

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Jamila dos Santos Alves

**ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DA NOZ PECÃ [*Carya illinoensis*
(Wangenh) C. Koch]: OBTENÇÃO DE ÓLEO POR FLUIDOS
PRESSURIZADOS E APLICAÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS EM
FILME BIODEGRADÁVEL**

**Santa Maria, RS
2021**

Jamila dos Santos Alves

ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DA NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]: OBTENÇÃO DE ÓLEO POR FLUIDOS PRESSURIZADOS E APLICAÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS EM FILME BIODEGRADÁVEL

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientadora: Prof.^a Dra.: Claudia Severo da Rosa

**Santa Maria, RS
2021**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Alves, Jamila dos Santos
ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DA NOZ PECÃ [Carya
illinoensis (Wangenh) C. Koch]: OBTENÇÃO DE ÓLEO POR
FLUIDOS PRESSURIZADOS E APLICAÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS
EM FILME BIODEGRADÁVEL / Jamila dos Santos Alves.- 2021.
131 p.; 30 cm

Orientador: Claudia Severo da Rosa
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2021

1. CO2 pressurizado 2. GLP pressurizado 3. Extratos
bioativos 4. Filmes biodegradáveis I. Severo da Rosa,
Claudia II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JAMILA DOS SANTOS ALVES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Jamila dos Santos Alves

ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DA NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]: OBTENÇÃO DE ÓLEO POR FLUIDOS PRESSURIZADOS E APLICAÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS EM FILME BIODEGRADÁVEL

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Aprovado em 31 de maio de 2021:



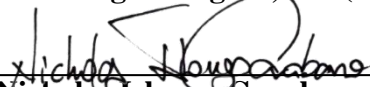
Claudia Severo da Rosa, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)



Roger Wagner, Dr. (UFSM)



Nicholas Islongo Canabarro, Dr. (USP)



Marcia Regina de Moura Aouada, Dra. (UNESP)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Me faltam palavras neste momento para expressar a gratidão que sinto por todos que caminharam junto comigo, me incentivaram e me auxiliaram nesses quatro anos e meio de doutorado. Talvez eu esqueça de citar alguém, mas eu acredito muito na lei de causa e efeito e infalivelmente essas pessoas terão suas vidas repletas de boa sorte.

Primeiramente agradeço a minha família, pois são eles que me incentivam e estão ao meu lado em todos os momentos. Meus pais, Roselaine Alves e Elbio Alves; e meus irmãos, Guilherme Alves e Vitoria Alves. Amo vocês e sou eternamente grata por ter vocês como minha família!! Também aos meus outros familiares, que torcem pelo meu sucesso e realização.

Ao meu namorado Rodrigo Godoy, que está do meu lado antes do início da graduação, sempre me dando suporte e incentivo. Obrigada por tanto, te amo.

Aos companheiros do Budismo de Nichiren Daishonin, da BSGI e ao meu mestre de vida, Dr. Daisaku Ikeda. Em um período de muita angústia durante o doutorado vocês me fortaleceram e eu retornei a essa prática que tanto amo. Nam-myoho-renge-kyo, Nam-myoho-renge-kyo, Nam-myoho-renge-kyo.

De forma especial, agradeço minha professora e orientadora Claudia Severo da Rosa, por me incentivar, pela confiança depositada em meu trabalho e pelo conhecimento compartilhado. Sem dúvidas, a senhora é o exemplo de profissional que quero ser um dia.

Agradeço ao Professor Marcio Antonio Mazutti, por abrir as portas do seu laboratório. Nunca esquecerei o que o senhor me disse no nosso primeiro contato: Estou aqui para ajudar! Tudo que tem dentro desse laboratório você pode utilizar. Sem sua disponibilidade este trabalho não teria saído do papel.

Aos Professores Roger Wagner e Alexandre José Cichoski pelo suporte e orientação para a realização de algumas análises essenciais deste trabalho.

À Professora Marcia Regina de Moura Aouada, que buscando referências sobre a elaboração de filmes biodegradáveis na internet encontrei seus vídeos falando sobre o assunto. Primeiramente seria uma referência no assunto, depois se tornou peça chave na elaboração do terceiro artigo desta tese, que maravilha seria se alunos pesquisadores pudessem encontrar pessoas tão humildes e disponíveis em ajudar como a senhora.

Desde o início até a conclusão desta tese eu precisei da ajuda de muita gente e sou grata por ter encontrado pessoas que me dispuseram do seu tempo, conhecimento e ajuda. São elas:

À Angela Souza Rodrigues, por ser minha amiga e parceira desde o primeiro dia de graduação e com quem dividi muitos momentos de alegrias, estudo, companheirismo, angústias e conquistas. Sou imensamente grata por ter tua amizade!

À Caroline Pagnossim Boeira, que no mestrado foi minha IC e agora no doutorado, minha colega. O destino nos uniu novamente e sou muito grata por termos firmado uma parceria tão forte em relação à execução do trabalho e uma amizade genuína que levarei para a vida.

À Tássia Carla Confortin e ao Izelmar Toderó, vocês foram essenciais na execução deste trabalho. Agradeço o empenho, dedicação, companheirismo e amizade.

À Stephanie Reis Ribeiro, pela ajuda nas análises de CG. Agradeço por todo o suporte, dedicação e amizade.

Ao Nicholas Islongo Canabarro, que foi a pessoa que me proporcionou o primeiro contato com o sistema de extração por fluidos pressurizados. Muito obrigada pelo suporte, ensinamentos e por aceitar o convite de avaliar este trabalho.

À Pamela Thais Sousa Melo, agradeço pela dedicação na realização das análises dos filmes e pelo conhecimento transmitido, mesmo que de longe.

Aos colegas que sempre estiveram dispostos a ajudar nas análises e/ou com conhecimento sobre algum assunto, são eles: Gabrielle Scapin, Thamiris Martiny, Silvino Robalo Sasso e Susanne Druzian. Vocês foram fundamentais para a execução deste trabalho.

A Pecanita Alimentos e ao Grupo Nozes Pitol por terem doado as amostras da noz pecã e da torta da noz pecã para a execução desse trabalho.

Aos funcionários do DTCA-UFSM, Alex, Magé, Marialene, Moisés, Ricardo e Sheila pela dedicação, amizade e suporte na execução das análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria por mais essa oportunidade de conhecimento e crescimento profissional.

A CAPES-FAPERGS pela concessão da bolsa de estudo que tornou possível a realização deste trabalho, me sinto privilegiada de ter sido bolsista nesse país que tanto desmerece os seus pesquisadores.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a concretização deste trabalho, meu muito obrigada!

*Nossa grandiosidade e força
como seres humanos não
estão sujeitas à posição social.
Verdadeiro campeão é aquele que,
independentemente de quanto
sejam difíceis as circunstâncias
que tenha de enfrentar ou de
quanto as coisas fiquem ruins,
continua a avançar com coragem
e esperança, sem desistir.*

(Daisaku Ikeda)

RESUMO

ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DA NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]: OBTENÇÃO DE ÓLEO POR FLUIDOS PRESSURIZADOS E APLICAÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS EM FILME BIODEGRADÁVEL

AUTORA: Jamila dos Santos Alves
ORIENTADORA: Claudia Severo da Rosa

Este trabalho teve por objetivo avaliar os processos de obtenção do óleo da noz pecã e da torta de noz pecã por fluidos pressurizados (dióxido de carbono - CO₂ e gás liquefeito de petróleo - GLP), bem como elaborar extratos bioativos da torta de noz pecã (TNP) e aplicá-los em filmes biodegradáveis e comestíveis. Para a obtenção dos óleos foi elaborado um planejamento 2² com triplicata no ponto central variando as condições de pressão e temperatura. Para a extração com CO₂ pressurizado utilizou-se pressão de 150-250 bar e temperatura de 20-60 °C; para a extração com GLP pressurizado utilizou-se pressão de 10-25 bar e temperatura de 20-40 °C. O estudo da extração do óleo da noz pecã buscou avaliar o rendimento de extração, atividade antioxidante, perfil de ácidos graxos, compostos bioativos (esqualeno e β-sitosterol), e os parâmetros de qualidade química dos óleos. Os maiores rendimentos foram observados a 250 bar / 20 °C e 10 bar / 20 °C para as extrações de CO₂ e GLP, respectivamente. Todos os óleos apresentaram inibição do radical DPPH acima de 70%. O ácido oleico foi o ácido graxo predominante em todas as amostras. Os maiores valores de compostos bioativos (esqualeno e β-sitosterol) foram encontrados nos óleos extraídos com CO₂. O óleo da torta da noz pecã foi caracterizado em termos de rendimento de extração, perfil de ácidos graxos, qualidade lipídica, conteúdo de esqualeno e β-sitosterol e qualidade físico-química. Os maiores rendimentos foram obtidos a 250 bar / 20 °C (CO₂) e 10 bar / 20 °C (C-LPG). O perfil químico dos óleos é caracterizado principalmente por ácidos graxos, onde os ácidos oleico e linoléico foram os compostos majoritários encontrados em todas as amostras. Teores de esqualeno e β-sitosterol também foram obtidos nos óleos. Os resultados mostraram que o TNP é uma biomassa interessante para extração de óleo e cujos processos de separação utilizando fluidos comprimidos são uma opção atrativa para processá-lo. Para a obtenção dos extratos foi utilizado um planejamento 2² com triplicata no ponto central onde avaliou-se a influência dos parâmetros de extração, como graduação alcoólica do etanol (%) e tempo de extração (min) no teor de compostos fenólicos. A condição que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais (101.61 mg GAE/g) foi a que utilizou a menor concentração de álcool e menor tempo de extração (condição 1 - 65% álcool / 20 min), sendo a condição escolhida para ser incorporada nos filmes. A adição de 10 e 20% de extrato da TNP nos filmes mostrou um aumento da alongação da ruptura, provocou um aumento na opacidade e escurecimento dos filmes. A incorporação do extrato da TNP nos filmes aumentou significativamente a atividade antioxidante.

Palavras-chave: CO₂ pressurizado. GLP pressurizado. Extratos bioativos. Filmes biodegradáveis.

ABSTRACT

STRATEGIES FOR THE USE OF NUTS PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]: OBTAINING OIL BY PRESSURIZED FLUIDS AND APPLICATION OF BIOACTIVE EXTRACTS IN A BIODEGRADABLE FILM

AUTHOR: Jamila dos Santos Alves

ADVISOR: Claudia Severo da Rosa

This work aimed to evaluate the processes of obtaining pecan oil and pecan pie by pressurized fluids (carbon dioxide - CO₂ and liquefied petroleum gas - LPG), as well as to elaborate bioactive extracts of pecan nut cake (PNC) and apply them to biodegradable and edible films. To obtain the oils, a planning 2² was prepared with a triplicate at the central point, varying the pressure and temperature conditions. For extraction with pressurized CO₂, a pressure of 150-250 bar and a temperature of 20-60 °C were used; for the extraction with pressurized LPG, a pressure of 10-25 bar and a temperature of 20-40 °C were used. The study of pecan oil extraction sought to evaluate the extraction yield, antioxidant activity, fatty acid profile, bioactive compounds (squalene and β-sitosterol), and the chemical quality parameters of the oils. The highest yields were observed at 250 bar / 20 °C and 10 bar / 20 °C for CO₂ and LPG extractions, respectively. All oils showed DPPH radical inhibition above 70%. Oleic acid was the predominant fatty acid in all samples. The highest values of bioactive compounds (squalene and β-sitosterol) were found in oils extracted with CO₂. PNC oil was characterized in terms of extraction yield, fatty acid profile, lipid quality, squalene and β-sitosterol content and physical-chemical quality. The highest yields were obtained at 250 bar / 20 °C (CO₂) and 10 bar / 20 °C (C-LPG). The chemical profile of oils is mainly characterized by fatty acids, where oleic and linoleic acids were the major compounds found in all samples. Squalene and β-sitosterol contents were also obtained in the oils. The results showed that PNC is an interesting biomass for oil extraction and whose separation processes using compressed fluids are an attractive option to process it. To obtain the extracts, a planning 2² with triplicate was used at the central point where the influence of the extraction parameters, such as ethanol alcohol content (%) and extraction time (min) on the content of phenolic compounds, was evaluated. The condition that presented the highest content of total phenolic compounds (101.61 mg GAE / g) was the one that used the lowest alcohol concentration and the shortest extraction time (condition 1 - 65% alcohol / 20 min), being the condition chosen to be incorporated into the films. The addition of 10 and 20% TNP extract to the films showed an increase in the elongation of the break, causing an increase in the opacity and darkening of the films. The incorporation of the PNC extract in the films significantly increased the antioxidant activity.

Keywords: Pressurized CO₂. Pressurized LPG. Bioactive extracts. Biodegradable films.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cacho de noz pecã	25
Figura 2 - Noz pecã.....	2626
Figura 3 - Torta da noz pecã.....	27
Figura 4 - Diagrama de fases em condições de fluido supercrítico	28

Artigo 1

Figura 1 - Kinetic extraction curve of pecan nut oil using P-CO ₂ (A) and P-LPG (B).....	61
---	----

Artigo 2

Figura 1 - Overall extraction curves of PNC oil using C-CO ₂ (A) and C-LPG (B).....	86
Figura 2 - Induction time of PNC oils obtained by C-CO ₂ (—), C-LPG (—) and Soxhlet (—)..	87

Artigo 3

Figura 1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura de filmes com diferentes formulações.....	118
Figura 2 - Atividade antioxidante dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP.....	119
Figura 3 - Biodegradabilidade dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP.....	120

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1 - Experimental design (2 ²) of the extraction of pecan nut oil.....	54
Table 2 - Yield and recovery of pecan nut oils obtained by P-CO ₂ and P-LPG.....	55
Table 3 - Effect of the variables (two-way ANOVA) on the extraction yield of pecan nut oils obtained by P-CO ₂ and P-LPG.....	56
Table 4 - Antioxidant activity toward DPPH radical of pecan nut oils obtained by P-CO ₂ and P-LPG.....	57
Table 5 - Effect of the variables (two-way ANOVA) on the antioxidant activity of pecan nut oils obtained by P-CO ₂ and P-LPG.....	58
Table 6 - Fatty acids profile (%total fatty acids) and bioactive compounds (squalene and β -sitosterol) (mg/100g) of pecan nut oils obtained by P-CO ₂ and P-LPG.....	59
Table 7 - Chemical quality parameters of pecan nut oils from the conditions with higher extraction yield.....	60

Artigo 2

Table 1 - Extraction conditions for C-CO ₂ and C-LPG.....	82
Table 2 - Yields and recovery of PNC oils obtained by C-CO ₂ and C-LPG.....	83
Table 3 - Fatty acid profile (%), lipid quality, and squalene and β -sitosterol (mg/100g) of PNC oils extracted by C-CO ₂ and C-LPG.....	84
Table 4 - Acidity (mg KOH/g) and peroxide (mEQ O ₂ /Kg) levels of PNC oil.....	85

Artigo 3

Tabela 1 - Projeto experimental (2 ²) da preparação dos extratos da TNP.....	112
Tabela 2 - Compostos fenólicos totais do extrato da TNP.....	113
Tabela 3 - Efeito da variáveis no teor de compostos fenólicos totais dos extratos da TNP.....	114
Tabela 4 - Espessura, resistência a tração (RT) e alongação na ruptura (ER) dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP.....	115
Tabela 5 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade e ângulo de contatos dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP.....	116
Tabela 6 - Propriedades ópticas dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP.....	117

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.1.1	Objetivos Específicos	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	NOZ PECÃ.....	24
2.1.1	Composição Nutricional da Noz Pecã	25
2.1.2	Torta da Noz Pecã	27
2.2	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DE ÓLEOS.....	28
2.2.1	Extração Mecânica	28
2.3.2	Extração por Solvente Orgânico	28
2.2.3	Extração por CO₂ Supercrítico	29
2.2.4	Extração por Líquido Pressurizado	30
2.3	FILMES ANTIOXIDANTES BIODEGRADÁVEIS.....	31
2.3.1	Biopolímeros utilizados em filmes	31
2.3.1.1	<i>Gelatina</i>	31
2.3.1.2	<i>Amido de milho</i>	32
2.3.1.3	<i>Método casting para elaboração de filmes</i>	33
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS INTEGRADOS	34
3.1	ARTIGO 1 - SIMULTANEOUS EXTRACTION OF OIL AND BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PECAN NUT USING PRESSURIZED SOLVENTS.....	34
3.2	ARTIGO 2 - USE OF COMPRESSED FLUIDS IN THE RECOVERY OF PECAN NUT CAKE OIL: INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON YIELD AND EXTRACT QUALITY.....	62
3.3	ARTIGO 3 - INCORPORAÇÃO DE EXTRATO BIOATIVO DA TORTA DA NOZ PECÃ EM FILMES BIODEGRADÁVEIS.....	88
4	DISCUSSÃO GERAL	121
5	CONCLUSÃO GERAL	122
	REFERÊNCIAS	122

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os preços acessíveis da noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] levaram os produtores a expandir seus pomares, com isso a popularização desse fruto aumentou consideravelmente nas últimas décadas (REIS et al., 2020). Além disso, essa expansão também foi alicerçada pelo crescente consumo de nozes aliados aos benefícios proporcionados à saúde (MARTINS et al., 2018).

As nozes são normalmente consumidas cruas, torradas ou salgadas, além de serem usadas como ingrediente em uma variedade de produtos de panificação e confeitaria (SHAKERARDEKANI et al., 2013). Apesar de ser muito consumida na forma *in natura*, o aumento da demanda de consumidores por óleos vegetais saudáveis vem impulsionando o processamento da noz pecã para a obtenção de óleo.

A utilização da noz pecã para obtenção de óleo também é alicerçada pela grande quantidade desse nutriente presente em sua composição, aproximadamente 93% da noz pecã é composta de lipídios (até 75%, p / p) (KIRALAN et al., 2020). O óleo é predominantemente composto por ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oleico e linoleico presentes em maiores quantidades (SALVADOR et al., 2016). Além disso, o óleo de noz pecã também contém tocoferóis, fitoesteróis e outros micronutrientes (DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2015). Estudos clínicos com seres humanos revelam que consumir nozes pode desempenhar um papel importante na redução do risco de doenças cardíacas e melhora no perfil lipídico sérico, esses benefícios são devido ao seu alto teor de ácidos graxos insaturados (RAJARAM et al., 2001). É importante salientar que a noz pecã não fornece somente lipídios para a dieta, elas também são ricas em proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e compostos bioativos (AMAROWICZ et al., 2017; USDA, 2018).

Diferentes métodos de extração de óleos vegetais têm sido empregados, sendo que se destacam a prensagem e a extração por solventes. Embora se produza um óleo de boa qualidade, o rendimento da extração por prensagem é muito baixo, ocasionando a perda do óleo. Processos que utilizam solventes líquidos deixam menos de 1% de óleo residual, que é um índice pelo menos cinco vezes menor do que com o uso da prensa (BOSS, 2000). No entanto, durante a etapa de recuperação/separação do solvente, podem ocorrer problemas de transformação oxidativa dos óleos (SEBASTIÁN et al., 1998) prejudicando a qualidade final do produto.

Por outro lado, métodos ditos não-convencionais, como a extração utilizando fluidos pressurizados parece um método mais atraente, esse tem apresentado eficiência nas extrações de óleos vegetais (PEDERSSETTI et al, 2011; ABAIDE et al, 2017; SCAPIN et al, 2017a;

SCAPIN et al, 2017b), minimiza alterações químicas e degradação de compostos sensíveis ao calor, o óleo é obtido em temperaturas relativamente baixas e livre de resíduos de solventes orgânicos (BOZAN e TEMELLI, 2002; YIN et al., 2005; SPARKS et al., 2006).

A torta da noz pecã é um subproduto da prensagem a frio das nozes para obtenção do óleo, e apresenta um percentual de óleo elevado (36-59%) após a extração (SALVADOR et al., 2016). Além disso, a torta da noz pecã é rica em carboidratos, proteínas, fibra alimentar, minerais, compostos fenólicos e taninos condensados (SARKIS et al., 2014; ALVAREZ-PARRILLA et al., 2018; GALVÃO MACIEL et al., 2020). Atualmente, estudos que utilizam a torta da noz pecã como matéria-prima para obtenção de compostos biologicamente ativos são escassos. Desta forma o seu reaproveitamento e sua utilização para a obtenção de compostos de interesse, possibilita a valorização biológica e nutricional, além da agregação de valor deste subproduto.

Uma alternativa bastante interessante é a recuperação do óleo residual da torta da noz pecã, assim seria possível utilizá-lo na indústria alimentícia para enriquecer a composição química de alguns alimentos. SALVADOR et al. (2016) utilizaram diferentes técnicas de extração (Soxhlet, ultrassom e fluido supercrítico) para recuperar esse óleo. Os maiores rendimentos de extração foram obtidos quando se utilizou a extração por Soxhlet (69,6% com etanol e 64% com acetona) seguida da extração com fluido supercrítico (58,4%). O ácido oleico foi o principal ácido graxo encontrado no óleo recuperado da torta de noz pecã.

Outra possibilidade é extrair os compostos bioativos presentes na torta da noz pecã e utilizá-los como ingredientes ou aditivos pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Atualmente, na indústria de alimentos há uma grande preocupação com o destino das embalagens plásticas que envolvem os alimentos, pois é um item que é descartado ao chegar ao consumidor ou após o consumo do produto embalado.

Em todo o mundo, mais de 400 milhões de toneladas de plástico são produzidas a cada ano, sendo que apenas 9% são recicladas. Desse montante, no ano de 2017 o setor de embalagens, o qual inclui a área de alimentos, consumiu 158 milhões de toneladas de plástico sendo a maioria descartável (CATERBOW e SPERANSKAYA, 2020). No Brasil, depois da construção civil (22,5%), o setor que mais consome produtos plásticos é o de alimentos, responsável por 20,3% desse total (ABIPLAST, 2019).

O alto consumo de embalagens plásticas e a baixa taxa de reciclagem leva ao acúmulo gradual de plásticos no meio ambiente e o descarte de milhões de toneladas de plástico em aterros sanitários a cada ano (MOSTAFAVI e ZAEIM, 2020). Diante disso, a crescente

preocupação em relação à poluição ambiental produzida pelos plásticos levou pesquisadores a desenvolverem filmes biodegradáveis e comestíveis (SEDAYU et al., 2019).

Os biopolímeros são os principais ingredientes utilizados na elaboração de filmes, no qual se incluem as proteínas, gorduras e polissacarídeos, eles podem ser utilizados sozinhos ou combinados (THARANATHAN, 2003; UMARAW e VERMA, 2017). O amido é considerado um dos candidatos mais promissores por causa de seu preço baixo, abundância e comportamento termoplástico (JIMÉNEZ et al., 2012). A gelatina tem sido extensivamente estudada para a elaboração de filmes devido sua resistência e principalmente flexibilidade, sendo eficaz também como barreiras às trocas gasosas, contudo possuem baixa resistência ao vapor de água (WOLF, 2007). Assim, a elaboração da mistura de biopolímeros, as quais combinam as propriedades de dois ou mais biopolímeros em uma única solução filmogênica, apresentam-se como uma boa estratégia para melhorar as características dos filmes. Com o intuito de obter filmes biodegradáveis ativos, agentes antioxidantes e antimicrobianos são adicionados aos filmes, assim esses compostos podem ser migrados da embalagem para o alimento de modo a estender a sua vida útil (PIÑEROS-HERNANDEZ et al, 2017).

Diante ao exposto, a obtenção do óleo de noz pecã por fluidos pressurizados como o CO₂ e o GLP torna-se uma alternativa atrativa e inovadora frente aos métodos convencionais de extração. E utilizar a torta de noz pecã como matéria prima para extração de compostos bioativos valoriza esse produto que é subutilizado pela indústria de extração de óleo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os processos de obtenção do óleo da noz pecã e da torta de noz pecã por fluidos pressurizados (CO₂ e GLP), bem como elaborar extratos bioativos da torta de noz pecã e aplicá-los em filmes biodegradáveis e comestíveis.

2.1.1 Objetivos Específicos

□ Extrair o óleo da noz pecã e da torta da noz pecã utilizando CO₂ supercrítico e GLP pressurizado e avaliar a influência das condições de pressão e temperatura no processo de extração;

- Determinar o rendimento global de cada extração, comparar os rendimentos com os obtidos por Soxhlet, e estabelecer quais são as condições de maior rendimento;
- Avaliar a cinética da extração dos óleos;
- Avaliar a qualidade físico-química e antioxidante dos óleos extraídos;
- Determinar o perfil de ácidos graxos dos óleos extraídos;
- Identificar e quantificar o teor de esqualeno e β - sitosterol, por cromatografia gasosa dos óleos extraídos;
- Obter extratos da torta da noz pecã utilizando o método convencional de agitação;
- Quantificar o conteúdo de fenólicos dos extratos da torta da noz pecã;
- Aplicar o extrato que obteve melhores resultados de compostos fenólicos em filmes ativos biodegradáveis e comestíveis pelo método de *casting*;
- Caracterizar os filmes obtidos quanto à espessura, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, ângulo de contato, propriedades mecânicas (-tensão na ruptura e alongação na ruptura), propriedades ópticas e microscopia eletrônica de varredura
- Determinar a atividade antioxidante (DPPH) *in vitro* dos filmes;
- Acompanhar a biodegradabilidade do filme depositado em solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NOZ PECÃ

A noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] é uma cultura indígena originária dos Estados Unidos, com produção comercial iniciada há pouco mais de 100 anos, desde então, a sua produção se estendeu para a Austrália, África do Sul, Israel, Argentina, Chile e Brasil (WAKELING et al., 2001).

No Brasil a noqueira pecã, tem sua maior produção na região Sul do país, por ser uma espécie típica de clima temperado (GIROTTO et al., 2016). Sendo que o estado do Rio Grande do Sul destaca-se como produtor, produzindo cerca de 2.561 toneladas de nozes, e as cidades com maior área destinada ao cultivo são Cachoeira do Sul com 610 ha, Anta Gorda com 150 ha e Minas do Leão com 110 ha (IBGE, 2014).

