UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DAYANE CRISTINA GOMES OKIYAMA

**Reaproveitamento da Casca da Amêndoa de Cacau para Extração
de Gordura e Biocompostos Utilizando Solventes Alcoólicos**

Pirassununga

2018

DAYANE CRISTINA GOMES OKIYAMA

**Reaproveitamento da Casca da Amêndoa de Cacau para Extração de Gordura e
Biocompostos Utilizando Solventes Alcoólicos**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

OO41r Okiyama, Dayane Cristina Gomes
Reaproveitamento da Casca da Amêndoa de Cacau
para Extração de Gordura e Biocompostos Utilizando
Solventes Alcoólicos / Dayane Cristina Gomes
Okiyama ; orientadora Christianne Elisabete da
Costa Rodrigues. -- Pirassununga, 2018.
225 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. líquido pressurizado. 2. flavanóis. 3.
alcaloides. 4. tocoferóis. 5. coeficientes de
difusão. I. Rodrigues, Christianne Elisabete da
Costa, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus filhos, Alice e Artur, ao meu marido

Willian e à minha amiga e irmã Mariane.

A eles minha eterna gratidão e o maior amor que sou capaz de sentir!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me colocar neste caminho e me dar forças para vencer as dificuldades.

Agradeço ao meu marido, Willian, pelo apoio, atenção e carinho em todos os momentos, por ser do meu time e sempre lutar ao meu lado.

Agradeço a minha irmã Mariane por ser minha principal incentivadora e torcedora fiel, por acreditar na minha capacidade e sempre me colocar para cima, a minha gratidão a ti só não é maior que a minha saudade.

Agradeço aos meus filhos por, pelo simples fato de existirem, serem meu norte e meu sul, meus guias que me levam aonde devo estar.

Agradeço à minha família de sangue e de vida, Shimoyamas, Gomes, Okiyamas e Costas, vocês foram meu porto seguro e meu descanso ao longo de todos esses anos de pós-graduação.

Agradeço à minha orientadora Christianne Elisabete da Costa Rodrigues pela oportunidade de fazer parte de sua equipe. Agradeço também por compreender minhas limitações e por exigir de mim o meu melhor, fazendo com que hoje eu sinta orgulho de todo o trabalho que desenvolvemos ao longo desta caminhada.

Agradeço à Keila e aos meus colegas de laboratório pelas conversas, risadas, consolos e conselhos, vocês foram fundamentais.

Agradeço à Ingrid, aluna de iniciação científica, pelo companheirismo e suporte durante o desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

Agradeço à professora Alessandra Lopes de Oliveira e a toda equipe do Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais da FZEA/USP os quais nos auxiliaram em parte deste trabalho.

Ao professor Luiz Alberto Beraldo de Moraes e ao especialista Eduardo J. Crevelin responsáveis pelo Laboratório de Espectrometria de Massas FFCLRP/USP pelo auxílio nas análises de determinação de alcaloides e flavanóis.

Ao Laboratório de Encapsulação e Alimentos Funcionais pelo apoio na execução de parte das análises contempladas neste trabalho.

Ao Laboratório de Química Biológica pelo auxílio na execução das análises de atividade antioxidante.

À professora Maria Inés Genovese e à equipe do Laboratório de Compostos Bioativos de Alimentos FCF/USP pelo apoio em parte deste trabalho.

Agradeço às empresas processadoras de cacau, localizadas em Ilhéus/Bahia, pelas doações das cascas das amêndoas de cacau.

Agradeço a participação dos membros componentes da banca examinadora pelas valiosas contribuições.

Agradeço pelo apoio parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de Doutorado processo nº 2015/03579-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e fomento à pesquisa (Auxílios a Pesquisa processo nº 2014/09446-4, processo nº 2017/20840-4 e Projeto Temático processo nº 2014/21252-0).

