**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

PAOLA MARESSA APARECIDA DE OLIVEIRA

**ÓLEO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA,
EXTRAÇÃO COM FLUÍDO PRESSURIZADO E COMPARAÇÃO DE SUA
COMPOSIÇÃO COM O ÓLEO DE CAFÉ EXTRAÍDO PELOS PEQUENOS
PRODUTORES DO ESTADO DE SÃO PAULO – ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO
DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

PAOLA MARESSA APARECIDA DE OLIVEIRA

**ÓLEO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA,
EXTRAÇÃO COM FLUÍDO PRESSURIZADO E COMPARAÇÃO DE SUA
COMPOSIÇÃO COM O ÓLEO DE CAFÉ EXTRAÍDO PELOS PEQUENOS
PRODUTORES DO ESTADO DE SÃO PAULO – ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO
DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Ciência.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Lopes de Oliveira.

Pirassununga
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

O48o	Oliveira, Paola Maressa Aparecida de
extraído	Óleo de grãos de café verde obtido por extração supercrítica, extração com fluido pressurizado e comparação de sua composição com o óleo de café
	pelos pequenos produtores do Estado de São Paulo: análise da concentração de compostos bioativos / Paola Maressa Aparecida de Oliveira. --Pirassununga, 2013. 102 f.
	Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos. Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
	Orientador: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira.
Óleo	1. Cafestol 2. <i>Kahweol</i> 3. Extração com fluido supercrítico 4. Extração com fluido pressurizado 5. de café verde. I. Título.

A Deus de infinita bondade:

A minha amada mamãe:

Aos meus irmãos Anne Carolina e João Gabriel:

Aos meus tios Iracema e Max:

A vocês que sempre me encorajaram a ir até o fim

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo infinito amor que tem por mim, a N. S. Aparecida e aos Espíritos de Luz pela força que me deram nas inúmeras vezes que perdi as minhas e por terem me carregado no colo quando já não podia mais caminhar.

A toda a minha Família sem os quais nada disso seria possível. Em especial a mamãe pelos inúmeros conselhos e pela força mesmo de longe, minha tia e aos meus irmãos por todo apoio e pelas inúmeras vezes que me fizeram acreditar que eu seria capaz, que conseguiria obrigada por nunca terem desistido de mim! Além de um pequeno agradecimento aos meus animais de estimação: Cherrie, Nanos e Toshio (in memoriam). Um agradecimento especial a minha irmã loira que eu amo de paixão Taciane Marcelle Marques. E a você que não quis ser citado na minha dissertação por não se achar merecedor desta, mas que muito contribuiu na escrita final dessa, portanto eu deixo aqui o meu muitíssimo obrigada.

A minha orientadora Alessandra de Oliveira primeiramente por ter me aceito como sua orientada, permitindo que eu fizesse parte da Família LTAPPN, pelos preciosos ensinamentos, pela confiança, por todas as oportunidades, pela paciência, preocupação, carinho e amizade.

Aos meus amigos do LTAPPN: Alessandra Barros, Ana Carolina, Débora, Eliane Takahashi, Flávia, Gabriela, Larissa, Luciana, Mirelle, Naila, Pedro, Samira, Vinicius e em especial aos meus incríveis estagiários Rafael e Victor. E ao Técnico Nilson Ferreira pelo apoio no laboratório, MUITO OBRIGADA!

As Professoras Dr^{as}: Carmen Trindade, Christianne Rodrigues, Cíntia Gonçalves, Cynthia Ditchfield, Eliana Kamimura, Monica Mazalli e Rosemary de Carvalho por terem cedido gentilmente os seus laboratórios e aparelhos para que minhas análises pudessem ser realizadas e seus respectivos técnicos: Marcelo, Keila, Guilherme e Edineli pelos ensinamentos, atenção e amizade. A Prof^a. Dr^a. Elisabete Viegas, ao Prof. Dr. Paulo José Sobral e ao Prof. Dr. Rogério Lacaz Ruiz, pelos ensinamentos e por todo apoio que deram a mim nesses anos de FZEA.

A minha família Pirassununguense: Ana Paula minha companheira de quarto quando cheguei aqui, pessoa muito importante com quem aprendi muito! As minhas amigas-irmãs de República: Débora que me acolheu mesmo quando nem me conhecia direito, que me deu dicas valiosas e com quem eu muito aprendi, Camila e Keliani que foram muito importantes para mim neste último ano, a vocês quatro que me ajudaram muito e estiveram ao meu lado nas alegrias e também nas tristezas não me abandonando nunca, MUITO OBRIGADA meninas, amo vocês demais!

Aos meus sempre amigos que mesmo tão longe estiveram presentes: Elisa Estevão, Letícia Salum, Lorrán Ribeiro, Marina Albuquerque e Olivia Souza.

Aos meus amigos mais que queridos: Adja, Adriana Bordignon, Atânasio, Bárbara (Babi), Beatriz Egerland, Caio (Leleco), Carol Capellini, Cristian, Daniel (Kbaço), Diane, Drucila, Eduardo (Frodo), Eloisa (Elô), Elmeson (Mineiro), Fasto, Francisca, Francesco, Flávio (Perna), Flávio (Flávinho), Frederick (Fred), Fernando Eustáquio, Graziela, German, Geancarlo Katsurayama, Gisele, Hugo Costa, Helena Cruz, Isadora (Isa), Jaiber, Juliana

(Jú), Julio Segura, Julio (Volverine), Jasmine Dillon, José Raul, Josiane, Juliano Gonçalves, Kevin Gardie, Leandro (Baiano), Lucas Arantes, Mauricio, Matheus (Inútil), Max, Mayra Di Gregorio, Paula (Paulinha), Patrícia (Paty), Rafael Maia, Roney Ramos, Rogério Augusto, Thaysa Silva, Taíse, Talita Comunian, Vitor Garcia, Volnei, Wissem Ta e a todos aqueles que fizeram parte dos meus dias nesses últimos anos e com quem eu aprendi muito.

Aos meus amigos que conheci no estágio na França: Aleksandra Krstulja, Alexandre Le Bolloch, Anabella Mocanu, Carla Grazieli, Daniela Barbu, Edyta Korbut, Fernanda Guedes, Frederich, Hala Nehme, Hanane Be, Kinga Puzio, Laëtitia Fougere, Laoges Thao, Manabu Hamada, Maxime, Muge Oskay, Olek Salwinski, Priscila França, Rebeca Chamorro, Sandrini, Sergio MTZ, Valou, Yuto Sueoka e todos que de alguma forma me ajudaram.

A Carmen, Diedri, Francisco (Chico), Guilherme, Silmara e Sônia pelo carinho, paciência e pelos momentos de diversão e descontração.

Aos funcionários do Banco do Brasil – Campus USP, representados pelas pessoas do Dannyell Medeiros e Denilson Oliveira pelo carinho e atenção. E aos funcionários da limpeza sempre tão solícitos e amigos.

A senhora Tânia Bartholo Andreotti e o Leonildo José Secarecha (Tijolo) que foram muito importantes quando cheguei aqui na FZEA, muito obrigada por todo o auxílio e apoio. A seção internacional representada pela Sra. Clélia Godoy e o Prof. Dr. Raul Franzolin Neto, muito obrigada por todo o apoio que deram a mim na época do meu estágio na França.

A empresa AGTTEC – Inovação, representada pelo Sr. Agnaldo Toniato, pelo fornecimento dos grãos de café verde e do óleo de café verde obtido por prensagem pelos pequenos produtores do Estado de São Paulo.

A Universidade de São Paulo – FZEA/USP pela oportunidade, por oferecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho. E a todos os professores pelos valiosos ensinamentos e funcionários pelo carinho e auxílio. Em especial aos funcionários da Seção de Pós-graduação e do Departamento de Engenharia de Alimentos: Alecsandra de Araújo, Augusto Dorta, Stephanie Dias, Layla Denófrío, Stéfani Destéfano, Alessandra Boldrini, Paula Argenti e Rafael David respectivamente.

A Université D’Orléans na França, pelo convite de estágio. Pelo carinho recebido de todos os novos amigos, em especial a Syeme e Mathieu Beaumesnil que estiveram em todos os momentos me apoiando e a Professora Dr^a. Agnès Chartier.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro e a CAPES/COFECUB/USP pela oportunidade de estagiar na França.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) (Processo FAPESP N° 2010/16665-3) pelo financiamento das minhas pesquisas.

E a todos aqueles não citados que direta ou indiretamente contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho, AGRADEÇO!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser... mas Graças a
Deus, não sou o que era”.*

Martin Luther King

RESUMO

Oliveira, P.M.A. **Óleo de grãos de café verde obtido por extração supercrítica, extração com fluido pressurizado e comparação de sua composição com o óleo de café extraído pelos pequenos produtores do Estado de São Paulo – análise da concentração de compostos bioativos.** 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Este projeto de pesquisa, com o apoio dos pequenos produtores de café do Estado de São Paulo/Brasil, visou estudar e caracterizar o óleo de grãos de café verde obtido pela extração supercrítica e extração com fluido pressurizado. Foi feita a caracterização deste produto, considerando os componentes minoritários com atividade biológica demonstrada na literatura, como os componentes fenólicos e os diterpenos cafestol e kahweol. Com o objetivo de obter o óleo de café verde enriquecido, principalmente nestes dois principais diterpenos, componentes relevantes para as indústrias cosmética e farmacêutica, aplicaram-se como inovação tecnológica a extração supercrítica (SFE) e extração com fluido pressurizado (PFE). Os ensaios de extração foram realizados no Laboratório a Alta Pressão e Produtos Naturais (FZEA/USP/Brasil) para as SFE e no Laboratoire de Procédés (IUT/Université d'Orléans/França) para PFE. No desenvolvimento da metodologia de análise dos diterpenos foram realizados estudos do método de saponificação do óleo de café verde Arabica (*Coffea arabica*) cv. Catuaí amarelo, obtido por prensagem (OP). E, concomitantemente a este estudo analítico, foram feitas as extrações do óleo dos mesmos grãos de café verde via SFE e PFE. Os diferentes óleos de grãos de café verde, obtidos pelos três métodos de extração foram analisados e comparados entre si considerando principalmente a concentração dos diterpenos. A metodologia analítica desenvolvida na primeira fase do trabalho constatou que para uma melhor análise dos diterpenos a reação de saponificação deve ser feita utilizando NaOH e a 70 °C. A fração insaponificável foi analisada para os diferentes extratos. Para os extratos obtidos via SFE, a cafeína teve que ser separada do óleo. A análise de quantificação dos diterpenos via cromatografia gasosa, utilizando o próprio cafestol e kahweol como padrão externo, indicou que o óleo obtido por SFE apresentou 50.180,41 mg cafestol/kg óleo e 63.764,32 mg kahweol/kg óleo na condição otimizada. Para a PFE as concentrações máximas obtidas foram de 65.876,29 mg cafestol/kg óleo e 53.328,47 mg kahweol/kg óleo e, no óleo de café verde obtido pelo método convencional a concentração dos diterpenos mostrou-se inferior com 7.508 mg cafestol/kg óleo e 12.822 mg kahweol/kg óleo. As propriedades físicas medidas

visando à caracterização do óleo dos grãos de café verde obtido por SFE e prensagem dos grãos indicaram que tanto a densidade quanto a viscosidade diminuem com o aumento da temperatura. Para ambos os óleos, o comportamento da densidade foi semelhante, para aquele obtido pelo método convencional, os valores variaram de 0,94177 g/cm³ (25 °C) a 0,92143 g/cm³ (55 °C) e para o óleo obtido por SFE a variação foi de 0,93645 g/cm³ (25 °C) a 0,9157 g/cm³ (55 °C). A viscosidade dinâmica para o óleo obtido por prensagem variou de 127,8798 mPa×s (25 °C) a 35,0510 mPa×s (55 °C) e, para o óleo obtido por SFE, estes valores foram menores, entre 84,0411 mPa×s (25 °C) e 24,2555 mPa×s (55 °C). O índice de refração para ambos os óleos foi semelhante. Na extração com fluido pressurizado, (PFE), um valor ótimo de rendimento do extrato foi obtido quando se empregou metanol como solvente para uma temperatura de 100 °C e tempo de equilíbrio estático de 20 min. Este valor foi 183% superior à média dos resultados obtidos nos outros ensaios. Na concentração de diterpenos nestes extratos, nota-se também que o etanol foi menos eficiente que o metanol. Na comparação dos dois processos inovadores (SFE e PFE), a concentração de kahweol apresenta-se como o principal componente em quase todos os ensaios, com valores da relação cafestol/kahweol entre 0,73 e 0,96. No entanto, ao ser analisado o processo individualmente, percebe-se que a extração com fluido supercrítico indica que a maioria dos extratos obtidos teve uma concentração de kahweol superior ao cafestol.

Palavra-Chave: cafestol, kahweol, Extração com fluido supercrítico, Extração com fluido pressurizado, Óleo de café verde.

ABSTRACT

Oliveira, P.M.A. **Green coffee oil obtained by supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and comparison of its composition with coffee oil extracted by small producers in the State of São Paulo - analyzing the concentration of bioactive compounds.** 2013. 102 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

This research project, with the support of small coffee producers in the State of São Paulo/Brazil, aimed to study and characterize the green coffee oil obtained by the supercritical fluid extraction and pressurized fluid extraction. Was made to characterize this authentic product, considering the minor components with biological activity demonstrated in the literature, such as phenolic compounds and diterpenes cafestol and kahweol. In order to get the green coffee oil enriched, mainly in these two major diterpenes, components relevant to cosmetic and pharmaceutical industries, applied technological innovation as the supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized fluid extraction (PFE). The extraction tests were performed at the High Pressure Laboratory and Natural Products (FZEA/USP/Brazil) for SFE and the Laboratoire de Procédés (IUT/Université d'Orléans/France) for PFE. In the development of methodology for analyzing diterpenes were conducted studies on the method of saponification of the green oil Arabica coffee (*Coffea arabica*) cv. yellow Catuaí, obtained by pressing (OP). And, concomitantly this analytical study were extracted from the oil of the same green coffee beans by SFE and PFE. Different green coffee beans oils, obtained by the three extraction methods were analyzed and compared with each other considering mainly the concentration of diterpenes. The analytical methodology developed in the first phase of the work found that for a better analysis of the diterpenes saponification reaction must be made using NaOH and 70 °C. The unsaponifiable fraction was analyzed for the different extracts. Specifically for extracts obtained by SFE, caffeine had to be separated from the oil. The analysis and quantification of diterpenes made by gas chromatography, using himself as cafestol and kahweol external standard, indicated that the oil obtained by SFE showed cafestol 50,180.41 mg/kg oil and kahweol 63,764.32 mg/kg oil in optimal condition. For the PFE maximum concentrations were obtained cafestol 65,876.29 mg/kg oil and kahweol 53,328.47 mg/kg oil and the green coffee oil obtained by the conventional method the concentration of diterpenes was lower than with 7,508 mg cafestol/kg oil kahweol and 12,822 mg/kg oil. The physical measures for the characterization of oil from green coffee beans

obtained by SFE and pressing the grains indicated that both the density and the viscosity decrease with increasing temperature. For both oils, the density behavior was similar, to that obtained by the conventional method, the values ranged from 0.94177 g/cm³ (25 °C) to 0.92143 g/cm³ (55 °C) and the oil obtained by the SFE variation was 0.93645 g/cm³ (25 °C) to 0.9157 g/cm³ (55 °C) . The dynamic viscosity for the oil obtained by pressing ranged from 127.8798 mPa×s (25 °C) to 35.0510 mPa×s (55 °C) and the oil obtained by SFE, these values were lower, between 84.0411 mPa×s (25 °C) and 24.2555 mPa×s (55 °C). The index of refraction for both oils was similar. In the extraction pressure, (PFE), an optimal value of the extract yield was obtained when methanol was used as solvent at a temperature of 100 ° C and static equilibrium time of 20 min. This value was 183% above the average of the results obtained in other tests. At the concentration of these diterpenes extracts, note also that the ethanol was less effective than methanol. In comparing the two innovative processes (SFE and PFE), the concentration of kahweol presents itself as the main component in almost all tests, compared with values of cafestol/kahweol between 0.73 and 0.96. However, the process to be analyzed individually, it is clear that the supercritical fluid extraction indicates that most of the extracts had a concentration higher of kahweol than cafestol.

Key-words: cafestol, kahweol, Supercritical fluid extraction, Pressurized fluid extraction, Green coffee oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de fases para o dióxido de carbono (Fonte: SANDERS, 1993)	24
Figura 2 - Pé de café, <i>Coffea arabica</i> cv. Catuaí amarelo (fonte: PEREIRA, 2011)	28
Figura 3 - Cafestol, kahweol e a molécula 16-o-methylcafestol (Fonte: KURZROCK; SPEER, 2001)	31
Figura 4 - Estrutura química da cafeína e metilxantinas relacionadas (Fonte: ALTIMARI, 2006)	32
Figura 5 - Grãos verdes e grãos triturados	35
Figura 6 - Jogo de seis peneiras da série padrão Tyler e grãos de café verde triturados	36
Figura 7 - Diagrama esquemático do sistema de extração com fluido pressurizado (PFE) ...	38
Figura 8 - Esquema representativo do processo de extração com fluido supercrítico (SFE), (Fonte: WATERS, 2011)	40
Figura 9 - Unidade extratora que opera com fluido supercrítico tharscf, (a) foto dos grãos de café já triturados; (b) extrator de leito fixo; (c) equipamento e (d) frasco coletor com extrato	41
Figura 10 - Esquema representativo da reação de saponificação a quente e extração da matéria insaponificável, (Adaptada de DIAS et al., 2010)	47
Figura 11 - Densímetro digital Anton Paar dma 4500	49
Figura 12 - Viscosímetro automático Anton Paar	50
Figura 13 - Espectro de íons de massa do kahweol (a) e cafestol (b) do óleo de café verde saponificado a quente e silanizado	56
Figura 14 - Espectro de massas do kahweol (a) e do cafestol (b) do óleo de café verde saponificado a frio e silanizado	56
Figura 15 - Fração insaponificável do óleo de café verde com reação de transesterificação a quente silanizado (—) e não silanizado (—)	57
Figura 16 - Fração insaponificável do óleo de café verde com reação de transesterificação a frio silanizado (—) e não silanizado (—)	57
Figura 17 - Regressão linear dos pontos experimentais que demonstram a concentração dos diterpenos puros em função da área dos picos obtidos no GC/MS	58
Figura 18 - Cromatograma de íons totais da cafeína pura (a) da isolada do óleo de café verde obtido por SFE (b) e seu respectivo espectro de massas (c)	61
Figura 19 - Diagrama de pareto que indica os efeitos das variáveis P e T e da interação entre elas P×T no rendimento do óleo de grãos de café verde obtidos por SFE	62

Figura 20 - ASR do rendimento (R) em função de P e T para o modelo de segunda ordem do DCCR 2 ²	63
Figura 21 - Frascos dos ensaios de 01 a 11 do óleo de grãos de café verde separado da cafeína, mais um frasco com os componentes cafeína + óleo, obtidos por SFE	64
Figura 22 - Diagrama de pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T no rendimento do óleo de grãos de café verde obtidos por SFE	65
Figura 23 - Diagrama de pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T no rendimento de cafeína obtida por SFE	66
Figura 24 - Diagrama de pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T na concentração de cafestol no óleo de grãos de café verde	67
Figura 25 - Diagrama de pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T na concentração de kahweol no óleo de grãos de café verde	68
Figura 26 - Curva de calibração que indica a absorbância do ácido gálico a 375 nm nas concentrações de 30, 20, 15, 10, 5, 2,5 e 1 ppm	70
Figura 27 - Diagrama de pareto das variáveis (T e P) estudadas para presença dos compostos fenólicos totais, do óleo de café verde	71
Figura 28 - ASR da CFT em função de P e T para o modelo de primeira ordem do DCCR 2 ²	72
Figura 29 - ASR da CFT em função de P e T para o modelo de segunda ordem do DCCR 2 ²	73
Figura 30 - Rendimento dos extratos obtidos dos grãos de café verde usando etanol (EtOH), metanol (MeOH) e água (H ₂ O) como solventes na PFE	76
Figura 31 - Concentração de diterpenos nos extratos obtidos dos grãos de café verde usando etanol (EtOH), metanol (MeOH) e água (H ₂ O) como solventes na PFE	77
Figura 32 - Razão entre as concentrações dos diterpenos cafestol e kahweol (C/K) nos extratos. resultados obtidos das amostras provenientes da PFE E SFE	77
Figura 33 - Curva de calibração que indica a absorbância do ácido gálico a 375 nm para diferentes concentrações (PFE)	78
Figura 34 - Diagrama de pareto, que demonstra o efeito das variáveis P e T no índice de refração do óleo de grãos de café verde obtidos a 25 e 40 ^o C	81
Figura 35 - Cromatograma dos extratos dos grãos de café verde. placa de sílica gel F ₂₅₄ (Merck, Düren, GE), fase móvel tolueno, acetato de etila, ácido fórmico (50:40:10, v:v:v), bandas de ácido clorogênico (CL), ácido cafeico (CAF), o cafestol (C), o kahweol (K), óleo de prensagem novo (ON), óleo de prensagem armazenado há dois anos (OV), uma amostra do óleo obtido por extração com CO ₂ supercrítico (SFE) e a fração insaponificável deste óleo (SAPO). Leituras no comprimento de onda de 254 nm e após aplicação do agente revelador fast blue salt	83
Figura 36 - Cromatograma de íons totais que mostra os picos dos ácidos graxos presentes no óleo de café verde obtido por SFE	84

