróis e TG e para a extração pelo CO₂-SC.

3.4. Extração com CO₂-SC

A extração do esqualeno no DDOS modificado (cristalização/Na₂CO₃) foi realizada em um equipamento analítico de extração supercrítica, modelo 7680A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA), utilizando-se dióxido de carbono com

pureza mínima de 99,99% (White Martins, Osasco, SP). A configuração da unidade de extração supercrítica esta esquematizada na Figura 10.

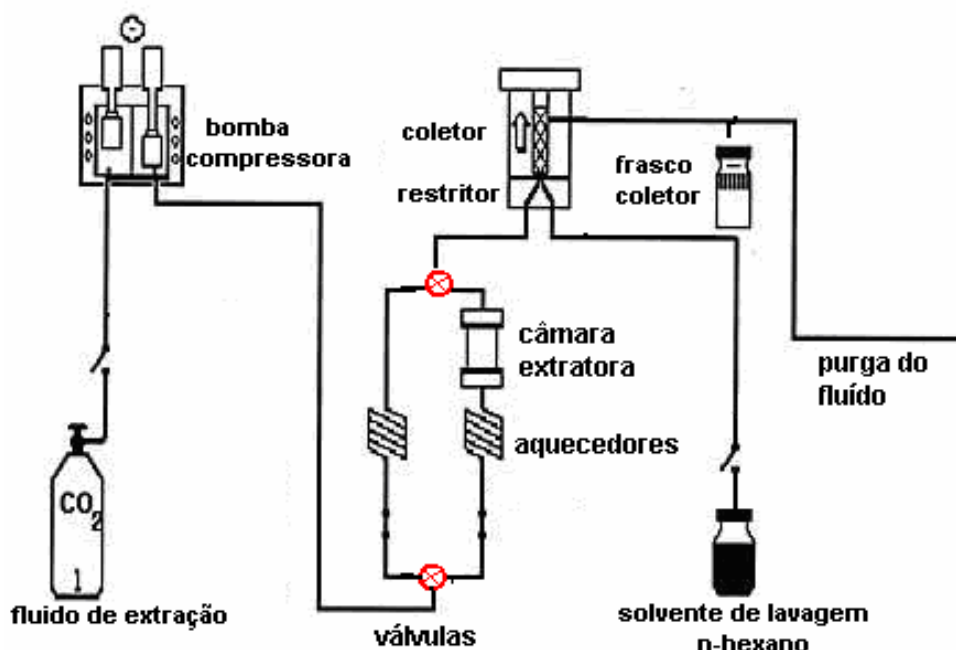


Figura 10 - Desenho esquemático do sistema de extração por fluido supercrítico modelo 7680A - Hewlett Packard.

Neste processo de extração, quando o dióxido de carbono atinge a temperatura e a pressão requeridas, o mesmo entra em contato, com a amostra (DDOS modificado), na câmara extratora de aço inoxidável, com volume de 3,93 mL. Este procedimento ocorre de duas formas denominadas: tempo de extração estático (TEE) e tempo de extração dinâmico (TED). O TEE corresponde a um tempo preestabelecido, no qual o fluido se mantém em contato com a amostra, sem deslocamento. Já no TED, o fluido entra em contato com a amostra e é continuamente removido, sob um fluxo e tempo prefixados.

Depois de sair da câmara extratora o fluido supercrítico é conduzido para o restritor, onde ocorre sua despressurização e conseqüente expansão para o ambiente. Com isso, os compostos extraídos ficam adsorvidos em um

coletor de ODS (octadecilsilica). Posteriormente, são eluídos com n-hexano e coletados em frascos de vidro de 2 mL e analisados por CG.

O experimento foi dividido em duas etapas. Em uma primeira fase foram testadas 3 temperaturas (40, 50 e 60 °C) e 3 pressões (110, 157 e 281 bar), conforme descrito na Tabela 5. Mantiveram-se constantes as seguintes variáveis: TEE (0 min), TED (15 min) e o fluxo de CO₂-SC (1,0 mL/min). A magnitude destes parâmetros foi estipulada visando permitir a passagem de volume de CO₂ suficiente para lavar a câmara extratora por 3 a 10 vezes, durante todo o período da extração, garantindo desta forma a completa recuperação do esqualeno (ARAÚJO, 2004).

Na segunda etapa do experimento, empregando-se os parâmetros já otimizados na etapa anterior (temperatura e pressão) foram avaliados os efeitos de 2 níveis de TEE (0 e 5 min), 3 de TED (15, 20 e 25 min) e 2 de fluxo de CO₂-SC (1,0 e 1,5 mL/min), conforme especificado na Tabela 6.

Em todas as etapas do experimento foram mantidos constantes os seguintes parâmetros: quantidade de DDOS modificado (15 mg), adsorvido em tiras de papel filtro de 2 x 4 cm; volume da câmara de extração (3,93 mL); temperatura do restritor na extração e na reconstituição da amostra (55 °C); temperatura do coletor durante a extração (20 °C) e durante a reconstituição da amostra (55 °C). A temperatura do coletor foi estabelecida seguindo a recomendação do fabricante do equipamento, sendo a mesma mantida, no mínimo, em 10 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente utilizado na lavagem (KNIPE et al., 1993).

Tabela 5 – Variáveis testadas na primeira etapa do experimento.

Tratamento	T (°C)	p (bar)	Densidade do CO ₂ (g/mL)	Nº. de vezes*
1	40 °C	110 ± 2	0,68	5,16
2		157 ± 2	0,79	4,44
3		281 ± 3	0,90	3,90
4	50 °C	110 ± 2	0,50	7,02
5		157 ± 2	0,72	4,88
6		281 ± 3	0,86	4,08
7	60 °C	110 ± 2	0,35	10,03
8		157 ± 2	0,64	5,49
9		281 ± 3	0,81	4,33

*Número de vezes que o CO₂-SC passa pela câmara extratora, calculado com base na equação abaixo:

Volume de CO₂ = fluxo de CO₂ . (densidade na cabeça da bomba/densidade da extração). TED; sendo que, densidade na cabeça da bomba = 0,92 g/mL.

Tabela 6 – Variáveis testadas na segunda etapa do experimento.

Tratamento	Fluxo de CO ₂ -SC (mL/min)	TEE (min)	TED (min)
1	1,0	0	15
2			20
3			25
4	1,5	5	15
5			20
6			25
7	1,5	0	15
8			20
9			25
10	1,5	5	15
11			20
12			25

TEE = Tempo de extração estática

TED = Tempo de extração dinâmica

3.4.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em triplicata. Na primeira etapa em esquema fatorial 3² (3 temperaturas e 3

pressões). O efeito da temperatura e da pressão sobre os teores de esqualeno extraído foi testado por meio de ajuste a um modelo quadrático.

Na segunda etapa empregou-se esquema fatorial 2 x 3 x 2 (2 TEE, 3 TED e 2 fluxos de CO₂). Em cada nível de TEE (0 ou 5 min) foram avaliados os efeitos do TED e do fluxo de CO₂ sobre os teores de esqualeno extraído testando ajustes de modelos matemáticos quadrático e linear, respectivamente. Todas as análises estatísticas foram realizadas segundo técnicas usuais do software Statistical Analysis System (SAS), versão 9.1.

3.5. Análise cromatográfica do teor de esqualeno

As análises por CG foram realizadas de acordo com VERLEYEN et al. (2001), com modificações. Para quantificar os teores de esqualeno foram utilizados 15 mg do DDOS centrifugado e do DDOS modificado (cristalização/Na₂CO₃) dissolvido em 2 mL de hexano, enquanto que o extrato obtido do extrator supercrítico foi diretamente injetado no cromatógrafo.

Empregou-se o mesmo cromatógrafo anteriormente citado equipado com coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,1µm). Foram feitas injeções de 1,5 µL, no modo split (83:1), utilizando-se hidrogênio como gás de arraste à pressão de 16 psi e velocidade de 43,1 cm/s. A temperatura do injetor e do detector foi de 360 °C. A coluna foi mantida a 170 °C por 5 minutos, com aumento a uma taxa de 15 °C/min até 230 °C, permanecendo por 8 minutos.

Nesta etapa utilizou-se além do padrão externo (esqualeno 97%, Fluka Riedel-de Haën, Seelze, Germany), o padrão interno (n-octacosano 99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), a fim de otimizar a análise, pois foi empregada a injeção manual, que se constitui em um dos principais fatores de erro experimental de técnicas cromatográficas (LANÇAS, 1993). Preparou-se uma solução estoque de esqualeno e a partir desta foram preparadas soluções para curva padrão com concentrações variando de 0,0456 µg/µL a 2,052 µg/µL. Utilizou-se uma solução estoque de n-octacosano para que todas as soluções analisadas apresentassem a concentração de 0,16 µg/µL do padrão interno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção e caracterização do DDOS centrifugado

Na Tabela 7 constam os teores médios de esqualeno, AGL, fitoesteróis e TG totais dos DDOS centrifugados Cargill e Olvebra; do DDOS Cargill após a cristalização e após a cristalização seguida do tratamento com Na_2CO_3 (cristalização/ Na_2CO_3). Observa-se que, os DDOS brutos Cargill e Olvebra apresentaram teores de esqualeno semelhantes, porém os teores de AGL do primeiro foram bem superiores aos do DDOS Olvebra. Portanto, o DDOS Cargill apresenta maior potencial para a concentração de esqualeno, visto que os AGL serão removidos, por isto foi selecionado para a modificação físico-química por cristalização/ Na_2CO_3 e posterior extração com $\text{CO}_2\text{-SC}$.