A noqueira pecã é uma árvore que alcança uma altura de 30 metros e chega a uma idade superior aos 100 anos produzindo mais de 100 kg de nozes por planta (FRUSSO, 2007). O fruto é uma drupa, agrupando-se em cachos que contém normalmente de três a sete unidades, com epicarpo que se separa do fruto na maturação (Figura 1) (BRISON, 1974).

As nozes são consumidas de forma *in natura* ou processada, há empresas especializadas no seu processamento que oferecem produtos como a noz descascada, farinha e, em menor escala, seu óleo (MARTINS et al., 2017).

Figura 1 - Cacho de noz pecã



Fonte: Paralelo 30.

Disponível em: <http://pecan.com.br/>.

2.1.1 Composição Nutricional da Noz Pecã

A composição nutricional da noz pecã (Figura 2) produzida no sul do Brasil, apresenta cerca de 3,7% de umidade, 7,8% de carboidratos, 9,9% de proteínas e 7,8% de fibras totais. Além disso, apresenta um conteúdo médio de 1,4% de cinzas, sendo considerada fonte de minerais tais como cálcio, ferro, magnésio, fósforo e zinco (VONDERHEIDE et al., 2002; ORO et al., 2008; HADDAD, 2011).

A noz pecã é caracterizada pelo alto conteúdo de óleo (65,93 – 78,07%), é rica em ácidos graxos insaturados, especialmente ácidos graxos mono-insaturados (MUFAs), seguidos por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). O ácido graxo predominante no óleo da noz pecã é o ácido oleico (C18:1), que constitui cerca de 70% -78% (SCAPINELLO et al., 2017). Entre os PUFAs, o ácido linoleico (C18:2) apresenta quantidades elevadas (17,69 – 37,52) (VENKATACHALAM et al., 2007). Os ácidos palmítico e esteárico são principais ácidos graxos saturados com 4,7% –5,4% e 2,3% –2,5%, respectivamente (PRADO et al., 2013). Alimentos ricos em MUFAs e PUFAs, como a noz pecã, apresentam benefícios à saúde, pois

contribuem para a redução das frações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL), responsáveis, em parte, pelo aumento do colesterol sérico (DAMASCENO et al., 2013).

Figura 2 - Noz pecã



Fonte: Paralelo 30 Sul.

Disponível em: <http://pecan.com.br/>.

O óleo da noz pecã também é rico em esteróis vegetais, conhecidos como fitoesteróis, contendo valores que variam de 102 a 157 mg / 100 g, principalmente β -sitosterol (89 - 117 mg / 100 g), Δ^5 -avenasterol (cerca de 15 mg / 100 g), campesterol (5 - 6 mg / 100 g) e estigmasterol (3 mg / 100 g) (SEGURA et al., 2006). O interesse atual nos fitoesteróis deve-se principalmente ao fato de que esses compostos são agentes efetivos de redução do colesterol (DE JONG et al., 2003) e, portanto, protegem contra doenças cardiovasculares. O óleo da noz pecã é uma fonte alimentar de α -tocoferol ($12,2 \pm 3,2$ mg / g), γ -tocoferol ($168,5 \pm 15,9$ mg / g) e esqualeno ($151,7 \pm 10,8$ mg / g) (RYAN et al., 2006).

A noz pecã também é uma rica fonte de compostos fenólicos (2016 mg GAE / 100 g) e são relatadas por apresentar maior quantidade desses compostos quando comparada a nove tipos diferentes de nozes, são elas: amêndoas (418 mg GAE / 100 g), castanha do Brasil (310 mg GAE / 100 g), castanha de caju (274 mg GAE / 100 g), avelãs (835 mg GAE / 100 g), macadâmias (156 mg GAE / 100 g), amendoim (396 mg GAE / 100 g), pinhão (68 mg GAE / 100 g), pistache (1657 mg GAE / 100 g) e nozes (1556 mg GAE / 100 g) (WU et al., 2004). Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante, e podem inibir a ação de enzimas, como as lipoxigenases, responsáveis por alterações oxidativas (SHAHIDI e ZHONG, 2005).

2.1.2 Torta da Noz Pecã

O óleo de noz-pecã é comestível, e apesar do consumo ser pouco difundido, possui um mercado consumidor promissor, devido às suas qualidades nutricionais e características sensoriais de óleo gourmet (MARTINS et al., 2017).

A torta da noz pecã (Figura 3) é o subproduto da prensagem a frio das nozes para obtenção do óleo, e apresenta um percentual de óleo elevado (36 – 59%) após a extração (SALVADOR et al., 2016). Marchetti et al. (2017) analisaram a torta de noz pecã e verificaram que os ácidos graxos principais foram o ácido oleico (65,10 g / 100 g) e linoleico (28,6 g / 100 g), seguidos pelo ácido linolênico (1,33 g / 100 g), além disso possui 13,20% de fibra alimentar, 13,20% de proteína, 11,96% de carboidratos e 3,67% de cinzas. Sarkis et al. (2014) extraíram compostos fenólicos solúveis em água de tortas industriais de diferentes sementes e nozes, e verificaram que dentre as matrizes estudadas a torta da noz pecã obteve o maior teor de compostos fenólicos (690 mg / 100 g), bem como a maior atividade antioxidante pelo método de ABTS (34,125 $\mu\text{mol} / \text{L}$ equivalente em Trolox).

Apesar de seu alto teor de óleo, elevado valor nutricional e características sensoriais agradáveis, a torta é normalmente empregada como ração animal, sendo caracterizada por ser um subproduto de baixo valor comercial (SALVADOR et al., 2016). Sendo assim, este subproduto apresenta um grande potencial econômico para a recuperação de compostos de interesse nutricional.

Figura 3 - Torta da noz pecã



2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DE ÓLEOS

2.2.1 Extração Mecânica

A prensagem é o método mais popular para extrair o óleo das sementes oleaginosas (SINGH e BARGALE, 2000) e baseia-se na separação sólido-líquido pela aplicação de forças de compressão (BRENNAN et al., 1990).

As vantagens da extração mecânica são: baixo custo inicial de instalação; pode ser usado em operações de até 3 mil t/d de capacidade; não emprega solventes, o que reduz o custo de processamento e do óleo obtido; e produz um óleo que pode ser consumido sem necessidade de refino (OETTERER et al., 2006). No entanto, a eficiência da extração por prensagem é bem inferior àquela obtida pelo tradicional método de extração por solvente, sendo afetada diretamente pelas condições iniciais dos grãos, como o teor de umidade e temperatura, e por aspectos construtivos da prensa (PIGHINELLI et al., 2008). A prensagem também pode reduzir a vida útil dos compostos ativos devido ao oxigênio e exposição à luz (HERRERO et al., 2006).

2.2.2 Extração por Solvente Orgânico

A extração de óleo de matrizes sólidas por solvente, também chamada de lixiviação ou extração sólido-líquido, é um processo que envolve o contato da matéria prima com um solvente adequado, capaz de solubilizar, transportar e dissolver o óleo de dentro para fora da matriz (DAHLSTROM et al., 1997).

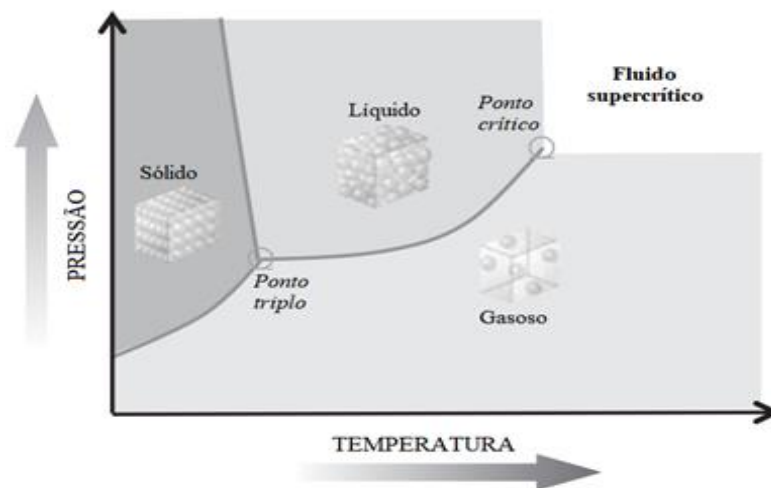
Nesse processo, o óleo é obtido por meio de extração com solvente químico orgânico, o solvente utilizado atualmente é o hexano, com ponto de ebulição próximo de 70 °C (MANDARINO, 2001). Esse solvente orgânico é o preferido no processo de extração, por ser o mais seletivo, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água, o que evita misturas azeotrópicas (MORETTO e FETT, 1998). No entanto, sua inflamabilidade, alto custo, potencial poluidor ambiental, tóxico e possivelmente carcinogênico a saúde (Kemper, 1997), justificam o estudo de alternativas ao seu uso. Ainda, para cada tonelada de grão processado, cerca de 2 litros de solvente são perdidos no meio ambiente, e por essa razão o processo de extração de óleos vegetais é considerado pelos órgãos de proteção ambiental como um dos maiores responsáveis pela emissão de gases do efeito estufa (SCHWARZBACH, 1997).

2.2.3 Extração por CO₂ Supercrítico

A tecnologia supercrítica foi utilizada pela primeira vez com a finalidade de extrair óleos comestíveis e seus compostos no início dos anos de 1970 (BRUNNER, 2005). Atualmente essa tecnologia vem sendo industrialmente empregada na obtenção de diferentes produtos tais como: obtenção de extratos de plantas para fins cosméticos, extração de óleos essenciais de plantas e a produção de tabaco sem nicotina (MANTELL et al., 2013). Essa técnica tem várias vantagens em relação aos métodos convencionais devido à ausência de solvente retido nos extratos, extração em baixa temperatura, elevada qualidade do produto e menor uso de energia (MOSLOVAC et al., 2014).

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que se encontra acima de sua temperatura crítica e pressão crítica (KNEZ et al., 2014). O ponto crítico representa as condições de pressão e temperatura nas quais a fase líquido e gás deixam de existir, e a fase de fluido supercrítico surge (Figura 4) (MANTELL et al., 2013).

Figura 4 - Diagrama de fases em condições de fluido supercrítico



Fonte: Adaptado de Mantell et al. (2013).

Uma das características do fluido supercrítico é apresentar simultaneamente propriedades dos gases e dos líquidos. Nas regiões próximas ao ponto crítico o fluido tem densidade e difusividade similares à de líquido, porém viscosidade comparável à dos gases. Assim, um fluido supercrítico apresenta bom poder de solvatação e alta difusividade (TAYLOR, 1996).

A principal desvantagem da utilização dessa tecnologia é o aumento dos custos de investimento, se comparada às técnicas tradicionais de extração à pressão atmosférica (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Ainda assim, é um dos poucos processos que apresentam capacidade de produzir produtos isentos de solventes e de lidar com material de alta viscosidade (BRUNNER, 2005).

O principal solvente utilizado na extração supercrítica é o dióxido de carbono (CO_2), pois permite operações supercríticas com pressões relativamente baixas e temperaturas próximas à ambiente ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $P_c = 73,8 \text{ bar}$), além disso é atóxico, inerte, não inflamável, não corrosivo, não poluente e está facilmente disponível com elevada pureza e baixo custo (MANTELL et al., 2013). Outra vantagem é que o CO_2 é gasoso à temperatura e pressão ambiente, o que torna muito simples a recuperação do extrato livre de solvente, além disso as extrações com CO_2 podem ser conduzidas em temperaturas amenas, o que permite a extração de compostos termolábeis ou facilmente oxidáveis (HERRERO et al., 2010).

A extração com CO_2 subcrítico opera de maneira semelhante à extração com CO_2 supercrítico, exceto que opera abaixo do ponto crítico de temperatura e pressão de CO_2 . Ao contrário da extração com CO_2 supercrítico, um óleo extraído por CO_2 subcrítico apresenta a coloração mais clara, retém uma maior quantidade de componentes bioativos, contém menos ceras e resinas (TAN et al., 2018).

2.2.4 Extração por Líquido Pressurizado

Existem várias técnicas baseadas no uso de fluidos pressurizados que têm em comum uma maior eficiência em relação a utilização de processos à atmosfera convencional, envolvendo condições operacionais que permitam que os solventes adquiram propriedades físico-químicas que não são atingíveis de outra forma (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2017).

Alguns estudos têm sugerido a utilização de propano (Zanqui et al., 2015; Trentini et al., 2017; Teixeira et al., 2018;) e n-butano (Novello et al., 2015; Rapinel et al., 2017; Sun et al., 2018) para a extração de óleo de matrizes vegetais. Quando esses gases são liquefeitos, suas propriedades físico-químicas são ideais por possuírem solubilidade em lipídios (YANG et al., 2004). Ainda, possuem vantagens significativas pois requerem uma quantidade pequena de solventes e permite uma extração mais rápida do que os métodos clássicos (HU et al., 2011).

Uma alternativa interessante ao uso desses solventes supracitados seria a utilização de GLP pressurizado, pois é um fluido relativamente barato, limpo e prontamente disponível (SILVA et al., 2013; BIER et al., 2016). Recentemente diversos trabalhos demonstram a

eficiência do GLP na extração de óleos quanto ao rendimento, tempo de extração e qualidade do extrato (SOARES et al., 2016; ABAIDE et al., 2017; SCAPIN et al., 2017a; SCAPIN et al., 2017b).

2.3 FILMES ANTIOXIDANTES BIODEGRADÁVEIS

Plásticos de origem petroquímica têm sido amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e embalagens, mas o uso extensivo gerou um sério impacto sobre a poluição ambiental já que esses materiais requerem centenas de anos para se degradar em compostos básicos (DA ROCHA et al., 2018).

Recentemente, filmes à base de polímeros biodegradáveis surgiram como uma alternativa promissora as embalagens de polímeros petroquímicos principalmente devido à sua natureza ecológica (JACOB et al., 2020). Os polímeros biodegradáveis (também chamados de biopolímeros) estão associados ao uso de matérias-primas renováveis, como as proteínas, gorduras e polissacarídeos (THARANATHAN, 2003; UMARAW & VERMA, 2017). Além da biodegradabilidade, esses polímeros possuem propriedades vantajosas como, suplementação do valor nutricional dos alimentos, incorporação de propriedades antioxidantes e antimicrobianas, origem renovável, custo relativamente baixo e o fato de que não possuem impacto negativo sobre o ambiente comparado ao material plástico tradicional (SAM et al., 2015).

A oxidação é uma das reações de degradação mais importantes que ocorrem nos alimentos, limitando assim sua conservação (NERÍN et al., 2008). A incorporação de extratos vegetais antioxidantes em filmes biodegradáveis permite a obtenção de filmes ativos que promovem a vida útil e a valorização dos produtos, essa é uma alternativa interessante principalmente devido os extratos serem de origem natural e apresentar propriedades bioativas (MIR et al., 2018). A principal vantagem dos filmes adicionados de extratos vegetais é que o composto antioxidante é reforçado na matriz polimérica em vez de ser adicionado diretamente no alimento (JACOB et al., 2020). Sendo adicionado deste modo, oferece vantagens como menores quantidades de substâncias ativas necessárias, atividade focada na superfície do produto, liberação controlada para a matriz alimentar e eliminação de etapas adicionais no processo de produção necessárias para adição de antioxidantes (BOLUMAR et al., 2011).

2.3.1 Biopolímeros utilizados em filmes

2.3.1.1 *Gelatina*

A gelatina é oriunda do abate e processamento de suínos, bovinos, animais marinhos e avícolas, é produzida pela hidrólise do colágeno dos ossos, pele e tecidos conjuntivos desses animais (KHAN e SADI, 2020). A gelatina é um polipeptídeo de alto peso molecular composto por aminoácidos: principalmente glicina (27%), hidroxiprolina e prolina (25%) (WANG et al., 2009).

A gelatina é extensivamente estudada por sua capacidade de formar filme, esses apresentam propriedades mecânicas satisfatórias, umidade relativa intermediária e excelentes propriedades de barreira ao oxigênio, no entanto, essas características são prejudicadas pela alta sensibilidade à umidade e natureza hidrofílica da gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2009; BAKRY et al., 2017).

As propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de gelatina podem ser melhoradas pela incorporação de outros biopolímeros como proteínas, lipídios e polissacarídeos e através da modificação da rede polimérica por meio da reticulação das cadeias da gelatina (agentes químicos, agentes físicos, adição de extratos vegetais e adição de enzimas (HOSSEINI et al., 2018).

2.3.1.2 Amido de milho

O amido, é o polissacarídeo de reserva da maioria das plantas, ocorre amplamente na natureza e é comumente utilizado como hidrocolóide alimentar (DA ROCHA et al., 2018). Sua molécula é composta de dois tipos de polímeros de d-glicose: amilose (20% –30%) e amilopectina (70% –80%) (RYDZ et al., 2018).

O amido de milho se destaca como um potencial e o mais promissor biopolímero para ser utilizado como filme em alimentos por causa de sua abundância, economia e excelente capacidade de formação de filmes (THAKUR et al., 2019). Filmes à base de amido são insípidos, inodoros, incolores, comestíveis e possuem baixa permeabilidade ao oxigênio em ambientes com baixa umidade (THE et al., 2009). No entanto, os filmes à base de amido possuem alta sensibilidade à água e propriedades mecânicas deficientes (LIU et al., 2021). O desempenho dos filmes à base de amido pode ser melhorado com a adição de plastificantes, mistura de outros biopolímeros e adição de extratos vegetais (JHA et al., 2020).

Para a elaboração da solução filmogênica, o amido deve ser aquecido com a água. Com o aumento da temperatura, os grânulos de amido vibram intensamente, rompendo as ligações intermoleculares, estabelecendo ligações de hidrogênio com a água e causando uma diminuição no número e no tamanho das regiões cristalinas. Dessa forma, a viscosidade da solução aumenta

consideravelmente, adquirindo um aspecto gelatinoso devido ao inchaço dos grânulos de amido e a adesão de uns aos outros (RODRIGUES et al., 2021).

2.3.1.3 Método *casting* para elaboração de filmes

Basicamente, os filmes são estruturas autônomas pré-formadas separadamente e aplicadas na superfície do alimento, entre os componentes do alimento, ou mesmo embalagens seladas comestíveis (OTONI et al., 2017). O método de *casting* é o método mais utilizado para a formação de um filme em escala de laboratório e piloto. Este método envolve três etapas para preparar um filme a partir de biopolímeros: i) Solubilização do biopolímero em um solvente adequado, ii) fundição do solução no molde, iii) secagem da solução fundida (RHIM et al., 2006).

A principal vantagem do método de fundição de formação de filme é a facilidade de fabricação sem o uso de equipamentos especializados (CHEN et al., 2008). Porém, para a produção em escala industrial, apresenta algumas desvantagens, como tempo de processo e custo elevados, esta última em função do grande gasto energético para a secagem dos filmes (MALI et al., 2010).

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS INTEGRADOS

3.1 ARTIGO 1 - SIMULTANEOUS EXTRACTION OF OIL AND BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PECAN NUT USING PRESSURIZED SOLVENTS

Artigo publicado no periódico The Journal of Supercritical Fluids, ISSN: 0896-8446, Área de avaliação em Ciência de Alimentos A2.

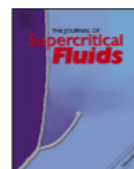
J. of Supercritical Fluids 153 (2019) 104598



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



Simultaneous extraction of oil and bioactive compounds from pecan nut using pressurized solvents



Jamila dos Santos Alves^{a,*}, Tássia Carla Confortin^b, Izelmar Todero^b,
Angela Souza Rodrigues^a, Stephanie Reis Ribeiro^a, Caroline Pagnossim Boeira^a,
Roger Wagner^a, Marcio Antonio Mazutti^b, Claudia Severo da Rosa^a

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900 RS, Brazil

^b Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900 RS, Brazil

Simultaneous extraction of oil and bioactive compounds from pecan nut using pressurized solvents

Jamila dos Santos Alves^{a,*}, Tássia Carla Confortin^b, Izelmar Todero^b, Angela Souza Rodrigues^a, Stephanie Reis Ribeiro^a, Caroline Pagnossim Boeira^a, Roger Wagner^a, Marcio Antonio Mazutti^b, Claudia Severo da Rosa^a

^aDepartment of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

^bDepartment of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

* Corresponding author: alves.jamila@outlook.com (Alves, Jamila dos Santos)

Phone: +55 55 996325678

Highlights

- Pecan nut oil was extracted with pressurized CO₂ and pressurized LPG;
- The extractions with pressurized LPG showed recovery of oil above 90%;
- Oleic, linoleic, linolenic, palmitic and stearic acids were quantified;
- Bioactive compounds such as squalene and β -sitosterol were also quantified.

Abstract

This study investigated the extraction of pecan nut oil using pressurized carbon dioxide (P-CO₂) and pressurized liquefied petroleum gas (P-LPG) at different temperature and pressure conditions. The effect of the variables pressure and temperature on the extraction yield, antioxidant activity, fatty acids, and bioactive compounds (squalene and β -sitosterol) were evaluated. The highest yields were observed at 250 bar / 20 °C and 10 bar / 20 °C for the P-CO₂ and P-LPG extractions, respectively. All oils presented inhibition of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical above 70%. Oleic acid was the predominant fatty acid in all samples. The highest values of bioactive compounds (squalene and β -sitosterol) were found in oils extracted with P-CO₂.

Keywords: *Carya illinoensis*; Oil extraction; Fatty Acids; Squalene; β -sitosterol.

1. Introduction

The pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] originated in the United States and is also cultivated in other countries such as Mexico, Australia, South Africa, Israel, Brazil, Argentina, China, among others [1-3]. In Brazil, the pecan tree has its largest production in the southern region of the country, and the Rio Grande do Sul is the largest producer [4, 5].

This fruit is characterized by a high oil content (65.93 - 78.08%) [6], and oleic acid is the predominant fatty acid in the lipid fraction (62.5%) [7]. Currently, the pecan nut oil is used as a gourmet oil and health promoter for its sensory characteristics and nutritional benefits [8]. It presents unique flavor, well appreciated in salad dressings and cooking [9] besides being a source of unsaturated fatty acids and bioactive compounds such as tocopherols and phytosterols [10, 11]. However, pecans do not only provide fat for diet, but they are also a source of protein, dietary fiber, vitamins, minerals and many other bioactive substances, which are known to provide health benefits. [12, 13].

Traditionally, plant oils from different matrices have been extracted by pressing and organic solvents; however, these extraction procedures have limitations including low efficiency [14] and use a large volume of toxic solvents [15], respectively. Thus, these limitations stimulated researchers' interest in studying oil extraction from different plant sources using pressurized solvents. [16-19]. This type of extraction offers numerous advantages over conventional extraction techniques as high selectivity, the absence of light and oxygen

(which avoids oxidation), use of a low temperature, avoiding the decomposition of labile compounds, reductions in energy consumption and the absence of polluting organic solvent [20].

Supercritical carbon dioxide (CO₂) extraction uses CO₂ above its critical point and exhibits liquid-like density and gas – like viscosity and diffusion coefficients [21]. This type of extraction is an environmentally acceptable solution since CO₂ is non-flammable and non-toxic, it is a suitable lipid solvent and leaves the treated matrix free of solvent residues [22]. According to Temelli et al. [23] much of the oil content in nuts is extracted at temperatures between 35 and 100 ° C and pressures from 90 to 700 bar. However, different studies have used conditions in which CO₂ is not in its supercritical range and reported good results in terms of yield of oil [24], fatty acids [25], bioactive compounds [26] and aromatic compounds [27].

An alternative approach to the use of CO₂ is the application of liquefied petroleum gas (LPG) as a pressurized solvent. Extraction using pressurized LPG (P-LPG) presents higher oil yield shorter time with a consequent reduction in the consumption of solvent and the process can be carried out at lower pressures and temperatures reducing the costs [24,28]. LPG is a colorless liquid, available in nature at low cost, and in extractions can be used at low pressures and temperatures with ease of separation of the final product by depressurizing the system [17, 29]. However, LPG is highly flammable, toxic and because of these characteristics requires more care, attention and control during extraction [29].

Therefore, the use of pressurized CO₂ (P-CO₂) and pressurized LPG (P-LPG) becomes highly promising for the extraction of pecan nut oil. Based on this context, the main objective of this study was to extract pecan nut oil using P-CO₂ and P-LPG and to evaluate the extraction yield, antioxidant activity, fatty acids profile, bioactive compounds (squalene and β -sitosterol), and the chemical quality parameters of the oils.

2. Materials and methods

2.1 Obtaining of samples and their preparation for extraction

Pecan nuts (varieties Barton, Cape Fear, Desirable, Cherokee, Cheyenne, WestrenSchley, Shawnee, Choctaw, Mahan, Shoshoni, and Stuart) were supplied by Pecanita Alimentos, in the city of Cachoeira do Sul, RS, Brazil (S: 30° 02' 21" / W: 52° 53' 38").

The moisture content of the samples was determined according to the method 925.09 by AOAC [30] to verify the need for initial drying. Martínez and Vance [31] reported that high

moisture content is undesirable since it acts as a barrier in the mass transfer, while generally, moisture values ranging from 3 and 10% do not cause significant impact in the final product. The samples from this study had a moisture content of 2.88 g / 100 g, thus the drying step was not necessary. For the extractions, the samples were ground in the Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) from the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil in a knife micro mill (Marconi MA 630) until obtaining a flour, which was packed in dark glass containers and stored in a freezer at -18 °C for use.

2.2 Solvents and chemical reagents

CO₂ (purity > 99.5%) was purchased from White Martins S.A. (Santa Maria, RS, Brazil). LPG was purchased from Liquigás S.A. (Santa Maria, RS, Brazil) and consisted of a mixture of propane (50.3 wt.%), n-butane (28.4 wt.%), isobutane (13.7 wt.%), ethane (4.8 wt.%), and other hydrocarbons minor constituents (2.8 wt.%). The standards for squalene (98%), β -sitosterol (95%) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and solvents used in the experiment were of analytical grade (PA) purchased from Vetec Fine Chemicals (Xerem, RJ, Brazil) and Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3 Solvent extraction using n-hexane

The pecan nut oil was extracted in a Soxhlet apparatus using n-hexane, for 8 h, and the extraction yield was compared with the extractions using P-CO₂ and P-LPG [32]. For extraction, 5 g of samples were used in 100 mL of n-hexane. The extractions were performed in triplicate.