Figura 37 - Curva padrão do ácido mirístico utilizada na quantificação da concentração de ácidos graxos presentes no óleo de grãos de café verde obtido por SFE 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições operacionais da pfe para uma vazão fixa de solvente (2 mL/min.)	39
Tabela 2. Níveis dos dois fatores (P e T) do DCCR no estudo da otimização da extração do óleo de grãos de café verde com CO ₂ supercrítico	42
Tabela 3. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis (reais e codificadas) no estudo do efeito da temperatura (T) e pressão (P) no rendimento e na composição do óleo de grãos de café verde, para a extração com CO ₂ supercrítico	42
Tabela 4. Massa de grãos de café verdes triturados retidos nas peneiras utilizados no cálculo da granulometria	53
Tabela 5. Densidade aparente da amostra de grãos de café verde	54
Tabela 6. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis no estudo do efeito da temperatura (T) e da pressão (P) no rendimento do óleo de café verde obtido por SFE, no seu índice de refração e na sua concentração de fenólicos totais (CFT) – variáveis reais	60
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento do óleo de grãos de café verde (R)	62
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para o rendimento do óleo de grãos de café verde (R)	63
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para a CFT no óleo de grãos de café verde	71
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para a CFT no óleo de grãos de café verde	73
Tabela 11. Condições experimentais da extração com fluido pressurizado (PFE), massa de extrato, concentração de diterpenos e concentração de compostos fenólicos totais para cada extrato	76
Tabela 12. Densidades (P), viscosidades dinâmicas (H) e coeficientes lineares em função da temperatura (T) para os óleos obtidos por prensagem e por extração com fluido supercrítico	80
Tabela 13. Composição em ácidos graxos de óleo de café verde	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Ácido Gálico
Ar	Argônio
ASE	Extração com Solvente Acelerado
ASR	Análise de Superfície de Resposta
C	Cafestol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CLAE	Cromatografia Líquida da Alta Eficiência
CO₂	Dióxido de Carbono
cv.	Cultivar
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
E	Porosidade
EM	Espectro de Massa
Eq. AG	Equivalente em Ácido Gálico
EtOH	Etanol
FID	Detector de Ionização de Chamas
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplado com Espectrometria de Massas
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
H₂	Hidrogênio
H₂O	Água
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IR	Índice de Refração
K	Kahweol
KOH	Hidróxido de Potássio
MeOH	Metanol
MTBE	Terc Butil Metil Éter
H	Viscosidade dinâmica

N₂	Nitrogênio
NaCO₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Potássio
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina e Polietilenoglicol
OP	Óleo de Prensagem
OPA	Óleo de Prensagem Antigo
OPN	Óleo de Prensagem Novo
ρ	Densidades
P	Pressão
PFE	Extração com Fluido Pressurizado
SC-CO₂	Dióxido de Carbono Supercrítico
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
T	Coefficiente Linear em função da Temperatura
T	Temperatura
te	Tempo de Espera
TIC	Cromatografia de Íons Totais
TLC	Cromatografia em Camada Delgada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Extração com Fluido Supercrítico (SFE)	24
2.2. Extração por Fluido Pressurizado (PFE)	26
2.3. Café	27
2.4. Compostos Bioativos do Café	30
2.4.1. Cafestol e kahweol	30
2.4.2. Cafeína	32
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Caracterização física da matéria-prima	35
4.2 Extração do óleo de café verde	37
4.2.1 Extração com Fluido Pressurizado (PFE)	38
4.2.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)	40
4.2.3 Determinação da Porosidade	42
4.2.3.1 Separação e purificação dos extratos obtidos por SFE	42
4.3 Caracterização do extrato	43
4.3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) nos extratos	43
4.3.2 Preparo do óleo de café verde para quantificação dos diterpenos	44
4.3.2.1 Saponificação a frio	45
4.3.2.2 Saponificação a quente	45
4.3.3 Quantificação dos diterpenos cafestol e kahweol	48
4.3.4 Determinação Experimental de Propriedades Físicas	48
4.3.4.1 Determinação de Densidade e Viscosidade	49
4.3.4.2 Determinação dos Índices de Refração	50
4.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	51
4.3.6 Determinação da composição em ácidos graxos presentes no óleo do café	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Caracterização da Matéria-Prima	53
5.1.1 Grãos de Café verde	53

5.1.2 Preparo da amostra de óleo de grãos de café verde para a quantificação dos diterpenos cafestol e kahweol	54
5.2 Quantificação de cafestol e kahweol	58
5.3 Extração com fluido supercrítico (SFE)	59
5.3.1 Rendimento total dos extratos obtidos por SFE	61
5.3.2 Rendimento do Óleo de grãos de café verde obtidos por SFE	64
5.3.3 Rendimento de cafeína	65
5.3.4 Rendimento de cafestol e kahweol	66
5.3.5 Determinação de compostos fenólicos totais nos extratos SFE	69
5.4 Extrações com fluido pressurizado	74
5.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais nos extratos PFE	78
5.5 Outras caracterizações físico-químicas dos extratos de grãos de café verde	79
5.5.1 Medida das propriedades físicas do óleo de café verde (Densidade e Viscosidade)	79
5.5.2 Índice de refração	81
5.5.3 Cromatografia em Camada Delgada	82
5.5.4 Determinação da composição em ácidos graxos presentes no óleo de café obtido por SFE	83
6 CONCLUSÕES	86
7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

Apesar de o café ser um item tradicionalmente importante na dieta do brasileiro, ele não teve a sua origem no Brasil. Registros indicam que ele é originário da antiga Abissínia, hoje Etiópia, país localizado na África Central (um pouco mais a leste). Foi na Arábia, entretanto, que a sua cultura foi desenvolvida em escala um pouco mais comercial. O nosso país produz dois tipos de café, a arábica e o conilon (robusta). O arábica representa uma produção de aproximadamente 75% da produção nacional, enquanto o conilon fica com os outros 25% restantes (QUEIROZ, 2008).

No período de novembro de 2011 a outubro de 2012, o consumo de café per capita no Brasil bateu recorde na última temporada e foi o maior registrado desde 1965. Neste período, o consumo per capita foi de 6,23 quilos de café em grão cru, ou 4,98 quilos de café torrado, o equivalente a quase 83 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 2,10% em relação ao período anterior. O consumo de café no país deverá crescer até 3% em 2013, o que elevaria o consumo interno para cerca de 21 milhões de sacas. Na indústria o faturamento deve ser da ordem de R\$ 8,7 bilhões e o crescimento de 24,3% sobre 2012 (CAFÉPOINT, 2013).

Os grãos de café verde contêm de 7 a 17% de lipídeos. Seu óleo é constituído basicamente de triacilgliceróis (75%) e ácidos graxos livres em proporção similar aos óleos vegetais comuns (FERRARI et al., 2010). A fração insaponificável do óleo de café verde é constituída de esteróis, tocoferóis, fosfatídeos, ceramidas entre outros componentes minoritários cujas atividades biológicas têm sido demonstradas.

As atividades biológicas atribuídas do óleo de café têm motivado investigações de sua composição química. Martín et al. (1998) avaliaram a concentração de ácido clorogênico, cafeína, trigonelina, ácidos graxos e polifenóis em 41 amostras de grãos de café arábica e robusta e constataram que as duas variedades apresentam diferentes concentrações em cafeína e ácidos graxos livres. A discriminação entre as duas espécies também foi analisada com relação à sua concentração de tocoferol. A avaliação da concentração destes componentes demonstra uma tendência para a investigação das atividades biológicas atribuídas ao óleo de café verde já que os tocoferóis (α , β , γ e σ) são compostos lipofílicos com propriedades altamente antioxidantes. Os resultados apresentados por Alves et al. (2009) mostram que a concentração de tocoferol pode também ser usada para diferenciar

as duas espécies, indicando que o café arábica possui maior concentração de tocoferóis em sua composição, especificamente β -tocoferol.

Óleos vegetais são amplamente usados em aplicações industriais, especificamente nos setores de alimentos, fármacos e cosméticos devido ao seu importante papel na formulação de produtos. Os lipídeos podem ser emolientes, emulsificantes, modificadores de viscosidade, agentes de propagação, dentre outras importantes funções, mas a aplicação específica de um óleo vegetal depende de sua composição.

O óleo de café verde é comercializado como matéria-prima para aplicações na indústria de cosméticos e farmacêuticos principalmente pela sua ação antioxidante (GREEN PLANT EXTRACTS, 2010; ELMIPANT, 2010). É um ingrediente indicado na manipulação de cremes e pomadas para o tratamento do envelhecimento da pele, pele seca e rachada, eczemas, psoríase e outras doenças relacionadas à pele (FROM NATURE WITH LOVE, 2010), ações atribuídas principalmente aos fitosteróis, compostos fenólicos como por exemplo o ácido clorogênico, cafeína, dentre outros.

O óleo de café verde é rico em compostos fenólicos, particularmente em ácidos clorogênicos (PERRONE et al., 2008) cujo alto potencial antioxidante foi demonstrado (NAIDU et al., 2008). Além desta importante atribuição, o óleo de café verde tem sido utilizado no tratamento do câncer como agente “quimioprotetor” (drogas que protegem os tecidos saudáveis dos efeitos tóxicos das drogas anticâncer). Vários componentes do óleo de café verde possuem esses efeitos, como a cafeína e polifenóis, incluindo ácidos clorogênicos (FERRAZANO et al., 2009), mas algumas evidências têm apontado os efeitos antitumor dos diterpenos presentes no óleo de café verde (MURIEL; ARAUZ, 2009).

Os principais constituintes diterpênicos do café verde são o cafestol e kahweol. Estes componentes, específicos do café, são difíceis de serem isolados separadamente, sendo o último altamente instável quando purificado. Desta forma, as propriedades biológicas destes compostos têm sido estudadas tradicionalmente utilizando uma mistura de ambos (CAVIN et al., 2002). Estudos controlados têm mostrado uma correlação positiva entre a ingestão de café e os níveis de colesterol no plasma sanguíneo. Estudos em humanos têm indicado que a queda da concentração de colesterol está relacionada com o tipo de preparo da bebida. Bebida a base de café não filtrado (estilo Turco) aumenta o colesterol no plasma, enquanto que na bebida filtrada este efeito é eliminado (AHOLA et al., 1991). Este comportamento é correlacionado com a quantidade de lipídeos ali presentes. O café não filtrado possui maior quantidade de lipídeos, os quais contêm cafestol e kahweol, que são

responsáveis pelo aumento de colesterol no plasma proveniente do café não filtrado (WEUSTEN-VAN DER WOUW et al., 1994).

Estudos epidemiológicos revelam uma associação inversa entre o consumo de café e o risco de alguns tipos de câncer. Desta forma, muitas pesquisas têm sido voltadas para a identificação dos componentes presentes no café que possam ser responsáveis por este efeito benéfico. Em modelos animais e em cultura de células humanas, os diterpenos cafestol e kahweol têm produzido uma ampla gama de efeitos bioquímicos que resultaram na redução na genotoxicidade de vários carcinomas (CAVIN et al., 2002).

O óleo de café verde ou torrado é industrialmente obtido por prensagem dos grãos, mas a extração de óleo de café pelo emprego de dióxido de carbono supercrítico (SFE) tem sido muito explorada. Industrialmente, a SFE tem sido aplicada aos grãos de café verde visando a descafeinação, mas resultados de algumas pesquisas demonstraram também o emprego desta tecnologia na obtenção de óleo de café verde rico em diterpenos (ARAÚJO; SANDI, 2006; AZEVEDO et al., 2008).

Os métodos de extração sólido-líquido mais amplamente usados na obtenção de extratos ricos em compostos bioativos podem ser divididos em “tradicionais” e “novos”. As técnicas tradicionais de extração sólido-líquido são essencialmente embasadas nos processos de difusão e osmose, incluindo extração Soxhlet, a qual ocorre sob ebulição e refluxo do solvente e, agitação ultrassônica (VANDENBURG et al., 1999).

Os mais novos métodos de extração têm sido: Extração com Fluido Supercrítico (SFE) e Extração por Fluido Pressurizado (PFE) (VANDENBURG et al., 1999). Os métodos tradicionais de extração são realizados à pressão atmosférica, enquanto nos novos métodos é possível alterar não só as condições de temperatura como também a pressão.

A Extração por Fluido Supercrítico (SFE) é uma técnica que vem sendo utilizada nos processos de separação para obtenção de uma infinidade de produtos naturais em diversos segmentos da indústria e da pesquisa, com vários estudos tendo sido feitos visando às aplicações industriais para essa tecnologia. SFE tem sido aplicada na produção industrial de café, chá e sementes de guaraná descafeinados (SALDANA et al., 2002a), na extração de aromas, nicotina, óleos essenciais, ácidos graxos e na purificação de produtos farmacêuticos, o que demonstra o quanto essa tecnologia é promissora dentro desses segmentos (SUTTER et al., 1994).

A SFE de matrizes sólidas consiste em duas etapas: extração e separação do extrato do solvente. Na extração, o solvente supercrítico escoia através de um leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os compostos desta matriz. O solvente é alimentado no extrator e

distribuído uniformemente no interior do leito fixo. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e passa pelo precipitador, onde finalmente os componentes são separados (BRUNNER, 1994).

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que apresenta propriedades P-T (pressão - temperatura) acima dos seus valores críticos. Enquanto abaixo do ponto crítico, uma substância pode existir como sólido, líquido ou vapor, acima do mesmo existe a região supercrítica na qual as variações das propriedades termodinâmicas podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (SANDLER, 1989; BRUNNER, 2005). Este fluido exibe propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um gás e de um líquido, o que aumenta sua função como solvente.

Extração com Fluido Pressurizado (PFE), conhecida também como Extração com Solvente Acelerada (Accelerated Solvent Extraction – ASE) é uma técnica de extração amplamente utilizada no preparo de amostras, nas quais se objetiva identificar a presença de toxinas. Pallaroni; Von Holtst (2003) utilizaram diferentes condições de temperatura, misturas de solventes e tempo na extração de zearalonona de milho. Esta micotoxina é produzida por microrganismos do gênero *Fusarium* e pode proporcionar aspectos negativos à saúde animal ou mesmo humanos. Esta técnica também tem sido utilizada no preparo de amostras para identificação de contaminantes presentes em peixes (VON HOLST et al., 2005; PARDO et al., 2007a) e determinação de acrilamida (componente com propriedades tóxicas) em café e cacau (PARDO et al., 2007b).

Esta técnica de extração tem sido direcionada para obtenção de extratos enriquecidos com componentes bioativos. Pol et al. (2007), por exemplo, estudaram o comportamento de dois solventes (água e metanol) na extração de esteviosídeos, substitutos naturais de açúcares presentes na *Stevia rebaudiana*. A extração de ginsenosídeos das raízes do ginseng americano (*Panaxquinquefolium*) também foi feita com diferentes tipos de solventes e os resultados comparativos mostraram que o método que empregou PFE proporcionou melhores rendimentos dos extratos (ZHANG et al., 2006). Na extração de ácidos triterpênicos de *Glycirrhiza glabra*, cujo licor das raízes tem propriedades antiinflamatória e antialérgica, a extração com PFE foi utilizada como metodologia de preparo de amostra rica nos compostos ativos (CLAUDE et al., 2008).

A PFE envolve extrações com solventes líquidos em condições de altas temperaturas e pressões. Nesta técnica aproveita-se da diminuição da viscosidade do solvente com o aumento da temperatura para que a solubilidade do soluto seja aumentada. Além disso, altas temperaturas provocam a quebra de interações entre o soluto e a matriz, facilitando a

difusão do soluto para a superfície desta matriz. Nesta técnica, rápidas taxas de extração são alcançáveis se comparadas às técnicas convencionais como extração com Soxhlet. A extração com solvente a alta pressão pode ser feita pelo método estático e dinâmico ou pela combinação dos dois. No método estático, a amostra é acondicionada em um extrator de aço inoxidável preenchido com o solvente de extração e dando continuidade à extração, o solvente é purgado com N_2 em um coletor. No método dinâmico o solvente é continuamente bombeado através da amostra tendo como desvantagem o uso de grandes quantidades de solvente e conseqüente diluição do extrato. Um dessecante tal como sulfato de sódio, terra diatomácea ou celulose, pode ser adicionado diretamente na célula de extração ou, qualquer outro material adsorvente pode ser usado para que seja feita (no próprio extrator) a clarificação do extrato (RIDGWAY et al., 2007). Uma infinidade de solventes orgânicos (ou mistura deles) tem sido utilizada nesta técnica de extração como, por exemplo (mas não restrito a), hexano, acetona, metanol, acetonitrila e água.

Neste trabalho, a SFE e a PFE foram empregadas como estudo de inovação tecnológica na obtenção do óleo de grãos de café verde ricos em diterpenos (cafestol e kahweol). Estes métodos de extração tiveram suas variáveis de processo variadas com intuito de obter óleo de grãos café verde ricos em diterpenos (cafestol e kahweol), e comparar a concentração destes componentes com aqueles presentes no óleo obtido pelo método convencional (prensagem dos grãos). Análises químicas e físicas aplicadas e desenvolvidas foram às ferramentas básicas no levantamento de dados dos processos, mostrando as classes de compostos presentes, a identificação e a quantificação dos diterpenos com foco no enriquecimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

Um fluido supercrítico é definido como qualquer substância cuja temperatura e pressão estejam acima do ponto crítico (Figura 1). A mudança de fase de uma substância do estado líquido ou gasoso para o supercrítico ocorre de forma contínua e o estado é alcançado pelo aumento simultâneo da temperatura e da pressão de uma substância de forma a modificar o estado de agregação entre suas moléculas. Esta alteração produz uma modificação na densidade da substância e, como consequência, de seu poder de solubilização e seu comportamento químico (LANÇAS, 2002).

Figura 1 - Diagrama de fases para o dióxido de carbono (Fonte: SANDERS, 1993).

Segundo Hung; Unger (1994), o processo de extração por fluido supercrítico consiste essencialmente de duas etapas, o fracionamento ou a extração propriamente dita e a separação. Neste processo, a matriz vegetal entra em contato com o fluido no extrator e o material pode ser extraído por um sistema contínuo ou em batelada, também denominados dinâmico ou estático. No método dinâmico, a separação ou coleta é contínua e ocorre pela

expansão do fluido saturado através de uma válvula de redução de pressão. A queda de pressão torna o soluto insolúvel e ele se precipita no coletor. O solvente pode ser recirculado ou não.

O dióxido de carbono (CO_2) em seu estado supercrítico, assim como a maioria dos fluidos supercríticos, tem a densidade próxima à de um líquido, baixa viscosidade e difusividade. Estas características, intermediárias a de um gás e um líquido, lhe confere excelentes qualidades de extração (FILIPPIS, 2011). O CO_2 , por possuir baixa temperatura (31°C) e pressão críticas (≈ 74 bar), permite que baixos valores de temperatura sejam empregados no processo de extração. Além disso, nas condições ambientes, dissipa-se totalmente no ambiente após a descompressão durante a coleta, pode ser recuperado ao sistema e é encontrado em abundância no ar atmosférico (MAUL, 2000).

O CO_2 tem sido muito comumente empregado como fluido supercrítico na indústria de alimentos e de aromas também por ser uma substância com baixa toxicidade, não carcinogênico, não inflamável, não ser prejudicial à saúde humana quando inalado a baixas concentrações, por ser facilmente removido do material extraído e ecologicamente correto (MUKHOPADHYAY, 2000; DANH et al., 2009).

Devido a estas características, o CO_2 supercrítico quando usado como solvente propicia maior atividade biológica em seus extratos, e isso se dá devido principalmente ao fato de que em processos convencionais de extração são empregados solventes orgânicos em temperaturas mais elevadas que podem provocar a alteração dos compostos especialmente durante a recuperação do solvente (MESOMO, 2013).

O CO_2 supercrítico tem sido empregado na extração de diversos tipos de óleos e extratos de vegetais, como o óleo de gengibre (MESOMO, 2013), óleo de semente de canola (PEDERSSETTI et al., 2011), extrato de semente de pitanga (SANTOS, 2012), extração da semente de gergilim (CORSO et al., 2010), óleo de cravo da Índia, óleo de eucalipto (RODRIGUES et al., 2002), extração de lúpulo, extração de nicotina, óleos residuais de rosas, extração de fragrâncias, extração de aromas, extração de óleo de milho, extração de corantes de pimenta (SUTTER et al., 1994), a extração de lipídeos de cianobactérias (MENDES et al., 2006), a extração de óleos essenciais de plantas (MACHADO et al., 1993; DELLA PORTA et al., 1999), a extração de licopeno de tomate (CADONI et al., 2000), a descafeinização do café (ZOSEL, 1978) além da descafeinização de folhas de chá (BRUNNER, 1994) dentre outros.

Um dos óleos extraídos por SFE é o óleo de café verde, que possui grande valor comercial na área química e farmacêutica. No entanto os efeitos negativos gerados pelo

excesso de cafeína levaram a um aumento do consumo de café descafeinado, gerando o desenvolvimento também de vários processos que removam este alcalóide de grãos de café. Entre estes processos esta o emprego de dióxido carbono em condições supercríticas (RAMALAKSHMI; RAGHAVAN, 1999).