Os teores de AGL, TG, esteróis e esqualeno dos DDOS estudados estão dentro da faixa de variação relatada na literatura, em g/100, correspondente a: 25,3 - 89,3; 1,7 - 5,9; 4,1 - 22,6 e 0,6 - 7,8, respectivamente (BRUNNER et al., 1991; STOLDT e BRUNNER, 1998; CHANG et al., 2000; VERLEYEN et al., 2001). A ampla variação nos teores das diferentes substâncias no DDOS deve-se as diferenças operacionais da desodorização, como pressão, temperatura e tempo; além das diferenças inerentes a matéria-prima empregada (VERLEYEN et al., 2001).

Tabela 7 – Teores médios de esqualeno, AGL, fitoesteróis e TG totais nos destilados da desodorização do óleo de soja (DDOS)

Especificações do produto	Esqualeno (g/100 g)	AGL¹ (g/100 g)	Fitoesteróis totais (g/100 g)	TG totais (g/100 g)
DDOS Olvebra centrifugado ²	3,35 ± 0,62 ³	39,71±3,06	4,723±1,23	8,73±1,66
DDOS Cargill centrifugado	3,45 ± 0,76	52,76 ±2,93	5,288 ±0,98	4,52 ±0,87
DDOS Cargill cristalizado ⁴	4,47 ± 0,84	52,76 ±4,93	3,12 ±0,23	7,87 ±0,78
DDOS Cargill cristalizado ⁴ / Na ₂ CO ₃ ⁵	6,36 ± 0,96	0,56 ± 0,02	3,57±0,15	9,35±0,17

¹AGL expresso em ácido oléico;

²Centrifugado a 15.000 g por 30 min a 15 °C;

³Os dados referem-se a média ± desvio padrão de triplicatas.

⁴Cristalização em hexano/acetona a – 40 °C.

⁵Saponificação a frio com Na₂CO₃.

4.2. Modificações físico-químicas do DDOS

Inicialmente foi realizada uma pré-purificação do DDOS Cargill, envolvendo cristalização com solventes a baixa temperatura seguida de tratamento com Na₂CO₃, com a finalidade de excluir ou reduzir compostos que apresentam baixo fator de separação entre estes e o esqualeno, nas condições de extração com CO₂-SC.

O DDOS é um produto complexo constituído de muitas substâncias, incluindo ácidos graxos livres (AGL), tocoferóis, esteróis, esqualeno e triglicerídios (TG). A natureza complexa desta mistura dificulta sobremaneira a separação de seus componentes (VERLEYEN et al., 2001).

Foram testadas 4 temperaturas de cristalização (-20, -30, -40 e -50 °C) e dois solventes: armazenagem em hexano e em hexano seguido de armazenamento em acetona (hexano/acetona), para averiguar qual a condição que acarreta menor massa não cristalizável (MNC).

Como a cristalização reduz os teores de fitoesteróis (LEHMAN e EMBREE, 1951), será observada maior concentração de esqualeno no DDOS após a extração pelo CO₂-SC, pois, segundo MENDES et al. (2005), estes dois compostos apresentam baixo fator de separação em sistemas de extração com CO₂-SC, constatado pela aplicação de um processo semi-contínuo com a

combinação dos principais constituintes do DDOS (estigmaesterol, esqualeno, tocoferóis e ácido linolênico), em que verificaram que, para separar os tocoferóis, foram necessários três extratores em série, operados a 40 °C: o primeiro sob pressão de 90 bar para separar o ácido linolênico da mistura, o segundo a 250 bar para separar o stigmaesterol e finalmente o terceiro a 350 bar para separar o esqualeno, porém para estes dois últimos compostos, a eficiência máxima alcançada foi de 76,3 %.

Na Tabela 8 é descrito o resumo da variância de regressão linear da MNC para as temperaturas, quando o hexano foi empregado como solvente na cristalização. Observa-se que a regressão e a falta de ajuste foram, respectivamente, significativa e não significativa a 1% de probabilidade pelo teste F. Portanto, as oscilações na MNC ocorreram devido as temperaturas testadas e a equação linear é o modelo matemático mais adequado para descrever estas variações.

Tabela 8 – Resumo da análise de variância de regressão linear da MNC do DDOS armazenado em hexano, em função da temperatura.

Fontes de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
(Tratamentos)	(3)	(0,10136)
Regressão	1	0,27684**
Falta de ajuste	2	0,01362 ^{ns}
Resíduo	12	0,02355

MNC = massa não cristalizável.

**significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

^{ns}não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito da temperatura na MNC quando a cristalização foi realizada em hexano/acetona é descrito pelo modelo de equação quadrática, pois conforme observado na Tabela 9 a regressão é significativa e a falta de ajuste é não significativa ($p \leq 0,01$).

Tabela 9 – Resumo da análise de variância de regressão da MNC do DDOS armazenado em hexano/acetona em função da temperatura.

Fontes de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
(Tratamentos)	(3)	(0,61482)
Regressão	2	0,87502**
Falta de ajuste	1	0,09442 ^{ns}
Resíduo	12	0,329035

MNC = massa não cristalizável.

**significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

^{ns}não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Na Figura 11 são mostradas as curvas obtidas com as equações de regressão para o efeito da variação da temperatura na redução da MNC, em cada solvente, com seus respectivos coeficientes de determinação (r^2). Verifica-se que a armazenagem em hexano/acetona acarretou maior redução na MNC do que somente em hexano e que estas diferenças foram significativas ($p \leq 0,01$). Além disso, para os dois solventes observa-se que a temperatura de -40°C acarretou maior redução na MNC. Devido a isto, a cristalização em hexano/acetona a -40°C foi a condição escolhida.

Após a cristalização o DDOS foi submetido a tratamento com Na_2CO_3 , ou seja, saponificação à frio, para remoção somente dos AGL. Procedeu-se desta forma porque em trabalhos anteriores foi observado que, em extrações com $\text{CO}_2\text{-SC}$, o esqualeno apresentou baixo fator de separação dos AGL, enquanto que compostos mono, di e triglicerídios foram satisfatoriamente separados (BONDIOLI et al., 1992; BONDIOLI et al., 1993; CATCHPOLE et al., 2000b).

A cristalização acarretou uma redução de 41% nos teores de fitoesteróis totais e um aumento na concentração de esqualeno em aproximadamente 30% (Tabela 7). Ambos os tratamentos, cristalização/ Na_2CO_3 , acarretam um aumento de aproximadamente 84% na concentração de esqualeno comparando-se com DDOS centrifugado.

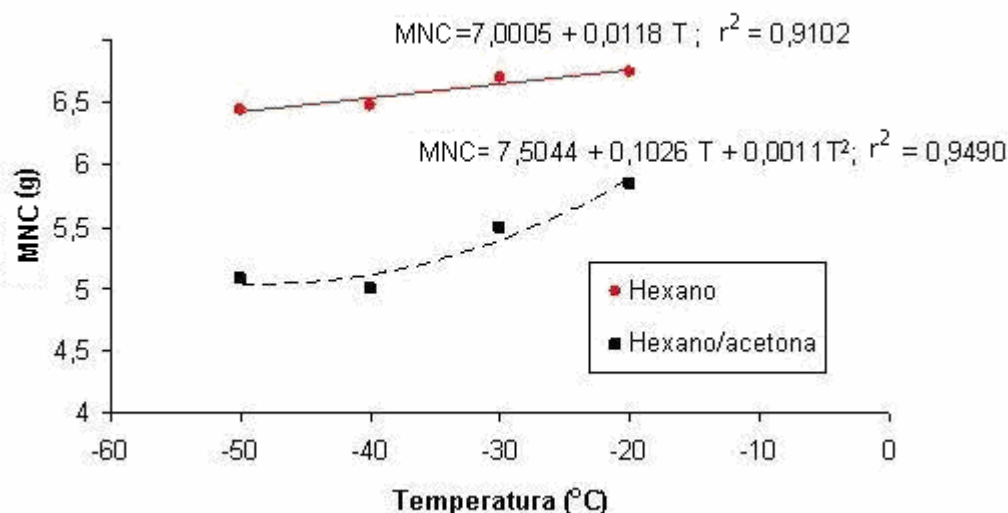


Figura 11 – Massa não cristalizável (MNC) do deslilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) em função das temperaturas e dos solventes empregados na cristalização

Na Figura 12 são mostrados os cromatogramas típicos do DDOS Cargill bruto centrifugado, após ser submetido a cristalização e cristalização/ Na_2CO_3 . Observam-se a redução nas áreas dos fitoesteróis e o aumento nas áreas do esqualeno e dos TG totais, devido às modificações físico-químicas do DDOS Cargill, confirmando os resultados mostrados na Tabela 7.

Nos cromatogramas A e B da Figura 12 verifica-se um pico acentuado no tempo de retenção próximo a 8 min, que praticamente desaparece no cromatograma C, comparando-se estes cromatogramas com os obtidos por VERLEYEN et al. (2001), que também analisaram a composição química do DDOS por CG, verifica-se que provavelmente este pico refere-se ao dos AGL. Portanto, o tratamento com Na_2CO_3 foi eficiente na remoção dos teores de AGL, esta observação é confirmada na Tabela 7.