2.4 Extraction by pressurized solvents

Extractions were performed on a laboratory scale [33] composed basically by: (i) a 100 mL extraction vessel (stainless steel) with internal diameter of 2.5 cm and 19.5 cm of height, supporting up to 350 bar; (ii) a syringe pump (ISCO 500 D, Lincoln, NE, USA), supporting up to 250 bar; (iii) a cooling bath (Quimis, São Paulo, SP, Brazil) for controlling the temperature of CO₂ and LPG at the syringe pump; (iv) a heating bath (Quimis, São Paulo, SP, Brazil) with thermocouples; (v) a heating electric jacket to control the temperature inside the extraction

vessel; (vi) blocking valves and micrometering valves (HIP 15-11AF2 316SS, Erie, PA, USA); and (vii) 1/8 inch tubing of stainless steel (HIP, Erie, PA, USA).

Approximately 5 g sample was used for the extraction procedures. The solvent (CO₂ or LPG) was pumped into the bed and left for 20 min in contact with the plant matrix to stabilize the system. A constant mass flowrate of 4 g/min of CO₂ or LPG was used. The mass flowrate was calculated from the volumetric flowrate from pump records and solvent density at the pump reservoir conditions (5 °C and pressure of extraction).

An experimental design with 2 levels and 2 variables (2²) was used, where the experiments at the central point were performed in triplicate (Table 1). The minimum temperature (20 °C) was defined to use a temperature lower than the critical point of CO₂ (31 °C) and the maximum (60 °C) was set to avoid possible thermal degradation of the oil. Regarding the pressure, conditions were set so that they were within the maximum pressure limit of the equipment (250 bar).

The kinetic extraction curves were determined according to the extracted oil mass (g) as a function of the mass of the solvent (g CO₂ or g LPG) consumed in the process until the oil was depleted. For this purpose, in the P-CO₂ extraction, the mass of oil was determined every 10 min, totaling 300 min of extraction, leading to a solvent to feed ratio of 240. For the P-LPG extraction, the mass was determined every 1 min in the first 2 min, and then after 4 min, and every 4 min until the end of the extraction, totaling 40 min, leading to a solvent to feed ratio of 4. The densities of the P-CO₂ and P-LPG were obtained through the NIST Chemistry WebBook [34].

The global yield (X_0) of extracted oil was obtained by calculating the ratio of the total mass of extracted oil (m_e) to the initial mass (m_i) of the samples (Eq. (1)). The oil recovery (R_0) was determined by the ratio of the total mass of extracted oil (m_e) of each process and the mass of oil extracted by Soxhlet ($m_{soxhlet}$) (Eq. (2)).

$$X_0 = \left(\frac{m_e}{m_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$R_0 = \left(\frac{m_e}{m_{soxhlet}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.5 Characterization of oils obtained by P-CO₂ and P-LPG

2.5.1 Antioxidant activity (DPPH radical) of the oils

The antioxidant activity of each sample of oil was evaluated toward 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radical using the methodology described by Dal Prá et al. [35]. The oils were diluted in absolute ethanol to a concentration of 60 mg/mL, determined by preliminary tests. The antioxidant activity toward DPPH radical (AA_{DPPH} , %) was calculated using Eq. (3) as the percentage inhibition related to the control, which means the complete oxidation (100%). All analyses were performed in triplicate.

$$AA_{DPPH} (\%) = \left(\frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where A_{DPPH} is the absorbance of DPPH solution; A and A_B are the absorbance values of the sample and blank, respectively.

2.5.2 Fatty acid profile of the oils

The transesterification/saponification of triacylglycerols was performed as described in the AOCS method Ce 2-66 [36], with modifications proposed by Chen et al. [37]. For that, 10 mg of the extracted oil was mixed with 100 μ L of 2M KOH and 1.0 mL hexane, agitated vigorously, and then 100 μ L methyl tricosanoate (C23:0Me) standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added. Further stirring and subsequent centrifugation were performed at 9464 x g for 5 min (Microcentaur, MSE, England). Approximately 500 μ L of the supernatant containing the fatty acid methyl esters (FAME) in hexane was subjected to chromatographic analysis.

The FAME of the samples was analyzed on a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) (Varian 3400 CX, Santa Ana, CA, USA). One microliter of each sample was manually introduced with a syringe into the split/splitless injector operating in a split mode 1:30 at 250 °C. Hydrogen gas was used as a carrier gas at a constant pressure of 172.369 kPa. FAMES were separated on Supelco SP-2560 capillary column (100 m \times 0.25 mm \times 0.20 μ m) (Bellefonte, PA, USA). The initial column temperature was 140 °C, remaining for 5 min, increasing up to 180 °C at 8 °C / min. Subsequently, the temperature increased to 210 °C at a rate of 4 °C / min and finally increased to 250 °C at a rate of 20 °C / min, remaining for 7 min. The flame ionization detector was maintained at 250 °C. The identification of the compounds was performed by comparing the retention times of the analytes with the retention

times of FAME Mix-37 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, HE, Germany). The results were obtained by summing the peak area and expressed in %.

2.5.3 Determination of squalene and β -sitosterol

The non-saponifiable fraction was obtained by the official method (Ce 12-16) [36], with modifications. For that, 0.3 ± 0.01 g of extracted oil was mixed with 5 mL of 10% methanolic KOH solution, and heated in a 50 °C water bath for 3 h, cooled, and then 10 mL of distilled water was added. The extract was partitioned with 5 mL of hexane three times. The organic fraction was evaporated and reconstituted in 1 mL hexane: isopropanol solution (3:2 / v:v). The extract was analyzed in GC-FID (Varian Model 3400 CX, Santa Ana, CA, USA) as follows: 1 μ L of the extract was introduced into the split/splitless injector, in the splitless mode (1 min split-off period), at constant temperature of 250 °C. Hydrogen was used as a carrier gas at a constant pressure of 172.369 kPa. The compounds were separated using a capillary column BPX 5 CB (25 m \times 0.22 mm \times 0.20 μ m) (RGE, Melbourne, VIC, Australia). The column temperature was 60 °C for 1 min, increasing to 300 °C at a rate of 20 °C / min, and remaining for 23 min. The detector was maintained at a temperature of 280 °C. The identification of the compounds was performed by comparing the retention times of the analytes with the respective standards. The results were expressed as mg/100g oil.

2.5.4 Chemical quality parameters of the oils

The following determinations were performed for the experiment condition with the highest yield: acidity index (Method: Cd 3d-63); Iodine value by Wijs method (Method: Cd 1-25); refractive index in an Abbé refractometer (Method: Cc 7-25), described by AOCS [36] and peroxide value, according to International Dairy Federation (Method: 74A) [38]. The oil extracted by Soxhlet was subjected to the same determinations.

2.6 Statistical analysis

The software StatSoft (Inc, Tulsa, OK 74104, USA) was used to evaluate the effects of the independent variables (pressure and temperature) on the responses (extraction yield, antioxidant activity, fatty acid profile, squalene and β -sitosterol) of the extraction process using P-CO₂ and P-LPG, considering 95% confidence level for all variables. The chemical quality

parameters and the antioxidant activity were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at a 95% confidence level.

3. Results and discussion

3.1 Yield and recovery of pecan nut oils

The yields and recovery of pecan nut oils obtained by P-CO₂ and P-LPG are presented in Table 2. For the extractions using P-CO₂, the highest yield (52.26%) and the highest oil recovery (70.46%) were reached in the condition 250 bar / 20 °C, while the lowest yield (4.77%) and recovery (6.44%) were at 150 bar / 60 °C, which corresponds to the conditions with the highest and lowest densities (963 and 604 kg/m³), respectively. It is noteworthy that the highest yield was found in the condition of higher pressure and lower temperature (250 bar / 20 °C), where CO₂ was in the liquid phase. The solvation power of CO₂ depends mainly on its density, which increases with increasing pressure in the isothermal process and decreases with increasing temperature in the isobaric system [39].

When the P-LPG was used, the highest yield (76.21%) and the highest recovery (102.70%) were observed under the lower pressure and temperature condition (10 bar / 20 °C). It is important to point out that this condition had a yield value higher than that obtained by the Soxhlet method (73.42%) at a lower extraction time. When comparing the extraction of pecan nut oil using the two technologies (P-CO₂ and P-LPG), the extractions using the P-LPG were faster (40 min) and presented higher yield and recovery.

Alexander et al. [40] extracted the pecan nut oil with supercritical CO₂ and found a yield of 14.34% (45 °C / 413 bar) to 31.6% (75 °C / 551 bar), the pressures and temperatures used in this work are milder and in some conditions the yield values were higher than those reported by these authors. Polmann et al. [41] extracted pecan nut oil by enzyme-assisted aqueous extraction and found yields values of 11.6% (Celluclast®) to 47.3% (Alcalase®), some extraction conditions used in our work presented higher yields than those found by these authors.

The ANOVA results of the effects of pressure and temperature on extraction yield using P-CO₂ and P-LPG are presented in Table 3. For the P-CO₂ extraction, the pressure had directly proportional effect and the temperature had inversely proportional effect on the response. Increasing pressure from 150 to 250 bar (at 20 and 60 °C) improves the solvation power of the solvent, providing a higher and better permeability of the solvent into the solid

matrix. This effect is associated with the increase in the CO₂ density promoting better extraction yields. The opposite occurs with temperature, the temperature increase from 20 to 60 °C (at 150 and 250 bar) decreased the oil yield. The temperature effect on the solvation power of CO₂ has a competing effect caused by both density and solute vapor pressure. Increasing temperature under constant pressure will decrease density but increase volatility and vice versa. If the conditions are below “crossover” pressure, density will dominate over the solute volatility, thus solubility decreases with increasing temperature [42].

The kinetic extraction curves of the P-CO₂ and P-LPG extractions are presented in Fig. 1. Throughout the extraction time with P-CO₂, the extraction at 250 bar / 20 °C obtained a higher yield when compared to the other conditions, followed by the condition 200 bar / 40 °C.

For P-LPG, the condition 10 bar / 20 °C presented a lower yield at the beginning of the extraction, with a higher overall yield at the end of the 40 min process. The other extraction conditions presented similar kinetic behavior. The variation of P-LPG density under the pressure and temperature conditions of this study did not affect the efficiency of the process.

The main difference observed from the kinetic profiles of Fig. 1 is in relation to the amount of solvent used in the process. To extract the oil present in 5g pecan nut, 1,200 g of P-CO₂ were used in 300 min of extraction and 160 g of P-LPG in 40 min of extraction. This result is corroborated by Soares et al. [17] who used the same solvents of this study for the extraction of rice bran oil and realized that P-LPG had higher solvation power than P-CO₂.

3.2 Antioxidant activity of pecan nut oils

Table 4 presents the antioxidant activity of pecan nut oils obtained under different extraction conditions using P-CO₂ and P-LPG as a solvent. For the P-CO₂ extraction, the conditions 150 bar / 20 °C and 250 bar / 20 °C presented the lowest antioxidant activity, with values of 85.14% and 84.12%, respectively, while a higher activity was observed at 200 bar / 40 °C and 250 bar / 60 °C, with values of 90.18% and 94.29%, respectively. The extraction at 150 bar / 60 °C showed a very low yield and was not studied. The results corroborate with Rosa et al. [43] who states that antioxidant compounds are extracted at pressures between 150 and 400 bar and temperatures of 40 and 60 °C.

Regarding the P-LPG extraction, condition 4 (25 bar / 20 °C) exhibited the highest percentage of antioxidant activity (94.48%) with significant differences from the other conditions. Salvador et al. [9] extracted the oil from the pecan nut cake using high and low pressure techniques and found antioxidant activity values by DPPH (500 µg / mL) of 1.4% (SC-

CO₂ 300 bar / 50 °C) to 93.9% (ultrasound ethanol and acetone soxhlet). In general, the use of P-CO₂ or P-LPG extraction may be a promising technology for the extraction of pecan nut oil with antioxidant activity.

Table 5 shows ANOVA results the effects of the variables studied on the antioxidant activity of pecan nut oils extracted with P-CO₂ and P-LPG. For the P-CO₂ extraction, the variable temperature exhibited a positive effect, showing that an increase in temperature led to an increase in the antioxidant activity of the oils. For the P-LPG extraction, the variable pressure showed the highest effect, demonstrating that oil with higher antioxidant activity can be produced with increasing pressure. However, a negative effect was observed for the variable temperature and the variable interactions.

3.3 Fatty acids profile and determination of squalene and β -sitosterol of pecan nut oils

The results of the quantification of fatty acids of pecan nut oils extracted by P-CO₂ and P-LPG are presented in Table 6. Five fatty acids were identified, including C16:0 (palmitic acid), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid), and C18:3 (linolenic acid). It is observed that oleic acid was the predominant fatty acid for all conditions studied, followed by linoleic acid. These results are consistent with that reported in the literature for oleic acid (49-69%) and linoleic (19-40%) in pecan nut oil [44]. Alexander et al. [40] found oleic acid ranging from 60.2 to 65.7% and linoleic acid from 22.3 to 26% in pecan nut oil extracted with supercritical CO₂. Villarreal-Lozoya et al. [45] used n-hexane as a solvent for the extraction of the oil of different pecan nut cultivars and reported that there was a significant difference in the content of oleic and linoleic acid between cultivars; oleic and linoleic acid ranged across from 53% to 75% and 15% to 36%, respectively.

The amount of oleic acid found in this study was higher than that reported for other nuts, such as Para nuts (28.92%) [46], pistachios (54.59%) [47], peanuts (40.78%) [48], and lower than the values found in hazelnuts (79.34%) [49]. The high oleic acid contents are interesting since a diet rich in oleic acid can reduce the systolic blood pressure, thus reducing the risk of heart disease [50], in addition to reducing the levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL) in humans [51].

Table 6 shows the contents of squalene and β -sitosterol in pecan nut oils extracted with P-CO₂ and P-LPG. For the P-CO₂ extraction, the squalene levels in the oil ranged from 9.07 to 15.61 mg/100g, while the β -sitosterol levels ranged from 15.14 to 23.41 mg/100g for the conditions 150 bar / 20 °C and 250 bar / 60 °C, respectively. It is observed that both squalene

and β -sitosterol presented higher levels in the conditions higher pressure and higher temperature. In the P-LPG extraction, the squalene levels ranged from 1.68 to 4.07 mg/100g for the extractions at 17.5 bar / 30 °C and 10 bar / 20 °C, respectively, whereas β -sitosterol presented values ranging from 13.32 to 17.56 mg/100g for the extractions at 17.5 bar / 30 °C and 10 bar / 40 °C, respectively. Fernandes et al. [8] studied pecan nut oil obtained by oil pressing and found squalene content of 29.88 mg/100g, while Miraliakbari and Shahidi [52] reported β -sitosterol values of 167 mg/100g and 175 mg/100g for extractions performed with hexane and chloroform/methanol, respectively, which was higher than those found in the present study.

There was no significant effect of the variables pressure, temperature and interaction of the variables on fatty acid levels (for P-CO₂ and P-LPG), squalene (for P-CO₂ and P-LPG) and β -sitosterol (for P-LPG). However, as can be seen from the Pareto graph (Fig. 2), for P-CO₂ extraction there was a positive effect of pressure and temperature variables, and a negative effect of the interaction of these variables on β -sitosterol levels.

3.4 Chemical quality parameters of pecan nut oils

Table 7 presents the results for acidity index, iodine value, peroxide value, and refractive index of pecan nut oils obtained under the condition with the higher extraction yield, corresponding to the condition 4 (250 bar / 20 °C) and condition 1 (10 bar / 20 °C) for the P-CO₂ and P-LPG extractions, respectively.

In relation to the parameter acidity, a significant difference was observed between the samples, with the highest values (3.33 mg KOH/g) for P-CO₂ extraction. Considering that CO₂ extraction has a relatively lower yield, the concentration of free fatty acids may be higher in the extracted oil because CO₂ selectively solubilizes firstly the free fatty acids that may be present in the sample. Salvador et al. [9] evaluated commercial pecan nut oil and found values of 1.70 to 1.90 mg KOH/g for the acidity.

A significant difference was observed between the peroxide values of this study, with values of 0.49 mEQ O₂/kg and 1.27 mEQ O₂/kg for the P-CO₂ and P-LPG extractions, respectively, which is lower when compared to the Soxhlet extraction (3.84 mEQ O₂/kg). The low peroxide value observed for P-CO₂ and P-LPG can be explained by the use of a closed system in the extraction of the oil, which leads to a minimum exposure to oxidation. In contrast, the extraction with n-hexane uses open system and in addition [53], the mixture of the oil with the solvent is under heating favoring the oxidation. The oils produced by the P-CO₂ and P-LPG

extractions are in accordance with the standards provided by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil in cold-pressed extraction and unrefined oils [54] for the parameter acidity and peroxide value, with levels of up to 4 mg KOH g and up to 15 mEQ O₂/kg, respectively.

The iodine value ranged from 136.31 to 140.18 g I₂/100g for the P-LPG and P-CO₂ extractions, respectively, which represents a high degree of unsaturation. No significant differences were observed between the refractive indices, which are in agreement with the values reported by Oro et al. [7], who found a refractive index of 1.47 in cold-pressed pecan nut oil.

4. Conclusion

A positive effect of pressure was observed on the extraction yield of pecan nut oil produced by P-CO₂ extraction, with the highest value (52.26%) observed for the condition where CO₂ is in the liquid phase (250 bar / 20 °C). The P-LPG extraction presented the highest yield (76.21%) at lower pressure and temperature conditions (10 bar / 20 °C). All oils presented inhibition of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical above 70%. The fatty acid profile of the oils extracted by the two methods was within the values reported in the literature, and oleic acid was the main component in all extraction conditions. The antioxidant compounds such as squalene and β-sitosterol were identified in both extraction processes. The chemical quality parameters of the oils showed that they are within the standards established by the Brazilian legislation. The P-LPG was shown to be a promising extraction solvent, providing a higher yield in much shorter times, besides presenting good chemical quality, fatty acid profile, and antioxidant activity. However, the need to perform additional analysis is emphasized to verify that the extracted oil does not contain any residues of the components present in the LPG.

Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest regarding this work.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- [1] R.E. Worley, Pecan physiology and composition, in: C.R. Santerre (Ed), Pecan Technology, Chapman & Hall, New York, 1994, pp. 39-48.
- [2] L.T. Wakeling, R.L. Mason, B.R. D'arcy, N.A. Caffin, Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] grown in Australia, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1277–1281. <http://doi.org/10.1021/jf000797d>.
- [3] R. Zhang, F. Peng, Y. Li, Pecan production in China, Sci. Hortic. 197 (2015) 719-727. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.035>.
- [4] IBGE, Lavoura Agrícola Municipal. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/default_xls.shtm, 2018 (Accessed December 12, 2018).
- [5] D. Fronza, J.J. Hamann, Técnicas para o cultivo da noqueira-pecã, Colégio Politécnico, Núcleo de Fruticultura, Santa Maria- RS, 2016.
- [6] M. Venkatachalam, S.K. Sathe, Chemical composition of selected edible nut seeds, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 4705–4714. <http://doi.org/10.1021/jf0606959>.
- [7] T. Oro, P.J. Ogliari, R.D.C.M. Amboni, D. Barrera-Arellano, J.M. Block, Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces pecán [*Carya Illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases, Grasas y Aceites 59 (2008) 132-138. <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i2>.
- [8] G.D. Fernandes, R.B. Gómez-Coca, M.C. Pérez-Camino, W. Moreda, D. Barrera-Arellan, Chemical characterization of major and minor compounds of nut oils: almond, hazelnut, and pecan nut, J. Chem. (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/2609549>.
- [9] A.A. Salvador, R. Podestá, J.M. Block, S.R.S. Ferreira, Increasing the value of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] cake by means of oil extraction and antioxidant

activity evaluation, *J. Supercrit. Fluids* 116 (2016) 215-222.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.046>.

[10] A.G. Atanasov, S.M. Sabharanjak, G. Zengin, A. Mollica, A. Szostak, M. Simirgiotis, A. Mocan, Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects, *Trends Food Sci. Technol.* 71 (2018) 246-257. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.019>.

[11] A.C.P Prado, B.A. Manion, K. Seetharaman, F.C. Deschamps, D.B. Arellano, J.M. Block, Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch], *Ind. Crops Prod.* 45 (2013) 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.042>

[12] E.H. Haddad, Health effects of a pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] nut-rich diet, in: V.R. Preedy, R.R. Watson, V.B. Patel (Eds.), *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 2011, pp. 891–898.

[13] A.G. Ortiz-Quezada, L. Lombardini, L. Cisneros-Zevallos, Antioxidants in pecan nut cultivars [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], in: V.R. Preedy, R.R. Watson, V.B. Patel (Eds.), *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 2011, pp. 881–889.

[14] A.I. Bamgboye, A.O.D. Adejumo, Development of a sunflower oil expeller, *Int. Commis. Agric. Eng.* 9 (2007) 1–7.

[15] N. Castejón, P. Luna, F.J. Señoráns, Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents, *Food Chem.* 244 (2018) 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.014>.

[16] Z. Novello, J. Scapinello, J.D. Magro, G. Zin, M.D. Luccio, M.V. Tres, J.V. Oliveira, Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane, *Ind. Crops and Prod.* 76 (2015) 697- 701. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.075>.

[17] J.F. Soares, V. Dal Prá, M. Souza, F.C. Lunelli, E.R. Abaide, J.R.F. Silva, R.C. Kuhn, J. Martínez, M.A. Mazutti, Extraction of rice bran oil using supercritical CO₂ and compressed liquefied petroleum gas, *J. Food Eng.* 170 (2016) 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.016>.

[18] E.R. Abaide, G.L. Zabet, M.V. Tres, R.F. Martins, J.L. Fagundes, L.F. Nunes, S. Druzian, J.F. Soares, V. Dal Prá, J.R.F. Silva, R.C. Kuhn, M.A. Mazutti, Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids, *Food Bioprod. Process.* 102 (2017) 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.008>.

[19] G.L. Teixeira, S.M. Ghazani, M.L. Corazza, A.G. Marangoni, R.H. Ribani, Assessment of subcritical propane, supercritical CO₂ and soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts, *J. Supercrit. Fluids* 133 (2018) 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.003>.

[20] R.P. Cuco, L. Cardozo-Filho, C. Silva, Simultaneous extraction of seed oil and active compounds from peel of pumpkin (*Cucurbita maxima*) using pressurized carbon dioxide as solvent, *J. Supercrit. Fluids* 143 (2019) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.002>.

[21] S.D. Manjare, K. Dhingra, Supercritical fluids in separation and purification: A review, *Materials Science for Energy Technol.* 2 (2019) 463–484. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.04.005>.

[22] P. Subra-Paternault, C. Harscoat-Schiavo, R. Savoie, M. Bruna, J. Velasco, V. Ruiz-Mendez, Utilization of pressurized CO₂, pressurized ethanol and CO₂-expanded ethanol mixtures for de-oiling spent bleaching earths, *J. Supercrit. Fluids* 149 (2019) 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.016>.

[23] F. Temelli, M.D.A. Saldaña, P.H.L. Moquin, M. Sun, Supercritical fluid extraction of specialty oils, in: J.L. Martinez, (Ed.), *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceutical and Bioactive Compounds*, CRC Press, 2007, pp.52–91.

- [24] G. Scapin, E.R. Abaide, R.F. Martins, R.G. Vendruscolo, M.A. Mazutti, R. Wagner, C.S. Rosa, Quality of perilla oil (*Perilla frutescens*) extracted with compressed CO₂ and LPG, J. Supercrit. Fluids 130 (2017) 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.007>.
- [25] C.X. Tan, G.H. Chong, H. Hamzah, H.M. Ghazali, Comparison of subcritical CO₂ and ultrasound-assisted aqueous methods with the conventional solvent method in the extraction of avocado oil, J. Supercrit. Fluids, 135 (2018) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.036>.
- [26] M. Arab, B. Bahramian, A. Schindeler, P. Valtchev, F. Dehghani, R. McConchie, Extraction of phytochemicals from tomato leaf waste using subcritical carbon dioxide, Innovative Food Sci. Emerg. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102204>.
- [27] P.K. Rout, S.N. Naik, Y.R. Rao, Subcritical CO₂ extraction of floral fragrance from *Quisqualis indica*, J. Supercrit. Fluids 45 (2008) 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.02.011>.
- [28] G. Scapin, E.R. Abaide, L.F. Nunes, M.A. Mazutti, R.G. Vendruscolo, R. Wagner, C.S. Rosa, Effect of pressure and temperature on the quality of chia oil extracted using pressurized fluids, J. Supercrit. Fluids 127 (2017) 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.030>.
- [29] I.L. Valente, T.C. Confortin, L. Luft, G.A. Ugalde, G.L. Zobot, M.A. Mazutti, L.M. Terra, Extraction of bioactive compounds from *Botryosphaeria dothidea* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas, J. Supercrit. Fluids 136 (2018) 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.02.013>.
- [30] AOAC, Association of Official Agricultural Chemists, Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, 18 ed., Gaithersburg, Maryland, 2005.
- [31] J.L. Martínez, S.W. Vance, Supercritical extraction plants equipment, process, and costs, in: J.L. Martínez, Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, CRC Press, Nova York, 2008, pp. 25-49.

[32] IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7ed., Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, 1992.

[33] D. Sallet, E. Abaide, C. Marcuz, G. Ariotti, V.D. Prá, G. Ugalde, G.L. Zabet, M.A. Mazutti, R.C. Kuhn, Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas, *J. Supercrit. Fluids* 122 (2017) 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.005>.

[34] NIST, National Institute of Standards and Technology, Chemistry WebBook. <http://webbook.nist.gov/chemistry>, 2018 (accessed 10 december 2018).