Os métodos mais comuns para a extração do óleo dos grãos de café incluem extração com solvente orgânico com hexano usando Soxhlet durante várias horas. No entanto, este procedimento possui uma desvantagem importante: o tempo de extração é muito longo, consumindo grandes quantidades de solvente. Algumas pesquisas têm demonstrado vantagem para a extração supercrítica do óleo de grãos de café e para obtenção de aroma do café (GOPALAKRISHNAN, 1990; LOPEZ-FONTAL; CASTANO-CASTRILON, 1999; ROSELIUS et al., 1982; SARRAZIN et al., 2000). De acordo com Roselius et al. (1982), a diferença de temperatura das extrações do óleo influenciam na sua cor bem como no aroma, fazendo do CO₂ supercrítico mais uma vez um método de excelência na obtenção dos produtos oriundos do café.

2.2 Extração por Fluido Pressurizado (PFE)

A utilização de um fluido pressurizado para a obtenção de extratos é conhecida por ser um método rápido e eficiente para a extração de compostos a partir de fontes vegetais. Solventes pressurizados são de particular interesse, uma vez que as suas propriedades físico-químicas podem ser ajustadas por meio da alteração da pressão e da temperatura, o que permite o controle do poder de solubilização e da seletividade do solvente durante o processo (PRONYK; MAZZA, 2009).

Um fluido pressurizado é aquecido a altas pressões e temperaturas abaixo das críticas. Esta técnica permite que o solvente possa existir no estado líquido mesmo quando estiver com temperatura superior à sua temperatura de ebulição, devido à ação de pressões elevadas. Por exemplo, para o etanol ou a água, quando valores de pressão por volta de 200 bar e temperaturas elevadas (até 200 °C) são empregadas, este fluido se mantém no estado líquido, apesar da temperatura estar acima da sua temperatura de ebulição nas condições atmosféricas. A utilização destes fluidos nestas condições em processos extrativos permite uma melhora da solubilidade dos compostos a serem extraídos, bem como uma aceleração da cinética de dessorção destes compostos da matriz vegetal (RICHTER et al., 1997).

Na PFE, a elevada temperatura de extração aumenta a capacidade de solubilização do solvente e o emprego de altas pressões acelera a difusão nos poros da matriz já que a viscosidade do solvente é diminuída. Este fato causa uma maior penetração do solvente na matriz, aumentando sua capacidade de extração (LOPEZ-AVILA, 1999).

O método de extração com fluido pressurizado é semelhante à extração Soxhlet, exceto o fato de que os solventes são usados perto de sua região supercrítica, onde eles têm propriedades que possibilitam uma maior extração. Devido às suas propriedades, ETA técnica permite uma alta eficiência de extração com um menor volume de solvente (15 - 40 mL) que as extrações convencionais (Soxhlet, etc.) e um curto tempo de extração (15 - 20 min). A PFE é também conhecida como "Accelerated Solvent Extraction" (ASE) (RICHTER et al., 1996).

A PFE começou a ser utilizada na análise de contaminantes ambientais (herbicidas, pesticidas, hidrocarbonetos, etc.) em solos, sedimentos e tecidos animais, mas agora tem sido frequentemente usada para alimentos (carne, sementes, rações, etc.), produtos farmacêuticos e várias outras amostras biológicas. Esta técnica é adequada para substituir a extração de Folch para oxisteróis nos alimentos (BOSELLI et al., 2001) e de carotenóides nas plantas e de muitos outros compostos químicos (DENERY et al., 2004).

A PFE não tem uma ampla aplicação como ferramenta de rotina na extração de produtos naturais, mas ela é importante, pois ela utiliza menos solvente em um curto período de tempo, é livre de oxigênio e luz ambiente, tendo portanto um grande potencial para ser uma ferramenta poderosa na indústria (DODDS et al., 2004).

2.3 Café

O cafeeiro pertence ao grupo das plantas Fanerógamas, classe Angiosperma, subclasse Dicotiledôneas, ordem Rubiales, família das *Rubiaceas*, tribo *Coffeae*, subtribo *Coffeinae* e gênero *Coffea* (MATIELLO et al., 2005).

De acordo com Matiello (2005) a renovação de cafezais, promovida entre a década de 1970 e 1980 indicava o plantio de 2 cultivares (cv.) de café arábica, o Mundo Novo e Catuaí, em suas diversas linhagens que passaram a dominar a lavoura cafeeira no Brasil, com praticamente 100% da área plantada.

O café arábica é a espécie mais antiga que se conhece e é cultivada em regiões montanhosas, com altitude ótima entre 1.000 – 2.000 m e temperatura entre 15 – 24 °C. É uma espécie que possui certa dificuldade de ser cultivada, sendo mais sensível a doenças,

pestes, geadas, ao calor e à umidade, e prefere as zonas de elevada altitude para seu desenvolvimento (ABIC, 2013; EMBRAPA, 2013). É uma planta que ocorre em regiões tropicais do planeta, entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, podendo variar muito em aparência e quantidade de compostos químicos de acordo com a região (SIVETZ; DESROSIER, 1979; BANKS et al., 1999).

Os grãos de café arábica, que geralmente são maiores que de robusta, produzem uma bebida mais delicada e com aroma acidífero, representando aproximadamente 70% do café produzido no mundo. A espécie e a variedade do café influenciam fortemente na sua composição química, mas outros fatores, como as condições de cultivo, o grau de maturação e as condições de armazenamento, também devem ser considerados (SMITH, 1989).

Figura 2 - Pé de café, *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo (Fonte: PEREIRA, 2013).

O cafeeiro da cv. Catuaí Amarelo (Figura 2) é resultante do cruzamento artificial de cafeeiros selecionados de Caturra Amarelo e Mundo Novo, apresentando como características principais, vantajosas, o seu porte baixo, que facilita o manejo da plantação, e a alta capacidade produtiva das plantas. Apresenta facilidades na realização da colheita manual e mecânica. Entretanto, apresenta maior susceptibilidade à doença da ferrugem do cafeeiro, maturação mais tardia e mais desuniforme do que a Mundo Novo. Os compostos fenólicos presentes no café contribuem sobremaneira para o sabor e para a atividade antioxidante do mesmo (MATIELLO et al., 2005).

O café é explorado tradicionalmente como bebida, mas nos últimos tempos o óleo de café verde ou torrado e os produtos derivados destes grãos têm sido explorados comercialmente.

A industrialização de oleaginosas é uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro pela utilização dos seus produtos na formulação de alimentos, de cosméticos e de fármacos (LAGO; FREITAS, 2006).

O óleo de café pode ser extraído usando diferentes solventes, resultando em produtos com diferentes quantidades de aromáticos e ceras. Convencionalmente, o óleo de café industrializado é obtido pelo processo de prensagem dos grãos em expeller. Porém, nos últimos anos novas técnicas para extração do óleo sem sido avaliadas, em escala laboratorial, visando ao aumento dos compostos de interesse e no rendimento do processo. É o caso da extração supercrítica e extração com etanol comercial (FREITAS; LAGO, 2001; OLIVEIRA et al., 2001).

O óleo de café verde tem sido utilizado na indústria de cosméticos por causa da propriedade emoliente fornecida pelo ácido graxo e a sua capacidade de bloquear a luz solar prejudicial à pele do ser humano (ALVAREZ; RODRIGUEZ, 2000; GROLLIER; PLESSIS, 1988; PELLE, 1999). Óleo de café torrado também tem sido amplamente utilizado como uma fonte de sabor em alimentos e cosméticos. Além disso, uma redução nos níveis de diterpenos no óleo de café torrado aumenta significativamente a sua estabilidade e do perfil sensorial, diminuindo o seu efeito de hipercolesterolemia (BAK; GROBEE, 1989; KOLLING -SPEER et al., 1999).

O café é uma mistura complexa de componentes químicos e pode conter mais que mil produtos químicos diferentes, incluindo carboidratos, lipídeos, compostos nitrogenados, vitaminas, minerais, alcalóides e compostos fenólicos (SPILLER, 1998). A maioria dos estudos com café são sobre os efeitos na saúde dos seres humanos (WILLETT et al., 1996). O consumo de café tem sido associado com a redução do risco de várias doenças crônicas (ASCHERIO et al., 2001; SALAZAR-MATINEZ et al., 2004).

Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de antioxidantes naturais. Eles são largamente encontrados em frutos, legumes, grãos, sementes, folhas, raízes, cascas, dentre outros. Estes constituintes são capazes de retardar o envelhecimento e o aparecimento de doenças, e até mesmo de impedi-las (SÄÄKSJÄRVI et al., 2007; KAWACHI et al., 1996).

Ao longo dos anos, os compostos fenólicos tem se tornado de grande importância pelas suas características antioxidantes. Uma das principais classes de compostos fenólicos

é a dos ácidos hidroxicinâmicos, dentre os quais os ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico se destacam. Eles podem ser encontrados no reino vegetal sob a forma livre ou esterificada e esse grupo de ésteres é chamado de ácidos clorogênicos (CGA), muito presentes nos grãos de café verde (FARAH et al., 2002).

Além destes compostos fenólicos, o café é um alimento que contém componentes não-nutricionais que podem ter efeitos benéficos para a saúde, tais como anti-inflamatórios e compostos com propriedades anti-cancerígenas (BELLISLE et al., 1998). O kahweol e seu derivado, o cafestol, são diterpenos encontrados em quantidades consideráveis em grãos de café e, na bebida não filtrada, por exemplo, nos cafés de estilo turco ou escandinavo (GROSS et al., 1997). Estes dois diterpenos têm demonstrado ter tanto propriedades adversas como quimio-protetoras (DE ROOS et al., 1998.; CAVIN et al., 2002). Ambos aumentam o nível de colesterol no sangue em seres humanos e em animais (DE ROOS et al., 1998). No entanto, estudos em animais demonstraram que kahweol e cafestol podem proteger contra os efeitos cancerígenos ainda não conhecidos (HUBER et al., 1997; CAVIN et al., 2001).

Existe uma vasta literatura que relata o potencial dos compostos bioativos ou dos componentes funcionais na ação contra os males da hipertensão, doenças cardiovasculares, câncer entre outras (KRIS-ETHERTON et al., 2002; KAWACHI et al., 1996). Além da cafeína, o café apresenta outras substâncias bioativas como a trigonelina, compostos fenólicos (ácidos clorogênicos) e compostos resultantes da reação de Maillard, como as melanoidinas (PARRAS et al., 2007; MONTEIRO; TRUGO, 2005) e os diterpenos que serão explanados no próximo item.

2.4 Compostos Bioativos do Café

2.4.1 Cafestol e kahweol

O kahweol e cafestol são classificados como alcoóis de diterpeno pentacíclico baseados na fusão de unidades de isopreno (C5) para formar o esqueleto de caurano de 20 carbonos. A diferença estrutural entre ambos é pequena. O kahweol mostra uma dupla ligação entre os carbonos 1 e 2 (Figura 3), e esta variação resulta em um espectro com pico de absorção em diferente comprimento de onda (DIAS, 2009).

O cafestol e kahweol são diterpenos produzidos apenas por plantas do gênero *Coffea* e a quantidade destes entre as espécies são diferentes. O cafestol é encontrado em ambos *C.*

arabica e *C. canephora*, e o kahweol tem sido descrito como mais específico para *C. arabica* (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006, URGERT et al., 1995 e ROOS et al., 1997).

Na literatura encontra-se uma ampla faixa de concentração destes diterpenos nos frutos frescos de café inteiros e a origem geográfica dessas amostras de *C. canephora* tem mostrado influência significativa nesta composição (DIAS, 2009).

Figura 3 - Cafestol, kahweol e a molécula 16-O-methylcafestol (Fonte: KURZROCK; SPEER, 2001).

O cafestol (C) e o kahweol (K) possuem instabilidade a temperaturas elevadas. Embora seus pontos de fusão sejam 156 – 158 °C e 88 – 90 °C, respectivamente, ambos devem ser mantidos a -20 °C para uma melhor conservação destes compostos termosensíveis (CHAPEAU, 2010).

Recentemente, a atenção tem sido focada sobre os efeitos biológicos destes diterpenos, pois os mecanismos responsáveis pelos efeitos quimioprotetores de C + K ainda não são completamente conhecidos. Trabalhos recentes têm identificado que C + K possui efeitos preventivos contra diversos tipos de câncer que podem ser atribuídos a ambos devido a uma inibição da bio-ativação e estimulação da desintoxicação (MURIEL; ARAUZ, 2010).

A estes dois compostos, além de vários outros presentes no café, têm sido atribuídos efeitos quimioprotetores. A cafeína e os polifenóis, incluindo os ácidos clorogênicos e os produtos de sua degradação, são considerados potencialmente responsáveis pelos efeitos quimioprotetores do café (SCHILTER et al., 2001). Algumas evidências mostram também que o efeito anti-tumorgênico pode ser devido à presença destes diterpenos, já que os constituintes principais da fração testada na análise deste efeito foram identificados como sendo os diterpenos cafestol e kahweol (C + K) (GROSS et al., 1997).

Estes componentes específicos do café são muito difíceis de isolar, pois o kahweol é altamente instável quando purificado. Portanto, as propriedades biológicas destes compostos têm sido estudadas utilizando tradicionalmente uma mistura de ambos (CAVIN et al., 2002).

O cafestol e kahweol, além de quimioprotetores também são antioxidantes, antiinflamatórios e possuem efeitos hepatoprotetores (OIGMAN et al., 2012). Além disso, as evidências epidemiológicas sugerem que o consumo de café com elevado nível de kahweol está associada com uma taxa menor de câncer do cólon, um dos tipos de câncer mais comuns em todo o mundo (GIOVANNUCCI, 1998).

2.4.2 Cafeína

A cafeína (1, 3,7-trimetilxantina) é um derivado da xantina, que esta quimicamente relacionada com outras xantinas como a teofilina (1,3-dimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina) (Figura 4). Elas se diferenciam pela potência de suas ações farmacológicas sobre o sistema nervoso central (SNC) (GEORGE, 2000).

Figura 4 - Estrutura química da cafeína e metilxantinas relacionadas (Fonte: ALTIMARI, 2006).

A cafeína é um alcalóide presente em diferentes concentrações em cafés (HIGDON; FREI, 2006). Ela também é encontrada em uma grande variedade de bebidas, como chás e refrigerantes. É encontrada em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea* sp.) e nas folhas de chá verde (*Camilla sinensis*) *in natura* (CAMARGO; TOLEDO, 1998). A cafeína pode ser encontrada também em outros produtos vegetais, como o cacau

(*Theobroma cocoa*), no guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva-mate (*Ilex paraguayensis*) (BUCCI, 2000).

O teor de cafeína na bebida a base de café é influenciado pelo tipo do produto (podendo ser torrado ou instantâneo, descafeinado ou comum) e pelo processo utilizado no seu preparo (CAMARGO; TOLEDO, 1998). O teor deste alcalóide depende do tipo de grão e de sua forma de cultivo, além das condições de processamento, como no processo de torração (OESTREICH-JANZEN, 2010).

Pesquisas realizadas por Camargo; Toledo (1998) no preparo da bebida, mostraram que a fervura das amostras de café influencia a quantidade de cafeína extraída, que na bebida fervida chega a ser superior, entre 19 e 30%. Os teores de cafeína do café expresso são relativamente maiores, porque neste tipo de preparo a quantidade de pó utilizada é praticamente ao dobro da necessária para o café tipo caseiro.

Segundo Leite (2009) a diferença na quantidade de cafeína na bebida se deve também às diferentes combinações dos grãos (os *blends*) utilizados pelas indústrias de café. A cafeína possui uma grande estabilidade térmica, portanto as perdas na torração são mínimas. Para um mesmo grão, produzido nas mesmas condições, a concentração de cafeína é variável. Por exemplo, para o café (blend arábica + robusta) essa concentração pode variar de 130 a 282 mg/240 mL de café (HIGDON; FREI, 2006). O café arábica pode conter de 36 a 112 mg/100 mL de cafeína/café, enquanto que no robusta esta concentração pode variar de 56 a 203 mg/100 mL (OESTREICH-JANZEN, 2010).

Em alguns medicamentos, a cafeína é encontrada como agente antagonizador do efeito calmante de certos fármacos (SPRIET, 1995; SINCLAIR; GEIGER, 2000). Esta função antagonista nos receptores de adenosina A1 e A2A, estimulam o sistema nervoso central além de provocar efeitos como aumento da atenção, aumento da pressão sanguínea e aumento do metabolismo (NAWROT et al., 2003) além de estar relacionada à efeitos diuréticos (BRENELLI, 2003), melhora do humor, e redução dos sintomas associados com a doença de Parkinson (HECKMAN et al., 2010).

No entanto, a cafeína também tem alguns efeitos negativos, pois o consumo em excesso causa insônia e dependência leve, o que fez com que a indústria de café descafeinado se desenvolva. Atualmente, estima-se que de 10 a 15% da quantidade total de café consumido no mundo seja descafeinado (DUFRENE; RUBINSTEIN, 2010), e os genótipos de café naturalmente descafeinados também têm sido desenvolvidos (SILVAROLLA et al., 2004). Altas doses de cafeína também causam ansiedade, agitação, tensão, nervosismo, e agitação psicomotora (DALY; FREDHOLM, 1998).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar novos métodos de extração para obtenção de óleo de grãos de café verde oriundos do Brasil ricos em diterpenos cafestol e kahweol. Este objetivo surgiu do fato dos produtores de óleo de café verde brasileiros desconhecerem a possibilidade de emprego de novos processos de extração que possam enriquecer estes extratos.

Embora o Brasil seja o maior produtor e exportador de grãos de café verde no mundo (USDA, 2008), o óleo proveniente destes grãos, é rudimentarmente, obtido por prensagem. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram estudar a composição e as propriedades físicas do óleo de grãos de café verde obtido por novos processos de extração, estudar parâmetros (diferentes temperatura e pressões) nestes novos processos, a fim de identificar as melhores condições de extração dos diterpenos de interesse e comparar as características do óleo com aquele obtido pelo método convencional de prensagem dos grãos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização física da matéria-prima

Foram utilizados grãos verde de café Arábica (*Coffea arabica*), cultivar (cv.) Catuai Amarelo (Figura 5), produzidos na região de Jaú, Torrinha e Dois Córregos, São Paulo/Brasil (22°25'34"S e 48°10'09"W, 802 m acima do nível do mar e a uma temperatura média de 22 °C).

Os frutos foram selecionados e a colheita foi feita em junho de 2010 para óleo de prensagem e em junho de 2011 para os grãos utilizados na SFE e PFE. Estes foram lavados e secos em um pátio no sol. De um mesmo lote de grãos verdes e secos naturalmente pelos pequenos produtores foram retiradas as amostras para as extrações do óleo por PFE (na França) e SFE (no Brasil). O óleo oriundo da prensagem destes mesmos grãos por estes produtores também foi utilizado como matéria-prima neste trabalho. Uma amostra de óleo de prensagem foi obtida em 2010 (óleo velho - OV) e a outra mais recentemente, no final de 2011 (óleo novo - ON). As mesmas análises de composição química e propriedades físicas foram realizadas em todos os extratos.

Figura 5 - Grãos verdes e grãos triturados.

Os grãos secos ao sol, fornecidos pelos produtores, foram novamente submetidos à secagem em estufa com circulação de ar forçada à 50 °C por 48 h, porque após recebimento, estes grãos foram refrigerados e esta refrigeração gerou cristais de gelo que quando derretidos umedeceram os grãos. A umidade dos grãos foi determinada pelo método gravimétrico (AOAC, 1995). Os grãos foram triturados duas vezes, primeiro grosseiramente e depois finamente (Figura 5) em um moinho tipo martelo (Buhler-Miag, Braunschweig, GE). A densidade aparente dos grãos triturados foi determinada empiricamente através da relação entre massa dos grãos de café verde triturados acondicionados no leito fixo com seus respectivos volumes. As massas de grãos de café verde triturado acondicionada no extrator (SFE) e no reator (PFE) foram medidas 10 vezes, o valor médio foi fixo e utilizado em todos os experimentos. A densidade real ou massa específica das grãos triturados, foi medida em picnômetro de gás hélio (Quantachrome Ultrapyc 1200e, FL, USA) pela Central Analítica- IQ/UNICAMP.

Para a determinação da granulometria dos grãos de café verdes triturados, uma massa (30 g para a PFE e 88,6 g para a SFE) foi acondicionada em um jogo de seis peneiras da série padrão Tyler (Figura 6), com agitação durante 5 min., suficiente para promover a distribuição das partículas. O diâmetro médio foi calculado pela relação apresentada na equação 1.

Figura 6 - Jogo de seis peneiras da série padrão Tyler e grãos de café verde triturados.

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{j=1}^n (w_i \log \overline{d_i})}{\sum_{j=1}^n w_i} \right] \quad [1]$$

onde, $d_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$

d_i : abertura nominal da i-ésima peneira (mm);

d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm);

w_i : massa do material retido na i-ésima peneira.