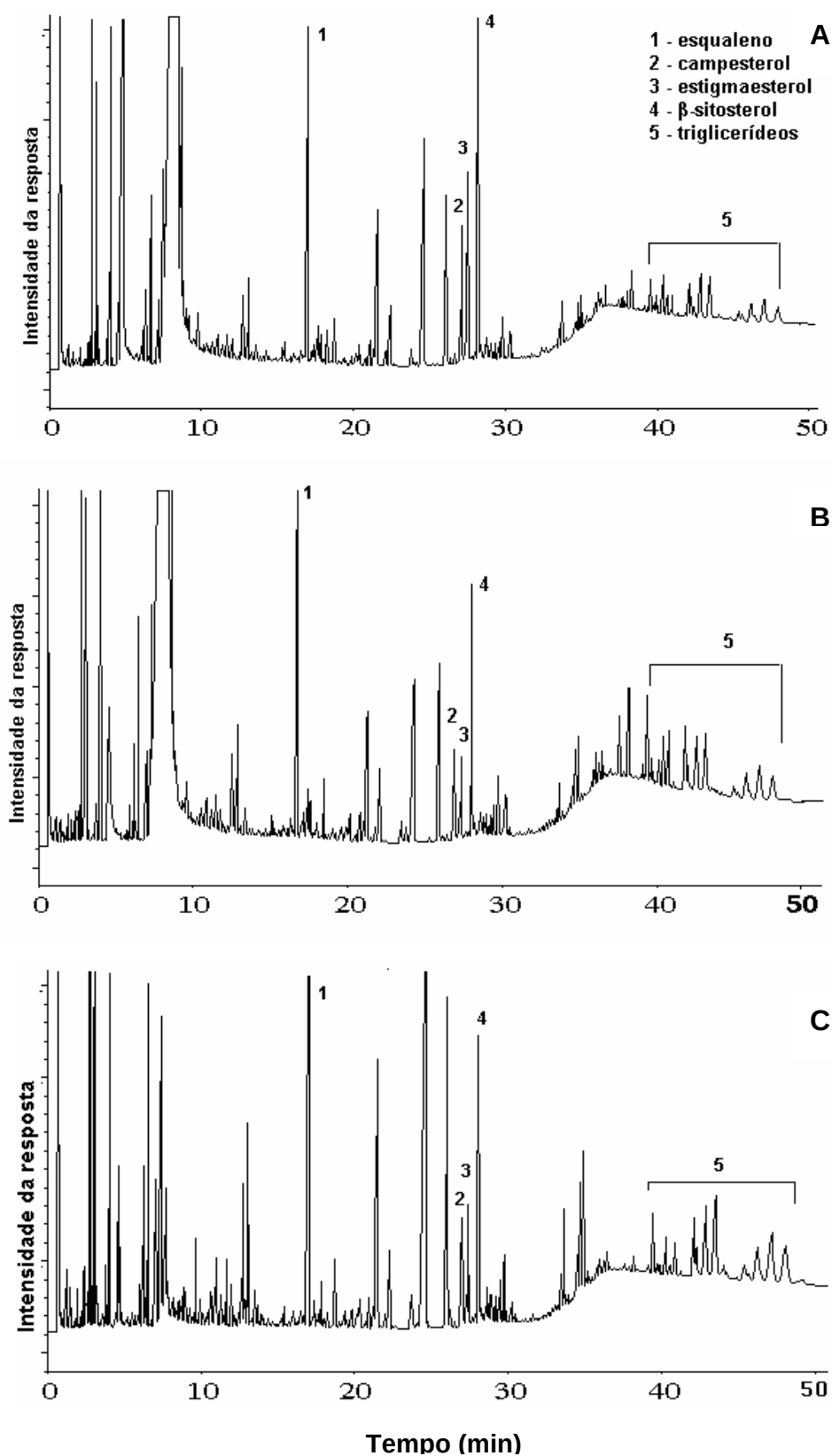


Figura 12 – Cromatogramas do DDOS Cargill bruto centrifugado (A), após a cristalização (B) e após cristalização e tratamento com Na_2CO_3 (C).

Modificações físico-químicas do DDOS, anteriores a extração com CO₂-SC, já foram testadas em outros trabalhos. Estas modificações incluem, cristalização em n-hexano e metanol a 4 °C, saponificação com NaOH e esterificação (LEE et al., 1991; NAGESHA et al., 2003) ou somente saponificação seguida de esterificação (BONDIOLI et al., 1993). Porém, a saponificação à frio com Na₂CO₃ não foi testada nesses estudos.

O tratamento com Na₂CO₃ é um procedimento rápido e demonstrou ser eficaz para a remoção de AGL (Tabela 7) e, provavelmente, acarreta menos alterações indesejáveis no DDOS, enquanto que, na saponificação com NaOH pode ocorrer a destruição de tocoferóis, devido a instabilidade deste composto na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (PARRISCH, 1980). Contudo, a saponificação a frio com Na₂CO₃ não é eficiente na remoção de metil e etil ésteres, que também apresentam baixo fator de separação do esqualeno em sistemas de extração com CO₂-SC (BONDIOLI et al, 1992).

4.3. Extração do esqualeno com CO₂-SC

O DDOS modificado por cristalização/Na₂CO₃ (DDOSM) foi empregado para realizar a extração com CO₂-SC. A otimização dos parâmetros físicos da extração foi realizada em duas etapas. Na primeira foram testadas 3 temperaturas e 3 pressões, sendo que a condição que acarretou a maior quantidade de esqualeno extraído foi empregada na etapa seguinte. Enquanto que, na segunda fase foram avaliados os efeitos da combinação de 2 níveis de fluxo, 2 de TEE e 3 de TED na concentração do esqualeno no extrato.

4.3.1. Efeito da pressão e da temperatura sobre a extração do esqualeno

A análise estatística para teores de esqualeno em função da pressão (p) e da temperatura (T) de extração consta na Tabela 10. Verifica-se que a regressão e a falta de ajuste foram significativas (teste F; $p \leq 0,01$), porém o índice de exatidão (R^2) foi alto (0,7675); logo, a falta de ajuste, mesmo significativa, é pequena. Portanto, a variação de teores de esqualeno ocorreu

devido aos tratamentos (temperatura e pressão), e podem ser estimados segundo a equação 1 (ver Tabela 3A; apêndice).

$$\text{ESQ} = 1,3 - 0,151T + 0,1487 p - 0,000336 p^2 \quad R^2 = 0,7675 \quad (\text{eq. 01})$$

Em que: ESQ são os teores de esqualeno estimados, T e p são respectivamente, a temperatura (°C) e pressão (bar) da extração por CO₂-SC.

Tabela 10 – Resumo da análise de variância de regressão múltipla dos teores de esqualeno, em função da pressão e da temperatura de extração.

Fontes de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
(Tratamentos)	(8)	(14,71602)
Regressão	3	30,12003*
Falta de ajuste	5	5,47362*
Resíduo	18	0,01658

*Teste F significativo a 1% de probabilidade.

Na Figura 13 é mostrado o gráfico da equação dos teores de esqualeno em função de T e p. Observa-se que, a variação de esqualeno em função de T é linear, ou seja, o decréscimo na temperatura de extração acarreta maior concentração de esqualeno. Enquanto que, a influência da pressão segue efeito quadrático. A partir da equação 01 pode-se calcular um valor máximo de pressão (221 bar), na qual são obtidos os níveis mais elevados de esqualeno extraído.

Na Tabela 11 são descritas as concentrações de esqualeno observadas no DDOSM, em função das pressões e temperaturas empregadas. Verifica-se que, conforme descrito pela equação de regressão, temperaturas menores e pressões maiores acarretaram maior concentração do esqualeno no DDOSM, exceto a 50 °C, no qual os teores de esqualeno foram similares nas pressões de 281 e 157 bar. Além disso, constata-se que em temperaturas superiores e na pressão mais baixa (110 bar) a solubilidade do esqualeno no CO₂-SC apresenta uma queda brusca, sendo que a 60 °C não foi mais detectada a

presença de esqualeno pelas análises por CG. Provavelmente, esta tendência deve-se ao decréscimo na densidade do fluido (ISMADJI e BHATIA, 2002).