[35] V. Dal Prá, J.F. Soares, D.L. Monego, R.G. Vendruscolo, D.M.G. Freire, M. Alexandri, A. Koutinas, R. Wagner, M.A. Mazutti, M. Barcellos, Extraction of bioactive compounds from palm (*Elaeis guineensis*) pressed fiber using different compressed, *J. Supercrit. Fluids* 112 (2016) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.011>.

[36] AOCS, American Oil Chemists Society, Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society: including additions and revisions, 6 ed. Champaign, Illinois, USA, 2009.

[37] Y. Chen, Y. Yang, S. Nie, X. Yang, Y. Wang, M. Yang, C. Li, M. Xie, The analysis of trans fatty acid profiles in deep frying palm oil and chicken fillets with an improved gas chromatography method, *Food Cont.* 44 (2014) 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.010>.

[38] IDF, International Dairy Federation, Anhydrous milkfat: determination of the peroxide value, in: International IDF Standards, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1991.

[39] Y. Wenli, Z. Yaping, C. Jingjing, S. Bo, Comparison of two kinds of pumpkin seed oils obtained by supercritical CO₂ extraction, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004) 355–358. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200400956>.

- [40] W.S. Alexander, G.H. Brusewitz, N.O. Maness, Pecan oil recovery and composition as affected by temperature, pressure, and supercritical CO₂ flow rate, *J Food Sci.* 62 (1997) 762-766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15452.x>.
- [41] G. Polmann, V. Badia, M. Frena, G.L. Teixeira, E. Rigo, J.M. Block, M.M.C. Feltes, Enzyme-assisted aqueous extraction combined with experimental designs allow the obtaining of a high-quality and yield pecan nut oil, *LWT* 113 (2019) 108283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108283>.
- [42] J.L. Orellana, T.D. Smith, C.L. Kitchens, Liquid and supercritical CO₂ extraction of fat from rendered materials, *J. Supercrit. Fluids* 79 (2013) 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.022>
- [43] P.T.V. Rosa, J.C. Parajó, H. Domínguez, A. Moure, B.D. Reinoso, R.L. Smith Jr., M. Toyomizu, L.J. Florusse, C.J. Peters, M. Goto, S. Lucas, M.A.A. Meireles, Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry, in: M.A.A. Meireles (Ed.), *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*, CRC Press, Nova York, 2009, pp. 272-400.
- [44] D. Firestone, *Physical and chemical characteristics of oil, fats and waxes*, AOCS Press, USA, 2006.
- [45] J.E. Villarreal-Lozoya, L. Lombardini, L. Cisneros-Zevallos, Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different, *Food Chem.* 102 (2007) 1241-1249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.024>.
- [46] J.B. Freitas, M.M.V. Naves, Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde, *Rev. Nutr.* 23 (2010) 269-279. <http://doi.org/10.1590/s141552732010000200010>.
- [47] A. Rabadán, M. Álvarez-Ortí, J.E. Pardo, A. Alvarruiz, A. Storage stability and composition changes of three cold-pressed nut oils under refrigeration and room temperature conditions, *Food Chem.* 259 (2018) 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.098>.

- [48] S. Arranz, R. Cert, J. Pérez-Jiménez, A. Cert, F. Saura-Calixto, Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils, *Food Chem.* 110 (2008) 985–990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.021>.
- [49] S.G. Özkal, M.E Yener, L. Bayindirli, Mass transfer modeling of apricot kernel oil extraction with supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 35 (2005) 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.12.011>.
- [50] S. Terés, G. Barcelo-Coblijn, M. Benet, R. Álvarez, R. Bressani, J.E. Halver, P.V. Escribá, Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 13811–13816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807500105>.
- [51] A.H. Stark, Z. Madar, Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr. Rev.* 60 (2002) 170–176. <https://doi.org/10.1301/002966402320243250>.
- [52] H. Miraliakbari, F. Shahidi, Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents, *J. Food Lipids* 15 (2008) 81-96.
- [53] J.N. Moon, A.T. Getachew, A.S.M. Tanbirul Haque, P.S. Saravana, Y.J. Cho, D. Nkurunziza, B.S. Chun, Physicochemical characterization and deodorant activity of essential oil recovered from *Asiasarum heterotropoides* using supercritical carbon dioxide and organic solvents, *Food Chem.* 244 (2019) 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.09.019>.
- [54] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, Dispõe sobre o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal, *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília.

Table 1: Experimental design (2^2) of the extraction of pecan nut oil.

Condition	P-CO ₂		P-LPG	
	P (bar)	T (°C)	P (bar)	T (°C)
1	150 (-1)	20 (-1)	10 (-1)	20 (-1)
2	150 (-1)	60 (+1)	10 (-1)	40 (+1)
3	250 (+1)	60 (+1)	25 (+1)	40 (+1)
4	250 (+1)	20 (-1)	25 (+1)	20 (-1)
5	200 (0)	40 (0)	17.5 (0)	30 (0)
6	200 (0)	40 (0)	17.5 (0)	30 (0)
7	200 (0)	40 (0)	17.5 (0)	30 (0)

Table 2: Yield and recovery of pecan nut oils obtained by P-CO₂ and P-LPG.

Condition	Solvent	P (bar)	T (°C)	Density (kg/m ³)	Time (min)	Yield (%)	Recovery (%)
1	CO ₂	150	20	904	300	25.35	34.17
2	CO ₂	150	60	604	300	4.77	6.44
3	CO ₂	250	60	787	300	33.53	45.19
4	CO ₂	250	20	963	300	52.26	70.46
5*	CO ₂	200	40	840	300	35.37 ± 0.30	47.68 ± 0.41
1	LPG	10	20	215	40	76.21	102.7
2	LPG	10	40	183	40	69.06	93.08
3	LPG	25	40	241	40	71.20	96.22
4	LPG	25	20	244	40	69.87	94.17
5*	LPG	17.5	30	227	40	67.47 ± 0.42	90.93 ± 0.58
Soxhlet	n-hexane	1.01325**	68	613	480	73.42	100

*Condition 5 corresponds to the mean ± standard deviation of the triplicate of the central point.

**atmospheric pressure.

Table 3: Effect of the variables (two-way ANOVA) on the extraction yield of pecan nut oils obtained by P-CO₂ and P-LPG.

	Effect	Standard Error	p
P-CO₂			
Intercept	31.7171	1.8288	<0.001*
(1) Pressure	27.8350	4.8387	0.0104*
(2) Temperature	-19.6550	4.8387	0.0269*
1 x 2	0.9250	4.8387	0.8606
P-LPG			
Intercept	69.8214	1.1827	<0.001*
(1) Pressure	-2.1000	3.1291	0.5502
(2) Temperature	-2.9100	3.1291	0.4210
1 x 2	4.2400	3.1291	0.2684

1 x 2 = interaction between pressure and temperature.

* There was a significant effect considering a significance of 95%.

Table 4: Antioxidant activity toward DPPH radical of pecan nut oils obtained by P-CO₂ and P-LPG.

Condition	Solvent	Pressure (bar)	Temperature (°C)	AA _{DPPH} (%)
1	CO ₂	150	20	85.14 ^b ± 0.59
2	CO ₂	150	60	n.d*
3	CO ₂	250	60	94.29 ^a ± 2.79
4	CO ₂	250	20	84.12 ^b ± 2.05
5	CO ₂	200	40	90.18 ^a ± 1.35
1	LPG	10	20	75.59 ^c ± 1.90
2	LPG	10	40	79.26 ^{bc} ± 0.26
3	LPG	25	40	77.47 ^{bc} ± 1.91
4	LPG	25	20	94.48 ^a ± 2.04
5	LPG	17.5	30	81.49 ^b ± 0.89

* n.d: not determined.

Analyses performed in triplicate.

Values expressed as mean ± standard deviation with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$) by the Tukey's test.

Table 5: Effect of the variables (two-way ANOVA) on the antioxidant activity of pecan nut oils obtained by P-CO₂ and P-LPG.

	Effect	Standard Error	p
P-CO₂			
Intercept	90.1800	0.7752	<0.001*
(1) Pressure	-1.9500	2.4514	0.5098
(2) Temperature	11.1000	2.4514	0.0455*
1 x 2	-0.9300	2.4514	0.7409
P-LPG			
Intercept	81.6114	0.2801	<0.001*
(1) Pressure	8.5500	0.7410	0.0014*
(2) Temperature	-6.6700	0.7410	0.0029*
1 x 2	-10.3400	0.7410	<0.001*

1 x 2 = interaction between pressure and temperature.

* There was a significant effect considering a significance of 95%.

Table 6: Fatty acids profile (%total fatty acids) and bioactive compounds (squalene and β -sitosterol) (mg/100g) of pecan nut oils obtained by P-CO₂ and P-LPG.

P-CO₂	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Squalene	β -sitosterol
1	4.68	1.55	71.60	21.56	0.61	9.07	15.14
2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
3	4.72	1.35	67.84	24.65	0.52	9.60	23.41
4	4.41	1.22	64.84	29.02	0.50	15.61	22.59
5	4.57 \pm 0.43	1.55 \pm 0.17	69.32 \pm 1.56	24.09 \pm 0.85	0.48 \pm 0.10	11.97 \pm 2.39	21.50 \pm 0.34
P-LPG	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Squalene	β -sitosterol
1	4.54	1.89	69.94	23.04	0.59	4.07	15.75
2	4.46	1.84	71.04	22.06	0.59	3.90	17.56
3	4.72	1.95	71.05	21.65	0.63	3.27	16.26
4	4.93	2.15	70.97	21.32	0.62	2.57	14.62
5	5.05 \pm 0.17	2.12 \pm 0.09	70.79 \pm 0.36	21.39 \pm 0.40	0.65 \pm 0.05	1.68 \pm 0.28	13.32 \pm 1.24

n.d: not determined

P-CO₂: 1 (150 bar / 20 °C); 2 (150 bar / 60 °C); 3 (250 bar / 60 °C); 4 (250 bar / 20 °C); 5 (200 bar / 40 °C).

P-LPG: 1 (10 bar / 20 °C); 2 (10 bar / 40 °C); 3 (25 bar / 40 °C); 4 (25 bar / 20 °C); 5 (17.5 bar / 30 °C).

Table 7: Chemical quality parameters of pecan nut oils from the conditions with higher extraction yield.

Solvent	Acidity (mg KOH/g)	Peroxide value (mEQ O ₂ /Kg)	Iodine index (g I ₂ /100g)	Refractive index
P-CO ₂ *	3.33 ^a ± 0.07	0.49 ^c ± 0.05	140.18 ^a ± 0.77	1.47 ^a ± (<0.01)
P-LPG**	1.18 ^c ± 0.13	1.27 ^b ± 0.23	136.31 ^c ± 0.55	1.47 ^a ± (<0.01)
Soxhlet	2.39 ^b ± 0.10	3.84 ^a ± 0.32	138.12 ^b ± 0.34	1.47 ^a ± (<0.01)

* Condition 4 (250 bar / 20 °C)

**Condition 1 (10 bar / 20 °C)

Values expressed as mean ± standard deviation with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey's test.

Analyses performed in triplicate.

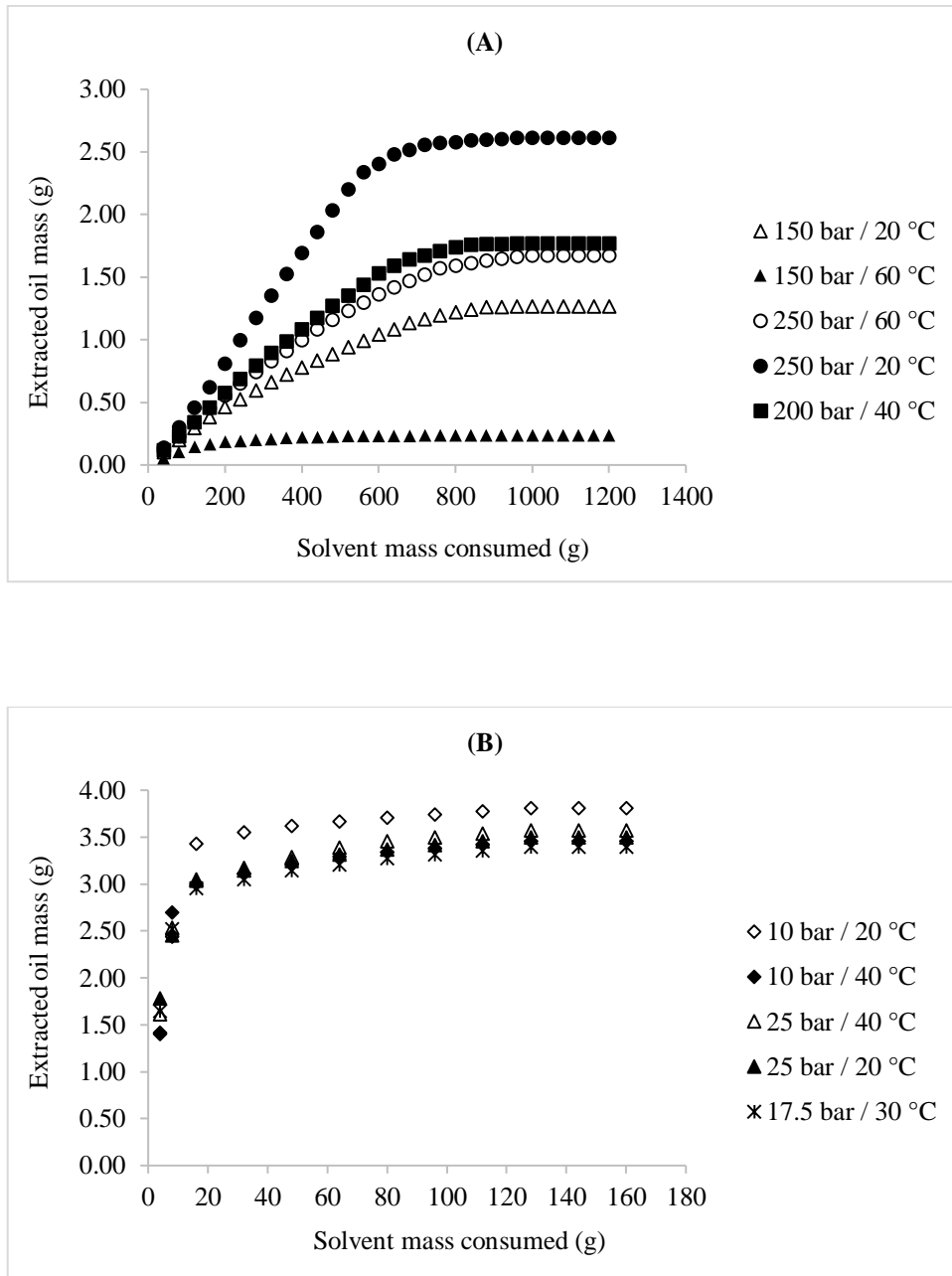


Figure 1: Kinetic extraction curve of pecan nut oil using P-CO₂ (A) and P-LPG (B).

3.2 ARTIGO 2 - USE OF COMPRESSED FLUIDS IN THE RECOVERY OF PECAN NUT CAKE OIL: INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON YIELD AND EXTRACT QUALITY

Artigo publicado no periódico The Journal of Supercritical Fluids, ISSN: 0896-8446, Área de avaliação em Ciência de Alimentos A2.

J. of Supercritical Fluids 161 (2020) 104820



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



Use of compressed fluids in the recovery of pecan nut cake oil: Influence of extraction conditions on yield and extract quality



Alves Jamila dos Santos^{a,*}, Tássia Carla Confortin^b, Izelmar Todero^b,
Angela Souza Rodrigues^a, Stephanie Reis Ribeiro^a, Silvino Robalo Sasso^a,
Nicholas Islongo Canabarro^c, Róger Wagner^a, Alexandre José Cichoski^a,
Marcio Antonio Mazutti^b, Claudia Severo da Rosa^a

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

^b Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

^c Laboratory of Optimization, Design and Advanced Control (LOPCA), School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein 500, CEP 13083-852, Campinas, SP, Brazil

Use of compressed fluids in the recovery of pecan nut cake oil: Influence of extraction conditions on yield and extract quality

Jamila dos Santos Alves^{a*}, Tássia Carla Confortin^b, Izelmar Todero^b, Angela Souza Rodrigues^a, Stephanie Reis Ribeiro^a, Silvino Robalo Sasso^a, Nicholas Islongo Canabarro^c, Róger Wagner^a, Alexandre José Cichoski^a, Marcio Antonio Mazutti^b, Claudia Severo da Rosa^a

^aDepartment of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

^bDepartment of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

^cLaboratory of Optimization, Design and Advanced Control (LOPCA), School of Chemical Engineering – University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein 500, CEP 13083-852 Campinas, SP, Brazil

* Corresponding author: alves.jamila@outlook.com (Alves, Jamila dos Santos)

Phone: +55 55 996325678

Highlights

- Pecan nut cake has a large amount of oil (54%);
- Pecan nut cake oil was recovered using compressed CO₂ and compressed LPG;
- The highest yield (56.33%) was obtained with compressed LPG extraction;
- Oil was predominantly comprised of unsaturated fatty acids (UFA \cong 93%);
- Significant contents of squalene and β -sitosterol were also obtained.

Abstract

Pecan nut cake (PNC) is residual biomass obtained as a result of cold pressing of pecan oil. PNC oil extractions using compressed carbon dioxide (C-CO₂) and compressed liquefied petroleum gas (C-LPG) were performed. The influence of extraction parameters such as pressure (150 to 250 bar – C-CO₂; 10 to 25 bar – C-LPG) and temperature (20 to 60 °C – C-CO₂; 20 to 40 °C – C-LPG) on the extraction yields and chemical profile were determined. The higher yields were achieved at 25 MPa / 20 °C (C-CO₂) and 1 MPa / 20 °C (C-LPG). The chemical profile of oils is mainly characterized by fatty acids where the oleic and linoleic acids were the majority compounds found in all samples. Contents of squalene and β -sitosterol also were obtained in the oils. The results showed that PNC is interesting biomass for oil extraction and which separation processes using compressed fluids is an attractive option for processing it.

Keywords: Residual biomass. Carbon dioxide. Liquefied petroleum gas. Fatty acids.

1. Introduction

The recovery of high-added value products from residual biomass and their applications in several areas of interest (such as pharmaceutical, cosmetic, biofuels and food) has claimed the attention of the scientific community [1]. In the pecan nut oil industry, the oil is obtained by cold pressing. Oro et al. [2] simulated this extraction and obtained a 45% oil yield. After pressing, pecan nut cake (PNC) is obtained as a byproduct of the process. PNC is biomass that presents a high content of remnant oil in their composition (36 to 59 g/100g) and according to the literature, it has a great nutritional value and good sensory characteristics [3]. Pecan nut oil is a rich source of fatty acids [4], tocopherols [5], and phytosterols [6], that can make the pecan nut cake biomass an attractive commercial product. However, to value these by-products, some aspects such as extraction method, environmental and safety issues need to be evaluated.

Conventional extraction with n-hexane is the technique traditionally used to recover residual biomass oil. The use of this solvent is discouraged due to solvent residues and damage to some components, important in the final product, mainly due to the use of high temperatures [7]. Therefore, an alternative to avoid the use of n-hexane is the application of pressurized fluids to obtain bioactive compounds from biomass such as PNC. Some studies have confirmed that the use of pressurized solvents can be as efficient as the use of organic solvents to oil extraction [8,9]. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide (SFE-CO₂) has been widely employed

to obtain oil from numerous vegetal matrices and the process allows obtaining a solvent-free extraction avoiding a further purification step. The critical CO₂ pressure and temperature (7.4 MPa and 31°C), as well as its non-toxicity, environmentally friendly and low cost, also make this solvent attractive [10,11]. These same characteristics are related to the use of subcritical CO₂ extraction. Some studies have shown that good extraction yields and good chemical profiles of the extracts have also been obtained when subcritical CO₂ extraction was performed [12-15].

Some studies have shown that compressed liquefied petroleum gas (C-LPG) is an alternative against SFE-CO₂ to extract bioactive compounds from vegetal matrices, as C-LPG extractions presented higher extraction yields and lower extraction times than SFE-CO₂ [16-18]. Extraction with C-LPG also possesses lower pressure, temperature and energy requirements than SFE-CO₂ [19]. The major concern about C-LPG extraction is their flammable nature which requires that extractions be performed at facilities appropriate to these conditions. It is worth noting that the extractions of pecan nut cake with pressurized fluids are scarce in the literature and more information about the extractions techniques is required.

Therefore, the aim of this study is the recovery of oil from pecan nut cake (PNC) using extraction techniques with compressed fluids (C-CO₂ and C-LPG). The oil was characterized in terms of extraction yields, fatty acids profile, lipidic quality, squalene and β -sitosterol contents, and physicochemical quality.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

The samples used in this study were donated by Nozes Pitol Alimentos Group (Anta Gorda, RS, Brazil). The nuts are dried in the shell in a silo, inserting hot air. After reaching the ideal moisture, the nuts are directed to the extraction of oil by cold pressing.

The residual biomass (pecan nut cake - PNC) obtained after pressing is the matrix used in this work. The PNC was stored in hermetically closed packing at -18 °C and protected from light until their use. Their initial moisture content was determined by the gravimetric method [20] and as equal to 3.6 % (w.b.). The high moisture content could affect the extraction yields acting as a barrier to diffusion of oil within PNC [21]. However, according to Snyder et al. [22], moisture content ranging from 3 to 12% (w.b.) showed no influence in the extraction step and for this reason, the PNC was used in their fresh form.

The PNC oil was obtained by Soxhlet extraction using n-hexane as solvent about 480 min [23]. Soxhlet extraction serves as a reference to compare the extraction yields and composition with pressurized fluid extractions. Briefly, 1 g of PNC was wrapped in a piece of filter paper and introduced into the Soxhlet apparatus containing about 100 mL of n-hexane. All assays were performed in triplicate and the value obtained was 54.78 % (± 0.12).

2.2. Solvents and chemical reagents

CO₂ (purity > 99.5%) was purchased from White Martins S.A. (Santa Maria, RS, Brazil). LPG was purchased from Liquigás S.A. (Santa Maria, RS, Brazil) and consisted of a mixture of propane (50.3 wt.%), n-butane (28.4 wt.%), isobutane (13.7 wt.%), ethane (4.8 wt.%), and other minor hydrocarbon constituents (2.8 wt.%). The standards for squalene (98%) and β -sitosterol (95%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All chemicals and solvents used in the experiment were of analytical grade (PA) purchased from Vetec Fine Chemicals (Xerém, RJ, Brazil) and Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Extractions procedures

2.3.1. Extraction using compressed fluids (CO₂ and LPG)

The extractions were conducted in a laboratory-scale unit described in detail elsewhere [24]. In each run, approximately 10 g of PCN was loaded into the extraction vessel for extractions using compressed carbon dioxide (C-CO₂) and approximately 5 g were used to extractions with compressed liquefied petroleum gas (C-LPG). The extractions were carried out at a solvent flow rate of 4 g/min for 220 min to C-CO₂ and for 20 min to C-LPG extractions, respectively. The influence of extractions parameters such as temperature and pressure were investigated through a 2² experimental central composite design (CCD) with triplicate in central point (Table 1), according to Alves et al. [14]. The overall extraction curves were obtained as a function of cumulative extracted oil mass with extraction time for all assays. The density (Table 2) of both compressed fluids was determined through NIST Chemistry WebBook [25].

The global extractions yields were obtained as a ratio between the mass of extracted oil (m_e) and the mass of raw material (m_i) loaded into the extraction vessel (Eq. (1)). The oil recovery (R_0) was obtained as a ratio between the mass of extracted oil (m_e) and the mass of oil obtained using Soxhlet method (m_{soxhlet}) (Eq. (2))

$$X_o = \left(\frac{mt}{mi} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$R_o = \left(\frac{mt}{msoxhlet} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.4. Oil characterization

2.4.1. Fatty acid profile

The oils triglycerides were transesterified/saponified by AOCS method Ce 2-66 [26], with modifications [27]. The fatty acid methyl ester (FAME) of samples was analyzed according to experimental conditions proposed by Alves et al. [14] using a gas chromatograph equipped with flame ionization detector (GC-FID) (Varian 3400 CX, Santa Ana, CA, USA). The identification of the compounds was performed by comparing the retention times of the analytes with the retention times of FAME Mix-37 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, HE, Germany). The results were expressed as a percentage of fatty acids by using an internal standard methyl ester tricosanoate (C23:0Me, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.4.2 Lipid quality

Three quality indexes of lipidic fractions were calculated based on the composition of fatty acids and were used to evaluate the lipid quality of the oils. The relation between hypocholesterolemic and hypercholesterolemic fatty acids (H/H) was obtained according to Santos-Silva et al. [28] (Eq. (3)):

$$H/H = \frac{C18:1n9 + C18:2n6 + C18:3n3}{C14:0 + C16:0} \quad (3)$$

The atherogenicity (IA) (Eq. (4)) and thrombogenicity indexes (IT) (Eq. (5)) were calculated according to Ulbricht et al. [29]:

$$IA = \frac{C16:0}{\Sigma \text{ PUFA} + \Sigma \text{ MUFA}} \quad (4)$$

$$IT = \frac{C16:0 + C18:0}{0,5(\Sigma \text{ MUFA}) + 0,5(\Sigma n6) + 3(\Sigma n3) + (\Sigma n3/\Sigma n6)} \quad (5)$$

where C16:0 (palmitic acid); C18:0 (stearic acid); C18:1n9 (oleic acid); C18:2n6 (linoleic acid); C18:3n3 (linolenic acid); Σ MUFA (sum of monounsaturated fatty acids concentrations); Σ n6 (sum of n-6 polyunsaturated fatty acid concentrations); Σ n3 (sum of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations).

2.4.3. Squalene and β -sitosterol of PNC oils

The nonsaponifiable oil fraction was obtained by the AOCS method Ce 12-16 [26] with modifications proposed by Alves et al. [14]. The extract was analyzed by GC-FID (Varian Model 3400 CX, Santa Ana, CA, USA) and the compounds were identified by comparing the analytes retention times with the respective patterns. The results were expressed by mg/100g of oil.