RESUMO

OKIYAMA, D. C. G. **Reaproveitamento da Casca da Amêndoa de Cacau para Extração de Gordura e Biocompostos Utilizando Solventes Alcoólicos.** 2018, 225 p. Tese de doutorado, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O objetivo principal desta tese de doutorado foi a valorização da casca da amêndoa de cacau através do estudo da viabilidade técnica do emprego de tecnologias de extração a pressão atmosférica (ATME) e com líquido pressurizado (PLE) para extração da gordura e biocompostos deste material, utilizando etanol e isopropanol como solventes, os quais são solventes GRAS com aplicação potencial como substitutos do hexano na extração de lipídeos. Para que a sua viabilidade na aplicação de processos de extração fosse atestada, inicialmente, a casca da amêndoa de cacau seca (CS) foi caracterizada. A CS mostrou ser um material nutricionalmente interessante, com teor intermediário de lipídeos (entre 18 a 22% b.s.), elevado teor de fibras, flavanóis e alcaloides e alta solubilidade proteica (47 – 54%), além de não apresentar contaminação por micotoxinas e cádmio. Sua gordura se destacou por ter perfil lipídico semelhante ao da manteiga de cacau com teor superior de ácido linoleico e teores de tocoferóis totais bastante elevados os quais variaram entre 1016 a 1273 mg/kg de gordura, sendo os isômeros majoritários o (γ + β) tocoferóis. Assim, a cinética de extração por PLE de lipídios e flavanóis totais (FLA) para sistemas contendo CS e etanol em grau absoluto (Et0) foi estudada nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C em tempos estáticos variando de 3 a 50 minutos e razão mássica sólido:solvente de 1:3. A partir destes experimentos determinou-se 30 minutos como o tempo adequado para que a condição de equilíbrio fosse alcançada para as três temperaturas avaliadas; à partir deste intervalo de tempo a extração de lipídeos está estabilizada e o rendimento de extração de FLA é máximo. Os extratos, as gorduras e os sólidos desengordurados oriundos da PLE foram avaliados levando a concluir que esta técnica foi extremamente viável para extração de lipídeos, flavanóis, alcaloides e tocoferóis da CS, fornecendo rendimentos de extração bastante elevados, em curto período de tempo, em um único estágio de contato. Os dados experimentais da cinética por PLE foram modelados e os coeficientes de difusão para a gordura foram estimados. Além disso, pode-se verificar que a PLE não afetou a solubilidade das proteínas presentes no material das extrações conduzidas a 60 e 75 °C, o que permite a obtenção de um sólido desengordurado com elevado valor. A investigação do processo de extração por ATME iniciou-se com sistemas contendo CS e solventes etanol e isopropanol, em grau absoluto e azeotrópico, nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C com razão mássica sólido:solvente de 1:3 e tempo de extração de 1 hora. Pode-se observar que, nessas condições, os experimentos de extração forneceram resultados de rendimento de extração de gordura aquém do esperado. Apesar disso, foi possível avaliar o efeito dos parâmetros de processo, temperatura e tipo de solvente, sobre o processo de extração; pode-se concluir que temperaturas mais elevadas levam a maiores rendimentos de extração de todas as classes de compostos avaliadas, para os lipídeos, em geral, o solvente isopropanol em grau absoluto foi o mais eficiente, entretanto, na extração de compostos fenólicos, FLA e tocoferóis o solvente etanol em grau azeotrópico apresentou melhor desempenho. Para uma investigação mais aprofundada, realizou-se o estudo da cinética de extração de lipídeos por ATME com os solventes etanol em grau absoluto e azeotrópico nas temperaturas de 75 e 90 °C. Com estes experimentos pode-se observar que, para garantir que a condição de equilíbrio fosse alcançada, seria necessário tempo de extração de pelo menos 3 horas para os solventes avaliados, com este tempo de extração os rendimentos aumentaram consideravelmente, bem como o teor de flavanóis totais nos extratos; por outro lado, a solubilidade proteica da fase refinado diminuiu consideravelmente. Os dados experimentais de cinética por ATME foram modelados e os

coeficientes de difusão para a gordura foram também estimados, sendo aproximadamente 5 vezes menores que os estimados para a PLE. Com base na determinação do tempo necessário para se atingir a condição de equilíbrio, realizou-se os experimentos para determinação dos coeficientes de partição (k) da gordura da casca da amêndoa de cacau, o qual permite estimar o número de estágios de extração para máxima exaustão dos sólidos em termos de teor de lipídeos. Estes experimentos mostraram que o solvente EtO a temperaturas mais elevadas fornece coeficientes de partição maiores. Os valores de k_{gordura} maiores obtidos para o EtO, se comparado com o solvente etanol em grau azeotrópico, indicam que seu emprego em processos de extração exigiria um número menor de estágios de contato para o esgotamento do sólido. Analisando os processos de extração empregados, pode-se concluir que a PLE apresenta eficiência superior na extração simultânea de flavanóis e compostos lipídicos da casca da amêndoa de cacau em relação a ATME, e também impacta menos a solubilidade proteica dos sólidos desengordurados oriundos do processo de extração, fato que demonstra sua elevada viabilidade técnica.