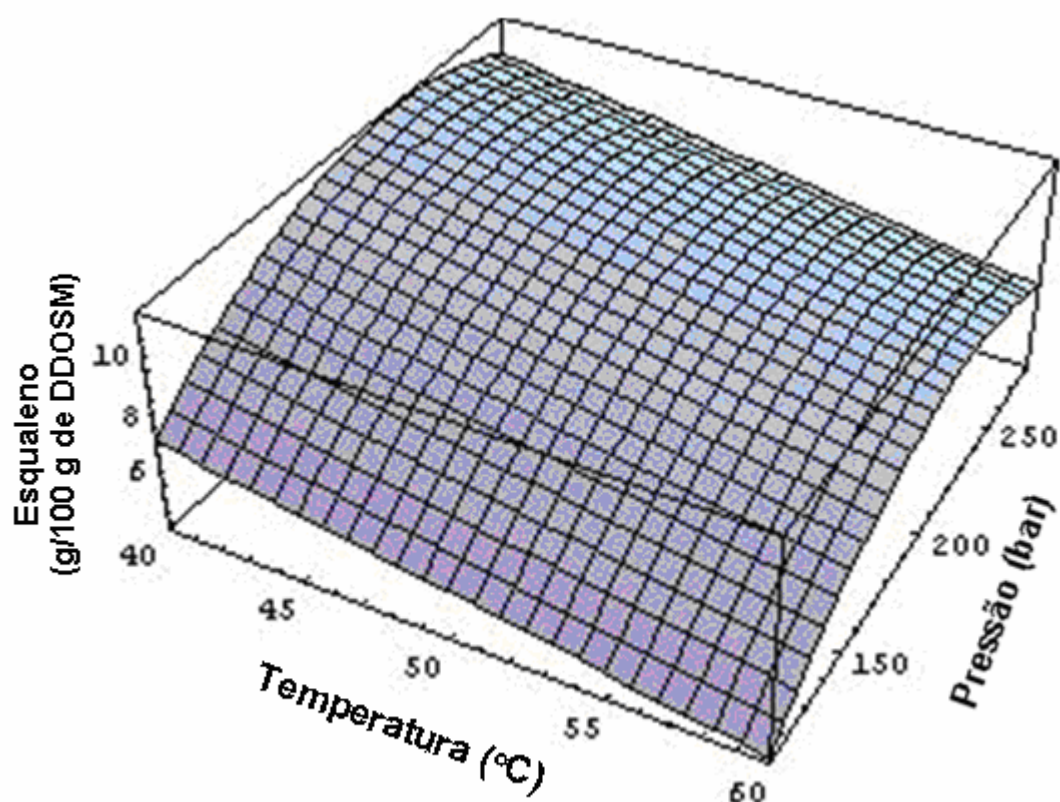


Figura 13 – Gráfico da equação de regressão para os teores de esqualeno em função da temperatura e pressão de extração, mantendo-se constante: TEE = 0 min, TED = 15 min, fluxo de CO₂ = 1,0 mL/min.

Tabela 11 – Teores médios de esqualeno (g/100 g de DDOSM) em função das temperaturas e pressões de extração com CO₂-SC, empregando-se TEE = 0 min, TED = 15 min, fluxo de CO₂ = 1,0 mL/min.

Pressões (bar)	Temperaturas (°C)		
	40	50	60
110	6,407 ± 0,078*	3,966 ± 0,130	nd.**
157	6,691 ± 0,165	6,607 ± 0,080	5,433 ± 0,125
281	7,116 ± 0,024	6,452 ± 0,133	5,706 ± 0,070

* Os dados são as médias ± desvios padrão de triplicatas.

**nd. = não detectado.

Observa-se que na temperatura de 40 °C (Tabela 11) a concentração de esqualeno no extrato apresentou pouca variação (de 6,41 a 7,12 g/100 g) devido ao aumento da pressão. Este mesmo comportamento já foi descrito por HE et al. (2003), que extraíram esqualeno de semente de amaranto e concluíram que esta substância é facilmente extraída nesta temperatura. Contudo, obtiveram maior concentração de esqualeno a 50 °C e 200 bar, pois nestas condições a seletividade é afetada pelos demais constituintes da matriz empregada.

BONDIOLI et al. (1993) extraíram esqualeno de destilado desodorizado de óleo de oliva, empregaram um equipamento em escala piloto em sistema de fluxo contracorrente constante de CO₂-SC, com colunas extratoras empacotadas, e também observaram que a temperatura de 40 °C foi mais efetiva, porém a pressão otimizada foi de 150 bar, que é inferior a verificada neste estudo (281 bar). Provavelmente, a diferença neste parâmetro foi devido aos modelos operacionais dos equipamentos.

A influência da densidade e da temperatura do fluido na extração do esqualeno é mostrada na Figura 14. Constata-se que o aumento da densidade foi o fator predominante na concentração do esqualeno no DDOSM. Contudo, comparando-se a densidade de 0,81 g/mL (60 °C) com 0,79 g/mL (40 °C), verifica-se que na primeira condição a quantidade de esqualeno extraído foi menor do que na segunda. Logo, deve-se considerar também o efeito da temperatura.

A solubilidade de um determinado analito no CO₂-SC é o principal fator determinante da eficiência de sua extração. A solubilidade é controlada pela interação de dois fatores: a volatilidade da substância, que está relacionada com a temperatura; e o efeito de solvatação do FS, alterado pela manipulação de sua densidade (LANG e WAI, 2001). Portanto, quando a temperatura aumenta isobaricamente existem duas tendências opostas, a solubilidade diminui em decorrência do decréscimo da densidade ou aumenta com a volatilidade do soluto, devido ao aumento da temperatura (DEL VALLE e AGUILERA, 1999; ISMADJI e BHATIA, 2002).

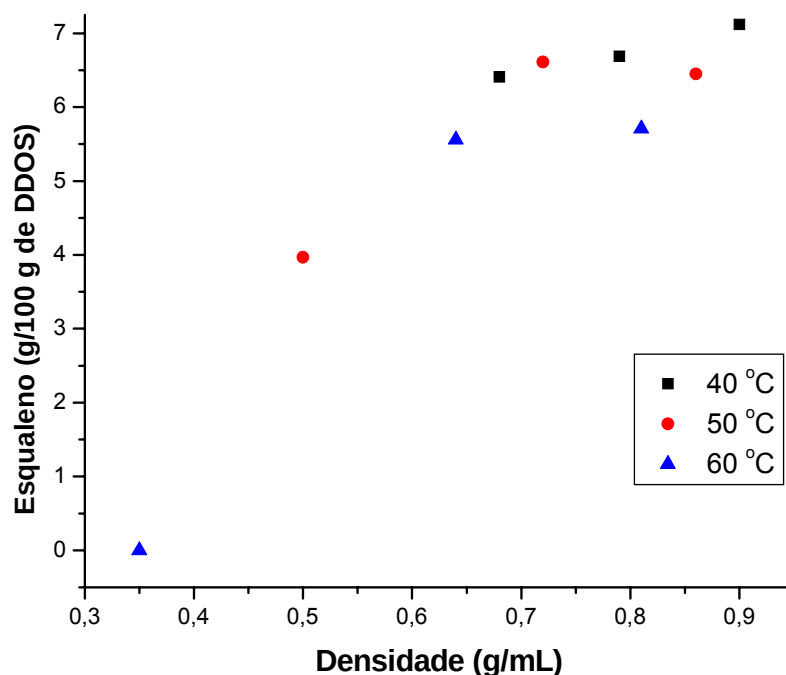


Figura 14 – Efeito da densidade do CO₂-SC e da temperatura nos teores de esqualeno extraído

Na Tabela 12 é descrita a solubilidade do esqualeno em função dos seguintes parâmetros físicos da extração: temperatura e pressão. Observa-se que, na menor temperatura testada (40 °C) e pressões mais elevadas, ou seja, nas densidades mais altas testadas neste estudo, o esqualeno é mais solúvel no CO₂-SC, . Por outro lado, na temperatura de 60 °C, onde se observa declive na densidade, o índice de recuperação (Apêndice; equação 1A) deste composto foi baixo (0 – 89,70%).

A maior concentração de esqualeno (7,12 g/100 g) foi obtida a 40 °C, 281 bar e 0,90 g/mL. Contudo, na mesma temperatura a 157 bar os teores de esqualeno foram somente um pouco inferiores (6,69 g/100 g). Provavelmente, este comportamento foi observado porque o aumento da densidade acarreta a solubilização de uma diversidade maior de componentes, logo a seletividade decresce (DANIEILSKI et al., 2007).

Tabela 12 – Concentração do esqualeno no CO₂-SC em diferentes condições de extração

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade do CO ₂ (g/mL)	Solubilidade do esqualeno no CO ₂ (mg/g)*
40	110 ± 2	0,68	0,0696
40	157 ± 2	0,79	0,0727
40	281 ± 3	0,90	0,0733
50	110 ± 2	0,50	0,0431
50	157 ± 2	0,72	0,0718
50	281 ± 3	0,86	0,0701
60	110 ± 2	0,35	nd**
60	157 ± 2	0,64	0,0591
60	281 ± 3	0,81	0,0620

*Massa de CO₂ = densidade na cabeça da bomba (0,92 g/mL) x TEE x fluxo

**nd = não detectado.

4.3.2. Efeito do fluxo do CO₂, do TEE e do TED sobre a extração do esqualeno

Foi empregada a condição otimizada na fase anterior do experimento (40 °C, 281 bar) e alterados o fluxo de CO₂, o TEE e o TED, para verificar seus efeitos na concentração do esqualeno no DDOSM.

As variáveis, fluxo de CO₂-SC e TED determinam a massa e o volume total de CO₂ (Apêndice; Tabelas 1A e 2A) utilizados durante a extração, por isto são críticas na recuperação do analito. O fluxo ótimo é aquele que permite a saturação dos componentes solubilizados e o tempo de extração deve permitir que todos os compostos sejam removidos da matriz e adsorvidos ao coletor (NICOLINO, 1995; PALMA et al., 2000).

O TEE corresponde a uma diluição em que a matriz permanece por um intervalo de tempo mergulhada no FS, geralmente é mais efetivo para amostras sólidas, ou para analitos fortemente ligados à matriz ou, ainda, quando são adicionados modificadores (LANGENFELD et al., 1994). Como a matriz

empregada é líquida e o composto de interesse é apolar, dispensa-se o uso de modificadores, por isso somente foi testado o TEE de 5 min.