2.5. Physicochemical properties of PNC oils

The physicochemical properties of PNC oils were determined for the extractions conditions that presented the higher extraction yields for both procedures using compressed fluids (C-CO₂ and C-LPG), and for Soxhlet extraction as well. For that, the acidity index [26], the peroxides index [30] and the induction time (oxidative stability) were determined [31]. The determination of the oxidative induction time was performed using a Rancimat operating at 120 °C and with an air flow of 20 L / h. The Rancimat method is based on accelerating the aging process of the sample by raising its temperature and passing a continuous stream of air through it. The air flow transports volatile oxidation products from the sample vessel into a vessel containing distilled water. The conductivity of this water is continuously measured. Conductivity increases in this vessel once oxidation products emerge. A sudden, strong increase in conductivity – revealed by an inflection in the curve – marks the induction time.

2.6 Statistical analysis

The effects of independent variables (pressure and temperature) on response variables (extraction yield, major fatty acid, squalene, and β -sitosterol) were separately evaluated by statistical analysis of variance (ANOVA) with a significance level of 5% using software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA). A Tukey test was applied to detect the differences among PNC physicochemical properties.

3. Results and discussion

3.1 PNC oil extraction

The extraction yields and recovery of PNC oil obtained by C-CO₂ and C-LPG as well as by Soxhlet method are shown in Table 2. As can be observed the extractions performed by the Soxhlet method reveals a great amount of remnant oil in the PNC (54.78%), which indicates that the cold pressing employed in the industry has low efficiency. The assays performed by C-CO₂ and C-LPG show that both pressure and temperature influence the global extraction yield and the extraction recovery.

The highest yield (43.65%) and recovery (79.08%) of PNC oil were achieved at 25 MPa / 20 °C and were about 75 times higher than the lowest ones (0.58% and 1.04%, respectively), observed at 15 MPa / 60 °C for the C-CO₂ extractions. It is emphasized that in the condition of higher yield (25 MPa / 20 °C) CO₂ is in the liquid phase. This result corroborates with Scapin et al. [15] who that extracted oil from the perilla and the highest yield was also found in the condition of 25 MPa / 20 °C. In the work done by Salvador et al. [3], they extracted the oil of PNC donated by two distinct industries (based in Brazil) by low-pressure extraction methods (Soxhlet and Ultrasound) using three different organic solvents (ethanol, n-hexane, and acetone) and by supercritical CO₂ extraction (10 – 30 MPa and 40 – 50 °C). The highest extraction yields achieved by authors were 69.6±3% by Soxhlet extraction with ethanol, 60±2% by Ultrasound extraction with acetone and 58.4±0.2% by SFE-CO₂ at 30 MPa / 40 °C.

In the present study, the influence of pressure and temperature on the extraction yields were analyzed through the analysis of variance (ANOVA) (Supplementary material 1). The results showed that in the conditions evaluated, the pressure and temperature alone affect significantly the extraction yields at a 95% confidence level. However, the interaction between pressure and temperature was not significant for the extraction yields. The increase of pressure has a positive effect on extraction yield, a result which agrees with that obtained in another work [32]. The authors attribute this effect due to the increase of fluid density because as the density increases, the distance between molecules decreases and the interaction between oil and CO₂ increases, leading to a greater oil solubility in CO₂ [33]. On the other hand, increase of temperature has a negative effect on extraction yield, since when the temperature is raised from 20 °C to 60 °C (for all pressure conditions) a decrease in extraction yields occurred. The effect of increasing the temperature in the extraction, at a constant pressure, is due to two mechanisms: (1) the enhancement of solubility due to an increase of solute vapor pressure and (2) the

decrease of solvent density [34]. In this work, the decrease in solvent power can be attributed to the decrease in CO₂ density (Table 2) and this fact could not be compensated by the increase in the oil vapor pressure.

For the assays performed with C-LPG, the extraction yields, and recovery were quite similar. Yields ranged from 52.47% (1 MPa / 20 °C) to 56.33% (2.5 MPa / 20 °C). As can be seen in Table 2, the extractions performed with C-LPG shown a better performance than C-CO₂ when a comparison is realized with Soxhlet extraction. We believe that the LPG composition (a mixture of hydrocarbons) can contribute to enhance its extraction performance under pressurized conditions. However, to ratify this affirmation is necessary a more deeply investigation.

The influence of pressure and temperature on the extraction yields of C-LPG extractions were also analyzed by ANOVA, and neither pressure and temperature alone nor the combination of both showed influence on extraction yields (Supplementary material 1). It is worth noting that the extraction times using C-LPG are 11 times smaller than those used for C-CO₂ is employed. Although extractions performed with C-LPG has shown promising results, it is necessary to perform further studies using this solvent so that its application at the industrial level is possible, in a safe way for those who operate the system and for those who will consume the extracted oil.

3.2 *Extraction kinetic curves*

Figure 1 shows the overall extraction curves (OECs) of PNC oil obtained at different extraction conditions with C-CO₂ (Fig 1. A) and C-LPG (Fig 1. B), respectively. The OECs were expressed in terms of cumulative oil mass as a function of time and S/F ratio. For the extractions realized with C-CO₂ (except assay 2), it can be observed that the OECs exhibit the constant extraction rate period (CER) and falling extraction rate period (FER) periods, followed by the diffusional-controlled (DC) period. However, the extractions performed with C-LPG occurred predominantly in the CER period and the extraction rates were faster than that for extractions with C-CO₂. The differences between the OECs periods found for the two solvents can be correlated with the mass used for each test (approximately 5g for C-LPG and 10g for C-CO₂) and due to its distinct chemical compositions. Even that CO₂ is a pure compound and which under high pressures its can also solubilize weak polar compounds, C-LPG is a mixture of hydrocarbons and this can contribute to increased solvation power when pressurized. The use of different masses of feed material impact the bed static height, and this can corroborate

to increase the mass transfer resistances along the extraction. For C-CO₂ tests, the static bed height must be greater than the C-LPG tests and, consequently, the path that the solute will travel from the surface of the particles to the exit of the bed height was greater. It is worth noting that even with higher bed static height, the C-CO₂ assays occurred mainly on CER period. For this reason, it can be inferred that for both solvents the external mass transfer mechanisms controlled the PNC extraction process.

As can be seen in Figure 1 (A), the condition at 25 MPa and 20 °C presented a global extraction yield approximately 45%-fold than that at 25 MPa and 60 °C, which was the second-best condition. It is noteworthy that for the condition at 25 MPa and 20 °C, the extraction yield achieved after 70 minutes of extraction (~ 25%) is similar to the value obtained at 25 MPa and 60 °C, however, in this case, it took about 150 minutes. The extraction time is another important parameter to evaluate, as it is linked with the solvent-feed ratio (S/F). However, for all extractions, except for the worst one (15 MPa and 60°C), the solvent-feed ratio was approximately 80 g CO₂ / g PNC. Therefore, the extraction parameters like pressure and temperature shown a great importance on the interaction of solvent and solid matrix. For the worst condition (15 MPa and 60 °C) approximately 70 g CO₂/ g PNC was necessary to achieve the extraction yield of 0.57% and its result help us to have an idea about the extraction efficiency, that depends on extraction conditions (temperature and pressure) as already shown in section 3.1. Therefore, it can be inferred that at 25 MPa and 20 °C was the best cost-benefit condition to perform the extraction of PNC oil with C-CO₂, as the higher extraction yield and lower solvent-feed ratio (S/F) were achieved, respectively.

For the extractions performed with C-LPG, all conditions achieved a similar amount of PNC oil after 20 minutes of extraction. When these results are compared with those ones using C-CO₂ it can be seen that the pressure range among the assays with C-LPG was lower than that with C-CO₂. In addition, the variability of the C-LPG density was also lower than that with C-CO₂. It is worth noting that the solvent-to-feed ratio values for C-LPG extraction were approximately 42-fold lower than that with C-CO₂. At 1 MPa and 20 °C (the best extraction condition with LPG), for example, the solvent-to-feed ratio was 1.8 g LPG/ g PNC and an extraction yield of about 56.33 % was observed. Therefore, the extractions with C-LPG showed a decrease in the solvent consumption and higher extraction yields than those obtained with C-CO₂.

3.3 PNC oil characterization

3.3.1 Fatty acid profile, lipid quality and quantification of squalene and β -sitosterol from PNC oil

Table 3 shows the results with regards to fatty acids profile, lipid quality, the concentration of squalene and β -sitosterol for PNC oil obtained by C-CO₂ and C-LPG. As can be seen in Table 3, oleic acid (58.81 to 64.70%) and linoleic acid (28.31 to 31.20%) were the main fatty acids found in the PNC oil for all extraction conditions investigated. The condition 15 MPa / 60 °C (CO₂ extraction) resulted in a very low yield, and therefore, there was not sufficient amount of sample to perform the fatty acid composition analysis. These results are corroborating with the oleic acid (56.30 to 73.90%) and linoleic acid (17.30 to 33.40%) concentrations obtained in other work for PNC oil [3]. The results of oleic and linoleic fatty acids found by Prado et al. [35] in pecan nut oil obtained by pressing showed an average of 72% and 20%, respectively. The results found in the PNC oil in this study showed, on average, a lower value of oleic acid (62%) and a higher value of linoleic acid (30%). According to some studies, although not considered as an essential fatty acid the consumption of oleic acid can act on the reduction of the level of low-density lipoprotein cholesterol fraction (LDL) [36].

The concentration of oleic acid achieved in this study was higher than those found by other authors on the extraction of residual biomass such as chia cake (5.10 to 7.50%) [8] and sesame cake (41.90 to 42.90%) [37] and was similar to the concentration found on the extraction of olive bagasse (62.26 to 64.34%) [38]. The oils are predominantly characterized by unsaturated fatty acids (UFA \cong 93%), whose concentration is higher than saturated (SFA \cong 7%). In addition, monounsaturated fatty acids (MUFA \cong 63%) outperformed polyunsaturated fatty acids (PUFA \cong 30%).

The relation index between hypocholesterolemic and hypercholesterolemic fatty acids (H/H) present values of 14.20 (25 MPa / 60 °C) to 16.30 (15 MPa / 20 °C) for C-CO₂ extraction, and 18.34 (1 MPa / 20 °C and 1 MPa / 40 °C) to 19.10 (2.5 MPa / 40 °C) for C-LPG extraction. The values found in this study were higher than those ones related by Cunha et al. [39], which investigated the extraction of *bacaba-de-leque* oil using supercritical CO₂ and obtained values for the relation index in range of 4.07 (19 MPa / 60 °C) to 4.57 (15 MPa / 60 °C). According to Bentes et al. [40] as higher the relation H/H more nutritionally suitable is the oil.

Low atherogenicity (IA) (0.05 – 0.07) and thrombogenicity (IT) (0.13 – 0.17) indexes were obtained for the PNC oils extracted with C-CO₂ and C-LPG. It is worth noting the

relevance of these results, because the lower the AI and IT values, the greater the amount of anti-atherogenic fatty acids [41]. Therefore, PNC oil may be used to reduce the risk of coronary diseases.

For extractions with C-CO₂ the squalene concentrations were in range of 1.23 mg/100g oil (15 MPa / 20 °C) to 2.19 mg/100g oil (25 MPa / 60 °C), while the β -sitosterol concentrations were 15.16 mg/100g oil (15 MPa / 20 °C) to 19.51 mg/100g oil (25 MPa / 60 °C). As can be observed, lower squalene and β -sitosterol concentrations were achieved for the extraction conditions where lower pressure and temperature values were employed, while the higher ones were obtained for the extraction condition with higher pressure and temperature. For the extraction with C-LPG the squalene concentrations shows values in range of 0.98 mg/100g oil (1 MPa / 20 °C) to 2.61 mg / 100g oil (1 MPa / 40°C), and the β -sitosterol concentrations were found in range of 12.60 mg/100g oil (2.5 MPa / 40 °C) to 15.55 (2.5 MPa / 20 °C). It is noteworthy that for the extraction performed with C-GLP at 1.75 MPa and 30 °C, the presence of β -sitosterol was not observed.

The results of ANOVA showed a negative effect of interaction between pressure and temperature on the amount of oleic acid, showing that moderate values of temperature and pressure are more suitable to preserve this fatty acid (Supplementary material 2). For the extraction with C-LPG were not observed significant effects in the amount of oleic acid present in the oils. No significant effects were observed for squalene and β -sitosterol contents obtained by extraction with C-CO₂ and C-LPG.

3.3.2. Physicochemical properties of PNC oils

Table 4 presents the results for acidity and peroxide levels from PNC oils obtained by C-CO₂, C-LPG and Soxhlet extraction. For the extraction with compressed fluids, the analysis was performed only for conditions that present the higher extraction yield (25 MPa / 20 °C for C-CO₂ and 1 MPa / 20 °C for C-LPG).

As can be seen in Table 4, the higher value of acidity level was achieved by the extraction with C-CO₂ (2.06 mg KOH/g). In this case, it can be inferred that the small amount of water present in the sample may contribute to the hydrolysis effects and oil degradation, since water absorbs the CO₂ and becomes acidic due to the formation of carbonic acid [42]. The higher value for C-CO₂ extract acidity can be related to the extraction of free fatty acids, as showed by Zacchi et al. [43] According to the authors, under constant conditions of temperature

(60°C) the increase of pressure corroborates to enhance the free fatty acids extraction per unit mass of solvent.

The peroxide level results there was significant difference between the peroxide levels for extractions performed and the values for extractions performed with compressed fluids (0.59 mEQ O₂/kg for C-CO₂, and 0.14 mEQ O₂/kg for C-LPG) were lower than those one performed by Soxhlet (4.62 O₂/kg). Salvador et al. [3] realized the analysis of commercial PNC oils and PNC oil obtained by Soxhlet extraction with n-hexane. According to the authors, the values for peroxide levels were in the range of 2.5 to 6.1 mEQ O₂/Kg and 4.0 to 4.8 mEQ O₂/Kg, respectively. The PNC oils obtained by compressed fluid extractions comply with the standards set by the National Health Surveillance Agency (ANVISA, Brazil) [44] (Table 4) for cold-pressed and unrefined oils. The maximum acceptable values for acidity and peroxide levels are 4.0 mg KOH/g and 15 mEQ O₂/kg, respectively.

Figure 2 shows the oxidative induction times curves of PNC oils obtained by C-CO₂, C-LPG, and Soxhlet. The PNC oil extracted by C-LPG presented greater stability (6.66 h), followed by those obtained by Soxhlet (2.81 h) and C-CO₂ (1.02 h). Previous work shows that vegetable oil extracted with SC-CO₂ has less oxidative stability than oil extracted with hexane, three are the most cited reasons: (1) low extraction of tocopherols (natural antioxidant) [45]; (2) lower phospholipid content, known to have a synergistic antioxidant effect with tocopherols and [46]; (3) presence of oxygen in the commercial CO₂ used in the extraction [47]. Although we do not have data to confirm these postulates, it is important to present some explanation of the possible causes of the results found for oxidative stability.

The values obtained for the oils in this study are higher than those reported by Cuco et al. [48] for pumpkin residual biomass oil extracted by supercritical CO₂, ultrasound and Soxhlet. The oxidative induction times for the extraction with supercritical CO₂ were 72 min for the oil extracted from a mixture of pumpkin peel and seeds, and 104 min for the oil extracted from pumpkin seeds only; 68 min for ultrasound oil obtained from pumpkin peel; and for the oil extracted by Soxhlet the values were 28.2 min for the oil extracted from a mixture of pumpkin peel and seeds and 48.5 min for the oil extracted from pumpkin seeds.

4. Conclusion

The extraction of PNC oil showed that this residual biomass has a great amount of oil to be extracted. When extraction was performed with C-CO₂, higher extraction yields and recoveries were obtained under the condition at 25 MPa / 20 ° C (43.65% and 79.08%,

respectively). For extraction with C-LPG, the higher extraction yields (56.33%) and recovery (102.65%) were found at 1 MPa / 20 °C. If a comparison among the extractions performed by n-hexane, C-CO₂ and C-LPG were accomplished, it can be seen that the extraction using C-LPG was faster (20 minutes) and showed higher extraction yields and recovery than the others extraction techniques employed in this study. In view of the promising results found in the extraction with C-LPG, it is necessary to perform further studies using this solvent so that its application at the industrial level is possible, in a safe way for those who operate the system and for those who will consume the extracted oil. The employment of compressed liquids such as C-CO₂ and C-LPG to obtain oils rich in unsaturated fatty acids is advantageous and according to the results of lipidic quality, it should be antiatherogenic. Even after the oil extraction carried out in the industry, the residual biomass oils showed a significative content of squalene and β -sitosterol. For the conditions where higher extraction yields were achieved, the PNC oils presented acidity and peroxide levels comply with National Health Surveillance Agency (ANVISA, Brazil). This study has shown the efficiency in the employment of compressed fluids (C-CO₂ and C-LPG) on the recovery of PNC oils.

Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest regarding this work.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- [1] J.P. Coelho, R.M. Filipi, M.P. Robalo, R.P. Stateva, Recovering value from organic waste materials: Supercritical fluid extraction of oil from industrial grape seeds, *J. Supercrit. Fluids* 141 (2018) 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.008>.
- [2] T. Oro, H.M.A. Bolini, D.B. Arellano, J.M. Block, Physicochemical and sensory quality of crude brazilian pecan nut oil during storage, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (2009) 971–976. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1434-z>.

- [3] A.A. Salvador, R. Podestá, J.M. Block, S.R.S. Ferreira, Increasing the value of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C.Koch] cake by means of oil extraction and antioxidant activity evaluation, *J. Supercrit. Fluids* 116 (2016) 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.046>.
- [4] X-Y. Zhao, A-H. Liu, W. Zhang, S-J. Lv, K. Ren, The effect of pecan oil on hippocampal cells apoptosis of ovariectomized rats, *Procedia Eng.* 18 (2011) 375-380. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.11.060>.
- [5] M. Kornsteiner, K.H. Wagner, I. Elmadfa, Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types, *Food Chem.* 98 (2006) 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.033>.
- [6] I. Bouali, H. Trabelsi, W. Herchi, L. Martine, A. Albouchi, G. Bouzaïen, S. Sifi, S. Boukhchina, O. Berdeaux, Analysis of pecan nut (*Carya illinoensis*) unsaponifiable fraction. Effect of ripening stage on phytosterols and phytostanols composition, *Food Chem.* 164 (2014) 309 – 316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.029>.
- [7] K. Czaikoski, M.C. Mesomo, A.P. Scheer, O.R.D. Santa, C.L. Queiroga, M.L. Corazza, Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane, *J. Supercrit. Fluids*, 97 (2014) 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.008>.
- [8] C. Guindani, R. Podestá, J.M. Block, M.J. Rossi, N. Mezzomo, S.R.S. Ferreira, Valorization of chia (*Salvia hispanica*) seed cake by means of supercritical fluid extraction, *J. Supercrit. Fluids*, 112 (2016) 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.010>.
- [9] M.V. Alvarez, S. Cabred, C.L. Ramirez, M.A. Fanovich, Valorization of an agroindustrial soybean residue by supercritical fluid extraction of phytochemical compounds, *J. Supercrit. Fluids*, 143 (2019) 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.012>.
- [10] G. Brunner, Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes, first ed., Steinkopff, Germany, 1994.

- [11] M.C. Ribas, D. Mantovani, J.A. Awadallak, R.L. Canevesi, N.M. Tazinafo, L.C. Filho, F. Palú, E.A. Silva, Study of candeia oil extraction using pressurized fluid and purification by adsorption process, *J. Supercrit. Fluids* 92 (2014) 177-182.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.009>.
- [12] S.L. Chia, H.C. Boo, K. Muhamad, R. Sulaiman, F. Umanan, G.H. Chong, Effect of subcritical carbon dioxide extraction and bran stabilization methods on rice bran oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92 (2015) 393-402. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2596-5>.
- [13] C.X. Tan, G.H. Chong, H. Hamzah, H.M. Ghazali, Comparison of subcritical CO₂ and ultrasound-assisted aqueous methods with the conventional solvent method in the extraction of avocado oil, *J. Supercrit. Fluids* 135 (2018) 45-51.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.036>.
- [14] J.S. Alves, T.C. Confortin, I. Todero, A.S. Rodrigues, S.R. Ribeiro, C.P. Boeira, R. Wagner, M.A. Mazutti, C.S. Rosa, Simultaneous extraction of oil and bioactive compounds from pecan nut using pressurized solvents, *J. Supercrit. Fluids* 153 (2019) 104598.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104598>.
- [15] G. Scapin, E.R. Abaide, R.F. Martins, R.G. Vendruscolo, M.A. Mazutti, R. Wagner, C.S. Rosa, Quality of perilla oil (*Perilla frutescens*) extracted with compressed CO₂ and LPG, *J. Supercrit. Fluids* 130 (2017) 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.007>.
- [16] J.F. Soares, V.D. Prá, M. Souza, F.C. Lunelli, E.R. Abaide, J.R.F. Silva, R.C. Kuhn, J. Martínez, M.A. Mazutti, Extraction of rice bran oil using supercritical CO₂ and compressed liquefied petroleum gas, *J. Food Eng.* 170 (2016) 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.016>.
- [17] D. Sallet, E. Abaide, C. Marcuz, G. Ariotti, V. Dal Prá, G. Ugalde, G.L. Zabet, M.A. Mazutti, R.C. Kuhn, Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas, *J. Supercrit. Fluids* 122 (2017) 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.005>.

- [18] E.R. Abaide, G.L. Zobot, M.V. Tres, R.F. Martins, J.L. Fagundez, L.F. Nunes, S. Druzian, J.F. Soares, V. Dal Prá, J.R.F. Silva, R.C. Kuhn, M.A. Mazutti, Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids, *Food Bioprod. Process.* 102 (2017) 289–298.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.008>.
- [19] M.C.J. Bier, A.B.P. Medeiros, J.S. Oliveira, L.C. Côcco, J.L. Costa, J.C. Carvalho, C.R. Soccol, Liquefied gas extraction: A new method for the recovery of terpenoids from agroindustrial and forest wastes, *J. Supercrit. Fluids* 110 (2016) 97-102.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.12.016>.
- [20] AOAC, Association of Official Agricultural Chemists, Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, eighteenth ed., Gaithersburg, Maryland, 2005.
- [21] N.T. Dunford, F. Temelli, Extraction conditions and moisture content of canola flakes as related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts, *J. Food Sci.* 61 (1997) 155-159.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04389.x>.
- [22] J.M. Snyder, J. P. Friedrich, D. D. Christianson, D. D, Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 1851–1856. <https://doi.org/10.1007/bf02540816>.
- [23] IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, seventh ed., Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, 1992.
- [24] T.C. Confortin, I. Todero, J.F. Soares, T. Brun, L. Luft, G.A. Ugalde, V.D. Prá, M.A. Mazutti, G.L. Zobot, M.V. Tres, Extraction and composition of extracts obtained from *Lupinus albus* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas, *J. Supercrit. Fluids* 128 (2017) 395-403.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.006>.
- [25] NIST, National Institute of Standards and Technology, Chemistry WebBook.
<http://webbook.nist.gov/chemistry>, 2019 (accessed 10 april 2019).

[26] AOCS, American Oil Chemists Society, Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society: including additions and revisions, sixth ed. Champaign, Illinois, USA, 2009.

[27] Y. Chen, Y. Yang, S. Nie, X. Yang, Y. Wang, M. Yang, C. Li, M. Xie, The analysis of trans fatty acid profiles in deep frying palm oil and chicken fillets with an improved gas chromatography method, *Food Cont.* 44 (2014) 191-197.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.010>.

[28] J. Santos-Silva, R.J.B. Bessa, F. Santos-Silva, Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat, *Livest. Sci.* 77 (2002) 187–194. [https://doi:10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi:10.1016/S0301-6226(02)00059-3).

[29] T.L.V. Ulbricht, D.A.T. Southgate, Coronary heart disease: seven dietary factors, *The Lancet* 338 (1991) 985–992. [https://doi:10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi:10.1016/0140-6736(91)91846-M).

[30] IDF, International Dairy Federation, Anhydrous milkfat: determination of the peroxide value, in: *International IDF Standards*, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1991.

[31] European Committee for Standardization, Fatty acid methyl esters (Fame), Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test), method EN14112, 2003.

[32] A.D. Sánchez-Camargo, F. Parada-Alfonso, E. Ibáñez, A. Cifuentes, A. On-line coupling of supercritical fluid extraction and chromatographic techniques, *Journal Sep. Sci.* 40 (2017) 213–227. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601040>.

[33] A. Molero Gómez, E. Martínez de la Ossa, Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide, *Chem. Eng. J.* 88 (2002) 103–109.
[https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(01\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(01)00260-1).

[34] O. Olubi, J.V. Felix-Minnaar, V.A. Jideani, Physicochemical and fatty acid profile of egusi oil from supercritical carbon dioxide extraction, *Heliyon*, 5 (2019) e-01083.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01083>

- [35] A.C.P Prado, B.A. Manion, K. Seetharaman, F.C. Deschamps, D.B. Arellano, J.M. Block, Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch], *Ind. Crops Prod.* 45 (2013) 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.042>
- [36] T. Costa, N. Jorge, N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes, *Ciênc. Biol. Saúde*, 13 (2011) 195-203.
- [37] M.C. Capellini, L. Chiavoloni, V. Giacomini, C.E.C. Rodrigues, Alcoholic extraction of sesame seed cake oil: Influence of the process conditions on the physicochemical characteristics of the oil and defatted meal proteins, *J Food Eng.*, 240 (2019) 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.029>.
- [38] D.K. Yanik, Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace, *LWT-Food Sci. Technol.*, 77 (2017) 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.020>.
- [39] V.M.B. Cunha, M.P. da Silva, S.H.B. de Souza, P.N. Bezerra, E.G.O. Menezes, N.J.N. da Silva, D.A.D.S. Banna, M.E. Araújo, R.N.C. Júnior, Bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) oil extraction using supercritical CO₂ and bioactive compounds determination in the residual pulp, *J. Supercrit. Fluids* 144 (2019) 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.010>.
- [40] A.S. Bentes, H.A.L. Souza, X.M.F. Mendonça, M.G. Simões, Caracterização física e química e perfil lipídico de três espécies de peixes amazônicos, *Rev. Bras. Tecnol. Agroind.*, 3 (2009) 97-108.
- [41] I.B. Tonial, D.F. Oliveira, C.E.C. Bravo, N.E. Souza, M. Matsushita, J.V. Visentainer, Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.), *Alim. e Nutrição*, 21 (2010) 93- 98.
- [42] C. Turner, J.W. King, L. Mathiasson, Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis, *J. Chromatogr. A.*, 936 (2001) 215-237. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01082-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01082-2).