Palavras-chave: testa de cacau, etanol, flavanóis, alcaloides, tocoferóis, índice de solubilidade de nitrogênio, coeficientes de difusão, líquido pressurizado, PLE.

ABSTRACT

OKIYAMA, D. C. G. **Reuse of Cocoa Bean Shell for Fat and Biocompounds Extraction Using Alcoholic Solvents** 2018, 225 p. Ph.D. Thesis, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2018.

The main objective of this Ph.D. thesis was the valorization of the cocoa bean shell through the study of the technical feasibility of the use of atmospheric pressure extraction (ATME) and pressurized liquid extraction (PLE) technologies for the extraction of fat and biocompounds of this material, using ethanol and isopropanol as solvents, which are GRAS solvents with potential application as substitutes for hexane in lipid extraction. In order for its viability in the application of extraction processes to be attested, initially, the dried cocoa bean shell (CS) was characterized. CS showed to be a nutritionally interesting material, with an intermediate content of lipids (between 18 to 22% d.b.), high fiber content, flavanols and alkaloids and high protein solubility (47-54%), besides not being contaminated by mycotoxins and cadmium. Its fat was remarkable for having a lipid profile similar to that of cocoa butter with a higher content of linoleic acid and quite high total tocopherols, which ranged from 1016 to 1273 mg / kg of fat, with the major isomers being ($\gamma + \beta$) tocopherols. Thus the PLE extraction kinetics of lipids and total flavanols (FLA) for systems containing CS and absolute ethanol (Et0) were studied at 60, 75 and 90 ° C in static times ranging from 3 to 50 minutes and mass ratio solid:solvent of 1: 3. From these experiments, 30 minutes were determined as the adequate time for the equilibrium condition to be reached for the three temperatures evaluated; from this time interval the lipid extraction is stabilized and the extraction yield of FLA is maximal. The raffinate phases, extract phases and fats from PLE were evaluated leading to the conclusion that this technique was extremely viable for extracting lipids, flavanols, alkaloids and tocopherols, providing very high extraction yields in a short period of time with a single stage of contact. Experimental data of PLE kinetics were modeled and the diffusion coefficients for fat were estimated. In addition, PLE did not affect the solubility of the proteins present in the material from extractions conducted at 60 and 75 °C, which allows obtaining a high value defatted meal. The investigation of the extraction process by ATME started with systems containing CS and solvents ethanol and isopropanol, in absolute and azeotrope degree, at 60, 75 and 90 ° C with mass ratio solid:solvent of 1:3 and time of extraction time of 1 hour. Under these conditions, the extraction experiments gave results of fat extraction yields less than expected. Despite this, it was possible to evaluate the effect of process parameters, temperature and type of solvent on the extraction process; it can be concluded that higher temperatures lead to higher extraction yields of all classes of compounds evaluated. For lipids, in general, the absolute isopropanol was the most efficient solvent, however, in the extraction of phenolic compounds, FLA and tocopherols the ethanol azeotropic showed better performance. For a more in-depth investigation, the kinetics of lipid extraction by ATME with ethanol in absolute and azeotropic degree at 75 and 90 °C were carried out. With these experiments it can be observed that, in order to guarantee that the equilibrium condition was reached, extraction time of at least 3 hours was required for the solvents evaluated, with this time of extraction the yields increased considerably, as well as the content of flavanols totals in extracts; on the other hand, the protein solubility of the raffinate phase decreased considerably. Experimental kinetic data by ATME were modeled and the diffusion coefficients for fat were also estimated, being approximately 5 times smaller than those estimated for PLE. Based on the determination of the time required to reach the equilibrium condition, the experiments were carried out to determine the partition coefficients (k) of the cocoa bean shell fat, which allows estimating the number of extraction stages to maximum depletion in terms of lipid content. These experiments showed that the solvent Et0

at higher temperatures provides larger partition coefficients. The higher k_{fat} values obtained for EtO, when compared to ethanol solvent in azeotropic grade, indicate that their use in extraction processes would require a lower number of contact stages for the depletion of the solid. Analyzing the extraction processes applied, it can be concluded that PLE has superior efficiency in the simultaneous extraction of flavanols and lipid compounds from the cocoa bean shell in relation to ATME, and has less impact on the protein solubility of the defatted meal, a fact that demonstrates its high technical feasibility.