Não foram encontrados na literatura dados sobre a otimização dos parâmetros fluxo de CO₂, TEE e TED para a extração de esqualeno de outras matrizes, utilizando extrator analítico, semelhante ao deste estudo, pois nem todos os equipamentos empregam a combinação de TEE e TED. Portanto, não são possíveis comparações dos resultados obtidos com os já descritos. KO et al. (2002) também empregaram equipamento de extração pelo CO₂-SC em escala analítica, porém somente avaliaram teores de esqualeno em função das alterações de pressão e temperatura, enquanto que o fluxo de CO₂ (3 mL/min), TEE (15 min) e TED (15 min) foram mantidos fixos.

Na Tabela 13 é descrito o resumo da análise de regressão para os teores de esqualeno, na ausência de TEE, em função do fluxo de CO₂-SC e do TED. Verifica-se que o modelo de regressão empregado é significativo e a falta de ajuste também (teste F; $p \leq 0,01$), contudo o índice de exatidão é elevado (0,8872). Portanto, a variação de teores de esqualeno ocorreu devido aos tratamentos (fluxo e TED) e, podem ser estimados segundo a equação 2 (ver Tabela 4A; apêndice).

$$\text{ESQ} = 9,61 + 2,6187 F - 0,5553 \text{ TED} + 0,0156 \text{ TED}^2 \quad R^2 = 0,8872 \quad (\text{eq. 02})$$

Em que: ESQ são os teores de esqualeno estimados e F o fluxo de CO₂-SC (mL/min).

Tabela 13 – Resumo da análise de variância da regressão múltipla dos teores de esqualeno extraído em função do fluxo e do TED, quando o TEE=0 min.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
(Tratamentos)	(5)	(2,1788)
Regressão	3	3,2219*
Falta de ajuste	2	0,6143*
Resíduo	12	0,03794

*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

O gráfico da equação dos teores de esqualeno em função de TED e do fluxo de CO₂ é mostrado na Figura 15. Observa-se que, a variação da concentração do esqualeno em função do fluxo de CO₂ é linear, ou seja, o aumento no fluxo acarreta aumento nesta concentração. Por outro lado, considerando-se o efeito do TED, o comportamento é quadrático e o aumento do TED proporcionou extração de maior quantidade de esqualeno.

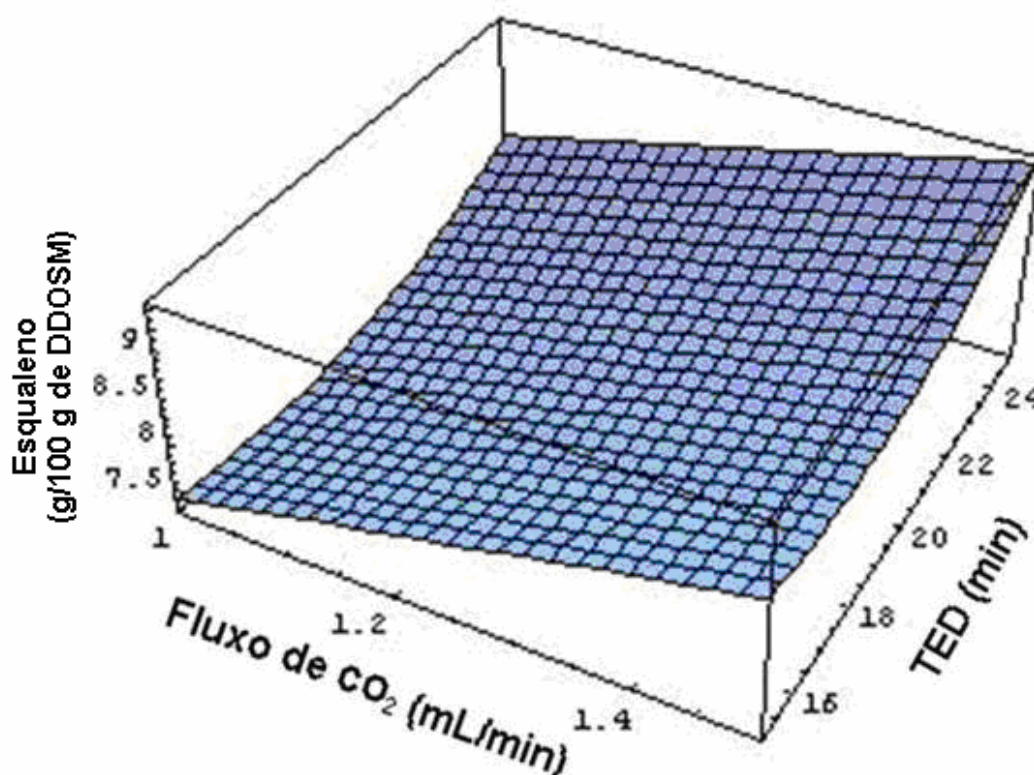


Figura 15 – Gráfico da equação de regressão para os teores de esqualeno em função do fluxo de CO₂ e do TED, mantendo-se constante: temperatura = 40 °C, pressão = 281 bar, densidade = 0,90 g/mL e TEE = 0 min.

Na Tabela 14 são descritas as concentrações de esqualeno observadas no DDOSM, em função dos fluxos de CO₂ e dos TED, quando o TEE é mantido fixo em 0 min. Verifica-se que, conforme constatado pela análise de regressão,

o aumento do fluxo do CO₂-SC acarretou uma concentração superior de esqualeno. Isto pode ter ocorrido devido a fluxos elevados serem recomendáveis para compostos altamente solúveis e de fácil acesso (ARAÚJO, 2004). A matriz empregada é líquida e na câmara de extração foi apenas adsorvida em papel-filtro, o que aumenta o contato com o FS.

Tabela 14 - Efeito do fluxo de CO₂-SC e TED na concentração do esqualeno no DDOSM (g/100 g), empregando-se a seguinte condição de extração: T = 40 °C; P = 281 bar; d = 0,90 g/ml; TEE = 0 min.

Fluxo de CO ₂ (mL/min)	TED (min)		
	15	20	25
1,0	7,116 ± 0,024 *	7,288 ± 0,069	8,417 ± 0,280
1,5	8,997 ± 0,184	8,717 ± 0,318	9,036 ± 0,097

* Os dados são as médias ± desvios padrão de triplicatas.

Porém, com testes posteriores usando fluxo de CO₂ de 2,0 mL/min, TED de 15 min e TEE de 0 min, foram obtidos teores de esqualeno menores (8,023 g/100 g) do que com fluxo de 1,5 mL, TED de 15 min e TEE de 0 min (8,997 g/100 g), por isto não foram investigados fluxos superiores. Segundo KNIPE et al. (1993) fluxos muito altos podem ocasionar decréscimo no rendimento pelas perdas de extrato por arraste durante a adsorção no coletor.

Verifica-se que no fluxo de CO₂ de 1,0 mL/min (Tabela 14), TED mais longos influenciaram na mais alta concentração do esqualeno, provavelmente, devido ao aumento da massa de CO₂-SC consumida na extração (13,8 g, 18,4 g e 23 g, para TED de 15, 20 e 25 min, respectivamente). Este mesmo comportamento não foi observado para o fluxo 1,5 mL/min, no qual os teores de esqualeno no DDOSM apresentaram pequena variação em função do aumento do TED, de 8,72 a 9,04 g/100 g. Neste caso, provavelmente foi atingida a saturação dos compostos extraídos, e o aumento no volume de CO₂ empregado não teve mais efeito sobre a solubilização do esqualeno (Tabela 2 A; apêndice).

A análise de regressão múltipla para o efeito da concentração de esqualeno em função da variação do fluxo e do TED, quando o TEE é fixado em 5 min é mostrada na Tabela 15. Observa-se que a equação linear não explica significativamente a variação dos teores de esqualeno extraído, em função do de fluxo de CO₂. Além disso, os efeitos do TED na extração do esqualeno, também não podem ser ajustados significativamente aos modelos matemáticos, linear ou quadrático. Portanto, quando é utilizado o TEE de 5 min o TED e o fluxo parecem não afetar os níveis de esqualeno, visto que, conforme observado na Figura 16, a variação é pequena em decorrência destes tratamentos (8,94 a 9,44 g/100 g de DDOSM).

Tabela 15 - Resumo da análise de variância da regressão múltipla dos teores de esqualeno extraído em função do fluxo e do TED, no TEE = 5 min.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
(Tratamentos)	(5)	(0,13620)
Regressão	3	0,109813 ^{ns}
Falta de ajuste	2	0,17579**
Resíduo	12	0,031455

^{ns}Teste F não significativo a 1% de probabilidade

** Teste F significativo a 1% de probabilidade.

Na Figura 16 são mostradas as concentrações do esqualeno no DDOSM em função do TED e do fluxo de CO₂, quando a extração é realizada com TEE de 5 min. Verifica-se que, o aumento do fluxo ocasionou aumento na extração do esqualeno, exceto para o TED de 15 min. Também se observa um decréscimo nos teores de esqualeno com o aumento do TED no fluxo de CO₂ de 1 mL/min e um efeito oposto em fluxo de 1,5 mL/min.