[43] P. Zacchi, S. Calvo Bastida, P. Jaeger, M.J. Cocero, R. Eggers, Countercurrent deacidification of vegetable oils using supercritical CO₂: Holdup and RTD experiments, *J. Supercrit. Fluids*, 45 (2008) 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.02.005>.

[44] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, Dispõe sobre o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal, Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília.

[45] S. Daković, J. Turkulov, E. Dimić, The quality of vegetable oils got by extraction with CO₂. *Fat Sci. Technol.* 91 (1989) 116–119. <https://doi.org/10.1002/lipi.19890910308>.

[46] G.R. List, J.P. Friedrich, Oxidative stability of seed oils extracted with supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66 (1989), 98–101. <https://doi.org/10.1007/bf02661793>.

[47] L. Calvo, M.J. Cocero, J.M. Diez, Oxidative stability of sunflower oil extracted with supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 1251–1254. <https://doi.org/10.1007/bf02540546>.

[48] R.P. Cuco, L. Cardozo-Filho, C. da Silva, Simultaneous extraction of seed oil and active compounds from peel of pumpkin (*Cucurbita maxima*) using pressurized carbon dioxide as solvent, *J. Supercrit. Fluids*, 143 (2019) 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.002>.

Table 1: Extraction conditions for C-CO₂ and C-LPG.

Condition	CO ₂		LPG	
	P (MPa)	T (°C)	P (MPa)	T (°C)
1	15 (-1)	20 (-1)	1 (-1)	20 (-1)
2	15 (-1)	60 (+1)	1 (-1)	40 (+1)
3	25 (+1)	60 (+1)	2.5 (+1)	40 (+1)
4	25 (+1)	20 (-1)	2.5 (+1)	20 (-1)
5*	20 (0)	40 (0)	1.75 (0)	30 (0)
6*	20 (0)	40 (0)	1.75 (0)	30 (0)
7*	20 (0)	40 (0)	1.75 (0)	30 (0)

* Central point

Table 2: Yields and recovery of PNC oils obtained by C-CO₂ and C-LPG.

Condition	Solvent	P (MPa)	T (°C)	ρ (kg/m ³)**	Time (min)	Yield (%)	Recovery (%)
1	CO ₂	15	20	904	220	20.03	36.29
2	CO ₂	15	60	604	220	0.58	1.04
3	CO ₂	25	60	787	220	25.08	45.44
4	CO ₂	25	20	963	220	43.65	79.08
5*	CO ₂	20	40	840	220	20.5 ± 0.1	37.2 ± 0.2
1	LPG	1	20	215	20	56.33	102.05
2	LPG	1	40	183	20	54.00	98.27
3	LPG	2.5	40	241	20	53.98	97.79
4	LPG	2.5	20	244	20	52.47	95.06
5*	LPG	1.75	30	227	20	55.5 ± 0.3	100.3 ± 0.1
Soxhlet	n-hexane	atmospheric	68	613	480	54.8 ± 0.1	100

P: pressure; T: temperature; ρ : density.

*Condition 5 corresponds to the mean ± standard deviation of the triplicate of the central point.

** Determined through NIST Chemistry WebBook [25].

Table 3: Fatty acid profile (%), lipid quality, and squalene and β -sitosterol (mg/100g) of PNC oils extracted by C-CO₂ and C-LPG.

		CO ₂				LPG				
		1	3	4	5	1	2	3	4	5
Palmitic	C16	5.69	6.38	6.07	6.4 ± 0.1	5.10	5.09	4.90	5.05	5.0 ± 0.5
Stearic	C18	1.54	1.78	1.49	1.5 ± 0.1	1.37	1.58	1.48	1.51	1.4 ± 0.1
Oleic	C18:1n9	60.94	58.81	62.1	61.1 ± 0.2	64.7	63.36	63.64	62.97	63.3 ± 0.5
Linoleic	C18:2n6	30.98	30.84	30.29	30.9 ± 0.2	28.31	29.32	29.54	29.83	29.5 ± 1.1
α -Linolenic	C18:3n3	0.85	0.97	0.05	0.06 < 0.01	0.52	0.65	0.43	0.63	0.6 ± 0.03
SFA		7.23	8.16	7.56	7.9 ± 0.1	6.47	6.67	6.38	6.56	6.5 ± 0.6
MUFA		60.94	58.81	62.10	61.1 ± 0.2	64.70	63.36	63.64	62.97	63.3 ± 0.5
PUFA		31.83	31.81	30.34	30.9 ± 0.1	28.83	29.97	29.68	30.46	30.0 ± 1.1
UFA		92.77	90.62	92.44	92.1 ± 0.1	93.53	93.33	93.32	93.43	93.5 ± 0.6
H/H		16.30	14.20	15.23	14.3 ± 0.2	18.34	18.34	19.10	18.50	18.6 ± 1.9
IA		0.06	0.07	0.07	0.07 ± (< 0.01)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05 ± (< 0.01)
IT		0.15	0.17	0.16	0.17 ± (< 0.01)	0.13	0.14	0.13	0.14	0.1 ± (< 0.01)
Squalene		1.23	2.19	1.63	1.2 ± 1.0	0.98	2.61	1.06	1.43	1.7 ± 1.0
β -sitosterol		15.16	19.51	15.29	16.9 ± 1.9	12.61	19.05	12.60	15.55	n.d

n.d: not detected.

C-CO₂: 1 (15 MPa / 20 °C); 3 (25 MPa / 60 °C); 4 (25 MPa / 20 °C); 5 (20 MPa / 40 °C).

C-LPG: 1 (1 MPa / 20 °C); 2 (1 MPa / 40 °C); 3 (2.5 MPa / 40 °C); 4 (2.5 MPa / 20 °C); 5 (1.75 MPa / 30 °C).

SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; UFA: unsaturated fatty acids.

H/H: relation between hypocholesterolemic and hypercholesterolemic fatty acids; IA: Index of atherogenicity; IT: Index of thrombogenicity.

Table 4: Acidity (mg KOH/g) and peroxide (mEQ O₂/Kg) levels of PNC oil.

	Legislation*	C-CO ₂ **	C-LPG***	Soxhlet
Acidity				
(mg KOH/g)	4	2.1 ^a ± 0.1	1.2 ^b ± 0.1	1.3 ^b ± 0.2
Peroxide value				
(mEQ O ₂ /Kg)	15	0.6 ^b ± 0.1	0.14 ^c ± 0.2	4.6 ^a ± 0.3

*Maximum values

** Condition 4 (25 MPa / 20 °C)

***Condition 1 (1 MPa / 20 °C)

Values expressed as mean ± standard deviation with different letters in the same line indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey's test.

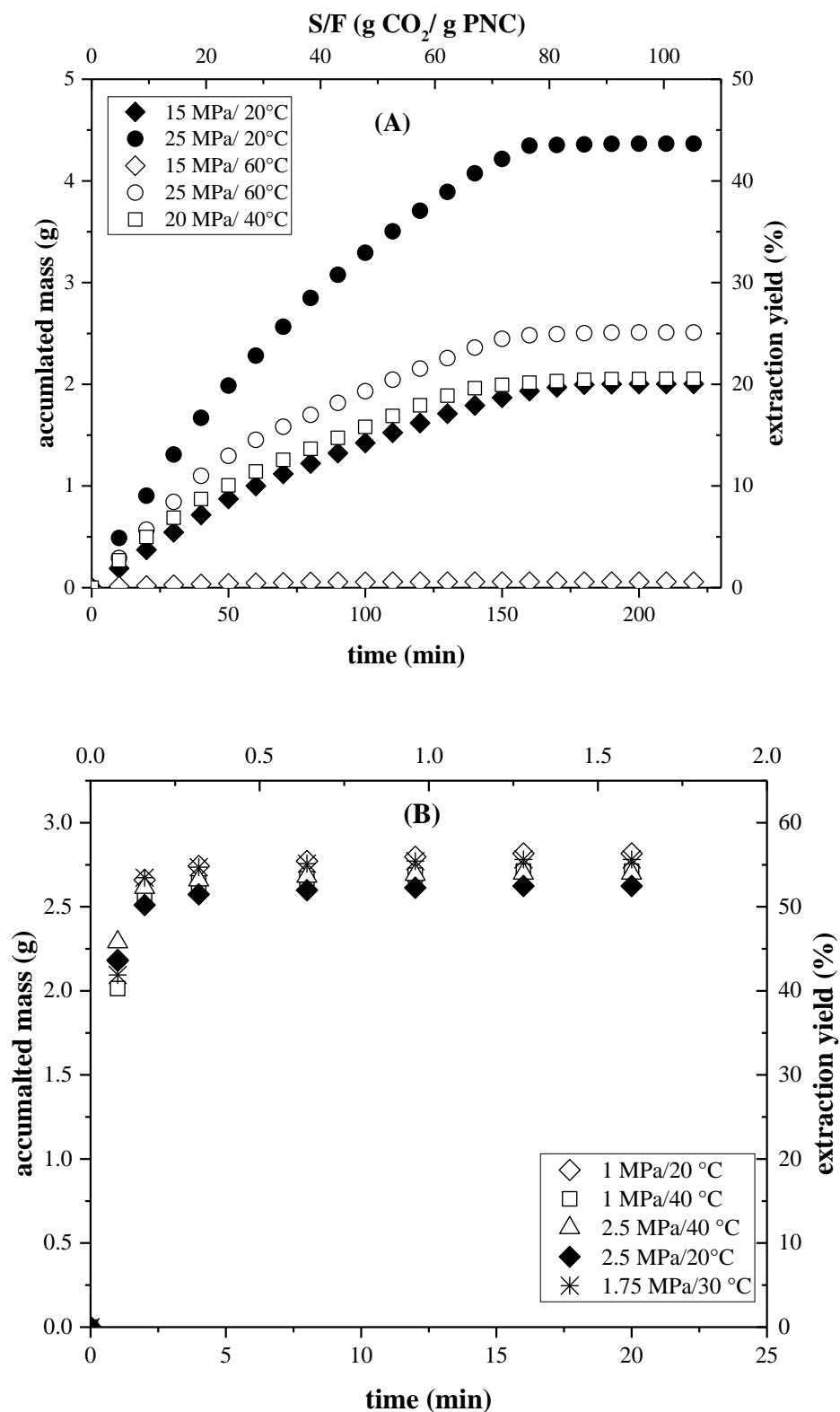


Fig. 1: Overall extraction curves of PNC oil using C-CO₂ (A) and C-LPG (B).

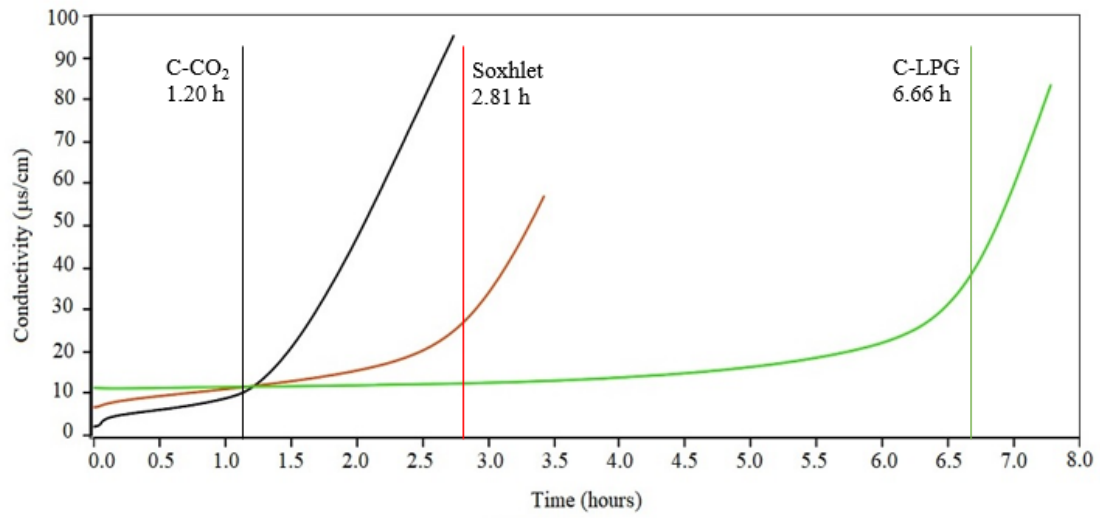


Fig. 2: Induction time of PNC oils obtained by C-CO₂ (—), C-LPG (—) and Soxhlet (—).

3.3 ARTIGO 3 - INCORPORAÇÃO DE EXTRATO BIOATIVO DA TORTA DA NOZ PECÃ EM FILMES BIODEGRADÁVEIS

Artigo a ser submetido no periódico International Journal of Biological Macromolecules, ISSN: 0141-8130, Área de avaliação em Ciência de Alimentos A1.

Incorporação de extrato bioativo da torta da noz pecã em filmes biodegradáveis

Jamila dos Santos Alves¹, Caroline Pagnossim Boeira¹, Pamela Thais Sousa Melo², Marcia Regina de Moura Aouada², Claudia Severo da Rosa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil

²Grupo de Compósitos e Nanocompósitos Híbridos (GCNH), Departamento de Física e Química, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, 15385-000, Brasil.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi extrair os compostos fenólicos da torta da noz pecã (TNP) e aplicar o extrato que obteve maior concentração desse composto em filmes elaborados com uma mistura de polímeros (gelatina-amido) e glicerol. Para a obtenção dos extratos a influência dos parâmetros de extração, como graduação alcoólica do etanol (%) e tempo de extração (min) no teor de compostos fenólicos foram investigadas. A condição que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais (101.61 mg GAE/g) foi a que utilizou menor concentração de álcool e menor tempo de extração (condição 1 - 65% álcool / 20 min), sendo a condição escolhida para ser incorporada nos filmes. As características dos filmes formados foram avaliadas. Os valores de espessura demonstraram que a disposição dos filmes nos moldes foi eficiente. A incorporação do extrato da TNP nos filmes não influenciou na ruptura dos filmes. A incorporação de 10 e 20% de extrato da TNP aumentou a alongação na ruptura. Os filmes apresentaram solubilidade maior que 67%. Todos os filmes apresentaram ângulo menor que

90°, caracterizando-os como hidrofílicos. A adição de extrato da TNP provocou um aumento na opacidade dos filmes. A luminosidade (L^*) foi maior no filme que não teve adição de extrato. O croma (C^*) foi maior no filme sem adição de extrato e no filme com 10% de extrato, indicando que a coloração desses filmes é mais intensa. Todos os filmes apresentaram o ângulo hue (h°) maior que 280°, caracterizando-os com tonalidade azulada. A incorporação do extrato da TNP nos filmes aumentou significativamente a atividade antioxidante. A biodegradação dos filmes ocorreu por completo até o 9º dia de deposição no solo. Filmes biodegradáveis elaborados com uma mistura de gelatina-amido enriquecidos com extrato TNP são potenciais carreadores de compostos antioxidantes e podem ser usados como embalagem ativa para estender a vida útil de produtos alimentícios.

Palavras-chave: *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch; compostos fenólicos; embalagem de alimentos; biopolímeros.

1 Introdução

A noz-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) está entre as principais nozes consumidas mundialmente [1], principalmente devido aos seus efeitos positivos na saúde [2], ao seu sabor e textura agradáveis [3]. Normalmente a noz pecã é consumida *in natura* ou em produtos de padaria e confeitaria [4], todavia ultimamente houve um aumento na demanda dos consumidores por óleos produzidos a partir das nozes.

A industrialização da noz pecã para a obtenção de óleo origina um subproduto denominado de torta da noz pecã (TNP). A TNP possui compostos valiosos e de interesse industrial, dentre eles destaca-se os compostos bioativos. A elaboração de extratos da TNP demonstraram ser ricos em compostos fenólicos, flavonoides totais, taninos condensados e

apresentam maior atividade antioxidante quando comparadas com outras tortas de nozes, como amêndoa, avelã e macadâmia [5].

Nos últimos anos, filmes biodegradáveis à base de biopolímeros têm sido considerados como substitutos de embalagens convencionais derivadas de petróleo [6]. A principal razão por trás disso são as preocupações ambientais em relação ao acúmulo de plásticos à base de petróleo na natureza [7].

Proteínas e polissacarídeos são os principais biopolímeros utilizados na elaboração de filmes para embalagens biodegradáveis [8], a mistura dos dois pode formar filmes com características melhoradas. Por exemplo, misturas de gelatina com amido têm chamado muita atenção uma vez que ambos são recursos renováveis, têm capacidade de formação de filmes e são comestíveis [9,10].

Compostos bioativos podem ser incorporados aos filmes biodegradáveis originando filmes ativos, esses compostos podem apresentar características antioxidantes que podem interagir com o produto embalado [11]. É evidente que esses compostos fornecem proteção ao alimento contra oxidação, crescimento de micro-organismos, escurecimento enzimático e perda de vitaminas, ao mesmo tempo melhora as propriedades de funcionalidade dos filmes [12].

Diante ao exposto, o fato da TNP ser um subproduto e possuir compostos de interesse comercial - como os compostos bioativos - o objetivo deste trabalho foi extrair os compostos fenólicos da TNP e aplicar o extrato que obteve maior concentração desse grupo de compostos em filmes e avaliar as características destes.

2 Material e métodos

2.1 Matéria-prima

A TNP foi doada pela Nozes Pitol Grupo Alimentos (Anta Gorda, RS, Brasil), sendo acondicionada em embalagem à vácuo e armazenada em congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização.

2.2 Elaboração dos extratos

Para obtenção dos extratos, 5 g da TNP foram misturadas com 50 mL de etanol, na proporção de 1:10 (p/v). Essa mistura foi colocada em um banho ultra-termostatizado (Marconi, modelo MA-184, Brasil) com agitação constante (Marconi MA039, Brasil) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A influência dos parâmetros de extração, como graduação alcoólica do etanol (%) e tempo de extração (min) foram investigadas através de um projeto experimental com 2 níveis e 2 variáveis (2^2) com triplicata no ponto central (Tabela 1). Após a extração, a filtração foi realizada com papel filtro (J. Prolab, Brasil) e o extrato foi rotaevaporado (R-300, Büchi Brasil Ltda, Brasil) a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, para remover o álcool e obter um volume final de 50 mL.

2.2.1 Avaliação dos compostos fenólicos dos extratos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por ROESLER [13]. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em miligramas de ácido gálico / g de torta da noz pecã parcialmente desengordurada (mg EAG g^{-1}).

2.3 Preparação dos filmes

A partir do resultado de um estudo anterior [14], foi elaborado um filme com uma mistura de gelatina e amido na proporção de 5% e 2%, respectivamente. Para a elaboração dos filmes foi utilizada a técnica de *casting*. Para o filme controle, a solução base de gelatina (Tipo A, SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, Brasil) foi hidratada com 5 g de gelatina em 100 mL de água destilada durante 1 h a $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, para

solubilização da gelatina a temperatura da solução base foi elevada para 55 °C em um banho ultra-termostatizado (Marconi, modelo MA-184, Brasil) por 10 min. O glicerol (Neon, Brasil) (10% em relação da massa de gelatina) foi adicionado sob agitação magnética. Para a solução de amido de milho (Maizena®, Brasil) foi misturado 2g de amido em 100 mL de água destilada e glicerol (10% em relação à massa seca do amido) sob agitação manual e aquecimento a 80 °C por 15 min. Após o preparo das soluções de gelatina e amido, foi elaborado uma mistura dessas soluções na proporção de 1:1 em agitador magnético por 1 min. Para a elaboração dos filmes adicionados de extrato, foi incorporado 10 e 20% de extrato da TNP (peso em relação a massa total de água utilizada) na mistura de gelatina e amido.

Após o preparo das soluções controle (GA), 10% de extrato (GA-10%) e 20% de extrato (GA-20%) elas foram vertidas em um suporte de poliéster e secas em estufa com circulação de ar por 24h a 30 °C.

2.4 Caracterização dos filmes

2.4.1 Espessura

A espessura dos filmes foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (nº 7326, Mitutoyo Corp., Japão). A espessura média de cada filme foi determinada em diferentes pontos ao longo dos filmes. Os valores médios também foram utilizados para calcular as propriedades mecânicas dos filmes e o valor de opacidade dos filmes.

2.4.2 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A PVA foi determinada por meio do método gravimétrico segundo método ASTM E96-80 [15] modificado por Mchugh et al. [16]. As amostras foram cortadas em círculos e fixadas sobre células padronizadas contendo 6 mL de água destilada. As células foram mantidas a 25

°C em uma estufa contendo gel de sílica para controle da umidade dos filmes. A quantidade de água permeada através do filmes foi determinada por pesagem periódica das células por 24h. A PVA foi definida como (equação 1):

$$PVA = \frac{g \cdot e}{A \cdot t \cdot \Delta P} \quad (1)$$

Onde, PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g.mm/m².h.kPa), *g* é o ganho de peso dos filmes; *t* é o tempo total em horas; *A* é a área de permeação (m²); *e* espessura média dos filmes (mm); ΔP é a diferença de pressão de vapor do ambiente (kPa, 30 °C); *g/t* foi calculada por regressão linear entre os pontos de ganho de peso e tempo (regime permanente).

2.4.3 Solubilidade

A solubilidade em água foi determinada de acordo com o método modificado por Peña et al. [17]. Discos (2 cm de diâmetro) de cada amostra foram cortados e secos em estufa a 100 °C por 24 h (porcentagem inicial de matéria seca - *mi*). Em seguida, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e agitadas em *shaker* orbital (MA-410, Marconi, Brasil) a 70 rpm em uma temperatura de 25 ± 2 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram colocadas uma estufa a 100 °C por 24 h para a determinação gravimétrica do teor de água dos filmes (matéria seca não solubilizada – *mf*). A porcentagem de solubilidade (*S*%) foi determinada usando a equação (2) :

$$S = \frac{(mi - mf)}{mi} \times 100 \quad (2)$$

2.4.4 Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas através de um medidor de ângulo de contato (Biolin Scientific, Optical Tensiometer Theta Lite, Suécia). Com o auxílio de uma seringa de precisão, uma gota (5-9 μL) de água Mili-Q foi depositada sobre a superfície do filme e os ângulos de contato determinados após 10s [18]. O valor do ângulo de contato foi calculado através da média dos ângulos nas extremidades direita e esquerda da gota.

2.4.5 Propriedades mecânicas

Os filmes foram cortados de acordo com o especificado na ASTM D882/97 [19] e caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas - tensão na ruptura e alongação na ruptura. As medidas foram realizadas em uma máquina de ensaio universal (modelo 3369, Instron Corp, EUA), operando com uma célula de carga de 50 N com velocidade de tracionamento de $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Os ensaios foram realizados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \pm 2\%$ de UR. A tensão na ruptura (σ) (equação 3) alongação na ruptura (ε) (equação 4) dos filmes foram calculados da seguinte forma:

$$\text{Tensão (MPa)} = \frac{F}{S} \quad (3)$$

$$\text{Alongação (\%)} = \ln \left(\frac{L}{L_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde F é o valor da força de ruptura exercida e S é a área seccional do filme. L e L_0 são os comprimentos de alongação do filme durante o experimento e o comprimento inicial do filme, respectivamente.

2.4.6 Propriedades ópticas

Os parâmetros de cor L^* (luminosidade), a^* (vermelho para verde) e b^* (amarelo para azul) dos filmes foram medidos em cinco posições aleatórias usando um espectrofotômetro

(Modelo CM-700d, Konica Minolta, Japão) usando a escala CIELab. As coordenadas para a^* e b^* foram usadas para calcular h° (ângulo hue - tonalidade) (equação 5), correspondendo à própria cor, e C^* ou croma (intensidade da cor) (equação 6).

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (5)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (6)$$

Para a avaliação da opacidade [20], os filmes foram cortados em retângulo e aderidos na célula teste do espectrofotômetro. As absorvâncias foram medidas a 600 nm usando um espectrofotômetro UV / VIS, com uma célula teste vazia como referência. A opacidade foi calculada por divisão da absorvância pela espessura do filme (mm).

2.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises morfológicas dos filmes (superfície e seção transversal) foram obtidas através de microscópio eletrônico de varredura computadorizado (EVO LS15, Carl Zeiss, Alemanha). Os filmes foram metalizados com um Sputter Coater (Q150TE, Quorum, Reino Unido). Em seguida, as amostras foram fixadas no stub com fita de carbono dupla face e o equipamento foi operado com voltagem de 5,00 kV e 10,00 kV.

2.4.8 Atividade antioxidante (DPPH)

Os filmes foram solubilizados em álcool 65% numa concentração de 5mg/mL e os extratos foram elaborados sob agitação por 20 min.

A atividade antioxidante dos filmes foi avaliada usando a atividade de eliminação de radicais livres de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de acordo com Shahbazi et al. [21]. Para tanto, 2,8 ml da solução de extrato do filme foram misturados com 0,2 ml de solução

metanólica 1 mM de DPPH. A mistura foi agitada e mantida à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. O a absorvância foi medida a 517 nm. Então, a porcentagem da atividade de eliminação do radical DPPH foi calculado da seguinte forma (equação 7):

$$\text{Eliminação do DPPH (\%)} = \frac{(\text{Abs DPPH} - \text{Abs do extrato do filme})}{\text{Abs DPPH}} \times 100 \quad (7)$$

2.4.9 Biodegradabilidade

A avaliação da biodegradabilidade foi realizada conforme Filipini et al. [18]. A avaliação foi qualitativa, uma vez que houve variações de peso por causa do solo depositado sobre os filmes. Solo regional da cidade de Santa Maria (RS, Brasil) foi disposto em bandejas de plástico a uma altura de 10 cm. As amostras (2 x 3 cm) foram ajustadas no suporte e enterradas no solo. As bandejas foram mantidas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Foi pulverizado água sobre o solo uma vez ao dia para manter a sua umidade. As avaliações foram realizadas a cada 3 dias até a degradação dos filmes. Os filmes foram retirados do solo e fotografados para observar visualmente a sua degradação.