4.2 Extração do óleo de café verde

Neste estudo, o óleo de grãos de café verde foi obtido por dois distintos processos de extração que empregaram altas pressões. Para o processo que emprega fluido supercrítico (SFE) a pressão variou de 179,5 à 325,5 bar e no processo que emprega fluido pressurizado (PFE) a pressão variou entre 2 a 7 bar. Em ambos os processos de extração houve o cuidado em escolher solventes seguros para a saúde (Generally Recognized as Safe - GRAS) como etanol, água e dióxido de carbono supercrítico.

Na PFE utilizou-se etanol (Merck, Darmstadt, GE), metanol (Carlo Erba, Val de Reuil, FRA) e água desmineralizada (Elga UHQ system, Millipore, Antony, FR). Na SFE empregou-se CO₂ com 99% de pureza (Oxinitro Gases e Equipamentos Ltda., Pirassununga, BR).

Estes dois métodos de extração foram usados visando obter extratos/óleos de grãos de café verde ricos nos seus dois principais diterpenos, cafestol e kahweol.

Ainda, os extratos obtidos pelo uso de PFE e SFE foram comparados com aquele obtido por método de prensagem dos grãos fornecidos pelos produtores de café.

O processo de prensagem consiste basicamente na submissão dos grãos de café verde triturados em um extrator de óleo por prensagem com antecedente injeção de vapor nos grãos. Após a prensagem o óleo sofre um processo simples de filtragem em um filtro-prensa para obtenção de óleo de grãos de café verde bruto (OLIVEIRA et al., 2005).

4.2.1 Extração com Fluido Pressurizado (PFE)

A extração com fluido pressurizado (PFE) foi realizada no laboratório de processos (Laboratoire de Procédés) do IUT/Université d'Orléans (França). Para esta extração utilizou-se um equipamento que opera com um volume máximo de 100 mL, projetado para minimizar as perdas de pressão causadas pela matriz no reator. Uma bomba de HPLC foi utilizada com uma vazão de solvente fixa em 2 mL/min. A temperatura do extrator foi controlada pelo uso de uma placa com agitação e aquecimento controlado por meio de termopares com sensores internos. A tubulação de saída do reator foi resfriada em um banho de gelo, a fim de evitar a formação de vapor. O diagrama do sistema de PFE é mostrado na Figura 7. A PFE foi feita em um circuito aberto (Figura 7), onde o solvente foi bombeado continuamente para o reator e coletado na saída do sistema.

Figura 7 - Diagrama esquemático do sistema de extração com fluido pressurizado (PFE).

O procedimento geral utilizado para a PFE de grãos de café verde consistiu em pesar 30g de grãos triturados acondicionados no extrator de leito fixo já embebido com uma

massa de solvente (etanol ou metanol ou água) resultando em aproximadamente 60 g ($\approx$ 1:1). O aquecimento foi então ativado quando a temperatura atingiu o valor de ajuste denominado tempo de espera (te), período este previsto antes do início do bombeamento. O bombeamento do solvente através da matriz acondicionada no reator foi interrompido quando a mistura (solvente/soluto) tinha aparência equivalente ao solvente de entrada, livre de pigmentação. Para isso foi estabelecida uma medida de refração visual visando estabelecer um limite de detecção quantitativa de extrato no solvente de saída, mas pequenas variações não permitiram interromper a extração. Desta maneira, a observação visual também foi considerada. Esta forma de detecção, na saída do extrator PFE pode ser considerada como um tema de estudo futuro e uma detecção UV poderia ser utilizada como meio de indicar o esgotamento da matriz neste processo de extração.

O solvente foi removido do extrato por evaporação, utilizando um rotaevaporador (BÜCHI H200 Labortechnik, AG com banho de aquecimento B490, Flawil, SWI) à 70 °C sob vácuo de 78 bar. A diluição do extrato concentrado (20 mL) em metanol (10 mL) indicou uma separação de três fases, uma fase metanólica, uma lípida e outra composta por um sólido branco (cafeína). Estas fases foram separadas por centrifugação.

No processo de separação por centrifugação utilizou-se uma centrífuga (ThermoJouan BR4i, Thermo FisherScientific, Waltham, USA) a 3.000 rpm, 25°C por 5 min.

Na PFE foram estudadas as condições operacionais de temperatura (T) e pressão (P) para diferentes solventes (etanol, metanol e água). No estudo da variação da temperatura empregaram-se 84 °C e 100 °C e as pressões utilizadas variaram de 2 à 7 bar (Tabela 1). Estas condições foram escolhidas devido às limitações do equipamento, já que foram aquelas que propiciaram a operação do PFE utilizado sem impedimento da extração contínua, já que foram feitas em circuito aberto (Figura 7).

Tabela 1. Condições operacionais da PFE para uma vazão fixa de solvente (2 mL/min.).

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
T (°C)	84	100	84	84	100	100	100	100
P (bar)*	2/3-6/7	5/6-3	3-4	4-2	4-3	5-4	5-4	2-3
Solvente	EtOH	EtOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	H ₂ O
te (min.)	20	0	0	20	0	20	20	20
Café verde (g)	30	30	30,79	30,28	30,16	30,03	30,02	30,16

*Lê-se os valores de P, no início-final do processo.

4.2.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

No LTAPPN/FZEA/USP (Brasil), os extratos foram obtidos pelo emprego de extração com fluido supercrítico (SFE). Assim como na PFE, na SFE os grãos triturados foram acondicionados a um extrator de leito fixo.

Na SFE utilizou-se o CO₂ supercrítico como solvente. O equipamento empregado foi um sistema de extração supercrítica TharSCF (Waters, Milford, USA), cujo esquema de funcionamento pode ser observado nas Figuras 8 e 9C. Embora o referido equipamento possa empregar co-solvente no processo de extração, especificamente neste estudo foi utilizado somente o CO₂ como solvente.

Figura 8 - Esquema representativo do processo de extração com fluido supercrítico (SFE), (Fonte: WATERS, 2011).

O processo de extração supercrítica consiste em promover o contato entre a matriz vegetal e o CO₂ supercrítico no extrator (Figura 9C) em condições preestabelecidas de pressão (P) e temperatura (T). O controle de pressão é feito pelo acionamento da bomba de alta pressão e pelo controle de válvulas de regulagem micrométrica de saída do sistema (*back pressure*). O extrato (Figura 9D), separado do gás, é continuamente coletado em uma câmara de coleta. Especificamente para este experimento, empregou-se um frasco coletor de volume menor que a câmara de coleta, imerso em banho de gelo. O volume do CO₂ é obtido a partir da vazão do mesmo no bombeamento. O sistema de extração é automático e sua operação e o controle de variáveis operacionais (T, P, vazão do CO₂ e do co-solvente) ocorre via software (Process Suit for SFE, Thar, Waters, Milford, USA).

Figura 9 - Unidade extratora que opera com fluido supercrítico TharSCF, (A) Foto dos grãos de café já triturados; (B) Extrator de leito fixo; (C) Equipamento e (D) Frasco coletor com extrato.

As extrações com CO_2 supercrítico foram realizadas em condições de temperatura e pressão de 66 a 94 °C e 179 a 325 bar respectivamente. Em todos os experimentos, antecedendo a extração dinâmica, o CO_2 nas condições pré-estabelecidas de P e T permaneceu em contato com os grãos de café verde triturados durante um período estático de 20 min. Tanto o tempo de extração dinâmica (6 h) quanto o tempo estático de contato foram definidos em testes preliminares. Para todos os ensaios foram utilizados aproximadamente 88,6 g de grãos de café verde triturado. Variando as condições experimentais de extração, analisou-se como respostas os rendimentos da extração calculados pela relação da massa de extrato e a massa de grãos de café verde secos e triturados acondicionados no extrator, a concentração de diterpenos neste óleo, a concentração de compostos fenólicos e algumas propriedades físicas.

No estudo da otimização do processo de SFE, foram estudadas variações nos valores de P e T segundo um delineamento composto central rotacional (DCCR) para estas duas variáveis, com 4 pontos estrela e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis das variáveis P e T estudados estão apresentados na Tabela 2 e a matriz do DCCR com valores reais e codificados, na Tabela 3.

Tabela 2. Níveis dos dois fatores (P e T) do DCCR no estudo da otimização da extração do óleo de grãos de café verde com CO₂ supercrítico.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
P (bar)	179,5	200	250	300	325,5
T (°C)	65,9	70	80	90	94,1

Tabela 3. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis (reais e codificadas) no estudo do efeito da Temperatura (T) e Pressão (P) no rendimento e na composição do óleo de grãos de café verde, para a extração com CO₂ supercrítico.

Ensaio	T	P	T (°C)	P (bar)
	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
1	1	1	90	300
2	1	-1	90	200
3	-1	1	70	300
4	-1	-1	70	200
5*	0	0	80	250
6*	0	0	80	250
7*	0	0	80	250
8	+α	0	94,1	250
9	-α	0	65,9	250
10	0	+α	80	325,5
11	0	-α	80	179,5

* Pontos centrais.

4.2.3 Determinação da Porosidade

A porosidade de leito fixo foi determinada pela relação entre a densidade aparente e real, demonstrada na equação 2.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad [2]$$

onde, d_a é a densidade aparente e d_r a densidade real dos sólidos triturados.

4.2.3.1 Separação e purificação dos extratos obtidos por SFE

No processo de SFE, a cafeína, por ser altamente solúvel em CO₂, é extraída juntamente com os demais compostos. Para separar a cafeína do óleo, os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o óleo foi retirado do tubo de

polipropileno (15 mL, 120x17 mm, Falcon). Na cafeína mantida como precipitado foi adicionado 3 mL de terc butil metil éter (MTBE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), agitou-se manualmente, e centrifugou-se novamente a 3.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação foi coletado todo o líquido (óleo + MTBE) presente no tubo Falcon. Este procedimento foi repetido para retirar todo o óleo de café residual aderido à cafeína o óleo foi centrifugado novamente, todo o líquido presente no tubo Falcon foi coletado e adicionado ao frasco. O sólido branco presente no tubo Falcon (cafeína) foi seco com nitrogênio a temperatura ambiente para remoção do resíduo de solvente, e a cafeína foi então pesada. A solução de óleo de grãos de café verde + MTBE foi também submetida à remoção do solvente com nitrogênio à temperatura ambiente. Após a secagem o óleo remanescente foi pesado. A cafeína foi diluída em metanol (Carlo Erba, Val de Reuil, FRA) na concentração de 24.000 ppm e analisada por cromatografia gasosa para identificação.

4.3 Caracterização do extrato

Os extratos obtidos por PFE, SFE e o obtido por prensagem foram analisados quimicamente. Análises físicas foram realizadas nos extratos obtidos por SFE e prensagem. O enfoque das análises químicas foi com respeito à concentração dos diterpenos nestes extratos e as análises físicas visaram à diferença na caracterização dos óleos obtidos por SFE e PFE. As descrições metodológicas destas análises estão devidamente apresentadas nos itens subsequentes.

4.3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) nos extratos

A concentração de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinada usando a metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965) com modificações pertinentes para os extratos de café verde obtidos por SFE, PFE e prensagem.

Para os extratos provenientes da SFE e PFE, as análises de determinação das concentrações de CFT passaram por modificações. Por serem insolúveis em metanol, os extratos foram diluídos em éter de petróleo (Synth, Diadema, BRA) (10.000 ppm) diferindo da metodologia de Singleton & Rossi (1965). Em 1 mL do extrato diluído foram adicionados 5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (Haloquímica, São Paulo, BRA) e água desmineralizada (MilliQ, Direct Q3 - Billerica, Massachusetts, USA) (1:10,v:v). Após 10

min., adicionaram-se 4 mL de Carbonato de Sódio anidro (Synth, Diadema, BRA) em solução (75g de Na_2CO_3 em 1 L de H_2O). Após duas horas em temperatura ambiente com ausência de luz e homogeneizados em ultrassom (Unique, UltraCleaner 1400, Indaiatuba, BRA), as leituras foram feitas em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, BRA) a 765 nm. Especificamente para estes extratos de característica apolar e, portanto, diluídos em éter de petróleo, houve necessidade de agitação constante em ultrassom para auxiliar a reação de redução da solução de Folin-Ciocalteu. Para a determinação da curva padrão também se usou ácido gálico (Vetel Química Fina, Rio de Janeiro, BRA) diluído em metanol nas proporções de 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 e 30 ppm. Após verificar a diferença na absorbância a 765 nm de três tipos diferentes de solventes (metanol, etanol e isopropanol) capazes de diluir o ácido a 50 ppm, escolheu-se o metanol como solvente.

Fez-se um estudo preliminar, para verificar a influência do solvente de diluição do ácido gálico na absorbância da mistura após a redução do reagente Folin-Ciocalteu, sem que influenciasse na quantificação de CFT do óleo de grãos de café verde, já que este foi diluído em éter de petróleo.

Neste estudo, o ácido gálico foi diluído em três diferentes tipos de solvente (metanol, etanol e isopropanol) a 50 ppm. A absorbância a 765 nm, após a reação com reagente Folin-Ciocalteu, resultou em 0,460 ($\pm 0,065$), 0,458 ($\pm 0,058$) e 0,497 ($\pm 0,055$) respectivamente. Não havendo diferença acima do que é comum em leituras experimentais (10% de erro), optou-se por manter o metanol como solvente de diluição. Este teste indicou também que o tipo de solvente não influencia consideravelmente a reação colorimétrica de redução do reagente de Folin-Ciocalteu.

Já para a análise dos extratos obtidos por PFE, a análise foi igual à descrita para SFE diferindo apenas no fato de que para a determinação da curva padrão foram utilizados o ácido gálico (Fluka, Buchs, SWL) nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 ppm. A concentração de fenólicos totais foi calculada e expressa em mg de ácido gálico equivalente/100 g de grãos de café verde.

4.3.2 Preparo do óleo de café verde para quantificação dos diterpenos

Na primeira fase de desenvolvimento deste trabalho houve o enfoque em estabelecer uma metodologia analítica para a análise dos dois principais diterpenos no óleo de grãos de café verde. Os trabalhos foram realizados concomitantemente no Brasil e na França.

Nos testes preliminares, o óleo de grãos de café verde obtidos por prensagem e fornecidos pelos produtores do Estado de São Paulo foi utilizado nas análises das concentrações de cafestol e kahweol, e neste estudo preliminar três métodos de saponificação foram testados para, a partir dos resultados, ser definido um único protocolo de análise.

4.3.2.1 Saponificação a frio

Na saponificação a frio foram utilizados 1 g de óleo de café verde bruto que sofreu reação de transesterificação com 3 g de hidróxido de potássio (KOH) e 20 mL de metanol (MeOH) durante 2 h de agitação em um *shaker* (Tecnal, Piracicaba, SP, BR). Foi recolhido 1 mL dessa solução alcoólica e adicionado 5 mL de água desmineralizada (MilliQ, Direct Q3 - Billerica, Massachusetts, USA) e novamente foi agitado por períodos de 2, 3, 4 h para verificar se o tempo de contato influenciava na reação. Após este período a extração dos insaponificáveis foi feita adicionando 6 mL de hexano (Mallinckrodt, Phillipsburg, USA), submetido à agitação por 2 min. A fase orgânica foi separada da aquosa e o hexano, contendo os compostos insaponificáveis foi lavado com 7 mL de água desmineralizada. A lavagem com água é necessária para eliminar o hidróxido de potássio remanescente na amostra. A fase orgânica foi separada da água e colocada na capela com o exaustor ligado para a evaporação do hexano. A fração insaponificável seca foi dissolvida em 3 mL de hexano, 9 mL de piridina (Merck, Darmstadt, GE) e 1 mL da mistura de hexametilsilazano (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e triclorometilsilano (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) respeitando a proporção de 9:3:1. A mistura de hexametilsilazano e triclorometilsilano foi adicionada com a função de silanizar os grupos hidroxil (SWEETLEY et al., 1963) silanizando a amostra antes da análise em cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas (GC/MS).

Depois de 30 min. a temperatura ambiente afim de que o excesso de piridina fosse removido, a amostra foi centrifugada e 1 µL da solução sobrenadante desta amostra foi injetada no GC/MS. A metodologia de análise por GC/MS está descrita subseqüentemente.

4.3.2.2 Saponificação a quente

Na saponificação a quente, três metodologias foram testadas feitas conforme descrito por Dias et al. (2010), com algumas adaptações. O óleo foi saponificado de forma direta

com uma separação subsequente da fração saponificável. Na França, 2 mL da solução de 1,25 M de hidróxido de potássio (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, FR) em metanol foi usado, na saponificação feita conforme descrita na Figura 10. Finalizada a reação a quente, executou-se a extração dos insaponificáveis com 2 mL de terc butil metil éter (MTBE), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) adicionados duas a três vezes na solução (2 mL). Na separação da fase orgânica rica em insaponificáveis utilizou-se centrifugação (ThermoJouan BR4i, Thermo FisherScientific, Waltham, USA) com temperatura ajustada a 20 °C. Após recolher todas as fases orgânicas, subsequente, esta fase orgânica, foi lavada com uma solução aquosa de ácido cítrico (1mg/mL) visando eliminar o potássio e alguns compostos solúveis em água. Para verificar a eficiência da extração e da presença de diterpenos no extrato, uma alíquota da fase orgânica contendo como padrão interno (Colesterol - Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, FR) foi injetada num cromatógrafo de fase gasosa, acoplado a um detector de ionização de chama. O hexano também foi testado na extração dos insaponificáveis, no entanto, o MTBE foi selecionado, pois não propiciou a formação de emulsão. A eficiência da extração foi determinada pela quantidade de cafestol e kahweol presente na fase insaponificável e pela repetibilidade dos resultados nestas amostras. A calibração interna com colesterol foi realizada para determinar a concentração de cafestol e kahweol nos extratos ou no óleo de café verde. Este estudo de metodologia foi desenvolvido pela professora Agnès Chartier, na Université d'Orléans. Neste período, foi realizado o estágio no ICOA e IUT da Université d'Orléans, onde foram feitas as extrações do óleo de café verde via PFE, com supervisão desta pesquisadora. Esta metodologia (CHARTIER et al., 2013) segue descrita como parte desta tese já que foi feito o acompanhamento do desenvolvimento das análises e utilizo-as na determinação da concentração dos diterpenos nos extratos de café verde.

A principal diferença entre o método a frio e quente foi que, além do aquecimento houve o tempo fixo de reação em 1 hora na saponificação a quente.

No Brasil, a saponificação a quente foi feita conforme descrito na Figura 10, no entanto foram utilizados 600 mg de óleo bruto de café verde, 2,52 g de KOH e 3 mL de Metanol, sendo que todos estes 3 componentes foram colocados no mesmo frasco em um banho ultrassônico por 1 h e 40 min. Após esse período essa solução foi colocada em banho-maria a 80 °C/1h, diferentemente do método empregado na França que usou 70 °C. Após este período, nesta solução adicionaram-se 2 mL de MTBE e 2 mL de água desmineralizada (MilliQ Direct Q3, Billerica, Massachusetts, USA). Após centrifugação a 3.000 rpm/1 min a fase orgânica (sobrenadante) foi recolhida e mais 2 mL de MTBE foi

adicionado à solução. Este procedimento se repetiu por três vezes a fim de retirar todo o cafestol e kahweol e demais insaponificáveis presentes na amostra. A fase orgânica recolhida foi lavada com água desmineralizada (3 mL). Após esta lavagem, a fase orgânica foi seca com fluxo de N₂ em concentrador (Tecnal, TE – 019, Piracicaba, BR) a temperatura ambiente.

A fração insaponificável foi silanizada como descrito na metodologia de saponificação a frio. Para análise de cromatografia, utilizou-se como solvente de diluição o próprio MTBE.

Figura 10 - Esquema representativo da reação de saponificação a quente e extração da matéria insaponificável, (Adaptada de DIAS et al., 2010).

No Brasil, a identificação dos diterpenos, assim como a quantificação, foram feitas por GC/MS, empregando o método de calibração externa, utilizando como padrões os próprios diterpenos (cafestol e kahweol).

Na escolha do método de saponificação, optou-se por empregar a saponificação a quente com a substituição do KOH por NaOH, de acordo com a metodologia de Chartier et al. (2013), onde foram utilizados 200 mg de óleo de café verde e 2 mL de NaOH em metanol (1.25 M). Outras alterações, além da temperatura (de 80 para 70 °C), o processo de centrifugação para separação da fase orgânica também foi alterado de 3.000 rpm/1 min para 7.000 rpm/5 min. e não houve o uso da solução de ácido cítrico.

4.3.3 Quantificação dos diterpenos cafestol e kahweol

A quantificação de cafestol e kahweol foi feita por normalização externa. Este método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrões de concentrações conhecidas. Foram preparadas soluções de cafestol e kahweol puros (Santa Cruz Biotechnology, California, USA.) em diversas concentrações para a construção da curva padrão. Estes diterpenos foram diluídos em MTBE a 0, 300, 500, 800, 1.000, 1.200, 1.400, 1.600 e 1.800 ppm.