Key-words: cocoa husk, ethanol, flavanols, alkaloids, tocopherols, nitrogen solubility index, diffusion coefficients, pressurized liquid, PLE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes da amêndoa de cacau.....	30
Figura 2. Fluxograma de pré-processamento e processamento do cacau.....	36
Figura 3. Processos de extração de óleos vegetais com solvente e recuperação do farelo desengordurado.....	52
Figura 4. Representação esquemática do ESL com n estágios operando em contracorrente...	53
Figura 5. Diagrama esquemático da PLE para o extrator Dionex ASE 150.	55
Figura 6. (a) Extrator Dionex ASE 150 para líquido pressurizado localizado no Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/ZEA/FZEA/USP). (b) Células de extração de 100 mL e filtro de celulose 30 mm.	77
Figura 7. (a) Extrator confeccionado em aço inox localizado no Laboratório de Engenharia de Separações (LES/ZEA/FZEA/USP). (b) Cesto utilizado para acondicionamento da matéria-prima oleaginosa.....	80
Figura 8. Casca da amêndoa de cacau seca (a) <i>in natura</i> (b) triturada.....	88
Figura 9. Curva de calibração em HPLC para α -tocoferol em 2-propanol.	94
Figura 10. Curva de calibração em HPLC para δ -tocoferol em 2-propanol.....	95
Figura 11. Curva de calibração em HPLC para γ -tocoferol em 2-propanol.....	95
Figura 12. Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) em função do pH para a casca da amêndoa de cacau seca.	100
Figura 13. Distribuição granulométrica da casca da amêndoa de cacau triturada.....	103
Figura 14. Distribuição granulométrica por difração a laser da casca da amêndoa de cacau seca obtida como produto de fundo das peneiras Tyler.	103
Figura 15. Curva de calibração para ácido gálico em água no comprimento.....	105
Figura 16. Curva de calibração para (-)- epicatequina em etanol absoluto no comprimento de onda de 640 nm.	107
Figura 17. Curva de calibração para tanino quebracho no comprimento de onda de 540 nm.	108
Figura 18. Estrutura química da (-)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina-B2, teobromina e cafeína.....	110
Figura 19. Curvas TG/DTG da decomposição térmica sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ : (a) CSPE liofilizado, (b) catequina, (c) epicatequina, (d) procianidina B2, (e) cafeína e (f) teobromina.....	115

Figura 20. Cinética de extração de lipídeos por PLE da casca da amêndoa de cacau seca. Dados Experimentais utilizando como solvente etanol absoluto: ■, 60,0 ± 0,1 °C; Δ, 75,0 ± 0,1 °C; ●, 90,0 ± 0,1 °C. Valores calculados:-----, modelo proposto por Perez et al. (2011).	117
Figura 21. Cinética de extração de flavanóis totais por PLE da casca da amêndoa de cacau seca. Dados experimentais utilizando etanol absoluto como solvente: □, 60,0 ± 0,1 °C; Δ, 75,0 ± 0,1 °C; e ○, 90,0 ± 0,1 °C. Valores calculados: -----, modelo proposto por Peleg (1988).	126
Figura 22. Teor de água nos extratos obtidos por PLE da casca da amêndoa de cacau seca utilizando como solvente etanol absoluto nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C.....	137
Figura 23. Teor de água nos extratos obtidos por ATME em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.	140
Figura 24. Índice de retenção em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.	142
Figura 25. Rendimento relativo de extração (%) de gordura da casca da amêndoa de cacau em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.	146
Figura 26. Teor residual de lipídeos (%) na fase refinado em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.	147
Figura 27. Rendimento de extração (%) de compostos fenólicos totais da casca da amêndoa de cacau em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA; (▲) IPA12.	155
Figura 28. Rendimento de extração (%) de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA; (▲) IPA12.	155
Figura 29. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.	158
Figura 30. Teor de flavanóis totais nos extratos oriundo da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.	159
Figura 31. Teor de água na fase extrato em função do tempo de processo: Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6, em massa – 75 °C; (Δ) Et6 – 90 °C.	164
Figura 32. Índice de retenção em função do tempo de processo: (■) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6 – 75 °C; (Δ) Et6 – 90 °C.....	165
Figura 33. Cinética de extração de lipídeos por ATME da casca da amêndoa de cacau seca. Dados Experimentais Et0: ▲, 90.0 ± 0.1 °C; ■, 75.0 ± 0.1 °C. Dados Experimentais Et6: Δ, 90.0 ± 0.1 °C; □, 75.0 ± 0.1 °C. Valores calculados:-----, modelo proposto por Perez et al. (2011).	166