2.5 Análise Estatística

Para os resultados da extração dos compostos fenólicos da TNP os efeitos das variáveis independentes (gradação alcoólica do etanol e tempo de extração) na variável resposta (atividade antioxidante) foram avaliados separadamente por análise estatística de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5% usando o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., EUA). O teste Tukey foi aplicado para detectar as diferenças entre as análises de caracterização dos filmes elaborados.

3. Resultados e Discussão

3.1 Compostos fenólicos totais do extrato da TNP

Os teores de compostos fenólicos totais são apresentados na Tabela 2. A condição que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais (101.61 mg GAE/g) foi a que utilizou menor concentração de álcool e menor tempo de extração (condição 1 - 65% álcool / 20 min). Os valores encontrados neste trabalho são superiores ao relatado por Maciel et al. [22] (2020) que avaliaram o extrato da torta da noz pecã obtida por diferentes solventes (água, ácido acético, etanol e suas combinações) e obtiveram valores que variaram de 1.72 a 27.44 mg GAE/g.

Os efeitos da concentração de álcool e tempo de extração nos teores de compostos fenólicos totais são apresentados na Tabela 3. A concentração de álcool e o tempo de extração apresentaram efeito negativo sobre a resposta. Ou seja, o aumento dessas variáveis implica na redução da extração dos compostos fenólicos totais. De acordo com esse resultado, pode-se inferir que a solução alcoólica de 65% apresenta polaridade e propriedades físicas que melhoram a extração dos compostos fenólicos totais. Em relação ao tempo, observa-se que tempos maiores que 20 min ocasionaram a redução da extração dos composto fenólicos totais, provavelmente devido a saturação do meio e a degradação dos compostos pela oxidação. De acordo com os resultados obtidos, o extrato utilizado para adicionar nos filmes foi o elaborado com álcool 65% e tempo de extração de 20 min.

3.2 Caracterização dos filmes

3.2.1 Espessura

A espessura de todos os filmes foi estatisticamente igual, variando entre 0.036 e 0.039 mm (Tabela 4). Esses resultados demonstram que a disposição dos filmes nos moldes de

poliéster foi eficiente. Diante disso, podemos afirmar que a incorporação do extrato da TNP não interferiu na estrutura do filme. Geralmente, a espessura dos filmes plásticos comerciais como o polietileno de baixa densidade (LDPE) e o polipropileno (PP) está entre 0.015–0.25 mm e 0.012 a 0.125 mm, respectivamente [23].

3.2.2 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes demonstram sua capacidade de manter íntegro e de permanecer assim mesmo com o estresse durante o processamento, transporte, manuseio e armazenamento dos alimentos embalados [24]. Na Tabela 4 podem ser observados os valores obtidos para resistência a tração (RT) e alongação na ruptura (ER) dos filmes. RT representa a força máxima que um filme pode suportar, e ER é a medida de flexibilidade do filme [25].

Os valores de resistência a tração não apresentaram diferença estatística entre si, demonstrando que a incorporação do extrato da TNP nos filmes não influenciou na ruptura destes. Quando um nível de 10 e 20% de extrato foi incorporado ao filme, uma maior ER foi observado quando comparada ao tratamento sem adição de extrato (GA). Da mesma forma, Xu et al. [26] relataram que o aumento da concentração de extrato de uva em filmes de nanocompósitos de amido de milho ocasionou uma elevação nos valores de ER, isso pode ter ocorrido devido à atuação do extrato como plastificante.

3.2.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Conforme mostrado na Tabela 5, a PVA dos diferentes filmes elaborados não apresentou diferenças significativas entre si. No entanto, o filme GA-20% apresentou o menor valor ($0.34 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{kPa}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^2$), até mesmo, quando comparado ao filme GA. Este resultado pode ser explicado pelas ligações cruzadas resultantes das interações entre a gelatina e os compostos fenólicos presentes no extrato da TNP.

Wu et al. [27] descobriram que a PVA diminuiu em filmes elaborados com gelatina de pele de carpa prateada adicionados de extrato de chá verde, possivelmente por causa das ligações cruzadas (ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas) entre os compostos fenólicos presentes no extrato e os grupos reativos da gelatina, reduzindo assim o volume livre da matriz polimérica. Albertos et al. [28] produziram filmes de gelatina adicionados de extratos de folhas de oliveira e obtiveram PVA superiores ao encontrado neste estudo (0.73 a 1.68 g.mm/kPa.h.m²). De acordo com Mali et al. [29], a PVA de filmes utilizadas em alimentos devem ser o mais baixo possível, pois na maioria das vezes sua principal função é prevenir ou diminuir a migração de umidade entre o alimento e o ambiente de embalagem, ou entre dois componentes dentro de um produto alimentar heterogêneo.

3.2.4 Solubilidade

Não foi encontrado diferença estatística entre os tratamentos para os valores de solubilidade. A solubilidade encontrada variou de 67.28% (GA-10%) a 69.38% (GA-20%). Bittencourt et al. [11] elaboraram filmes a base de gelatina incorporados com diferentes concentrações de extrato de cúrcuma e obtiveram valores mais baixos que os encontrados neste trabalho (35.4 a 40%). De acordo com Fakhouri et al. [9] a solubilidade em água pode direcionar para qual produto o filme pode ser utilizado, por exemplo, em produtos semi prontos que requerem cozimento no seu preparo a solubilização do filme é benéfica.

3.2.5 Ângulo de contato

O ângulo de contato é um indicador usado para medir a hidrofiliicidade ou grau de hidrofobicidade da superfície do filme [30]. Superfície hidrofílica corresponde a um ângulo de contato baixo ($\theta < 90^\circ$), enquanto o ângulo de contato alto ($\theta > 90^\circ$) corresponde a uma superfície hidrofóbica [31]. Neste estudo, todos os filmes apresentaram ângulo menor que 90° ,

caracterizando-os como hidrofílicos (Tabela 5). O GA (70.11 ± 0.98) apresentou o maior ângulo e não diferiu estatisticamente do GA-10% (64.90 ± 2.08). Observa-se que os filmes incorporados com o extrato da TNP tiveram o ângulo de contato reduzido. KAYA et al. [32] ao elaborarem filmes de quitosana com extrato da fruta *Berberis crataegina* também observaram uma diminuição do ângulo de contato, eles relatam que esse resultado é devido à hidrofiliabilidade do extrato.

3.2.6 Propriedades ópticas

3.2.6.1 Opacidade

Avaliando a opacidade dos filmes (Tabela 6), percebe-se que a adição de extrato provocou um aumento na opacidade dos filmes. O GA (1.32 ± 0.03) apresentou um valor de opacidade menor, ou seja, mais transparente que os outros filmes. O GA-20% (1.96 ± 0.06) apresentou maior opacidade não diferindo estatisticamente do GA-10% (1.81 ± 0.13). A redução da transparência de filmes elaborados com uma mistura de gelatina-quitosana adicionados de extrato de espinheiro da montanha (*Crataegus pinnatifida*) foram verificados por Kan et al. [33], eles relatam que transparência do filme diminuiu com a adição do extrato devido ao efeito da dispersão da luz do extrato na rede do filme, o que interferia na transmissão da luz.

3.2.6.2 Cor

A propriedade de cor dos filmes é um dos fatores mais importantes em termos de aparência geral dos produtos alimentícios e aceitação do consumidor [34]. As propriedades de cor dos filmes estão apresentadas na Tabela 6.

A luminosidade (L^*) foi maior no filme que não teve adição de extrato (GA) e diferiu estatisticamente dos filmes que foram adicionados de extrato. O croma (C^*) foi maior no GA (6.03 ± 0.21) e GA-10% (5.95 ± 0.05), indicando que a coloração desses filmes é mais intensa em comparação ao GA-20% (4.94 ± 0.14). O ângulo hue (h°) do GA apresentou os menores valores (287.35 ± 0.17) e aumentou significativamente à medida que a concentração de extrato no filme foi aumentada (GA-10% - 292.56 ± 0.26 ; GA-20% - 298.33 ± 0.73). O ângulo hue representa a tonalidade da cor dos filmes, neste trabalho todos os filmes apresentaram o h° maior que 280° , caracterizando-os com tonalidade azulada. A cor real dos filmes pode ser observada na Tabela 6. Conforme Souza et al. [20], a mudança de cor dos filmes adicionados de extrato pode ser devido a própria cor do extrato ou pela ligação dos compostos presentes no extrato ao polímero utilizado, e dependerá do tipo e da concentração do extrato adicionado.

3.2.7 MEV

Como pode ser visto na Fig. 1, a incorporação de extrato da TNP nos filmes (GA-10% e GA-20%) ocasionou uma superfície de fratura mais irregular e menos lisa em comparação ao filme sem extrato (GA). Os valores altos de TR e baixos de ER podem explicar a estrutura compacta do filme GA [35].

Os filmes GA-10% e GA-20% apresentam-se uma estrutura menos homogênea, isso deve-se a incorporação de outros componentes que estão presentes nos extratos. Apesar disso, não houve separação de fases na estrutura dos filmes, demonstrando boa miscibilidade dos componentes.

3.2.8 Atividade antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante dos filmes pode ser observada na Fig. 2. A incorporação do extrato da TNP nos filmes aumentou significativamente a atividade antioxidante. A atividade

antioxidante do filme GA foi de 3.32 ± 1.25 , o GA-10% e GA-20% aumentaram, respectivamente, para 46.23 ± 0.69 e 84.31 ± 1.29 . Medeiros Silva et al. [36] adicionaram extrato de folhas de nêpera (*Eriobotrya japonica*) em filmes elaborados com uma mistura de casca de banana e amido e observaram que a atividade antioxidante dos filmes aumentou com a adição de extrato, semelhante ao encontrado neste trabalho, demonstrando que a adição do extrato da TNP em filmes de gelatina-amido podem atuar como um antioxidante natural e assim preservar o alimento embalado.

3.2.9 Biodegradabilidade

As imagens dos filmes podem ser observadas na Fig. 3. Observa-se que no 3º dia a biodegradação já havia iniciado, aumentando sucessivamente até o 9º dia quando a biodegradação ocorreu por inteiro. Um fato importante de se relatar é que no GA a biodegradação foi um pouco mais rápida quando comparado aos filmes que foram adicionados de extrato da TNP.

É bem provável que os compostos bioativos presentes no extrato tenham afetado a atividade dos micro-organismos presentes no solo. O mesmo fato ocorreu com Piñeros-Hernández et al. [37], a integridade dos filmes contendo extrato de alecrim foi mais preservado, indicando que a biodegradação foi retardada pela presença do extrato de alecrim. De acordo com a EN13432 [38] para que embalagens sejam consideradas biodegradáveis é necessário que pelo menos 90% do material se decomponha dentro de 6 meses e pelo menos 95% no final do processo. O resultado encontrado neste trabalho, demonstra que os filmes elaborados são considerados biodegradáveis.

3.3 CONCLUSÃO

Filmes biodegradáveis desenvolvidos com uma mistura de biopolímeros (gelatina-amido) adicionados de extrato da TNP foram elaborados com sucesso. A adição de 10 e 20% de extrato nos filmes causou um aumento da ER. Todos os filmes apresentaram ângulo menor que 90°, caracterizando-os como hidrofílicos. A adição de extrato provocou um aumento na opacidade dos filmes. A luminosidade foi maior no filme GA e a adição de extratos da TNP escureceu os filmes. A incorporação do extrato nos filmes aumentou significativamente a atividade antioxidante. A biodegradação dos filmes ocorreu por completo no 9º dia. Os filmes biodegradáveis elaborados com uma mistura de gelatina-amido enriquecidos com extrato TNP são potenciais carreadores de compostos antioxidantes podendo ser usados como embalagem ativa em alimentos.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores confirmam que não há conflito de interesses em relação a este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

REFERÊNCIAS

[1] INC, Nuts & Dried Fruits - Statistical Yearbook 2019–2020. Statistical Yearbook. <https://www.nutfruit.org/industry/technical-resources?category=statistical-yearbooks> (Acesso em 12 de fevereiro de 2021).

- [2] E. Alvarez-Parrilla, R. Urrea-López, L.A. de La Rosa, Bioactive components and health effects of pecan nuts and their byproducts: A review, *J. Food Bioact.* 1 (2018) 56-92.
<https://doi.org/https://doi.org/10.31665/jfb.2018.1127>.
- [3] T. Oro, H.M.A. Bolini, D.B. Arellano, J.M. Block, Physicochemical and Sensory Quality of Crude Brazilian Pecan Nut Oil during Storage, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (2009) 971–976.
<https://doi.org/10.1007/s11746-009-1434-z>.
- [4] G. Polmann, V. Badia, M. Frena, G.L. Teixeira, E. Rigo, J.M. Block, M.M.C. Feltes, 2019. Enzyme-assisted aqueous extraction combined with experimental designs allow the obtaining of a high-quality and yield pecan nut oil. *LWT.* 113, 108283.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108283>.
- [5] J.R. Sarkis, A.P.F. Côrrea, I. Michel, A. Brandeli, I.C. Tessaro, L.D.F. Marczak, Evaluation of the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Seed and Nut Cakes from the Edible Oil Industry, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91 (2014) 1773–1782.
<https://doi.org/10.1007/s11746-014-2514-2>.
- [6] S.Z. Popović, V.L. Lazić, N.M. Hromiš, D.Z. Šuput, S.N. Bulut, Biopolymer packaging materials for food shelf-life prolongation, *Biopolym. Food Des.* (2018) 223–277.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00008-6>.
- [7] H. Yong, X. Wang, X. Zhang, Y. Liu, Y. Qin, J. Liu, Effects of anthocyaninrich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film, *Food Hydrocoll.* 94 (2019) 93–104.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.012>.

[8] B. Hassan, S.A.S. Chatha, A.I. Hussain, K.M. Zia, N. Akhtar, Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 1095-1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>.

[9] F.M. Fakhouri, L.C.B. Fontes, P.V.M. Gonçalves, C.R. Milanez, C.J. Steel, F.P. Collares-Queiroz, Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativo e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27 (2007) 369-375. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000200027>.

[10] X. Liu, N. Zhang, L. Yu, S. Zhou, R. Shanks, J. Zheng, Imaging the phase of starch–gelatin blends by confocal Raman microscopy. *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.005>.

[11] C.M. Bitencourt, C.S. Fávoro-Trindade, P.J.A. Sobral, R.A. Carvalho, Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films, *Food Hydrocoll.* 40 (2014) 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.014>.

[12] A. Silva-Weiss, V. Bifani, M. Ihl, P.J.A. Sobral, M.C. Gómez-Guillén, Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract, *Food Hydrocoll.* 31 (2013) 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.028>.

[13] R. Roesler, L.G. Malta, L.C. Carrasco, R.B. Holanda, C.A.S. Sousa, G.M. Pastore, Atividade antioxidante de frutas do cerrado, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27 (2007) 53-60. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>.

[14] N.M. Malherbi, A.C. Schmitz, R.C. Grando, A.P. Bilck, F. Yamashita, L. Tormen, F.M. Fakhouri, J.I. Velasco, L.C. Bertan, Corn starch and gelatin-based films added with guabiroba pulp for application in food packaging, *Food Packag. Shelf Life*, 19 (2019) 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.008>.

[15] ASTM - Standard test method for water vapor transmission of materials. E96-80. In: *Annual Book of American Standard Testing Methods*. Philadelphia: ASTM, 1980.

[16] T.H. Mchugh, R. Avena-Bustillos, J.M. Krochta, Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects, *J. Food Sci.* 58 (1993) 899-903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x>.

[17] C. Peña, K. de la Caba, A. Eceiza, R. Ruseckaite, I. Mondragon, Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6836-6842. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.112>.

[18] G. da Silva Filipini, V.P. Romani, V. Guimarães Martins, 2020. Biodegradable and active-intelligent films based on methylcellulose and jambolão (*Syzygium cumini*) skins extract for food packaging. *Food Hydrocoll.* 109, 106139. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106139>.

- [19] ASTM- Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-97. In: Annual book of American Standard Testing Methods. Philadelphia: ASTM, 1997.
- [20] V.G.L. Souza, A.L. Fernando, J.R.A. Pires, P.F. Rodrigues, A.A.S. Lopes, F.M.B. Fernandes, Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants, Ind. Crops. Prod. 107 (2017) 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>.
- [21] Y. Shahbazi, The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil as biodegradable materials for active food packaging, Int. J. Biol. Macromol. 99 (2017) 746–753. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.065>.
- [22] L. Galvão Maciel, F.L. Ribeiro, G.L. Teixeira, L. Molognoni, J.N. dos Santos, I.L. Nunes, J. Mara Block, 2020. The potential of the pecan nut cake as an ingredient for the food industry. Food Res.Int., 108718. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108718>.
- [23] J. Brandsch, O. Piringer, Characteristics of plastic materials, in: O.G. Piringer, A.L. Baner (Eds.), Plastic packaging: Interactions with food and pharmaceuticals, Wiley, Weinheim, 2008, pp. 15-60.
- [24] H. Haghghi, S. Biard, F. Bigi, R. De Leo, E. Bedin, F. Pfeifer, H.W. Siesler, F. Licciardello, A. Pulvirenti, Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils, Food Hydrocoll. 95 (2019) 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.019>.

- [25] A. Riaz, S. Lei, H.M.S. Akhtar, P. Wan, D. Chen, S. Jabbar, M. Abid, M.M. Hashim, X. Zeng, Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols, *Int. J. Biol. Macromol.* 114, (2018), 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.126>.
- [26] Y. Xu, N. Rehmani, L. Alsubaie, C. Kim, E. Sismour, A. Scales, Tapioca starch active nanocomposite films and their antimicrobial effectiveness on ready-to-eat chicken meat, *Food Packag. and Shelf Life* 16 (2018) 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.02.006>.
- [27] J. Wu, S. Chen, S. Ge, J. Miao, J. Li, Q. Zhang, Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract, *Food Hydrocoll.* 32 (2013) 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.029>.
- [28] I. Albertos, R.J. Avena-Bustillos, A.B. Martín-Diana, A. B., W.-X. Du, D. Rico, T.H. McHugh, Antimicrobial Olive Leaf Gelatin films for enhancing the quality of cold-smoked Salmon, *Food Packag. and Shelf Life* 13 (2017) 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.07.004>.
- [29] S. Mali, L.B. Karam, L.P. Ramos, M.V. Grossman, Relationships among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7720–7725. <https://doi.org/10.1021/jf049225>.

- [30] K. Wang, K. Wu, M. Xiao, Y. Kuang, H. Corke, X. Ni, F. Jiang, Structural characterization and properties of konjac glucomannan and zein blend films, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1096-1104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.127>.
- [31] N. Syahida, I. Fitry, A. Zuriyati, N. Hanani, 2020. Effects of palm wax on the physical, mechanical and water barrier properties of fish gelatin films for food packaging application. *Food Packag. Shelf Life.* 23, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100437>.
- [32] M. Kaya, P. Ravikumar, S. Ilk, M. Mujtaba, L. Akyuz, J. Labidi, A.M. Salaberria, Y.S. Cakmak, S.K. Erful, Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 45 (2018) 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.013>.
- [33] J. Kan, J. Liu, H. Yong, Y. Liu, Y. Qin, J. Liu, Development of active packaging based on chitosan-gelatin blend films functionalized with Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruit extract, *Int. J. Biol. Macromol.* 140 (2019) 384-392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.155>
- [34] S. Kakaei, Y. Shahbazi, Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet, *LWT-Food Sci. Technol.* 72 (2016) 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.021>.
- [35] M. Jridi, S. Hajji, H.B. Ayed, I. Lassoued, A. Mbarek, M. Kammoun, N. Souissi, M. Nasri, Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan

composite edible films, *Int. J. Biol. Macromol.* 67 (2014) 373–379.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.054>.

[36] V.D.M. Silva, M.C.C. Macedo, C.G. Rodrigues, A.N. dos Santos, A.C. de Freitas e Loyola, C.A Fante, 2020. Biodegradable edible films of ripe banana peel and starch enriched with extract of *Eriobotrya japonica* leaves. *Food Biosci.*, 100750.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100750>.

[37] D. Piñeros-Hernandez, C. Medina-Jaramillo, A. López-Córdoba, S. Goyanes, Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging, *Food Hydrocoll.* 63 (2017) 488–495.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>.

[38] EN 13432, Packaging - requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation - test scheme and evaluation criteria for the final acceptance of packaging.

European committee for standardisation, <https://www.en-standard.eu/bs>, 2000. (Acesso em 10 abril de 2021).

Tabela 1. Projeto experimental (2²) da preparação dos extratos da TNP.

Tratamento	Álcool (%)	Tempo (min)
T1	65 (-1)	20 (-1)
T2	65 (-1)	40 (+1)
T3	95 (+1)	20 (-1)
T4	95 (+1)	40 (+1)
T5*	80 (0)	30 (0)
T6*	80 (0)	30 (0)
T7*	80 (0)	30 (0)

* Ponto Central

Tabela 2. Compostos fenólicos totais do extrato da TNP.

Tratamento	Álcool (%)	Tempo (min)	Compostos Fenólicos (mg EAG/g de amostra)
T1	65 (-1)	20 (-1)	101,61
T2	65 (-1)	40 (+1)	50,50
T3	95 (+1)	20 (-1)	54,53
T4	95 (+1)	40 (+1)	36,89
T5*	80 (0)	30 (0)	40,92 ± 1,38

*A condição 5 corresponde à média ± desvio padrão da triplicata do ponto central.

Tabela 3. Efeito da variáveis no teor de compostos fenólicos totais dos extratos da TNP.

	Efeitos	Desvio padrão	p
Compostos Fenólicos Totais			
Interceptação	52,3257	0,3156	<0,01*
(1) Álcool	-30,3450	0,8350	<0,01*
(2) Tempo	-34,3750	0,8350	<0,01*
1 x 2	16,7350	0,8350	0,2235

Tabela 4. Espessura, resistência a tração (RT) e alongação na ruptura (ER) dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP (n=3).

Filmes	Espessura (mm)	RT (MPa)	ER (%)
GA	0,039 ± <0.01 ^a	62,99 ± 7,67 ^a	3,53 ± 0,62 ^b
GA-10%	0,036 ± <0.01	58,82 ± 2,53 ^a	4,42 ± 0,56 ^a
GA-20%	0,039 ± <0.01	62,87 ± 4,77 ^a	4,18 ± 0,68 ^{ab}

Valores expressos em média ± desvio padrão, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p <0,05) pelo teste de Tukey.

GA: mistura de gelatina e amido; GA-10%: mistura de gelatina e amido com 10% de extrato da TNP; GA-20%: mistura de gelatina e amido com 20% de extrato da TNP.




Tabela 5. Permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade e ângulo de contatos dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP (n=3).

Filmes	PVA (g.mm/kPa.h.m ²)	Solubilidade (%)	Ângulo de contato (θ°)
GA	0,37 \pm 0,03 ^a	69,10 \pm 1,49 ^a	70,11 \pm 0,98 ^a
GA-10%	0,40 \pm 0,01 ^a	67,28 \pm 3,57 ^a	64,90 \pm 2,08 ^{ab}
GA-20%	0,34 \pm 0,04 ^a	69,38 \pm 3,35 ^a	59,95 \pm 5,90 ^b

Valores expressos em média \pm desvio padrão, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

GA: mistura de gelatina e amido; GA-10%: mistura de gelatina e amido com 10% de extrato da TNP; GA-20%: mistura de gelatina e amido com 20% de extrato da TNP.

Tabela 6. Propriedades ópticas dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP (n=3).

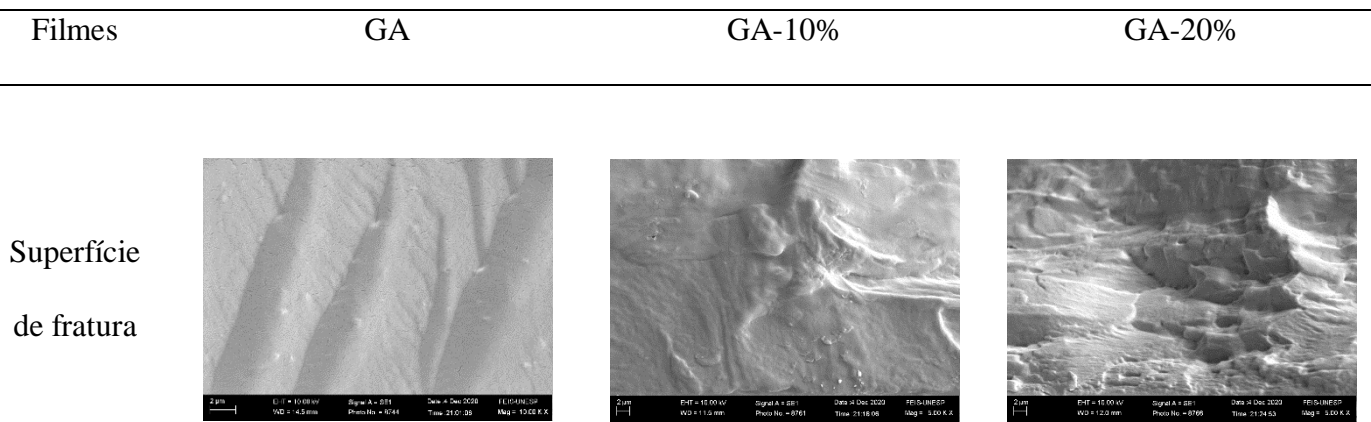
Filmes	Opacidade	L*	C*	h°	*Cor
GA	1,32 ± 0,03 ^b	90.59 ± 0,27 ^a	6,03 ± 0,21 ^a	287,35 ± 0,17 ^c	
GA-10%	1,81 ± 0,13 ^a	89.70 ± 0,23 ^b	5,95 ± 0,05 ^a	292,56 ± 0,26 ^b	
GA-20%	1,96 ± 0,06 ^a	88.79 ± 0,12 ^c	4,94 ± 0,14 ^b	298,33 ± 0,73 ^a	

Valores expressos em média ± desvio padrão, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p <0,05) pelo teste de Tukey.