A fração insaponificável silanizada ou não, diluída (1.000 e 500 ppm) e as soluções padrões foram injetadas (1 μ L) em um cromatógrafo gasoso acoplado em um espectrômetro de massas GC/MS (QP 2010 Plus, Shimadzu, Kioto, JP) com injetor automático (AOC-5000, Shimadzu, Kioto, JP) e coluna capilar RTX-5MS[®] (30 m $\times$ 0.25 mm id $\times$ 0.25 μ m, composta de 5% difenil/ 95% dimetilpolisiloxino, Restek, USA). As condições de análise basearam-se naquelas sugeridas por Lercker et al. (1995) e Roos et al. (1997). A injeção foi feita do modo *splitless* com temperatura do injetor de 300 °C. A temperatura do forno variou em um gradiente com temperatura inicial de 70 °C/2,5 min. com aumento de 40 °C/ min. até 200 °C/10 min., aumento de 6 °C/ min. até 235 °C/0 min. e aumento de 30 °C/ min. até a temperatura final de 330 °C/7 min., totalizando 31,75 min. de corrida. O Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com vazão de 1mL/ min. A temperatura de interface do GC com o MS foi de 290 °C e a temperatura da fonte de ionização de 250 °C. A energia de ionização foi de 70 eV e a faixa de varredura de massa de 40 a 800 *m/z*.

4.3.4 Determinação Experimental de Propriedades Físicas

As propriedades físicas de um fluido são importantes no estudo de processos. Um exemplo a se considerar é um *scale-up* de um sistema de extração, os fenômenos de transportes dos fluidos em uma instalação industrial está relacionada às características de viscosidade e densidade destes fluidos nas condições operacionais de cada estágio do processo.

Com base nestas considerações e com a finalidade de comparar os processos de extração com fluido supercrítico (SFE) e por prensagem dos grãos, determinou-se experimentalmente a viscosidade e a densidade do óleo de grãos de café verde. Os índices de refração destes óleos também foram determinados.

4.3.4.1 Determinação de Densidade e Viscosidade

As viscosidades dos extratos obtidos na extração com fluido supercrítico (SFE) foram determinadas em um micro-viscosímetro automático de queda de esfera, (AMVn, Anton Paar, Österreich, AUT). Além do controle de temperatura, este equipamento permite a determinação da viscosidade de uma mesma amostra em diferentes ângulos de inclinação, e com o número de repetições que o analista desejar, proporcionando assim, maior precisão e confiabilidade nos resultados.

A determinação da viscosidade requer o conhecimento prévio e preciso da densidade do composto puro ou da mistura que está sendo analisada, neste caso, de grãos de óleo de café verde. Deste modo, a mesma foi determinada empregando-se o densímetro digital de bancada (DMA 4500, Anton Paar, Österreich, AUT). Este equipamento é capaz de fornecer dados de densidade com exatidão de $0,00005 \text{ g/cm}^3$ e com repetibilidade do desvio padrão igual a $0,00001 \text{ g/cm}^3$. Também permite a obtenção de dados de índice de refração, propriedade que também foi monitorada neste trabalho.

Para a medida de densidade, as amostras foram injetadas diretamente no equipamento, que após estabilização da temperatura forneceu o resultado direto. Todas as medidas de densidade foram realizadas em triplicata. O baixo desvio padrão das medidas neste equipamento se deve ao fato de a análise ser realizada com a amostra estática no interior de um tubo em forma de U (Figura 11).

Figura 11 - Densímetro Digital Anton Paar DMA 4500.

Para a medida de viscosidade, as amostras foram injetadas em um capilar, que por sua vez foi alocado no equipamento, fornecendo os valores da medida em quadruplicata, em 3 ângulos diferentes, totalizando 12 medidas por amostra. Detalhes do viscosímetro automático e do capilar na Figura 12.

Figura 12 - Viscosímetro Automático Anton Paar.

4.3.4.2 Determinação dos Índices de Refração

Para fins de caracterização de mais uma propriedade física, foram realizadas análises do índice de refração (IR) de todas as amostras (óleos) obtidas por SFE e por prensagem, as quais foram medidas em um refratômetro Abbe (Lambda 2WAJ, Atto Instruments Co., Hong Kong, CHI), acoplado a banho termostático (UCB-12, Científica, RJ, BRA) que após calibrado, as temperatura foram ajustadas em 25 e 40 °C, temperaturas padrões para análise do IR de óleos e gorduras.

A calibração do refratômetro foi feita a uma temperatura de 20 °C, utilizando para tal água destilada. O valor do índice de refração foi ajustado para 1,333, valor do índice para esta substância nesta temperatura. Em seguida, para a realização da análise, foram colocadas aproximadamente 4 gotas do óleo, utilizando uma pipeta de Pasteur, na lâmina de leitura, aguardando alguns segundos para que ocorresse a estabilização da temperatura.

A leitura foi feita, observando a marcação numérica dos índices de refração para as amostras de óleo.

4.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A Cromatografia em Camada Delgada foi utilizada como análise preliminar para a identificação de diversos compostos presentes nos extratos obtidos por extração supercrítica (SFE) e por prensagem. Para isso, foram testadas diversas fases móveis utilizando-se placas de Sílica Gel F₂₅₄ (Merck, Nacherey-Nagel, Düren, GE) e reveladores NP/PEG e Fast blue salt preparados de acordo com a metodologia de Wagner & Blat, (2009), a fim de verificar a capacidade de eluição de diferentes fases móveis e o melhor revelador. Estes reveladores foram utilizados com intuito de indicar a presença de compostos fenólicos nos extratos.

Em um quarto das placas de Sílica Gel, em bandas de um centímetro de comprimento, foram aplicados os óleos obtidos por prensagem em datas diferentes (ON e OV) e uma amostra do óleo obtido por SFE diluídos em metanol (Carlo Erba, Val de Reuil, FRA) a 1.500 ppm, outra dos insaponificáveis do óleo dos grãos de café verde obtido por SFE diluídos em terc butil metil éter (MTBE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 1.500 ppm e os padrões ácido clorogênico (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) diluído em metanol a 200 ppm, ácido cafêico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluído em metanol a 200 ppm, cafestol (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) diluído em MTBE a 1.800 ppm e kahweol (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) diluído em MTBE a 1.800 ppm. Para aplicação dos extratos e dos padrões na placa utilizaram-se capilares de plásticos adaptados para depositar de 1 a 5 µL da solução do extrato. Após a eluição cromatográfica, as placas foram secas utilizando-se uma pistola térmica (Steinel, HL 1605S, USA). Em seguida, foi aspergida a solução de Fast Blue Salt, preparada com 0,5 g cloreto de di-*o*-anisidintetrazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em 100 mL de água desmineralizada (Direct Q3, Billerica, Massachusetts, USA). Por último, aqueceu-se a placa novamente com a pistola térmica para a visualização das bandas eluidas. As placas foram lidas em Luz UV a 254 nm e 365 nm.

As fases móveis testadas foram: acetato de etila (Mallinckrodt, Phillipsburg, USA), ácido acético glacial (Synth, Diadema, BRA), ácido fórmico (Merk, Darmstadt, GE) e água desmineralizada (modelo Direct Q3-Billerica, Massachusetts, USA) (100:11:11:26, v:v:v:v); clorofórmio (Êxodo científica, Hortolândia, BRA) acetato de etila (60:40, v:v);

clorofórmio (100, v); clorofórmio, acetona, ácido fórmico (75:16,5:8,5; v:v:v), clorofórmio, acetato de etila (70:30, v:v) e tolueno, acetato de etila e ácido fórmico na proporção 50:40:10 (v:v:v). A única fase móvel, para a qual se obteve melhores resultados foi aquela constituída por tolueno (Merck, Darmstadt, GE), acetato de Etila (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e ácido fórmico (Merk, Darmstadt, GE) na proporção de 50:40:10 (v:v:v).

4.3.6 Determinação da composição em ácidos graxos presentes no óleo do café

A determinação da composição em ácidos graxos no óleo do café foi realizada através da metodologia desenvolvida pela AOAC (2005), utilizando-se como reagente de saponificação o KOH 0,5 M e como reagente de esterificação o trifluoreto de boro em metanol (BF_3). O extrato utilizado para esta análise foi aquele oriundo da extração nas condições de P e T do ponto central do delineamento experimental (Tabela 3) já que no ponto central foram extraídos três extratos nas mesma condições. As análises foram realizadas em triplicata para estas amostras.

A análise cromatográfica para determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada em um GC/MS (QP-2010 plus, Shimadzu, Kyoto, JP) com injeção automática de 1 μL da solução de esterificáveis. Utilizou-se uma coluna modelo SP-2560 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) (100 m $\times$ 0,20 μm $\times$ 25 mm) nas condições de temperatura no injetor de 250 °C, com a coluna inicialmente a 100 °C, aumentando com uma taxa de 5 °C/ min. até 195 °C seguida de uma taxa de aumento de 2 °C/ min. até 250 °C, totalizando o tempo da corrida em 47,50 min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Matéria-Prima

Como matéria-prima, considerou-se, além dos grãos de café verde (*Coffea arabica*) cv. Catuaí Amarelo, o óleo destes grãos obtidos por prensagem em diferentes períodos, uma amostra obtida em 2010 (óleo velho - OV) e a outra obtida mais recentemente, final de 2011 (óleo novo - ON).

5.1.1 Grãos de Café verde

Os grãos de café verde secos e triturados apresentaram uma umidade de 4,73% ($\pm 0,1002$), completando 95,27% de sólidos totais. A massa retida (g) nas peneiras para o cálculo de diâmetro médio das partículas (Equação 1) dos grãos de café verde secos e triturados é apresentada na Tabela 4. Considerando as partículas retidas no fundo das peneiras no cálculo, o diâmetro médio das partículas resultou em 0,92 mm para os grãos de café verde triturados no Brasil para a extração com fluido supercrítico (SFE) e 0,96 mm para os grãos triturados na França para a extração com fluido pressurizado (PFE). Esta mesma granulometria foi mantida para todas as extrações.

Tabela 4. Massa de grãos de café verdes triturados retidos nas peneiras utilizados no cálculo da granulometria.

Abertura da peneira (mm)	Massa retida (g) SFE	Massa retida (g) PFE
2,00	20,45	8,63
1,60	8,31	2,94
1,25	11,33	3,62
1,00	9,47	2,96
Fundo	39,04	12,08
Total	88,6	30,23

Na caracterização da amostra determinou-se também a densidade aparente, que compreende a massa de grãos de café verde triturada acondicionada no extrator de leito fixo do equipamento de extração supercrítica (SFE) de 300 cm³. Este dado é necessário para que se conheça a porosidade do leito fixo para esta matéria-prima. Uma característica importante no meio poroso é a presença no material de espaços vazios, chamados capilares

ou poros. Estes podem ter formas complexas e diferentes dimensões geométricas. Para caracterização da estrutura de materiais secos, vários parâmetros têm sido introduzidos e o mais importante é a porosidade (ε) (STRUMILLO; KUDRA, 1986) que é determinada utilizando-se valores da densidade aparente e densidade real a partir da relação apresentada na Equação 2.

O valor médio da densidade aparente medida (Tabela 5) foi de $0,30 \text{ g/cm}^3 (\pm 0,01)$. E a densidade real, determinada por picnometria de gás Hélio foi de $1,26 \text{ g/cm}^3 (\pm 0,01)$, desta forma o leito fixo apresentou uma porosidade de 0,76.

Tabela 5. Densidade aparente da amostra de grãos de café verde.

Ensaio	Massa de grãos de café verde (g)	Densidade aparente (g/cm^3)
1	88,98	0,30
2	88,85	0,30
3	88,73	0,30
4	88,65	0,30
5	88,64	0,30
6	88,54	0,30
7	88,54	0,30
8	88,45	0,29
9	88,39	0,29
10	88,37	0,29
Média	88,60 ($\pm 0,19$)	0,30 ($\pm 0,01$)

5.1.2 Preparo da amostra de óleo de grãos de café verde para a quantificação dos diterpenos cafestol e kahweol

Até que se obtivesse o óleo de café verde por SFE e PFE, o preparo da amostra para a quantificação dos diterpenos iniciou-se com o óleo obtido por prensagem dos grãos (OV) extraídos e fornecidos pelos próprios produtores dos mesmos grãos de café.

Os experimentos iniciaram-se com a otimização do processo de transesterificação do óleo, com intuito de verificar a eficiência da extração dos compostos insaponificáveis do óleo e a presença dos diterpenos nesta fração. Enquanto os estudos na França foram direcionados para a otimização dos parâmetros analíticos da reação de transesterificação, no Brasil, a fração insaponificável obtida conforme descrito no item 4.3.2.2 foi silanizada ou não e analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Estas análises foram realizadas na tentativa de identificação das duas frações que representam os dois principais diterpenos presentes nos extratos de óleo de café verde.

A Figura 13 mostra os espectros de íons do kahweol (A) e do cafestol (B) provenientes do óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos saponificado a quente e silanizado. A identificação do kahweol (Figura 12A) foi possível pela detecção dos íons m/z 131, m/z 146, m/z 183, m/z 223 e m/z 314, sendo o m/z 314 o íon molecular deste diterpeno. O cafestol (Figura 12B) foi identificado pela presença dos íons de intensidade relativamente maiores m/z 117, m/z 147, m/z 223 e, sendo o íon m/z 316 o íon molecular desta substância segundo LERCKER et al. (1995).

Na Figura 14, observam-se os espectros de massas dos dois principais picos encontrados na análise de GC/MS da amostra de óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos pelos produtores do estado de São Paulo, saponificadas a frio e silanizadas. Pode-se afirmar, pela intensidade dos principais íons de massas, que a molécula de kahweol está presente (Figura 14A). Já, na Figura 14B, ao verificar o espectro de íons de massas do componente cujo pico teve o mesmo tempo de retenção do cromatograma de íons totais (TIC) do óleo de café verde saponificado a quente e silanizado, não se observa os espectros característicos do cafestol, a não ser o de m/z 133, portanto não se conclui que o pico correspondente a este espectro seja deste diterpeno.

A dificuldade de interpretação dos espectros de massas para o cafestol sugeriu que a saponificação a frio não seria uma metodologia a ser adotada neste estudo, mesmo porque se visualizam os melhores resultados para a amostra saponificada a quente (Figura 15). Estes ensaios preliminares estimularam os estudos de otimização de condições analíticas, principalmente o tempo e temperatura de reação, para que temperaturas acima da temperatura ambiente fossem aplicadas na saponificação ou reação de transesterificação sem que ocorresse degradação acentuada dos diterpenos a serem analisados.

Outra análise preliminar efetuada no Brasil consistiu em verificar se havia ou não necessidade de silanizar a amostra já que, este procedimento é o indicado para análises em cromatografia gasosa. Nas condições cromatográficas empregadas, o tempo de retenção das moléculas de cafestol e kahweol apresentou-se em torno de 25 e 27 min. Ao se comparar as frações dos insaponificáveis silanizados ou não (Figura 15) nota-se que esta fração, quando não sofreu silanização, apresentou picos mais bem definidos. Embora a literatura aponte como metodologia adequada a silanização de componentes pouco voláteis quando analisados por cromatografia gasosa, nestes testes preliminares evidenciou-se que a fração insaponificável pode ser injetada diretamente no GC sem silanizar e ainda com a vantagem de evitar mais um procedimento analítico que possa degradar os compostos em

análise. Desta forma optou-se por não silanizar a fração insaponificável do óleo de café verde.

Figura 13 - Espectro de íons de massa do kahweol (A) e cafestol (B) do óleo de café verde saponificado a quente e silanizado.

Figura 14 - Espectro de massas do kahweol (A) e do cafestol (B) do óleo de café verde saponificado a frio e silanizado.

Ainda, buscando confirmação de que a saponificação a frio não seja aplicável, analisou-se também a fração insaponificável do óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos derivada da reação de transesterificação sem emprego de temperatura elevada por GC/MS (Figura 16). Nota-se, para ambas as amostras (silanizada e não silanizada) que os picos apresentaram-se mal definidos embora tenham sido identificados os dois componentes.

Figura 15 - Fração insaponificável do óleo de café verde com reação de transesterificação a quente silanizado (—) e não silanizado (—).

Figura 16 - Fração insaponificável do óleo de café verde com reação de transesterificação a frio silanizado (—) e não silanizado (—).

Estes testes preliminares realizados no Brasil serviram como base de definições da metodologia analítica a ser utilizada no desenvolvimento deste projeto.

As amostras do óleo de café verde proveniente da extração com fluido supercrítico também foram analisadas e pôde-se detectar a presença dos dois diterpenos. No entanto, os resultados da concentração dos diterpenos em função das variáveis operacionais do processo de extração supercrítica serão apresentados em um item mais a frente.

5.2 Quantificação de cafestol e kahweol

A quantificação dos dois diterpenos na fração insaponificável do óleo de café verde foi feita por normalização externa utilizando como padrão o cafestol e o kahweol puros. A curva padrão foi elaborada em função das diferentes concentrações das soluções padrões (0, 300, 500, 800, 1.000, 1.200, 1.400, 1.600 e 1.800 ppm) e das áreas dos picos correspondentes obtidas no GC/MS (Figura 17). Com as equações geradas na regressão linear dos pontos experimentais para o cafestol (equação 3) e kahweol (equação 4) calculou-se a concentração dos dois diterpenos.

Figura 17 - Regressão linear dos pontos experimentais que demonstram a concentração dos diterpenos puros em função da área dos picos obtidos no GC/MS.

$$\text{Conc. Cafestol} = \frac{\text{Área do Pico} + 19.090}{6.394} \quad [3]$$

$$\text{Conc. Kahweol} = \frac{\text{Área do Pico} + 67.992}{3.815} \quad [4]$$

As quantificações foram feitas nas frações insaponificáveis obtidas pelo método de transesterificação a quente da amostra de óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos (ON e OV) e de óleo obtido por extração com fluido supercrítico (SFE). Estes ensaios foram feitos visando comparar a concentração dos diterpenos quando as diferentes metodologias de extração foram empregadas na obtenção do óleo. Os grãos utilizados na SFE eram da mesma variedade de grãos utilizados pelos produtores que extraíram o óleo por prensagem. Foi possível constatar diferença na concentração de diterpenos nos diferentes óleos. A concentração dos diterpenos no óleo de café obtido na SFE foi superior àquela presente no óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos (Tabela 6).

5.3 Extração com fluido supercrítico (SFE)

Nas extrações do óleo dos grãos de café verde com CO₂ supercrítico segundo o DCCR 2² foram geradas como respostas o rendimento dos extratos e a concentração de cafestol e kahweol nestes extratos, com o intuito de otimizar o processo de extração para que se possa obter óleo dos grãos de café verde enriquecido nestes diterpenos. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa Statistica v. 7 (STATSOFT, 2004) e apresentados por análise de superfícies de resposta. No processo de extração foram testadas diferentes condições experimentais para verificar a influência das variáveis operacionais (P e T) na solubilidade destes compostos avaliada pelo enriquecimento do extrato. A Tabela 6 apresenta a matriz do DCCR com variações das variáveis operacionais (valores reais) e o rendimento dos extratos obtidos.

Assim como no óleo obtido por prensagem dos grãos, o óleo obtido por extração com fluido supercrítico apresentou um sólido branco que se precipitava após a extração. Como é conhecido, a descafeinação dos grãos de café pelo emprego de fluido supercrítico é uma atividade industrialmente aplicada. Com intuito de confirmar a presença de cafeína no óleo, este sólido foi separado por centrifugação (3.000 rpm/1 min., à temperatura ambiente). O material sólido foi diluído em metanol (24.000 ppm) e analisado (1µL) no GC/MS nas condições cromatográficas descritas no item 4.3.3.

Tabela 6. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis no estudo do efeito da temperatura (T) e da pressão (P) no rendimento do óleo de café verde obtido por SFE, no seu índice de refração (IR) e na sua concentração de fenólicos totais (CFT) – Variáveis reais.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	ρ CO ₂ (kg/cm ³)	R (g/100g)	Óleo (g/100g)	Cafeína (g/100g)	cafestol (mg/kg óleo)	kahweol (mg/kg óleo)	Relação C/K	IR		CFT		
										25°C	40°C	ppm EqAG ¹	mg/100g de grãos	mg EqAG/g de óleo
1	300	90	695,42	8,08	6,50	1,60	21.470,35	26.462,27	0,81	1,4810	1,4767	5,44	8,79	1,09
2	200	90	524,65	6,34	5,15	1,21	28.512,90	22.750,15	1,25	1,4787	1,4737	13,08	16,59	2,62
3	300	70	788,67	4,20	3,17	1,03	46.906,76	60.399,10	0,77	1,4785	1,4735	4,47	3,75	0,89
4	200	70	661,10	2,72	1,70	1,02	50.180,41	63.764,32	0,79	1,4805	1,4760	3,08	1,68	0,62
5*	250	80	687,42	6,76	5,64	1,10	18.900,30	18.005,23	1,05	1,4775	1,4715	4,19	5,66	0,84
6*	250	80	687,42	7,26	5,61	1,65	17.635,22	17.427,98	1,01	1,4755	1,4755	6,00	8,71	1,20
7*	250	80	687,42	6,82	5,87	0,94	17.116,97	15.220,33	1,12	1,4790	1,4740	4,61	6,29	0,92
8	250	94,1	618,10	2,95	2,40	0,55	25.627,95	30.739,65	0,83	-	-	11,97	7,06	2,39
9	250	65,9	758,10	0,26	0,01	0,26	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-
10	325,5	80	764,78	4,56	3,76	0,81	8.794,46	5.316,23	1,65	1,4790	1,4740	5,30	0,28	1,06
11	174,5	80	509,42	1,62	0,41	1,21	19.089,27	20.370,59	0,94	1,4807	1,4760	5,44	4,96	1,09
ON ²							3.485,43	8.594,35	0,41	1,4787	1,4737	18,31	-	-
OV ³							7.508	12.822,00	0,59	1,4800	1,4750	2,90	-	-

¹EqAG significa equivalentes em ácido gálico; ² óleo de prensagem novo, obtido em outubro de 2012 e, ³ óleo de prensagem antigo, obtido em outubro de 2010. * Pontos centrais.