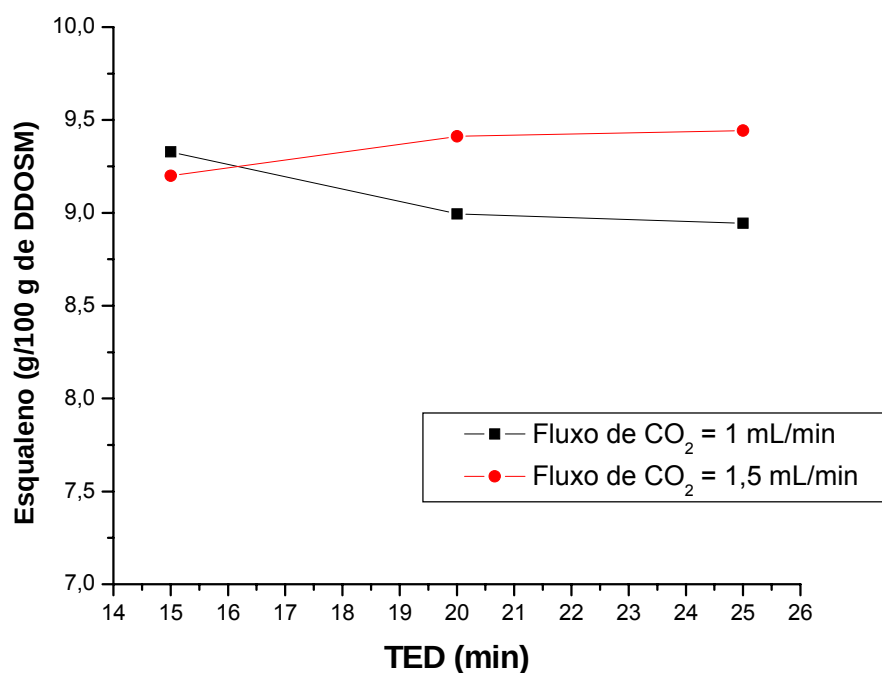


Figura 16 – Efeito do tempo de extração dinâmica (TED) e do fluxo de CO₂ na concentração de esqualeno, empregando-se a seguinte condição de extração: T = 40 °C; P = 281 bar; d = 0,90 g.mL⁻¹; TEE = 5 min.

Comparando-se a variação dos teores de esqualeno extraído empregando-se TEE (0 min), fluxo de CO₂ de 1,5 mL/min, nos diversos TED (8,943 a 9,329 g/100 g) com os obtidos no TEE de 5 min, variando fluxo e TED (8,717 a 9,444 g/100 g) verifica-se que são semelhantes. Portanto, o aumento do TEE ou do fluxo de CO₂ tiveram efeito similar na recuperação do esqualeno do DDOSM. Isto pode ter ocorrido porque o aumento do fluxo, do TED e do TEE tem efeito sobre a transferência de massa do analito para o FS devido ao aumento do volume de CO₂ empregado ou por facilitar a ruptura das interações analito-matriz, até um determinado limite, no qual é atingida a saturação deste analito no solvente (DANIELSKI et al., 2007).

Portanto, empregando-se o fluxo de CO₂ de 1,5 mL/min ou o TEE de 5 min, a variação dos demais parâmetros, na faixa testada neste estudo, não tem efeito significativo no aumento dos níveis de concentração de esqualeno. Porém, obteve-se a maior concentração de esqualeno no DDOSM (9,44 g/100 g), empregando-se os maiores fluxos, TED e TEE testados. Contudo, os teores

(9,33 g/100 g) obtidos com fluxo de CO₂ de 1,0 mL/min, TEE de 5 min e TED de 15 min não diferiram significativamente (teste F; $p \leq 0,01$). Como tempos de extração e fluxos menores são economicamente mais viáveis (LANG e WAY, 2001), a última condição de extração é a recomendável e está descrita na Tabela 16.

Tabela 16 – Condições termodinâmicas otimizadas da extração com CO₂-SC de esqualeno do DDOS modificado.

Parâmetros	Descrição
Teores de amostra	15 mg
Tipo de coletor	ODS
Condições de extração	
Temperatura	40 °C
Pressão	281 bar
Densidade	0,90 g/mL
TEE	5 min
TED	15 min
Fluxo de CO ₂	1,0 mL/min
Temperatura do restritor	55 °C
Temperatura do coletor	20 °C
Condições de reconstituição da amostra	
Solvente	n-hexano
Temperatura do coletor	55 °C
Volume de reconstituição	2 mL

4.4. Comparação do efeito dos tratamentos na concentração do esqualeno no DDOS

Na Figura 17 são mostrados os cromatogramas típicos do DDOS centrifugado, do DDOS modificado (cristalização/Na₂CO₃) e do extrato obtido após a extração com CO₂-SC. São evidenciados os tempos de retenção do

esqualeno e do n-octasano (padrão interno), verifica-se o aumento da área do esqualeno em função dos tratamentos.

Nos cromatogramas A e B (Figura 17) observa-se que no tempo de retenção de aproximadamente 7 min há um decréscimo significativo na área deste pico, comparando-se com o perfil cromatográfico obtido por VERLEYEN et al. (2001), que também analisaram DDOS utilizando a mesma coluna deste estudo (HP-5), é possível identificar como sendo, provavelmente, AGL, que conforme consta na Tabela 7 e no cromatograma da Figura 12 foram reduzidos em virtude do tratamento com Na_2CO_3 .

Na Tabela 17 estão descritos os teores de esqualeno no DDOS bruto, no DDOS modificado e no DDOS modificado e submetido a extração com CO_2 -SC. Observa-se que na pré-purificação (cristalização/ Na_2CO_3) obteve-se uma concentração de esqualeno de cerca de 84%. E após a extração com CO_2 -SC os teores de esqualeno apresentaram um percentual de concentração de 176%. Constata-se, portanto, a eficiência da metodologia empregada na obtenção de um DDOS com maiores teores de esqualeno, aumentado deste modo a possibilidade do uso deste resíduo como fonte desta substância.

Tabela 17– Comparação entre os teores de esqualeno no DDOS bruto, no DDOS cristalizado/ Na_2CO_3 e após a extração com CO_2 -SC.

DDOS	Esqualeno (g/100 g)
Bruto	$3,382 \pm 0,037^*$
Modificado (cristalizado/ Na_2CO_3)	$6,037 \pm 0,207$
Modificado e extração com CO_2 -SC	$9,328 \pm 0,265$

*Teores médio $\pm$ desvio padrão de triplicatas.

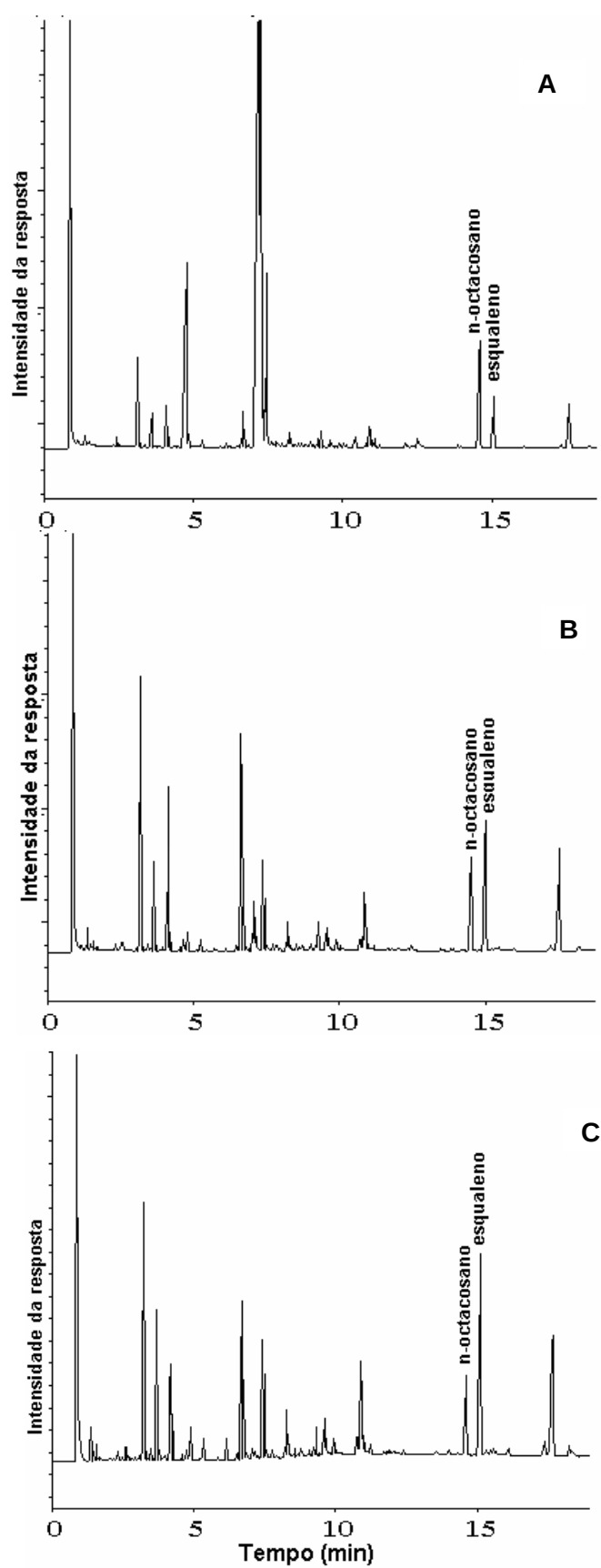


Figura 17 – Cromatogramas típicos do DDOS centrifugado (A), do DDOS modificado (B), e DDOS modificado após a extração com CO₂-SC (C).