*Cor: A cor foi obtida através do site: <https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>.

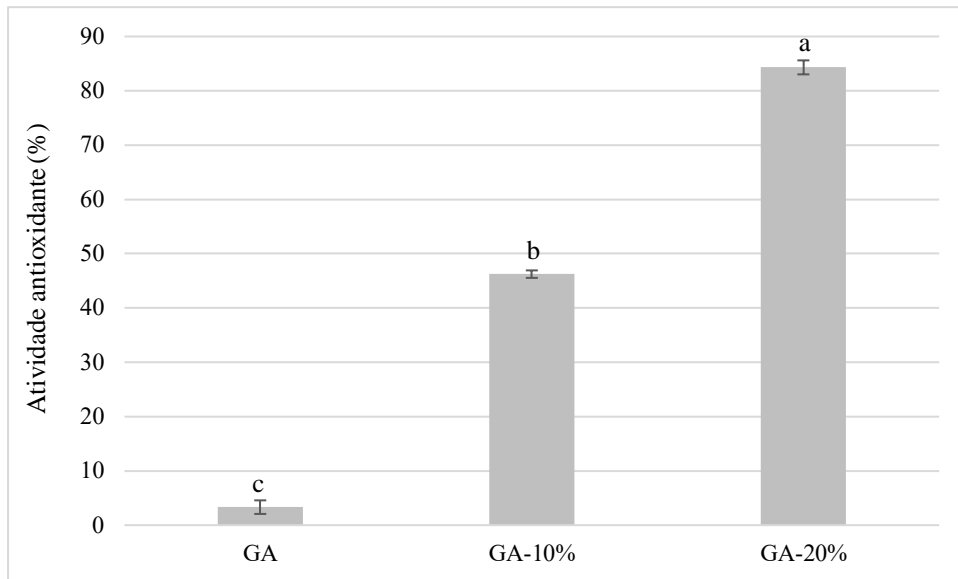
GA: mistura de gelatina e amido; GA-10%: mistura de gelatina e amido com 10% de extrato da TNP; GA-20%: mistura de gelatina e amido com 20% de extrato da TNP.

Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura de filmes com diferentes formulações.



GA: mistura de gelatina e amido; GA-10%: mistura de gelatina e amido com 10% de extrato da TNP; GA-20%: mistura de gelatina e amido com 20% de extrato da TNP.

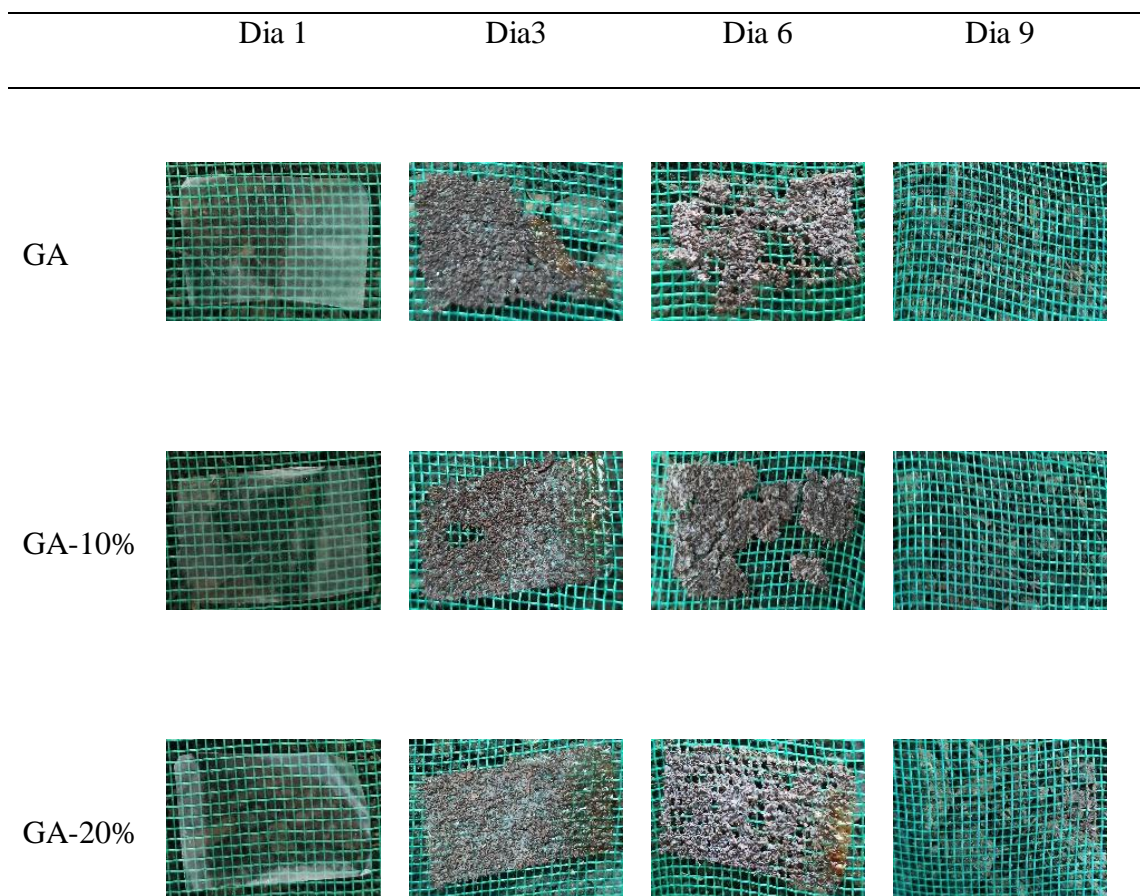
Figura 2. Atividade antioxidante dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP (n=3).



GA: mistura de gelatina e amido; GA-10%: mistura de gelatina e amido com 10% de extrato da TNP; GA-20%: mistura de gelatina e amido com 20% de extrato da TNP.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 3. Biodegradabilidade dos filmes de mistura de gelatina e amido adicionados de extrato da TNP.



GA: mistura de gelatina e amido; GA-10%: mistura de gelatina e amido com 10% de extrato da TNP; GA-20%:

mistura de gelatina e amido com 20% de extrato da TNP.

4 DISCUSSÃO GERAL

No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul destaca-se como produtor de noz pecã, produzindo cerca de 2.561 toneladas de nozes (IBGE, 2014). A noz pecã possui grandes quantidades de óleo em sua composição, sendo que o ácido graxo em maior concentração é o ácido oleico. Geralmente a noz pecã é consumida em sua forma *in natura*, mas a demanda de consumidores por óleos vegetais saudáveis vem impulsionando o processamento da noz pecã para a obtenção de óleo.

O primeiro artigo desta tese teve como objetivo a obtenção de óleo da noz pecã através da utilização de dióxido de carbono pressurizado (CO₂-P) e gás liquefeito de petróleo pressurizado (GLP-P) em diferentes condições de temperatura e pressão. Os maiores rendimentos foram observados em 250 bar / 20 °C (52,26%) e 10 bar / 20 °C (76,21%) para as extrações de CO₂-P e GLP-P, respectivamente. Os parâmetros de qualidade química dos óleos mostraram que ambas as tecnologias utilizadas produzem óleos que estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. RÁBAGO-PANDURO et al., 2021 aplicaram a tecnologia de campos elétricos pulsados como um pré-tratamento para melhorar a extração mecânica do óleo da noz pecã e obtiveram rendimentos que variaram de 68,9 a 77,4%, os valores encontrados por esses autores são compatíveis aos valores encontrados neste trabalho. No entanto, enfatiza-se que a utilização de GLP-P é mais favorável devido ao menor tempo de extração e a utilização de menos etapas de preparação da amostra.

Após a extração do óleo da noz pecã na indústria, o subproduto resultante apresenta um percentual de óleo elevado (36-59%) (SALVADOR et al., 2016). Sendo assim, o segundo artigo dessa tese teve por objetivo recuperar o óleo remanescente na torta da noz pecã (TNP) usando técnicas de extração com fluidos pressurizados (CO₂-P e GLP-P). Assim como no primeiro artigo, a condição de maior rendimento foi a 250 bar / 20 °C (43,65%) e 10 bar / 20 °C (56,33%) para as extrações de CO₂-P e GLP-P, respectivamente. O óleo recuperado era predominantemente composto de ácidos graxos insaturados (93%). Os resultados mostraram que o TNP é uma biomassa interessante para extração de óleo.

Ainda, a TNP possui quantidades significativas de compostos fenólicos, dessa maneira estratégias de utilização desses compostos são importantes para a valorização desse subproduto. Nesse sentido, o terceiro artigo dessa tese procurou extrair os compostos fenólicos da TNP e aplicá-los em filmes biodegradáveis. Os extratos adicionados aos filmes foram os elaborados com diferentes graduações de álcool e diferentes tempos de extração. A condição que utilizou álcool 65% e tempo de extração de 20 min foi a que apresentou o maior teor de compostos

fenólicos totais (101.61 mg GAE/g). Os filmes foram elaborados com uma mistura de gelatina, amido e glicerol (filme controle – GA), os extratos foram incorporados a solução filmogênica na concentração de 10 (GA-10%) e 20% (GA-20%). A adição de 10 e 20% de extrato da TNP nos filmes ocasionou um aumento da alongação da ruptura, provocou um aumento da opacidade e escurecimento dos filmes. A incorporação do extrato nos filmes aumentou significativamente a atividade antioxidante, o filme GA apresentou atividade antioxidante de 3,32% enquanto o GA-10% obteve 46,23% e o GA-20% 84,31%. Ju et al. (2019) adicionaram extrato de camu-camu em filmes elaborados com amido de teff e obtiveram valores de atividade antioxidante que variaram de 42,64 a 89,19%.

5 CONCLUSÃO GERAL

De maneira geral, a utilização de CO₂-P e GLP-P para a obtenção do óleo da noz pecã e da TNP foi muito vantajoso. Para as duas matrizes, a metodologia que apresentou os melhores resultados em termo de rendimento e qualidade química do óleo foi a que utilizou o GLP-P. Enfatiza-se que o tempo de extração no GLP-P foi o parâmetro que mais se destacou, pois em poucos minutos foi possível extrair totalmente o óleo das matrizes.

A adição do extrato da TNP em filmes biodegradáveis elaborados com uma mistura de gelatina-amido demonstrou ser uma alternativa vantajosa para a indústria de embalagens. Destaca-se que a incorporação do extrato da TNP nos filmes proporcionou um aumento significativo na atividade antioxidante das embalagens, demonstrando que o extrato da TNP em filmes biodegradáveis pode agir positivamente na vida útil de produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

ABAIDE, R. E. et al. Yield, composition, and antioxidant activity avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 289-298, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.008>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

ABIPLAST - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. **Perfil da indústria brasileira de transformação de material plástico**. São Paulo: ABIPLAST, 2018. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/publicacoes/perfil2019/>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ALVAREZ-PARRILLA, E.; URREA-LÓPEZ, R.; DE LA ROSA, L. A. Bioactive components and health effects of pecan nuts and their byproducts: A review. **Journal of Food**

Bioactives, v.1, p. 56–92, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/https://doi.org/10.31665/jfb.2018.1127>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

AMAROWICZ, R.; GONG, Y.; PEGG, R. B. Recent advances in our knowledge of the biological properties of nuts. In: FERREIRA, I. C. F. R.; MORALES, P.; BARROS, L. (Eds.). **Wild plants, mushrooms and nuts: Functional food properties and applications**. Chichester. 5 ed. Reino Unido: Wiley, 2017. cap. 11. p. 353-376.

BAKRY, N. F.; ISA, M. I. N.; SARBON, N.M. Effect of sorbitol at different concentrations on the functional properties of gelatin/carboxymethyl cellulose (CMC)/chitosan composite films. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 4, p. 1753-1762, 2017. Disponível em: <<http://www.ifrj.upm.edu.my>>. Acesso em: 15 fev. 2021.

BIER, M. C.J. et al. Liquefied gas extraction: A new method for the recovery of terpenoids from agroindustrial and forest wastes. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 97-102, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.12.016>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

BOLUMAR, T.; ANDERSEN, M. L.; ORLIEN, V. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 129, n.4, p. 1406–1412, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.082>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

BOSS, E. A. **Análise do desempenho de plantas de extração de óleo convencionais e de processos supercríticos**. 2000. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.

BOZAN, B.; TEMELLI, F. Supercritical CO₂ extraction of flaxseed. **Journal of American Oil Chemistry Society**, n. 79, p. 231-235, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11746-002-0466-x>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

BRENNAN, J. G. et al. **Food engineering operations**. 3ed. Inglaterra: Elsevier Applied Science, 1990.

BRISON, F. R. **Pecan Culture**. Austin: Capital Printing, 1974. 292p.

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

CATERBOW, A.; SPERANSKAYA, O. Uso bênção e maldição. In: VIANNA, M.; TELES, D. B (Eds). **Atlas do Plástico : Fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos**. 1ed. Rio de Janeiro: Fundação Heirich Böll, 2020. cap. 17, p. 16-17.

CHEN, Y. et al. Fluidized bed film coating of cohesive Geldart group C powders. **Powder Technology**, v. 189, n. 3, p. 466–480, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2008.08.002>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DAHLSTROM, D. A. et al. Liquid-solids operation and equipment. In: PENY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's Chemical Engineer's Handbook**. 7ed. Nova York: McGraw Hill, 1997, p. 1-59.

DAMASCENO, N. R. T. et al. Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 230, n. 2, p. 347- 353, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.08.014>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

DA ROCHA, M.; DE SOUZA, M. M.; PRENTICE, C. Biodegradable Films: An Alternative Food Packaging. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. **Food Packaging and Preservation**. 9 v. Massachusetts: Academic Press, 2018, p. 307–342. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811516-9.00009-9>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DE JONG, A.; PLAT, J.; MENSINK, R. P. Metabolic effects of plant sterols and stanols. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 7, p. 362–369, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(03)00002-0)>. Acesso em: 20 abr. 2020.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. et al. The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. **Food Chemistry**, v.168. n. 1, p. 529-537, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.092>>. Acesso em: 05 jan. 2021.

FRUSSO, E. A. Características morfológicas y fenológicas del pecán. In: LAVADO, R. S.; FRUSSO, E. A. (Eds.). **Producción de pecán en Argentina**. Buenos Aires. 2007. p. 1-18.

GALVÃO MACIEL, L. et al. The potential of the pecan nut cake as an ingredient for the food industry. **Food Research International**, v. 127, 108718, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108718>>. Acesso em: 05 jan. 2021.

GIROTO, K.; OLIVEIRA, G. A.; LIMA, J. D. Estudo de viabilidade econômica da produção de noz-pecã em pequenas propriedades rurais. In: XXXVI ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2016, João Pessoa – PB. **Anais...** Rio de Janeiro: ABEPRO, v. 1, p. 53-62, 2016. Disponível em: <<http://www.abepro.org.br/biblioteca>> Acesso em: 06. mar. 2018.

GÓMEZ-GUILLÉN M. et al. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science Technology**, v. 20, n. 1, p. 3-16, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>> Acesso em: 06. mar. 2021.

HADDAD, E. H. Health Effects of a Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] Nut-rich Diet. In: PREEDY, V.R.; WATSON, R.R.; PATEL, V.B. **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. 1 ed. Academic Press, 2011, cap.105, p.891-898.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v.1217, n. 16, p. 2495-2511, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>>. Acesso em: 07 mai. 2020.

HOSSEINI, S. F.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. A state-of-the-art review on the elaboration of fish gelatin as bioactive packaging: Special emphasis on nanotechnology-based approaches. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 125–135, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.022>>. Acesso em: 07 mai. 2020.

HU, J. et al. Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) with bioethanol: An efficient and sustainable approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 34, p. 5765– 5773, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.088>>. Acesso em: 07 jul. 2020.

IBGE. **Lavoura Agrícola Municipal 2014** – Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/default_xls.shtm>. Acesso em: 07 jul. 2018.

JACOB, J. et al. Antioxidant incorporated biopolymer composites for active packaging. In: ZHANG, Y. (Ed.). **Processing and development of polysaccharide-based biopolymers for packaging applications**. 1 ed. Elsevier Inc., 2020. p. 239-260. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818795-1.00010-1>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

JHA, P. Effect of plasticizer and antimicrobial agents on functional properties of bionanocomposite films based on corn starch-chitosan for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 571-582, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.242>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2058-2076, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0835-4>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

KNEZ, Z. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v.77, n. 1, p. 235-243, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.07.044>>. Acesso em: 20 fev. 2020

KEMPER, T. G. Extraction Principles and Extractor Design. In: WAN, P. J.; WAKELYN, P. J. **Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.137–141

KHAN, M.R.; SADIQ, M.B. Importance of gelatin, nanoparticles and their interactions in the formulation of biodegradable composite films: a review. **Polymer Bulletin**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00289-020-03283-4>>. Acesso em: 24 fev. 2021.

KIRALAN, S. S.; KIRALAN, M.; OZKAN, G. Cold pressed pecan (*Carya illinoensis*) oil. In: RAMADAN, M. F. (Ed.). **Cold Pressed Oils: green Technology, Bioactive Compounds, Functionality and Applications**. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 2020. cap. 46, p. 515–524.

LIU, P. et al. Effects of ultrasonication on the properties of maize starch/stearic acid/sodium carboxymethyl cellulose composite film. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 72, 105447, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105447>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n1p137>>. Acesso em: 02 mai. 2021.

MANDARINO, J. M. G **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 40p.

MANTELL, C. et al. Supercritical fluid extraction. In: RAMASWAMY, S.; HUANG, H. J.; RAMARAO, B.V. (Eds). **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. 5 ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2013. p. 79–100.

MARCHETTI, L. et al. Characterization of pecan nut expeller cake and effect of storage on its microbiological and oxidative quality. **Grasas y Aceites**, v. 68, n. 4, p. e226, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.3989/gya.0667171>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

MARTINS, C. R. et al. Cultura da noz-pecã para a agricultura familiar, In: WOLFF, L. F.; MEDEIROS, C. A. B. (Eds.). **Alternativas para a diversificação da agricultura familiar de base ecológica**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2017. 145 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 443). Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1081352/alternativas-para-a-diversificacao-da-agricultura-familiar-de-base-ecologica>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

MARTINS, C. R. et al. **Situação e perspectiva da noqueira-pecã no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2018. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1100226>>. Acesso em: 15 dezembro 2020.

MIR, S. A. et al. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 141–154, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.004>>. Acesso em: 15 fev. 2021.

MORETTO, E.; FETT, R. **Definicao de oleos e Gorduras tecnologia de oleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 144 p.

MOSLOVAC, T. et al. Pressing and supercritical CO₂ extraction of *Camelina sativa* oil. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 122–129, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.019>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

MOSTAFAVI, F. S.; ZAEIM, D. Agar-based edible films for food packaging applications - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, n. 15, p. 1165-1176, 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.123>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

NERÍN, C.; TOVAR, L. SALAFRANCA, J. Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 313-320, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.027>>. Acesso em: 20 mar. 2021.

NOVELLO, Z. et al. Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane. **Industrial Crops and Products**, v. 76, n. 15, p. 697- 701, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.075>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARC, M. A.; SPOTO, M. H. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1ed. São Paulo: Manole, 2006. 632p.

ORO, T. et al. Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases. **Grasas y Aceites**, v.59, n. 2. p. 132-138, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i2.501>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

OTONI, C. G. et al. Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables-A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 5, p. 1151–1169, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>>. Acesso em: 20 mar. 2021.

PEDERSSETTI, M. M. et al. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propano and supercritical carbone dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 2, p. 189-196, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.018>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

PIGHINELLI, A. L. M. T. et al. Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 66-71, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S0101-2061200800050001>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D.; MEDINA-JARAMILLO, C.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; GOYANES, S. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

PRADO, A. C. P. et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45 p. 64-73, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.042>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

RAJARAM, S. et al. A monounsaturated fatty acid-rich pecan-enriched diet favorably alters the serum lipid profile of healthy men and women. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2275-2279, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2275>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

RAPINEL, V. et al. An original approach for lipophilic natural products extraction: Use of liquefied nbutane as alternative solvent to n-hexane. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 524-533, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.003>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

REIS, R. S. et al. Chemical composition and oxidative stability of eleven pecan cultivars produced in Southern Brazil. **Food Research International**, v.136, 109596, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109596>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

RHIM, J. W. et al. Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: thermocompression versus solvent casting. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, n. 6, p. 3736–3742, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.23403>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

RODRIGUES, A. A. M. et al. Properties and characterization of biodegradable films obtained from different starch sources. **Food Science and Technology**, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/fst.28520>>. Acesso em: 10 abr. 2021.

RYAN, E. et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n. 3-4, p. 219-228, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09637480600768077>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

RYDZ, J. et al. Present and Future of Biodegradable Polymers for Food Packaging Applications. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. **Biopolymers for Food Design**, v. 20. Massachusetts: Academic Press, 2018, p. 431–467. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811449-0.00014-1>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

SALVADOR, A. A. et al. Increasing the value of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C.Koch] cake by means of oil extraction and antioxidante activity evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.116, p. 215-222, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.046>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

SAM, S.T. et al. Current application and challenges on packaging industry based on natural polymer blending. In: OLATUNJI, O. (Ed.). **Natural Polymers: Industry Techniques and Applications**. Suíça: Springer, Cham, 2015, p. 163–184. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1_6>. Acesso em: 20 fev. 2021.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. D. et al. On-line coupling of supercritical fluid extraction and chromatographic techniques. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 213–227, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jssc.201601040>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

SARKIS, J. R. et al. Evaluation of the phenolic content and antioxidant activity of different seed and nut cakes from the edible oil industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 10, p. 1773–1782, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11746-014-2514-2>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

SCAPIN, G. et al. Effect of pressure and temperature on the quality of chia oil extracted using pressurized fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 90-96, 2017a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.030>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

SCAPIN, G. et al. Quality of perilla oil (*Perilla frutescens*) extracted with compressed CO₂ and LPG. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, p. 176-182, 2017b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.007>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

SCAPINELLO, J. et al. Fatty acid profile of pecan nut oils obtained from pressurized n-butane and cold pressing compared with commercial oils. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 10, p. 3366–3369, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2771-9>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

SCHWARZBACH, J. **Aspectos de segurança relacionados ao hexano na extração de óleos vegetais**. São Paulo: Ed. Aspen, 1997. p. 27-34.

SEBASTIÁN, S. L. et al. Dearomatization of antioxidant *rosemary* extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 13-19, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf970565n>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SEGURA, R. et al. Other relevant components of nuts: Phytosterols, folate and minerals. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 2 p. 36-44, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/bjn20061862>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

SEDAYU, B. B.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W. A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings. **Carbohydrate Polymers**, v. 216, n. 15, p. 287-302, 2019. Disponível em: <<https://doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.021>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid Oxidation: Measurements Methods. In: SHAHIDI, F. (Ed). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 1, 6 ed. EUA: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

SHAKERARDEKANI, A. et al. Textural, Rheological and Sensory Properties and Oxidative Stability of Nut Spreads - A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n. 2, p. 4223–4241, 2013. . Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms14024223>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SINGH, J.; BARGALE, P. C. Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. **Journal of Food Engineering**, v. 43, n. 2, p. 75-82, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00134-X)>. Acesso em: 20 mar. 2020.

SILVA, J. R. F. et al. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 102-107, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.01.003>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

SOARES, J.F. et al. Extraction of rice bran oil using supercritical CO₂ and compressed liquefied petroleum gas. **Journal of Food Engineering**, n. 170, p. 58–63, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.016>>. Acesso em: 12 mar. 2020.

SPARKS, D. et al. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 83, n. 10, p. 885-891, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11746-006-5042-x>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

SUN, D. et al. Antarctic krill lipid extracted by subcritical n-butane and comparison with supercritical CO₂ and conventional solvent extraction. **LWT – Food Science and Technology**, v. 94, p. 1-7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.024>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

TAN, C. X. et al. Comparison of subcritical CO₂ and ultrasound-assisted aqueous methods with the conventional solvent method in the extraction of avocado oil. **The Journal of**

- Supercritical Fluids**, v. 135, p. 45–51, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.036>>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction**. Techniques in Analytical Chemistry. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996. 181p.
- TEIXEIRA, G. L. et al. Assessment of subcritical propane, supercritical CO₂ and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.133, n.1, p.122-132, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.003>>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- THAKUR, R. et al. Starch-based films: Major factors affecting their properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 1079-1089, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190>>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, n. 3, p.71-78, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- THE, D.P. et al. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 548–558, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.023>>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- TRENTINI, C. P. et al. Oil extraction from macauba pulp using compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 126, p. 72–78, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.02.018>>. Acesso em: 02 mai. 2020.
- UMARAW, P.; VERMA, A. K. Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1270-1279, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>>. Acesso em: 02 fev. 2021.
- USDA. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. **Food Data Central**, 2018. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/12142>>. Acesso em: 30 dez. 2020.
- VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4705–4714, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf0606959>>. Acesso em: 20 fev. 2020.
- VONDERHEIDE, A. P. et al. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5722–5728, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf0256541>>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- WANG, L. et al. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 11–19, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.030>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

WAKELING, L. T. et al. Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1277–1281, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf000797d>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2007.

WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026–4037, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf049696w>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n.10, p.1573-1580, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.019>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

YIN, J. Z. et al. Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. **Separation and Purification Technology**, v. 43, n. 2, p. 163-167, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.10.016>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

ZANQUI, A.B. et al. Subcritical extraction of flaxseed oil with n-propane: composition and purity. **Food Chemistry**. v.188, n. 1, p.452-458, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.033>>. Acesso em: 20 mar. 2020.