A Figura 18 mostra o cromatograma de íons totais da cafeína separada do óleo, da cafeína pura (padrão) e do espectro de massas da cafeína separada do óleo, comprovando, portanto, que a substância branca encontrada nos ensaios e no óleo obtido por prensagem era mesmo cafeína. Após essa confirmação, a cafeína foi separada do óleo de todos os ensaios como será relatado no item 5.3.3.

Figura 18 - Cromatograma de íons totais da cafeína pura (A) da isolada do óleo de café verde obtido por SFE (B) e seu respectivo espectro de massas (C).

5.3.1 Rendimento total dos extratos obtidos por SFE

Na análise dos resultados obtidos para o rendimento da extração, segundo o DCCR 2² empregado, nota-se que os efeitos principais dos ensaios correspondentes ao modelo de primeira ordem (ensaios 1 a 7, Tabela 6) representados no diagrama de Pareto (Figura 19) que as variáveis P e T no intervalo estudado (P, de 200 a 250 bar e T de 70 a 80 °C) não influenciaram o rendimento total da extração, não sendo estes efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%.

O modelo matemático de primeira ordem que indica o comportamento do rendimento do óleo (R) em função de P e T utilizadas no processo de extração com CO₂ supercrítico (Equação 5), como esperado não foi significativo como mostra análise de variância (ANOVA) (Tabela 7). O modelo também não pode ser considerado preditivo já que o coeficiente de determinação (R²) foi baixo, 0,78.

$$R = 6,0257 + 1,8750T + 0,8050P + 0,065T \times P$$

[5]

Figura 19 - Diagrama de Pareto que indica os efeitos das variáveis P e T e da interação entre elas P×T no rendimento do óleo de grãos de café verde obtidos por SFE.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento do óleo de grãos de café verde (R).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	p	R ²
T	14,063	1	14,062	9,17	0,056	0,78
P	2,592	1	2,592	1,69	0,2844	
P×T	0,017	1	0,017	0,01	0,9230	
Erro	4,602	3	1,534			
Total (T)	21,273	6				

Coefficiente de determinação (R²)= SQ_R/SQ_T;

Na análise do modelo de segunda, (Equação 6), nota-se que o rendimento do óleo de grãos de café verde, também não foi significativo (Tabela 8). O modelo também não prediz os dados experimentais (R² = 0,7), no entanto optou-se por gerar a superfície de resposta (Figura 20) com intuito de visualização dos pontos experimentais frente à superfície que seria válida se o modelo fosse preditivo.

$$R = 6,9347 + 1,4158T - 1,9225T^2 + 0,9234P - 1,1756P^2 + 0,065T \times P \quad [6]$$

Se o modelo fosse preditivo, poder-se-ia afirmar que a região próxima à condição do ponto central seria a otimizada (Figura 20). No entanto, em regiões onde elevadas temperaturas e pressões foram aplicadas (Tabela 6, Figura 20) obteve-se também um bom

rendimento. A não distinção da região otimizada que represente um maior rendimento dos extratos dos grãos de café verde pode ser devido à escolha de condições operacionais (P e T) já otimizadas para compor o DCCR, aquelas definidas por ARAÚJO; SANDI, 2006 e AZEVEDO et al., 2008.

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para o rendimento do óleo de grãos de café verde (R).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	p	R ²
T (L)	15,9888	1	15,9888	3,99	0,102	0,69
T (Q)	20,7056	1	20,7056	5,17	0,072	
P (L)	6,8014	1	6,8014	1,70	0,249	
P (Q)	7,7422	1	7,7422	1,93	0,223	
P×T	0,0169	1	0,0169	0,004	0,950	
Erro	20,0252	5	20,0252			
Total (T)	65,8566	10				

Coefficiente de determinação (R^2)= SQ_R/SQ_T .

Figura 20 - ASR do rendimento (R) em função de P e T para o modelo de segunda ordem do DCCR 2².

Além dos pontos centrais, o primeiro ponto axial (ensaio 1, Tabela 6), também alcançou valores altos de rendimento total, demonstrando que os maiores valores são aqueles obtidos para combinação de T e P elevadas. No ensaio 3, por exemplo, a P também foi elevada, mas a T foi baixa causando um menor rendimento de extrato total. Portanto para temperaturas de 80 e 90 °C e pressões de 250 e 300 bar foram obtidos os melhores rendimentos totais de extratos oriundos de grãos de café verde cv. Catuai Amarelo.

5.3.2 Rendimento do Óleo de grãos de café verde obtidos por SFE

Considerando que o rendimento total era composto pelo óleo de café e pela cafeína, o que pode ser percebido mesmo visualmente (Figura 21), optou-se por separá-los e verificar a influência das variáveis de processo (P e T) para o óleo e a cafeína separadamente. A proporção de óleo e cafeína no rendimento total para cada ensaio é apresentada na Tabela 6.

Figura 21 - Frascos dos ensaios de 01 a 11 do óleo de grãos de café verde separado da cafeína, mais um frasco com os componentes cafeína + óleo, obtidos por SFE.

Na análise dos efeitos principais das variáveis P e T dos ensaios correspondentes ao modelo de primeira ordem (ensaios 1 a 7, Tabela 6) representados no diagrama de Pareto (Figura 22), constata-se que o rendimento do óleo de grãos de café verde, separado da cafeína, também não sofreu influência das variáveis independentes dentro do intervalo estudado. Mesmo sem perceber tal influência, os melhores valores para o rendimento foram obtidos nas

condições do ponto central e o primeiro ponto axial (ensaio 1, Tabela 6). Tanto para rendimento total de extratos quanto para rendimento do óleo essas quatro condições são as melhores a ser utilizadas quando se quer obter grande quantidade de óleo de grãos de café verde.

Figura 22 - Diagrama de Pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T no rendimento do óleo de grãos de café verde obtidos por SFE.

5.3.3 Rendimento de cafeína

A cafeína não era o produto a ser estudado neste projeto de pesquisa, no entanto por ser altamente solúvel em CO₂ supercrítico e por isso ser significativa na avaliação dos resultados, seu comportamento também foi avaliado.

Para a cafeína separada do óleo, o rendimento variou com a P e T, influenciando, em alguns casos o rendimento total do extrato, no entanto, na análise estatística do efeito principal da P e T no rendimento da cafeína, também não foi possível detectar a influência destas variáveis para esta resposta no intervalo estudado (Figura 23).

Altos rendimentos para este composto foram obtidos às temperaturas elevadas (80 e 90 °C) independentemente dos valores de P (Tabela 6). No entanto, foi possível detectar uma condição, na qual se obteve praticamente só cafeína no extrato (ensaio 9, Tabela 6). Embora a quantidade de cafeína tenha sido relativamente baixa se comparado aos ensaios feitos com

temperaturas superiores, esta condição permite evidenciar que o fracionamento do extrato é possível.

A extração da cafeína com CO₂ supercrítico é empregada industrialmente na Alemanha e a solubilidade deste composto é elevada nas condições de 63 °C e 230 bar. Park et al. (2012) e Kim et al. (2008) demonstram que altas solubilidades deste composto podem ser obtidas para condições de pressões elevadas e baixa temperatura (40 °C), confirmando portanto o resultado encontrado neste trabalho.

Figura 23 - Diagrama de Pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T no rendimento de cafeína obtida por SFE.

Tanto para o rendimento total, para o óleo de café verde e para a cafeína, a variável que influenciou positivamente na concentração foi à temperatura (Figuras 19, 20 e 21), entretanto, na faixa de valores estudados não foi possível identificar significância desta variável ($p > 0,05$).

5.3.4 Rendimento de cafestol e kahweol

Para cada um dos ensaios do planejamento experimental DCCR 2² quantificou-se os diterpenos. A concentração dos diterpenos cafestol e kahweol foi determinada no óleo de café verde obtido por SFE e separado da cafeína, segundo a metodologia de análise otimizada para GC/MS (item 4.3.3).

Quando analisada a concentração de cafestol, foi observado que para diferentes condições de T e P obteve-se valores distintos e as melhores condições para este diterpeno ocorreram para P entre 200 e 300 bar e temperaturas de 70 °C (Tabela 6).

Embora a análise estatística dos efeitos principais dos ensaios correspondentes ao modelo de primeira ordem (ensaios 1 a 7, Tabela 6) representados no diagrama de Pareto (Figura 24) indiquem que as variáveis independentes (P e T) não influenciaram a concentração de cafestol para o nível de 95% de confiança segundo o DCCR 2² empregado, os resultados experimentais revelaram uma consideração importante no processo de extração supercrítica de óleo de grãos de café verde enriquecidos com seus dois principais diterpenos. O rendimento total do extrato, assim como o rendimento do óleo de grãos de café verde, foi maior para condições de temperaturas elevadas. Já para cafestol, as concentrações consideravelmente mais elevadas foram obtidas à 70 °C independentemente da pressão (Tabela 6). Este comportamento também é evidenciado no diagrama de Pareto (Figura 24) que indica um efeito negativo da temperatura nos resultados. Mais uma vez evidenciou-se a capacidade de fracionamento da técnica de extração com CO₂ supercrítico.

Figura 24 - Diagrama de Pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T na concentração de cafestol no óleo de grãos de café verde.

A análise estatística que avalia os efeitos principais de primeira ordem das variáveis independentes (P e T) na concentração de kahweol no planejamento estatístico (DCCR 2²) (ensaios de 1 a 7, Tabela 6) mostrou a não influência das variáveis nos resultados (Figura 25).

Assim como para o cafestol, as maiores concentrações de kahweol foram identificadas para a temperatura de 70 °C, independentemente da pressão (200 ou 300 bar), o que indica

que a melhor condição para obter o óleo de grãos de café verde ricos em diterpenos é em T de 70 °C.

Outro fato importante na interpretação dos resultados foi constatar que, na faixa dos valores de P e T empregados, ao se diminuir a temperatura de 70 °C para 65,9 °C com $p\text{CO}_2$ de 788,67 e 758,10 kg/cm³ respectivamente, favoreceu-se a extração fracionada da cafeína.

Figura 25 - Diagrama de Pareto, que demonstra o efeito das variáveis de extração P e T na concentração de kahweol no óleo de grãos de café verde.

Na análise de concentração dos diterpenos obtidos por SFE, nota-se que a relação entre cafestol/kahweol presentes no óleo de grãos de café verde para os ensaios 3 e 4 (Tabela 6) indicou uma maior concentração de kahweol presente no óleo (0,77 e 0,79 respectivamente). Outros ensaios, como aqueles do ponto central (ensaios 5, 6 e 7), mostram uma relação cafestol/kahweol próxima aos valores unitários (1,05, 1,01 e 1,65 respectivamente) indicando que, dependendo das condições operacionais empregadas, há também uma maior solubilização de um composto frente ao outro ou não. Este comportamento também indica uma possibilidade de fracionamento, mas não para as faixas de P e T empregadas neste estudo.

Embora as variáveis experimentais (P e T) não tenham demonstrado um efeito significativo na obtenção de dados estudados, nota-se que a temperatura influenciou positivamente a extração do óleo e da cafeína. No entanto, para os dois diterpenos esta influência foi negativa. Assim, condições mais brandas de temperatura favorecem a extração dos diterpenos.

5.3.5 Determinação de compostos fenólicos totais nos extratos SFE

Ao realizar a determinação de compostos fenólicos totais segundo a metodologia de Singleton & Rossi (1965), notou-se que os extratos obtidos por SFE e por prensagem, por serem compostos apolares, não eram solúveis em metanol. Portanto, foi testada a capacidade de dissolução destes óleos em outros solventes. Simultaneamente, observou-se a reação do extrato com o Folin-Ciocalteu. Como solventes para diluição do óleo, foram testados o etanol, éter de petróleo, diclorometano (Merck, Darmstadt, GE), acetona e as misturas etanol-metanol (50:50, v:v) e metanol-água (60:40, v:v).

O etanol diluiu completamente o extrato obtido por prensagem, porém, ao adicionar-se a solução de Na_2CO_3 , a mistura obtida ficou turva, impossibilitando a correta leitura em espectrofotômetro. Com a acetona ocorreu o mesmo efeito. Já o diclorometano e as duas misturas (etanol-metanol e metanol-água) não foram capazes de diluir o óleo.

O único solvente testado capaz de diluir o óleo e não interferir na reação (coloração) para a determinação dos compostos fenólicos totais foi o éter de petróleo. Mas este solvente, por sua vez, não dilui o ácido gálico. Na metodologia para obtenção da curva padrão do ácido gálico, utiliza-se metanol como solvente.

Com intuito de verificar a influência do solvente na construção da curva padrão do ácido gálico, este reagente foi diluído (50 ppm) em três diferentes solventes o metanol (Carlo Erba, Val de Reuil, FR), o etanol (JTBaker, Cidade do México, MX) e o isopropanol (Carlo Erba, Chaussée du Vexin, FR). A absorbância foi medida a 765 nm e as médias dos valores de absorbância obtidos para metanol, etanol e isopropanol foram $0,4975 \pm 0,028$ nm; $0,5065 \pm 0,0049$ nm e $0,5100 \pm 0,0432$ nm, respectivamente. Como esses resultados não diferiram significativamente, pois não são $p \leq 0,05$, foi possível afirmar que o tipo de solvente não influencia na absorbância do ácido gálico. Desta maneira optou-se por executar a análise utilizando o éter de petróleo para diluir o óleo de grãos de café verde e o metanol para o ácido gálico.

Finalizado estes testes preliminares, determinou-se a concentração de compostos fenólicos totais nos extratos obtidos por SFE e por prensagem. A Figura 26 apresenta a curva padrão de ácido gálico obtida para o cálculo da concentração dos fenólicos totais (CFT).

Os valores de absorbância convertidos pelo emprego da equação do ajuste linear da curva padrão (Figura 26) para CFT expressos em equivalente a ácido gálico (EqAG) para os óleos obtidos via SFE e para aqueles provenientes da prensagem dos grãos são apresentados na Tabela 6. A CFT também está apresentada em mg EqAG/100 g de grãos de café verde.

Figura 26 - Curva de calibração que indica a absorbância do ácido gálico a 375 nm nas concentrações de 30, 20, 15, 10, 5, 2,5 e 1 ppm.

Os valores de absorbância para os óleos purificados obtidos através de SFE e de prensagem foram convertidos em equivalentes em ácido gálico. Estes valores variaram de 3,08 a 13,08 ppm EqAG, sendo o maior valor referente ao óleo extraído na condição de 200 bar e 90 °C. Essas quantidades transformadas para 100 g de sementes de café verde geraram valores de 1,68 a 16,59 mg/100 g de sementes.

O óleo novo obtido por prensagem apresentou uma maior concentração de fenólicos totais. Já o óleo antigo (extraído em 2010) apresentou uma menor concentração (Tabela 6). Isso pode ser explicado pelo fato de os compostos fenólicos serem degradados no óleo durante a estocagem, o que é esperado já que tais compostos degradam à presença de luz e oxigênio.

Na análise dos efeitos principais das variáveis P e T na CFT expressa em mg EqAG/100 g, referentes aos ensaios 1 ao 7 da Tabela 6, constatou-se que estas são significativas. Esta influência pode ser observada no diagrama de Pareto (Figura 27) na qual se visualiza a influência negativa da P e positiva da T, o que indica que, para menores valores de P e T elevadas no processo de SFE, maiores foram as concentrações de compostos fenólicos. Os efeitos significativos de primeira ordem compõem o modelo (equação 7) e a ANOVA (Tabela 9) indicam que o modelo é significativo e mesmo preditivo já que o coeficiente de regressão, considerando a falta de ajuste, foi de 0,97 ($R^2 = 0,97$).

$$R = 6,51750 - 1,56250P + 2,74250T - 2,25750T \times P$$

[7]

Figura 27 - Diagrama de Pareto das variáveis (T e P) estudadas para presença dos compostos fenólicos totais, do óleo de café verde.

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para a CFT no óleo de grãos de café verde.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	p	R ²
P	9,76563	1	9,76563	10,88173	0,080902	0,97
T	30,08523*	1*	30,08523*	33,52363*	0,028558*	
P×T	20,38522*	1*	20,38522*	22,71503*	0,041315*	
Erro	1,79487	2	0,89743			
Total (T)	66,33309	6				

Coeficiente de determinação (R^2)= SQ_R/SQ_T ; *Significativo para $p<0,05$.

Na análise da superfície de resposta gerada pelo modelo (equação 7) (Figura 28) nota-se que na faixa de P e T estudadas, as maiores concentrações de compostos fenólicos foram obtidas para valores de T maiores que 80 °C (80, 90 e 94,1 °C) e P de 200 a 250 bar. Considerando que, altas densidades do CO₂ supercrítico influem positivamente na extração de compostos fenólicos, acredita-se que as elevadas temperaturas empregadas no processo de extração possam ter degradado alguns compostos, os quais já se apresentavam em concentrações inferiores quando comparados ao mesmo óleo obtido via prensagem dos grãos (OPN, Tabela 6).

Figura 28 - ASR da CFT em função de P e T para o modelo de primeira ordem do DCCR 2².

Na ANOVA do modelo de segunda ordem, correspondente aos ensaios 1 ao 11 da Tabela 6, constatou-se que o modelo é significativo tanto para a T quanto para a interação de T e P (Tabela 10), demonstrando que quanto maiores as temperaturas, melhores foram as obtenções dos compostos fenólicos totais do óleo de café verde via SFE.

A ASR gerada pelo modelo de segunda ordem (equação 8) mostra o mesmo comportamento da variação de CFT com as variáveis P e T (Figura 29). Quando se avaliou os coeficientes de regressão das equações preditivas da CFT em função das variáveis independentes (T e P), notou-se que os coeficientes significativos foram àqueles relacionados com a temperatura e com a interação de $P \times T$, porém para o modelo linear o coeficiente de regressão foi de 0,97, enquanto que para o quadrático foi de 0,91. O modelo linear é mais preditivo que o quadrático.

$$R = 4,93333 + 3,48727 T + 0,73584T^2 - 0,80600 P + 0,42834P^2 - 2,25750T \times P$$

[8]

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) do modelo de segunda ordem para a CFT no óleo de grãos de café verde.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	p	R ²
P (L)	5,1971	1	5,19708	2,12614	0,204606	0,91
P (Q)	1,0361	1	1,03607	0,42386	0,543749	
T (L)	97,2882*	1*	97,28820*	39,80088*	0,001473*	0,91
T (Q)	3,0576	1	3,05762	1,25088	0,314220	
P×T	20,3852*	1*	20,38522*	8,33965*	0,034273*	0,91
Erro	12,2219	5	2,44437			
Total (T)	138,4276	10				

Coefficiente de determinação (R^2)= SQ_R/SQ_T . *Significativo para $p < 0.05$.

Figura 29 - ASR da CFT em função de P e T para o modelo de segunda ordem do DCCR 2².

Considerando que os grãos de café verde arábica são ricos em compostos fenólicos, por exemplo, de 20 a 30 g EqAG/100 g de grãos (NAIDU et al., 2008) principalmente por que são ricos em ácido clorogênico, pode-se concluir que os extratos obtidos por SFE têm baixa concentração destes compostos. A CFT mínima foi de 0,28 mg EqAG /100 g de grãos e a máxima de 16,59 mg EqAG /100 g de grãos (Tabela 6). Este comportamento era esperado,

visto que os compostos fenólicos presentes nos grãos de café verde são representados principalmente pelos ácidos cafeico, clorogênico e ferrúlico (NAIDU et al., 2008; FARAH; DONANGELO, 2006), compostos altamente polares e que são poucos solubilizados pelo CO₂ supercrítico.

Na análise do óleo obtido por prensagem dos grãos, o óleo armazenado (OV), apresentou uma baixa CFT (2,90 ppm EqAG), no entanto, o óleo novo obtido por prensagem (ON) apresentou uma maior concentração de fenólicos totais (18,31 ppm EqAG) (Tabela 6). Isso pode ser explicado pelo fato de os compostos fenólicos serem degradados no óleo durante a estocagem, o que é esperado já que os compostos fenólicos se degradam na presença de luz e oxigênio.

O óleo novo obtido por prensagem (ON) sem ter sido submetido a longo período de estocagem, quando comparado ao óleo obtido por SFE apresenta uma CFT relativamente superior (Tabela 6). Este fato se explica pelo processo utilizado. Os óleos obtidos por SFE são ricos em compostos apolares, devido à característica do solvente (CO₂). Os compostos fenólicos, por terem uma característica mais polar, não foram fortemente extraídos com o óleo. Isso é um atributo importante do processo, pois com a eliminação do óleo, os grãos remanescentes do processo de SFE ficam enriquecidos nestes componentes. Se submetidos a outro processo de extração com solvente de maior polaridade poderá fornecer extratos ricos em compostos fenólicos sem a presença de óleo. Já o óleo obtido por prensagem dos grãos, por ser oriundo de um processo mecânico de separação não permite qualquer tipo de fracionamento. Desta forma, o óleo obtido por prensagem possui compostos polares e apolares em uma mesma mistura.