BONDIOLI et al. (1993) utilizaram para a separação de esqualeno, o destilado da desodorização do óleo de oliva (DDOO), com concentração inicial de esqualeno de 28 g/100 g. Para realizar a separação empregaram uma planta piloto de extração, com CO₂-SC em fluxo contracorrente contínuo (30 Kg / Kg de amostra), com um conjunto de três colunas empacotadas extratoras em série e com possibilidade de controle diferencial de temperatura, e obtiveram um extrato com 90 g/100 g de esqualeno. Porém, antes de submeter o DDOO a extração com CO₂-SC, realizaram modificações químicas que incluíram, saponificação a quente sob refluxo com NaOH, seguida de esterificação com glicerol e zinco como catalisador.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os do trabalho descrito anteriormente, observa-se que os percentuais de concentrações de esqualeno obtidos foram de 176% e 221%, respectivamente. Verifica-se que estes níveis de concentração são próximos e que as diferenças observadas devem-se, provavelmente, a constituição química inicial das amostras, as metodologias para a modificação química inicial dos destilados e aos modelos termodinâmicos empregados.

Utilizando os resultados deste estudo e os dados da produção nacional de óleo de soja de 2006/2007, estimada em 4,1 milhões de toneladas (ABIOVE, 2007) e o percentual de DDOS gerado de 0,1 a 0,4% do óleo bruto (MENDES et al., 2002), é possível simular a disponibilidade total média de esqualeno em aproximadamente 347 t, 619 t e 956 t, respectivamente para o DDOS centrifugado, DDOSM e após a extração com CO₂-SC. Portanto, a metodologia deste estudo agregou valor ao DDOS, aumentando a disponibilidade de esqualeno a partir desta matriz. Porém, é necessário avaliar a relação custo/benefício, assim como sua implantação em escala piloto visando à aplicação industrial.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, o DDOS foi submetido a processos prévios de purificação (cristalização/ Na_2CO_3) e após, otimizou-se as condições de extração com CO_2 -SC, com a finalidade de se obter um extrato com mais altas concentração de esqualeno.

A cristalização reduziu em 41% os teores dos fitoesteróis totais no DDOS e o tratamento com Na_2CO_3 foi eficiente na remoção de AGL. Ambos os tratamentos aumentaram a concentração de esqualeno em 84% comparando-se com o DDOS centrifugado.

As condições otimizadas para a extração supercrítica do esqualeno do DDOS modificado foram: 40 °C, 281 bar, 0,90 g/mL, 5 min (TEE), 15 min (TED) e fluxo de CO_2 de 1,0 mL/min.

A modificação físico-química do DDOS (cristalização/ Na_2CO_3) seguida da extração pelo CO_2 -SC proporcionou um aumento de 2,8 vezes nos teores de esqualeno. Logo, agregou valor ao DDOS, que é uma matéria-prima de baixo custo e amplamente disponível, visto que, o mesmo é um resíduo do processamento de óleo de soja, cuja produção nacional é significativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEI, A.A. An overview of franesyltransferase inhibitors and their role in lung cancer therapy. **Lung Cancer**, v. 41, s.1, p. 55-62, August, 2003.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos – teoria e prática**. 3^a. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 478 p.

ARAÚJO, J.M.A.; NICOLINO, A.P.N.; BLAT, C. Utilização do dióxido de carbono supercrítico na concentração de tocoferóis do destilado desodorizado do óleo de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 201-205, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS - **ABIOVE**. Balanço de oferta/demanda do complexo soja, 2007. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/estatistica_br.html > Acessado em 16/02/2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 1997.

BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R.S. Extraction of squalene from yeast by supercritical carbon dioxide. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 605-608, 2003.

BONDIOLI, P.; MARIANI, C.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; MOSSA, A.; MULLER, A. Lampante olive oil refining with supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 477-480, 1992.

BONDIOLI, P.; MARIANI, C.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; MOSSA, A.; MULLER, A. Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, p. 763-766, 1993.

BRUNNER, G; MALCHOW. Th.; STÜRKEN, K.; GOTTSCHAU Th. Separation of tocopherols from deodorizer condensates by countercurrent extraction with carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 4, p. 72-80, 1991.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p.21-33, 2005.

BUCZENKO, G.M.; OLIVEIRA, J.S.de; MEIEN, O.F.V. Caracterização físico-química do subproduto obtido durante a desodorização do óleo de soja. **Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos - B.CEPPA**, Curitiba, v. 20, p. 55-64, 2002.

CASTRO, M.D.L., JIMÉNEZ-CARMONA, M.M. Where is supercritical fluid extraction going? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, p. 223-228, 2000.

CATCHPOLE, O.J.; KAMP, J.C.; GREY, J.B. Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 4318-4324, 1997.

CATCHPOLE, O.J.; GREY, J.B.; NOERMARK, K.A. Fractionation of fish oils using supercritical CO₂ and CO₂ + ethanol mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 25-37, 2000a.

CATCHPOLE, O. J.; SIMÕES, P.; GREY, J.B.; NOGUEIRO, E.M.M.; CARMELO, P.J.; PONTE, M.N. Fractionation of Lipids in a Static Mixer and Packed Column Using Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4820-4827, 2000b.

CHANG, C.J.; CHANG, Y.F.; LEE, H.Z.; LIN, J.; YANG, P.W. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of High-Value Substances from Soybean Oil Deodorizer Distillate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4521-4525, 2000.

CLIFFORD, A.A. Introduction to supercritical fluid extraction in analytical science. In: WESTWOOD, S.A. **Supercritical fluid extraction and its use in chromatographic sample preparation**. Florida: CRC Press, 2000. p. 1-38.

COUTSIKOS, A., MAGOULAS, K., KONTOGEORGIS, G.M. Prediction of solid-gas equilibria with the Peng-Robinson equation of state. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 25, p. 197-212, 2003.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONER, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Berkeley: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DANIELSKI, L.; CAMPOS, L. M.A.S.; BRESCIANI, L. F.V.; HENSE, H.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 99–106, 2007.

DEL VALLE, J.M.; AGUILERA, J.M. Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. **Food Science Technology International**, v. 5, p. 1-24, 1999.

DREHER, D.; JUNOD, A.F. Role of free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, v. 32A, p. 30-38, 1996.

ENGELHARDT, H.; GROSS, A. Supercritical fluid extraction and chromatography: potential and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 10, p. 64-70, 1991.

ERICKSON, D.R. ed. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. St. Louis, Missouri, AOCS Press, 1995. p. 543.

FARVIN, K.H.S.; ANANDAN, R.; KUMAR, S.H.S.; SHINY, K.S.; SANKAR, T.V.; THANKAPPAN, T.K. Effect of squalene on tissue defense system in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 231-236, 2004.

GEERAERT, E.; SANDRA, P. Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase, part I. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 8, p. 415-422, 1985.

GRAAF, M.R.; RICHEL, D.J.; NOORDEN, C.J.F.; GUCHELAAR, H.J. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, p. 609-641, 2004.

GYLLING, H.; MIETTINEN, T.A. Postabsorptive metabolism of dietary squalene. **Atherosclerosis**, v. 106, p. 169-178, 1994.

HAMM, W. Trends in edible oil fractionation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 121-126, 1995.

HE, H.P.; CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Extraction and Purification of Squalene from *Amaranthus* Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 368-372, 2002.

HE, H.P.; CORKE, H. Oil and squalene in *Amaranthus* grain and leaf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7913-7920, 2003.

HE, H.P.; CORKE, H.; CAI, J.G. Supercritical carbon dioxide extraction of oil and squalene from *Amaranthus* grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7921-7925, 2003.

HECHT, S.S. Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines – a model for cancer prevention strategies. **Drug Metabolic Review**, v. 26, p. 373-390, 1994.

HOFFMANN, D.; BRUNNEMANN, K.D.; PROKOPCZK, B.; DJORIDJEVIC, M.V. Tobacco-specific N-nitrosamine and areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. **Journal of Toxicological Environment Health**, v. 41, p. 1-52, 1994.

INTITURO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa12200605.shtm>> Acessado em: 16 jan. 2007.

ISMADJI, S., BHATIA, S.K. Solubility of selected esters in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, p. 1-11, 2002.

JOHNSTON, K.P., PECK, D.G., KIM, S. Modelling supercritical fluids. How predictive is it?. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 28, p. 1115-1125, 1989.

KELLY, G.S. Squalene and its potential clinical uses. **Alternative Medicine Review**, v. 4, n.1, p. 29-36, 1999.

KHOR, H. T.; H.T.; CHIENG, D. T. Lipidaemic effects of tocotrienols, tocopherols and squalene: studies in the hamster. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 6, p. 36-40, 1997.

KIM, H.J.; LEE, S. B.; PARK, K. A; HONG, I. K. Characterization of extraction and separation of rice bran oil rich in EFA using SFE process. **Separation and Purification Technology**, v. 15, p. 1-8, 1999.

KNIFE, C.R.; MILES, W.S.; ROWLAND, O.F.; RANDALL, L.G. **Designing a sample preparation method that employs supercritical fluid extraction**. Wilmington, Hewlett-Packard Company, 1993.

KO, T. F.; WENG, Y.M.; CHIOU, Y.Y. Squalene content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* leaves and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5343-5348, 2002.