5.4 Extrações com fluido pressurizado

A Tabela 11 mostra as diferentes condições operacionais e os resultados das análises realizadas para cada ensaio. O extrato obtido por extração com água apresentou-se distinto dos demais, com uma cor verde intensa que indicava, a presença de moléculas adversas àquelas obtidas pelo emprego dos demais solventes orgânicos. Além disso, o emprego de água como solvente causou entupimento no equipamento e a extração, especificamente neste caso, teve que ser interrompida. Ainda mais, para a recuperação do extrato aquoso por evaporação, altas temperaturas seriam empregadas e para que se obtivesse uma quantidade considerável de óleo, outras extrações teriam que ser feitas já que o óleo é insolúvel em água. A possibilidade do emprego deste solvente não deve ser descartada, mas o equipamento

utilizado foi um limitante na escolha. Outro indicativo que mostra que o equipamento de extração com fluido pressurizado (PFE) empregado neste estudo necessita de ajuste mais rigoroso foi a quantidade elevada de metanol necessário no ensaio 6, por exemplo, (Tabela 11). No entanto, desconsiderando os efeitos de diluição, a quantidade de extrato obtida neste experimentos foi compatível com as demais.

A Figura 30 mostra a quantidade de óleo (g) nos extratos para cada um dos 8 ensaios. Um valor ótimo foi obtido quando se empregou metanol como solvente para uma temperatura de 100 °C e tempo de equilíbrio estático de 20 min. (ensaio 6, Tabela 11). Este valor foi 183% superior à média dos resultados obtidos nos outros ensaios.

A concentração dos diterpenos em função das condições operacionais pode ser visualizada na Figura 31. Ao se comparar o solvente empregado na extração, nota-se que o etanol foi menos eficiente que o metanol. Quando se analisa as condições de temperatura empregadas, observa-se que as mais favoráveis foram as mais elevadas, 84 °C e 100 °C. Para estes dois valores de temperatura, o efeito do tempo de espera de 20 min. foi positivo, especialmente para cafestol, cuja concentração aumenta em aproximadamente 25% quando se comparam os ensaios 3 com 4 e 5 com 6, respectivamente (Tabela 11).

A concentração de kahweol, assim como para a extração com fluido supercrítico (SFE) apresenta-se como o principal componente em quase todos os ensaios (Figura 31). Nestes casos, com valores da relação cafestol/kahweol entre 0,73 e 0,96. Outra observação interessante faz-se a influencia da temperatura na maior solubilização do cafestol frente ao kahweol, pois ao empregar-se o metanol como solvente, a concentração de cafestol aumenta frente ao kahweol (1,31) para temperaturas de 100 e 120 °C (Tabela 11, Figura 31).

Ao analisar a razão entre as concentrações de diterpenos cafestol/kahweol para os dois processos de extração empregados, nota-se que ambos têm praticamente o mesmo valor (Figura 32) pouco acima da unidade. No entanto, ao ser analisado o processo individualmente, percebe-se que a extração com fluido supercrítico apresenta um desvio negativo da média na distribuição normal, o que indica que a maioria dos extratos obtidos teve uma concentração de kahweol superior ao cafestol.

Tabela 11. Condições experimentais da Extração com Fluido Pressurizado (PFE), massa de extrato, concentração de diterpenos e concentração de compostos fenólicos totais para cada extrato.

Ensaio PFE	P (bar)	T (°C)	Solvente	Tempo estático (min)	Rendimento (g/100g)	Óleo (g/100g)	cafestol mg/kg óleo	kahweol mg/kg óleo	Compostos fenólicos totais (CFT)
									ppm EqAG
1	2	84	EtOH	20	70,60	0,27	18.991,34	22.802,52	216,14
2	2	100	EtOH	0	86,30	0,30	20.830,31	28.498,01	169,46
3	2	84	MeOH	0	102,80	0,25	41.291,54	43.094,25	194,43
4	2	84	MeOH	20	99,30	0,34	55.861,84	54.993,13	185,15
5	2	100	MeOH	0	102,50	0,53	48.416,97	53.328,47	136,15
6	2	100	MeOH	20	231,07	0,30	65.876,29	50.258,97	134,00
7	2	120	MeOH	20	71,00	0,28	41.318,80	31.438,97	335,98
8	2	100	H2O	20	212,37	0,00	0,00	0,00	0.00

Figura 30 - Rendimento dos extratos obtidos dos grãos de café verde usando etanol (EtOH), metanol (MeOH) e água (H₂O) como solventes na PFE.

Figura 31 - Concentração de diterpenos nos extratos obtidos dos grãos de café verde usando etanol (EtOH), metanol (MeOH) e água (H₂O) como solventes na PFE.

As concentrações máximas obtidas por PFE foram de 54.993 mg/kg de óleo para o kahweol e 65.876 mg/kg de óleo para o cafestol. Estes valores são superiores às concentrações destes diterpenos presentes no óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos, que para o ON foram de 8.594,35 mg/kg de óleo para o kahweol e de 3.485,43 mg/kg de óleo para o cafestol, já para o OV foram de 12.822,00 mg/kg de óleo para o kahweol e de 7.508 mg/kg de óleo para o cafestol. Valores semelhantes foram obtidos no óleo extraído por CO₂ supercrítico cujas máximas foram de 63.764,32 mg/kg de óleo para o kahweol e 50.180,41 mg/kg de óleo para o cafestol (Tabela 6). Portanto, na comparação das técnicas de extração, conclui-se que o óleo obtido por PFE e SFE permite um aumento da concentração destes diterpenos na composição.

Figura 32 - Razão entre as concentrações dos diterpenos cafestol e kahweol (C/K) nos extratos. Resultados obtidos das amostras provenientes da PFE e SFE.

5.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais nos extratos PFE

A concentração de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos obtidos por PFE. Foi expressa em ppm ($1\mu\text{g/mL}$) de compostos fenólicos presentes nos extratos brutos diluídos no solvente de extração. O intuito desta análise foi verificar somente se havia diferença nas concentrações de fenólicos extraídos para diferentes condições de extração. A Figura 33 mostra a curva padrão com diferentes concentrações de ácido gálico e sua respectiva absorbância a 765 nm.

Os valores de absorbância convertidos pelo emprego da equação do ajuste linear da curva padrão (Figura 33) para concentração de fenólicos totais (CFT) expressos em ppm equivalente a ácido gálico (EqAG), para os extratos obtidos via PFE, são apresentados na Tabela 11.

Figura 33 - Curva de calibração que indica a absorbância do ácido gálico a 375 nm para diferentes concentrações (PFE).

Por ter sido feita a análise de compostos fenólicos nos extratos ainda diluídos no solvente de extração e, portanto não se conhecer a concentração dos extratos obtidos por PFE no momento destas análises, não é possível comparar os resultados. Ou seja, sabe-se que uma condição de extração foi mais eficiente que a outra, mas não se sabe se a CFT no PFE foi superior à SFE ou àquela presente no óleo obtido por prensagem.

Provavelmente, a concentração de compostos fenólicos totais nos extratos obtidos por PFE será superior àquela obtida por SFE, já que neste método empregou-se solventes

polares (EtOH e MeOH). Especificamente na análise do processo de extração por fluido pressurizado, notou-se que os melhores resultados foram obtidos quando empregou-se o EtOH como solvente à 84 °C e o MeOH à 120 °C (Tabela 11).

5.5 Outras caracterizações físico-químicas dos extratos de grãos de café verde

5.5.1 Medida das propriedades físicas do óleo de café verde (Densidade e Viscosidade)

Óleo de café é composto principalmente de triacilgliceróis com ácidos graxos em proporções semelhantes às encontradas em óleos vegetais comestíveis, além dos componentes minoritários normalmente presentes na fração insaponificável do óleo, na qual se encontram os diterpenos em estudo.

O óleo bruto de grãos de café verde (*Coffea arabica*, cv. Catuaí Amarelo) obtido por prensagem dos grãos pelos produtores de São Paulo (Brasil) e aquele obtido por extração com fluido supercrítico a 300 bar e 80 °C foi filtrado a vácuo para eliminação do material sólido (caféina).

Os valores de densidade foram medidos em triplicata, obtendo-se assim valores mínimos de variação, e os valores de viscosidade foram obtidos através da média de 12 medidas experimentais, sendo 4 medidas para cada angulação de 50, 60, 70°.

Estas análises físicas, realizadas a 25, 35, 45 e 55 °C (Tabela 12), demonstraram que, independentemente, da temperatura empregada, o óleo de café obtido por prensagem dos grãos tem maior densidade e viscosidade dinâmica. Estas propriedades indicam diferenças importantes que irão servir como levantamento de dados na caracterização destes óleos. Estes resultados demonstram uma considerável influência do processo de extração nestas características físicas do óleo, as quais são fundamentais no entendimento dos processos que visam obter óleo de café verde rico em cafestol e kahweol, principalmente no que se refere aos fenômenos de transporte em processos industriais.

Os dados de densidade apresentados na Tabela 12 foram correlacionados por regressão linear ($y = a \cdot x + b$) em função da temperatura (T, K), (Equação 19) para o óleo obtido por SFE e equação 10 para o óleo obtido por prensagem dos grãos. Já o ajuste da viscosidade em função da temperatura só pôde ser obtido por meio de um ajuste logarítmico de $\ln(\eta)$ versus $(1/T)$, sendo que η é a viscosidade dinâmica, em mPa.s e T é a temperatura em Kelvin. A equação 11 refere-se ao óleo obtido por SFE e a equação 12 para o óleo obtido

por prensagem dos grãos. Todas estas equações apresentaram coeficiente de regressão ($R^2 > 0,99$) próximo à unidade.

Tabela 12. Densidades (ρ), viscosidades dinâmicas (η) e coeficientes lineares em função da temperatura (T) para os óleos obtidos por prensagem e por extração com fluido supercrítico.

Óleo de café obtido por Prensagem (convencional)		
Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade Dinâmica (m.Pa.s)
25	0,94177 ($\pm 0,00001$)	127,8798 ($\pm 2,4733$)
35	0,93497 ($\pm 0,00001$)	78,0818 ($\pm 1,7090$)
45	0,92819 ($\pm 0,00001$)	50,8540 ($\pm 1,1662$)
55	0,92143 ($\pm 0,00001$)	35,0510 ($\pm 0,6927$)
Óleo de café obtido por SFE		
Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade Dinâmica (m.Pa.s)
25	0,93645 ($\pm 0,00001$)	84,0411 ($\pm 1,7233$)
35	0,92953 ($\pm 0,00001$)	52,6311 ($\pm 1,1405$)
45	0,92260 ($\pm 0,00001$)	34,9692 ($\pm 0,6947$)
55	0,91570 ($\pm 0,00001$)	24,2555 ($\pm 0,4692$)

$$\rho = -0,007 \times T + 1,439 \quad [9]$$

$$\rho = -0,007 \times T + 1,427 \quad [10]$$

$$\ln \eta = 4.223,4 \times \frac{1}{T} - 9,3365 \quad [11]$$

$$\ln \eta = 4.051,3 \times \frac{1}{T} - 9,1693 \quad [12]$$

Tanto a densidade como a viscosidade tendem a diminuir com o aumento da temperatura. De fato, quanto maior a temperatura, maior a energia cinética das moléculas, e conseqüentemente, há um aumento no volume da substância, resultando em uma diminuição da densidade. Em relação à viscosidade, sabe-se que esta propriedade é o resultado das forças de atração entre moléculas que estão relativamente próximas umas das outras. Assim, quando a energia cinética aumenta, devido ao aumento da temperatura, as moléculas tendem a permanecer menos tempo juntas, tornando as forças intermoleculares menos efetivas, diminuindo a viscosidade. Também é possível observar que os valores de densidade e viscosidade são maiores para o óleo obtido por prensagem, sendo que esta observação é mais evidente para a segunda propriedade física (Tabela 12).

5.5.2 Índice de refração

Por serem extraídos por diferentes métodos, os extratos de grãos de café verde apresentaram coloração e viscosidade distintas (Tabela 12). Já, o índice de refração não diferiu consideravelmente quando SFE e prensagem foram empregadas na obtenção do óleo. Os óleos apresentaram índice de refração com valores semelhantes tanto a 25 °C quanto a 40 °C (Tabela 6).

Figura 34 - Diagrama de Pareto, que demonstra o efeito das variáveis P e T no Índice de refração do óleo de grãos de café verde obtidos a 25 e 40 °C.

Outro fato a ser considerado refere-se à influência das variáveis de processo (P e T) no índice de refração. Esta averiguação, feita pela análise dos efeitos principais do DCCR, ensaios 1 ao 7 (Tabela 6), indica que, embora a coloração dos extratos tenham sido distintas quando diferentes condições de P e T foram empregadas na SFE, estas variáveis não influenciaram o índice de refração, como se constata no diagrama de Pareto (Figura 34) que avalia os efeitos principais destas variáveis em relação a esta medida física.

5.5.3 Cromatografia em Camada Delgada

Os resultados obtidos pela análise de cromatografia em camada delgada (CCD) tiveram como objetivo identificar preliminarmente as diferenças na composição das principais classes de compostos presentes no óleo de grãos de café verdes extraídos por prensagem e por CO₂ supercrítico.

Inicialmente fez-se um estudo de adequação da fase móvel para separação dos compostos presentes. As fases móveis acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água desmineralizada na proporção de 100:11:11:26 (v:v:v:v), não separaram adequadamente os compostos presentes no óleo do café. As fases móveis constituídas por clorofórmio e acetato de etila na proporção de 60:40 (v:v) e 70:30 (v:v) nem mesmo eluíram os compostos presentes nos extratos, cujas manchas permaneceram na linha de base da placa onde os extratos foram aplicados.

As fases móveis constituída por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico na proporção 50:40:10 (v:v:v) foram capazes de separar os compostos presentes nos diferentes extratos. Como revelador, utilizou-se o Fast blue salt para identificar os componentes presentes. Na linha de base da placa cromatográfica aplicou-se o ácido clorogênico puro (CL), o ácido cafeico puro (CAF), o cafestol puro (C), o kahweol puro (K), o óleo de prensagem novo (ON), o óleo de prensagem armazenado há dois anos (OV), uma amostra do óleo obtido por extração com CO₂ supercrítico (ponto central do DCCR, Tabela 6) (SFE) e a fração insaponificável deste óleo (SAPO) (Figura 35). Na fração insaponificável do óleo obtido por SFE, detectaram-se os diterpenos kahweol, cafestol em concentrações consideravelmente elevadas. Na análise do kahweol puro notam-se duas manchas e isso é comum já que o cafestol pode ser formado a partir de uma quebra de uma dupla ligação do kahweol. No óleo obtido por prensagem (ON e OV) e no óleo obtido por SFE todos diluídos a 10.000 ppm, evidencia-se em maior concentração o kahweol (Figura 35).

Figura 35 - Cromatograma dos extratos dos grãos de café verde. Placa de Sílica Gel F₂₅₄ (Merck, Düren, GE), fase móvel tolueno, acetato de etila, ácido fórmico (50:40:10, v:v:v), bandas de ácido clorogênico (CL), ácido cafeico (CAF), o cafestol (C), o kahweol (K), óleo de prensagem novo (ON), óleo de prensagem armazenado há dois anos (OV), uma amostra do óleo obtido por extração com CO₂ supercrítico (SFE) e a fração insaponificável deste óleo (SAPO). Leituras no comprimento de onda de 254 nm e após aplicação do agente revelador Fast Blue Salt.

5.5.4 Determinação da composição em ácidos graxos presentes no óleo de café obtido por SFE

A separação dos ácidos graxos esterificados presentes no óleo de café verde obtido via extração supercrítica (SFE) pode ser visualizada no cromatograma de íons totais (CIT) apresentados na Figura 36.

A composição em ácidos graxos e a proporção destes componentes no óleo de café verde obtido por extração supercrítica (Tabela 13) estão em conformidade com valores encontrados na literatura. Para o ácido palmítico, sua porcentagem no óleo de café varia de 32,1 a 33,2%; ácido esteárico de 7,5 a 8,2%; oleico de 8,2 a 12,5%; linoleico de 42,6 a 46,2%; linolênico de 0,9 a 1,4%; araquídico de 2,6 a 3,3% e behênico de 0,5 a 0,7% (LAGO, 2001). Vale ressaltar que a composição do óleo e demais constituintes do grão é inerente à espécie e às condições de cultivo.

Figura 36 - Cromatograma de íons totais que mostra os picos dos ácidos graxos presentes no óleo de café verde obtido por SFE.

Os resultados apresentados em concentração de cada ácido graxo específico são expressos em equivalentes em ácido mirístico (Eq. AM) (Tabela 13) que foi utilizado como padrão no cálculo da concentração por normalização externa. A curva padrão e a regressão linear com a respectiva equação utilizada no cálculo da concentração de ácidos graxos em equivalentes ao ácido mirístico são apresentadas na Figura 37. O ácido mirístico é um ácido graxo não encontrado no óleo de café.

Figura 37 - Curva padrão do ácido mirístico utilizada na quantificação da concentração de ácidos graxos presentes no óleo de grãos de café verde obtido por SFE.

Os ácidos graxos em maior concentração presentes no óleo dos grãos de café verde obtidos por SFE são os ácidos palmítico, linoleico, oleico, esteárico e araquídico. Mais da metade dos ácidos graxos encontrados no óleo de café obtido por SFE são poli-insaturados,

linoleico (ω -6) e o oleico (ω -9) (Tabela 13) essenciais à dieta humana, uma vez que estes não são sintetizados pelo organismo e só podem ser adquiridos através da alimentação ou suplementação de nutrientes. Além disso, são reconhecidas inúmeras propriedades da classe dos lipídeos poli-insaturados no organismo, tais como atividade anti-inflamatória e inibição da formação de placas de gordura em vasos sanguíneos.

Tabela 13. Composição em ácidos graxos de óleo de café verde.

Pico	RT (min)	Ácido Graxo	Eq. AM (ppm)	%	μg Eq. AM/g de extrato	μg Eq. AM/100g de sementes
1	22,55	Ácido palmítico (C 16:0)	2.366,1	32,4	9.298,773	10.488,422
2	25,37	Ácido esteárico (C 18:0)	707,8	9,7	2.781,654	3.137,528
3	26,37	Ácido oleico (C 18:1)	936,8	12,8	3.681,624	4.152,637
4	27,98	Ácido linoleico (C 18:2)	2.799,6	38,3	11.002,428	12.410,036
5	28,39	Ácido araquídico (C 20:0)	339,0	4,6	1.332,27	1.502,716
6	29,72	Ácido linolênico (C 18:3)	99,9	1,4	392,607	442,836
7	31,77	Ácido behênico (C 22:0)	55,0	0,8	216,15	243,803

RT é o tempo de retenção; Eq. AM significa equivalente ao ácido mirístico.

A determinação da composição do óleo de café verde em ácidos graxos vai fornecer, pelo emprego de modelagem utilizando contribuição de grupos, a possível composição em triglicerídeos, que será utilizada na modelagem termodinâmica dos dados experimentais que visará a predição da solubilidade destes componentes do óleo em CO_2 supercrítico. Este é um trabalho atualmente em desenvolvimento no LTAPPN.

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se, no estudo da metodologia analítica para quantificação dos diterpenos no óleo dos grãos de café verde, que o processo de saponificação a frio não foi efetivo na obtenção da fração insaponificável para a qual são migrados o cafestol e o kahweol. Decidiu-se pela reação de saponificação a quente. Neste estudo fez-se um levantamento das diferentes condições analíticas encontradas na literatura, desenvolveu-se um método de saponificação a quente onde os melhores resultados foram obtidos para 70 °C em 1 hora de reação, utilizando solução de NaOH a 1,25 M.

O estudo do processo de extração com fluido pressurizado (PFE) foi direcionado para o emprego de etanol e metanol como solvente para fins analíticos.

Conclui-se que o uso de metanol para temperaturas elevadas geraram maiores concentrações dos diterpenos nos extratos para valores de temperatura elevados. Já na extração com fluido supercrítico (SFE), os extratos revelaram que o óleo obtido por essa técnica, além da presença de cafestol e kahweol, também é enriquecido em cafeína e essas concentrações são superiores às encontradas no óleo de café verde obtido por prensagem dos grãos pelos pequenos produtores do estado de São Paulo. Outra observação importante é que a cafeína é facilmente separada do óleo, o qual, mesmo após a separação permanece enriquecido nos diterpenos.

O óleo de grãos de café verde obtido por SFE apresentou melhores rendimentos para condições de elevada pressão e temperatura (300 bar e 90 °C). Esta condição não foi condizente com a concentração de diterpenos, já que as maiores concentrações nos extratos (50 g de cafestol/kg de óleo e 63 g de kahweol/kg de óleo) foram obtidos a 200 bar e 70 °C. A tecnologia de extração que emprega fluido supercrítico possibilitou o enriquecimento do óleo de grãos de café verde nestes diterpenos, já que no óleo obtido pelo método convencional de prensagem destes mesmos grãos, as concentrações destes diterpenos foram de 3,48 g de cafestol/kg de óleo OV e 7,50 g de cafestol/kg de óleo ON. Para o kahweol a concentração foi de 8,59 g/kg de óleo OV e 12,82 g/kg ON.