KOHNO, Y.; EGAWA, Y.; ITOH, S.; NAGAOKA, S.; TAKAHASHI, M.; MUKAI, K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1256, p. 52-56, 1995.

LAAKSONEN, R.; OJALA, J.P.; TIKKANEN, M.J.; HIMBERG, J.J. Serum ubiquinone concentrations after short- and long-term treatment with HMG-CoA reductase inhibitors. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 313-317, 1994.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos, Acta, 1993. 254p.

LANG, Q., WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. **Talanta**, v. 53, p. 771-782, 2001.

LANGENFELD, J.J.; HAWTHORNE, S.B.; MILLER, D.J.; PAWLISZYN, J. Role of modifiers for analytical-scale supercritical fluid extraction of environmental samples. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 909-916, 1994.

LEE, H.; CHUNG, B.H.; PARK, Y.H. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 8, p. 571-573, 1991.

LEHMAN, R.W.; EMBREE, N.D. Soybean oil by-products. In: MARKLEY, K. **Soybean and soybean products**. New York, Interscience, 1951. p. 833-852.

LEITNER, W. Designed to dissolve. **Nature**, v. 405, p. 129-130, 2000.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.C.; CAMPRA-MADRID, P.; GUIL-GUERRERO, J.L. γ -Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, p. 294-298, 2004.

LU, H.T.; JIANG, Y.; CHEN, F. Preparative separation and purification of squalene from the microalga *Thraustochytrium* ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 994, p. 37-43, 2003.

MATEOS, R.; DOMINGUEZ, M.M.; ESPARTERO, J.L.; CERT, A. Antioxidant effect of phenolic compounds, tocopherol and other minor components in virgin olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7170-7175, 2003.

MENDES, M.F.; PESSOA, F.L.P.; COELHO, G.V.; ULLER, A.M.C. Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, in press, 2005.

MENDES, M.F.; PESSOA, F.L.P.; ULLER, A.M.C. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, 257-265, 2002.

MIETTINEN, T. A.; VANHANEN, H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapessed oil and squalene feeding. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 356-363, 1994.

MOHAMED, R.S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 344-353, 1997.

MONTES, E.J.M. **Influência das variáveis de processo sobre a cristalização da lactose**. Viçosa: UFV, 2004. 103 p. (Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos de gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 150 p.

MURAKOSHI, M.; NISHINO, H.; TORUKA, H.; IWASHIMA, A.; OKUZUMI, J.; KITANO, H.; IWASAKI, R. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 52, p. 950-952, 1992.

NAGESHA, G.K.; MANOHAR, B.; SANKAR, K.U. Enrichment of tocopherols in modified soy deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide extraction. **European Food Research Technology**, v. 217, p. 427-433, 2003.

NAKAMURA, Y.; YASUHIDE, T.; YUKARI, T.; SHIBATA, T.; UCHIYAMA, M. Effect of dietary squalene on the fecal steroid excretions and the lipid levels of serum and the liver in the rat. **Nutrition Research**, v. 17, p. 243-257, 1997.

NICOLINO, A.P. **Utilização do CO₂ supercrítico na concentração de tocoferóis do destilado desodorizado do óleo de soja**. Viçosa: UFV, 1995. 64 p. (Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

O'SULLIVAN, L.; WOODS, J.A.; O'BRIEN, N.M. Squalene but not n-3 fatty acids protect against hydrogen peroxide-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells. **Nutrition Research**, v. 22, p. 847-857, 2002.

PALMA, M.; TAYLOR, L.T.; ZOECKLEIN, B.W.; DOUGLAS, L.S. Supercritical extraction of grapeglycoside. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 775-779, 2000.

PARRISH, D.B. Determination of vitamin E in foods – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 161-187, 1980.

PAUL, E.L.; TUNG, H.H.; MIDLER, M. Organic crystallization processes. **Powder Technology**, v. 150, p. 133–143, 2005.

POLIAKOFF, M.; KING, P. Phenomenal fluids. **Nature**, v. 412, p. 125, 2001.

QUANCHENG, Z.; GUIHUA, S.; HONG, J. Concentration of tocopherol by supercritical carbon dioxide with cosolvents. **European Food Research Technology**, v. 219, n. p. 398-402, 2004.

RAMAMURTHI, S.; McCURDY, A.R. Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 3, p. 287-295, 1993.

RAO, V.C.; NEWMARK, H.L.; REDDY, B.S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 287-290, 1998.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v.8, p. 269-284, 2002.

REICHERT, R.D. Oilseed medicinals: in natural drugs, dietary supplements and in new functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p. 353-360, 2002.

SCHMIDT, S. J. Water and solids mobility in foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 48, p. 1 – 101, 2004.

SHIN, D.H.; HEO, H.J.; LEE, Y.J.; KIM, H.K. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. **British Journal of Biomedical Science**, v. 61, p. 11-14, 2004.

SIHVONEN, M.; JARVEPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HOUPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 217-222, 1999.

SMITH, T.J.; YANG, G.; SERIL, D. N.; LIAO, J.; KIM, S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 703-706, 1998.

STOLDT J.; BRUNNER, G. Phase equilibrium measurements in complex systems of fats, fat compounds and supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 146, p. 269-295, 1998.

STRANDBERG, T.E.; TILVIS, R.S.; MIETTINEN, T.A. Effects of cholestyramine and squalene feeding on hepatic and serum plant sterol in the rat. **Lipids**, v. 24, p. 705-708, 1989.

TERAN-ORTIZ, G.P. **Cristalização de açúcares em doces de frutos**. Lavras: UFLA. 2004. 80 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos).

VAN DUUREN, B.L.; GOLDSCHMIDT, B.M. Co-carcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. **Journal of National Cancer Institute**, v. 56, p. 1237-1342, 1976.

VERLEYEN, T.; VERHE, R.; GARCIA, L.; DEWETTINCH, K.; HUYGHEBAERT, A.; GREYT, W. Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 277-285, 2001.

WOERFEL, J.B. Processing and utilization of by-products from soy oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, p. 188-191, 1981.

YANG, Y., GHARAIBEH, A., HAWTHORNE, S.B., MILLER, D.J. Combined temperature/modifier effects on supercritical CO₂ extraction efficiencies of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental samples. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 641-646, 1995.

YU, L. X.; LIONBERGER, R. A., RAW, A.S., D'COSTA, R.; WU, H.; HUSSAIN, A.S. Applications of process analytical technology to crystallization processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 349– 369, 2004.

XU, W. L.; HUANG,Y. B.; QIAN, J.H.; SHA, O.; WANG,Y. Q. Separation and purification of stigmasterol and β -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method. **Separation and Purification Technology**, v. 41, p.173– 178, 2005.

APÊNCIDE

APÊNDICE

$$\text{Índice de recuperação} = (X / Y) \times 100 \quad (\text{equação 1A})$$

Em que,

X = concentração do composto na fração extraída por CO₂-SC (g/100 g de DDOS);

Y = concentração do composto no DDOS centrifugado (g/100 g)

Tabela 1 A – Relações entre as densidades da extração, massas e volumes de CO₂ em extrações realizadas com TED = 15 min e fluxos de CO₂ = 1,0 mL/min

Densidade do CO ₂ (g/mL)	Massa de CO ₂ (g)*	Volume de CO ₂ (mL)**
0,68	13,8	20,29
0,79	13,8	17,47
0,90	13,8	15,33
0,50	13,8	27,60
0,72	13,8	19,17
0,86	13,8	16,05
0,35	13,8	39,43
0,64	13,8	21,56
0,81	13,8	17,04

*Massa de CO₂ = 0,92 g/mL (densidade na cabeça da bomba) x TED x fluxo de CO₂

**Volume de CO₂ = massa de CO₂ / densidade da extração

Tabela 2 A – Relações entre as massas e os volumes de CO₂ e os diferentes TED e fluxos de CO₂, em extrações realizadas em T = 40 °C, p= 281 bar e densidade = 0,90 g/mL.

Massa de CO ₂ (g)	Volume de CO ₂ (mL)	TED (min)	Fluxos de CO ₂ (mL/min)
13,8	15,33	15	1,0
20,7	23,00	15	1,5
18,4	20,44	20	1,0
27,6	30,67	20	1,5
23,0	25,55	25	1,0
34,5	38,33	25	1,5

Tabela 3 A – Resumo do teste de significância dos coeficientes da regressão dos teores de esqualeno, em função da pressão e da temperatura de extração, mantendo-se constante: TED = 15min TEE = 0 min, fluxo de CO₂ = 1,0 mL/min

Coeficiente	Valor
β_0	-1,28974 ^{ns}
β_{11}	-0,15092 ^{**}
β_{12}	0,14867 ^{**}
β_{21}	-0,000336 ^{**}

^{ns}Teste t não significativo a 1% de probabilidade

^{**}Teste t significativo a 1% de probabilidade

Tabela 4 A – Resumo do teste de significância dos coeficientes da regressão dos teores de esqualeno extraído em função do fluxo e do TED, mantendo-se constante os seguintes parâmetros: TEE = 0 min, T = 40 °C; P = 281 bar; d = 0,90 g/mL

Coeficiente	Valor
β_0	9,61217 ^{***}
β_{11}	2,61867 ^{***}
β_{12}	-0,55528 [*]
β_{21}	0,01556 ^{**}

^{***}Teste t significativo a 1% de probabilidade

^{**}Teste t significativo a 5% de probabilidade

^{*}Teste t significativo a 6% de probabilidade