A concentração de cafestol em diferentes espécies de café verde varia de 239 a 616 mg/100 g, e a concentração de kahweol de 5 a 1.065 mg/100 g de grãos de café verde (ROOS et al., 1997). Especificamente para o café arábica produzido no estado de São Paulo, a concentração de cafestol no óleo obtido por extração com CO₂ supercrítico variou

de 30 a 197 g/100 g de grãos de café verde e a concentração de kahweol variou de 24 a 253 g/100 g.

Os dois processos estudados, SFE e PFE, apresentam concentrações de diterpenos superiores à concentração deles no óleo de café obtido pelo método convencional. Na PFE, os extratos apresentaram concentrações de diterpenos que variaram de 18,99 a 65,87 g de cafestol/kg de óleo e de 22,80 a 54,99 g de kahweol/kg de óleo de grãos de café verde.

Neste trabalho foi possível verificar que o emprego de inovação tecnológica (SFE e PFE), como esperado, possibilitou a obtenção de um óleo de grãos de café verde enriquecidos em diterpenos. Este era o objetivo principal desta pesquisa. Vale ressaltar que, se o teor de lipídeos nos grãos de café arábica varia de 12 a 20% (LAGO, 2001) então, no processo de extração supercrítica há ainda condições de estudos, por exemplo, que envolvam a vazão e granulometria e que talvez possibilite a obtenção de rendimentos superiores a 8,08%.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Continuação dos estudos da determinação de compostos fenólicos totais nos extratos de PFE;
- Extrações com fluido pressurizado fazendo uso da água como solvente;
- Modelagem matemática do óleo de café verde obtido por SFE e PFE;
- Determinação dos ácidos graxos presentes no óleo de prensagem novo e velho e PFE;
- Aplicação dos extratos em modelos animais com câncer.

Este projeto de pesquisa ainda continua em andamento e há muito ainda a ser considerado no estudo do processo e do produto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 13 maio 2013.

AHOLA, I.; JAUHIAINEN M.; ARO, A. The hypercholesterolaemic factor of boiled coffee is retained by a paper filter. **Journal of Internal Medicine**, 230, 293-297, 1991.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** AOAC International: Arlinton, 1995.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.** 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method. 969.33. 2005.

ASCHERIO, A.; ZHANG, S.M.; AND HERNAN, M.A. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Annals of Neurology**, 50, 56–63, 2001.

ALTIMARI, L. R.; MORAES, A. C.; TIRAPEGUI, J.; MOREAU, R. L. M. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, 1, 2006.

ALVAREZ, A. M. R.; RODRIGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grassas Y aceites**, 51, 74–79, 2000.

ALVES, R.C.; CASAL, S.; ALVES, M.R.; OLIVEIRA, M.B. Discrimination between arábica and robusta coffee species on the basis of their tocopherols profiles, **Food Chemistry**, 114, 295-299, 2009.

ARAÚJO, M.A. & SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide, **Food Chemistry**, 101, 1087-1094, 2006.

AZEVEDO, A.B.A.; KIECKBUSH, T.G.; TASHIMA, A.K.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P.; VIEIRA DE MELO, S.A.B. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 44, 86-192, 2008.

BAK, A. A. A.; GROBEE, D. E. The effect on serum cholesterol levels of coffee brewed by filtering or boiling. **New England Journal of Medicine**, 321, 1432–1437, 1989.

BANKS, M.; McFADDEN, C.; ATKINSON, C. **The world encyclopedia of coffee**. London: Lorenz Books, 256 p. 1999.

BELLISLE, F.; DIPLOCK, A.T.; HORNSTRA, G.; KOLETZKO, B.; ROBERFROID, M.; SALMINEN, S.; SARIS, W.H.M. Functional food in Europe. **British Journal of Nutrition**, 80, 93, 1998.

BOSELLI, E.; VELAZCO, V.; CABONI, M.F. & LERCKER, G. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. **Journal of Chromatography A**, 917, 239–244, 2001.

BRENELLI, E.C.S. Extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química nova**, 26, 1, 136-138, 2003.
BRUNNER, G. In **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and application to separation processes**; BAUMGÄRTEL, H.; FRANCK, E. U.; GRÜNBEIN, W., Ed.; Springer: New York, 1994; 387p.

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

BUCCI, L.R. Selected herbals and human exercise performance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 72, 2, 624-636, 2000.

CADONI, E.; DE GIORGI, M.R.; MEDDA, E.; POMA, G. Supercritical CO₂ extraction of Lycopene and β -carotene from ripe tomatoes. **Dyes and Pigments**, 44, 27-32, 2000.

CAFÉPOINT. Disponível em: <<http://www.cafepoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-de-noticias/brasil-consumo-de-cafe-bate-recorde-e-aumenta-o-equivalente-a-610-mil-sacas-em-1-ano-82415n.aspx>>. Acesso em: agosto 2013.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, 421-424, 1998.

CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E.A.; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B₁-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, 39, 549–556, 2001.

CAVIN, C.; HOLZHAEUSES, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W.W.; SCHLTER, B. cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity, **Food and Chemical Toxicology**, 40, 1155-1163, 2002.

CHAPEAU, C. **Isolement d'agro molécules, le cafestol et le kahweol, d'une matrice végétale, le café**. 2010. 86p. Relatório de Estágio – Université d'Orléans, Orléans, 2010.

CHARTIER, A.; BEAUMESNIL, M.; OLIVEIRA, A.L.; ELFAKIR, C.; BOSTYN, S. Optimization of the isolation and quantitation of kahweol and cafestol in green coffee Oil. **Talanta**, 117, 102-111, 2013.

CLAUDE, B.; MORIN, P.; LAFOSSE, M.; BELMONT, A-S.; HAUPT, K. Selective solid-phase extraction of a triterpene acid from a plant extract by molecularly imprinted polymer. **Talanta**, 75, 344-350, 2008.

CORSO, M. P.; FAGUNDES-KLEIN, M. R.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamum indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 52, 56-61, 2010.

COSTA, H. M. DA.; RAMOS, V. D.; ABRANTES, T. A. S. A.; CASTRO, L. L. Y.; VISCONTE, L. L. Y.; NUNES, R. C. R.; FURTADO, C. R. G. Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, 14, 46-50, 2004.

DANH, L. T.; MAMMUCARI, R.; TRUONG, R.; FOSTER, N. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. **Chemical Engineering Journal**, 155, 617-626, 2009.

DELLA PORTA, G.; PORCEDDA, S.; MARONGIU, B.; REVERCHON, E. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction, **Flavour and Fragrance Journal**, 14, 214–218, 1999.

DENERY, J. R.; DRAGULL, K.; TANG, C. S.; LI, Q. X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluVialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. **Analytica Chimica Acta**, 501, 175-181, 2004.

DE ROOS, B.; SAWYER, J.K.; KATAN, M.B.; RUDEL, L.L. Validity of animal models for the cholesterol-raising effects of coffee diterpenes in human subjects. **Proceedings of the Nutrition Society**, 58, 551–557, 1998.

DIAS, R.C.E. **Diterpenos em café: desenvolvimento de metodologia para análise, avaliação em cafés torrados e em diferentes tecidos do fruto, e estudo da estabilidade**

com o processo de torra. 2009. 158p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F. G.; VIEIRA, L. G. E., et al. Evaluation of kahweol and cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 88-93, 2010.

DODDS, E.D.; MCCOY, M.R.; GELDENHUYS, A.; REA, L.D.; KENNISH, J.A. Microscale recovery of total lipids from fish tissue by accelerated solvent extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 81, 835-840, 2004.

ELMIPLANT. Disponível em: <<http://www.elmiplant.com/en/Ingredients/Green-Coffee-Coffea-Arabica-Seed-Oil>>. Acesso em: agosto 2010.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Embrapa café.** Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/links.htm>>. Acesso em: julho 2013.

FARAH, A.; NEVES, D.F.; TRUGO, L.C.; ROSENTHAL, A.; DELLA MODESTA, R.C. Compostos fenólicos em café torrado. In: **II simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**, Vitória, ES, 1-7, 2002.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 18, 23-36, 2006.

FERRARI, M.; RAVERA, F.; DE ANGELIS, E.; SUGGILIVERANI F.; NAVARINI, L. Interfacial properties of coffee oil. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, (Article in press), 2010.

FERRAZZANO, G.F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; DE NATALE, A.; POLLIO, A. Anticariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, doffee, tea), **Fitoterapia**, 80, 255-262, 2009.

FILIPPIS, F. M. **Extração com CO₂ Supercrítico de Óleos Essenciais de Hon-sho e Ho-sho – Experimentos e modelagem.** 2011. 144p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FREITAS, S. P.; GARCIA, T. N.; LAGO, R. C. A. Green coffee oil extraction with ethyl alcohol. In: **LIPIDEX SUDAMERICA, 2001**, Asaga, dmg, Buenos Aires, 35, 2001.

FROM NATURE WITH LOVE. Disponível em:

<http://www.fromnaturewithlove.com/product.asp?product_id=oilcoffeegreen&track=nbw100608>. Acesso em: agosto 2010.

GEORGE, A.J. Central nervous system stimulants. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 14, 1, 79-88, 2000.

GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal of Epidemiology**, 147, 1043–1052. 1998.

GOPALAKRISHNAN, N. Carbon dioxide extraction of coffee beans. **Indian Coffee**, 54, 7–10, 1990.

GREEN PLANT EXTRACTS. Disponível em:

<<http://www.greenplants.eu/3.aspx?sr=104>>. Acesso em: agosto de 2010.

GROLLIER, J. F.; PLESSIS, S. **Use of coffee bean oil as a sun filter.** United States Patent n_ 4,793,990. US Patent & Trademark Office, 1988.

GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT A.C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews, **Food and Chemical Toxicology**, 35, 547-554, 1997.

HECKMAN, M.A.; SHERRY, K.; DE MEJIA, G. Energy drinks: an assessment of their market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. **Comprehensive reviews in food science and foods safety**, 9, 303-317, 2010.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46, 101–123. 2006.

HUBER, W.W.; MCDANIEL, L.P.; KADERLIK, K.R.; TEITEL, C.H.; LANG, N.P.; KADLUBAR, F.F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) in the rat. **Mutation Research**, 376, 115–122, 1997.

HUNG, T. V.; UNGER, M. A. Applications of supercritical fluid extraction in Japanese food industry. **Food Australia**, 40, 235-238, 1994.

KAWACHI, I.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; SPEIZER, F. E. A prospective study of coffee drinking and suicide in women. **Archives of Internal Medicine**, 156, 521, 1996.

KIM, W.J.; KIM, J.D.; KIM, J.; OH, S.G.; LEE, Y.W. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction, **Journal of Food Engineering**, 89, 303–309, 2008.

KOLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green coffee and roasted coffees. **Journal High Resolution of Chromatography**, 22, 43–45, 1999.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSK, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTLN, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, 113, 71, 2002.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. **Journal of Separation Science**, 24, 843-848, 2001.

LAGO, R. C. A. **Lipídios em grãos de café**. B. CEPPA, Curitiba, 19, 2, 324, jul./dez. 2001.

LAGO, R. C. A.; FREITAS, S.P. Extração dos óleos de café verde e da borra com etanol comercial. **Comunicado Técnico**, 92, 1-6, 2006.

LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercrítico: Quo vadis?. **Revista Analytica**, 1-7, 2002.

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. High resolution gás chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids, **Chromatographia**, 41, 29-33, 1995.

LEITE, C.L. **Aceitação e preferência por cafés submetidos a diferentes métodos de extração de cafeína**. 2009. 121p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Nutrição e Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LOPEZ-AVILA, V. Sample preparation for Environmental Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 29, 3, 195-230, 1999.

LOPEZ-FONTAL, E. M.; CASTANO-CASTRILON, J. J. Extraccion de aceite a partir de subproductos de la trilla de cafe' pergamino. **Cenicafe**, 50, 66–68. 1999.

MACHADO, A.S.R.; GOMES DE AZEVEDO, E.; SARDINHA, R.M.A.; NUNES DA PONTE, M. High pressure carbon dioxide extraction from geranium plants, **Journal of Essential Oil Research**, 5, 185–189, 1993.

MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D.R. **Cultura do café no Brasil: Novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro e Varginha/MG, 2005. 434p.

MARTÍN, M.J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A.G. Discrimination between arábica and robusta Green coffee varieties according to their chemical composition, **Talanta**, 46, 1259-1264, 1998.

MAUL, A. A. Fluídos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 11, 2000.

MENDES, R.L.; REIS, A.D.; PALAVRA, A.F. Supercritical CO₂ extraction of c-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira* (Spirulina) *maxima*: comparison with organic solvent extraction, **Food Chemistry**, 99, 57–63, 2006.

MESOMO, M.C. **Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) usando CO₂ supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica**. 2013. 79p. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MESOMO, M. C.; SCHEER, A. DE P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, 71, 102-109, 2012.

MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, 28, 637-641, 2005.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.

MURIEL, P.; ARAUZ, J. Coffee and liver diseases. **Fitoterapia**, (Article in press), 2009.

MURIEL, P.; ARAUZ, J. Review Coffee and liver diseases. **Fitoterapia** 81, 297–305, 2010.

NAIDU, M.M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S.R., SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of Green coffee. **Food Chemistry**, 107, 377-384, 2008.

NAWROT, P., JORDAN, S., EASTWOOD, J., ROTSTEIN, J., HUGENHOLTZ, A., FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**, 20, 1–30. 2003.

OESTREICH-JANZEN, S. **Chemistry of coffee**. In L. Mander (Ed.), *Comprehensive natural products II. Chemistry and biology*. Oxford, UK: Elsevier Ltd. 1085–1113. 2010.

OIGMAN, S.S.et al. Microwave-assisted methanolysis of green coffee oil. **Food Chemistry**. 134, 999–1004, 2012.

OLIVEIRA, A. L.; SILVA, S. S.; SILVA, M. A. P.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, F. A. Sensory and yield response surface analysis of supercritical CO₂ extracted aromatic oil from roasted coffee. **Journal of Food Science and Technology**, 38, 38-42, 2001.

OLIVEIRA, A.L.; CRUZ, P.M.; EBERLIN, M.N.; CABRAL, F.A. Brazilian roasted coffee oil obtained by mechanical expelling: compositional analysis by GC-MS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25, 677-68, 2005.

PALLARONI, L.; VON HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 993, 39-45, 2003.

PARDO, O.; YUSÀ, V.; CASCOLLÀ, C.; LEÓN, N.; PASTOR, A. Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish. **Journal of Chromatography A**, 1154, 287-294, 2007a.

PARDO, O.; YUSÀ, V.; CASCOLLÀ, C.; LEÓN, N.; PASTOR, A. Determination of acrylamide in coffee and chocolate by pressurised fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, 24, 63-672, 2007b.

PARK, H.S.; IM, N.G.; KIM, K.H. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. **Food Science and Technologie**, 73-78, 2012.

PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A.M.; MURCIA, M.A. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, 102, 582-92, 2007.

PEDERSSETTI, M. M.; PALÚ, F.; DA SILVA, E. A.; ROHLING, J. H.; CARDOZO FILHO, L.; DARIVA, C. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propano and supercritical carbone dioxide. **Journal of Food Engineering**, 102, 189-196, 2011.

PELLE, E. **Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis**. United States Patent n_ 5,855,897. US Patent & Trademake Office, 1999.

PEREIRA, S.P. **Mundo novo amarelo - Fazenda da terra – 2011**. Disponível em: <www.redepeabirus.com.br>. Acesso em: 02 maio 2013.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C.M.; PAULIS, T.; MARTIN, P.R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars, **Food Chemistry**, 106, 859-867, 2008.

PÓL, J.; OSTRÁ, E.V.; KARÁSEK, P.; ROTH, M.; BENESOVÁ, K.; KOTLARIKOVA, P.; CÁSLAVSKÝ, J. Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 388, 1847-1857, 2007.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**, 95, 215-226, 2009.

QUEIROZ, J. **Abastecimento e segurança alimentar: o crescimento da agricultura e a produção de alimentos no Brasil**. Brasília/DF, 2008, 388p.

RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Caffeine in coffee: its removal. Why and how? **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, 39, 5, 441–456, 1999.

RIDGWAY K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, 1153, 36-53, 2007.

RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L.; AVDALOVIC, N.; POHL, C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. **Analytical Chemistry**, 68, 1033-1039, 1996.

RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L. Accelerated solvent extraction: a new technique for sample preparation. **Analytical Chemistry**, 68, 1033-1039, 1997.

RODRIGUES, V. M.; SOUSA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the Solubility of Extracts from Vegetable raw Material in Pressurized CO₂: A pseudo-ternary Mixture formed by Cellulosic Structure + Solute + solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, 22, 21-36, 2002.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A. AND KATAN, M.B. Levels of cafestol, kahweol, and Related Diterpenoids in Wild Species of the Coffee Plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 3065-3069, 1997.

ROSELIUS, W.; VITZTHUM, O.; HUBERT, P. **Method of extracting coffee oil containing aroma constituents from roasted coffee**. United State Patent n^o 4,328,225, US Patent & Trademark Office, 1982.

SÄÄKSJÄRVI, K.; KNEKT, P.; RISSANEN, H.; LAAKSONEN, M.A.; REUNANEN, A.; MÄNNISTÖ S. Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, 62, 908-915, 2007.

SALAZAR-MARTINEZ, E.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, 140, 1-8, 2004.

SALDANA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane, **Fluid Phase Equilibria**, 194, 885-894, 2002.

SANDLER, S. I. In **Chemical And Engineering Thermodynamics**. Ed.; Wiley Series, 1989, 2^a Ed., 622p.

SANDERS, N. Food legislation and the scope for increased use of near-critical fluid extraction operations in the food, flavouring and pharmaceutical industries. In: KING, M. B. e BOTT, T. R. **Extraction of natural products using near-critical solvents**. London: Chapman & Hall, 325p. Cap.2, p.35-29, 1993.

SANTOS, D.N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de semente de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.).** 2012. 99p. Dissertação (Mestrado), Pirassununga, 2012.

SARRAZIN, C.; LE QUERE, J-L.; GRETSH, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different methods. **Food Chemistry**, 70, 99–102, 2000.

SCHILTER, B.; HOLZHAUSER, D.; CAVIN, C. Health benefits of coffee. In: **Proceedings of the 19th International Scientific Colloquium on Coffee**, Trieste, 14–8, 2001.

SMITH, A. W. Introduction. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) **Coffee: chemistry**. 2. ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, p. 1-41, 1989.

SINCLAIR, C.J.D.; GEIGER, J.D. Caffeine use in sport: a pharmacological review. **Journal Sports Medicine Physical Fitness**, 40, 71-79, 2000.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 144-158, 1965.

SIVETZ, A. W.; DESROSIER, N. W. **Coffee technology**. Westport: AVI Publishing Company, 716 p. 1979.

SPILLER, M.A. The Chemical Components of Coffee. In: **Caffeine**. Spiller, G. A., Ed., CRC Press, Boca Raton, 97–161. 1998.

SPRIET, M.C. **Food service organizations: a managerial systems approach**. London: Prentice-Hall, Inc.; 1995.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 18, 201-216, 2006.

StatSoft, Inc. (2004). **STATISTICA** (data analysis software system), version 7. Disponível em: www.statsoft.com.

STRUMILLO, C.; KUNDRA, T. **Drying: principles, applications and design**. New York: Gordon and Breach Publishers, 1986.

SUTTER, L.E.D.N.; SILVA, M.F.F.; CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 14, 3-10, 1994.

SWEELEY, C. C; BENTLEY, R.; MAKITA, M., et al. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. **Journal of the American Chemical Society**, 85, 16, 2497, 1963.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43, 2167-2172, 1995.

USDA 2008 – **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/scripts/attacherep/attache_lout.asp>. Acesso em: Agosto de 2010.

VANDENBURG, H.J.; CLIFFORD, A.A.; BARTLE, K.D.; CARROLL, J.; NEWTON, I.D. Comparison of pressurised fluid extraction and microwave assisted extraction with atmospheric pressure methods for extraction of additives from polypropylene. **Analyst**, 124, 397-400, 1999.

VON HOLST, C.; MULLER, A.; SERANO, F.; SPORRING, S.; BJÖRKLUND, E. Optimization of pressurized liquid extraction for the determination of seven selected polychlorinated biphenyls in feed samples. **Chromatographia**, 61, 391-396, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas**. Springer, London, 2009, 384 p.

WATERS. **Extractor TharSCF**. Disponível em: < www.waters.com>. Acesso em: outubro 2011.

WEUSTERN-VAN DER WOUW, M.P.M.E.; KATAN, M.B.; VIANI, R.; HUGGET, A.C.; LIARDON, R.; LUND-LARSEN, P.G. et al. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effect on liver function enzymes. **Journal of Lipid Research**, 35, 721-733, 1994.

WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E. et al. Coffee consumption and coronary heart disease in women. **A ten-year follow-up. JAMA**, 275, 458-462, 1996.

ZHANG, S.; CHEN, R., WU, H.; WANG, C. Ginsenoside extraction from *Panaxquinquefolium* L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41, 57-63, 2006.

ZOSEL, K. Separation with supercritical gases: practical applications, **Angewandte Chemie International Edition in English**, 17, 702–709, 1978.