Figura 34. Teor de gordura residual na fase refinado em função do tempo de processo: (■) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6 – 75 °C; (Δ) Et6 – 90 °C.	169
Figura 35. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: (□) Et0; (▨) Et6.	170
Figura 36. Teor de flavanóis totais nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: Et0; (▨) Et6.	170
Figura 37. Rendimento de extração: (a) fenólicos totais (FT) e (b) flavanóis totais (FLA) da casca da amêndoa de cacau (%) em função da temperatura de processo: (□) Et0; (▨) Et6.	172
Figura 38. Índice de solubilidade de nitrogênio da casca da amêndoa de cacau (Lote 3) e das fases refinado oriundas das ATME para as diferentes condições de processo avaliadas após atingir condição de equilíbrio, determinados no pH 11: (□) Et0; (▨) Et6; - - - matéria-prima.	178
Figura 39. Teor de água na fase extrato em função da razão mássica sólido:solvente empregada na ATME: (Δ) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6 – 75 °C; (■) Et6 – 90 °C.	182
Figura 40. Índice de retenção em função da razão mássica sólido:solvente empregada na ATME: (Δ) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6 – 75 °C; (■) Et6 – 90 °C.	184
Figura 41. Diagrama de distribuição da gordura para sistemas compostos por cascas de amêndoas de cacau e etanol absoluto: (Δ) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C.	186
Figura 42. Diagrama de distribuição da gordura para sistemas compostos por cascas de amêndoas de cacau e etanol azeotrópico: (□) Et0 – 75 °C; (■) Et0 – 90 °C.	187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de grãos de cacau.....	29
Tabela 2. Composição da amêndoa de cacau.	30
Tabela 3. Composição em termos dos ácidos graxos (%) principais de manteigas de cacau natural produzidas a partir amêndoas provenientes de diferentes países.	41
Tabela 4. Composição lipídica da manteiga de cacau.	41
Tabela 5. Composição da casca ou testa da amêndoa de cacau.	44
Tabela 6. Constantes físicas e químicas da manteiga de cacau e da casca da amêndoa de cacau.	47
Tabela 7. Composição em ácidos graxos da manteiga de cacau e da gordura da casca da amêndoa de cacau (%).	48
Tabela 8. Conjuntos experimentais e caracterizações realizadas.	63
Tabela 9. Composição química de diferentes lotes de casca da amêndoa de cacau. Lote T – Casca da amêndoa de cacau torrada. Lote 1 – CS empregada para PLE. Lote 2 – CS empregada para ATME. Lote 3 – CS empregada para cinética de extração de lipídeos por ATME e determinação do coeficiente de partição.	90
Tabela 10. Composição em ácidos graxos da gordura da casca da amêndoa de cacau, extraída por Bligh e Dyer (1959) comparada a composição da manteiga de cacau (FIRESTONE, 2013).....	93
Tabela 11. Teor de tocoferóis nas gorduras das cascas das amêndoas de cacau secas.	96
Tabela 12. Determinação dos teores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A na casca da amêndoa de cacau seca.....	98
Tabela 13. Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) para a casca da amêndoa de cacau seca, para os diferentes valores de pH avaliados.....	100
Tabela 14. Distribuição granulométrica da casca da amêndoa de cacau seca triturada.	104
Tabela 15. Parâmetros instrumentais do método UPLC-MS/MS para cada composto quantificado.	110
Tabela 16. Curvas de calibração dos compostos (-)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina-B2, teobromina e cafeína obtida por UPLC-MS/MS.	111
Tabela 17. Quantificação por UPLC-MS/MS de flavanóis (catequina, epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) no CSPE liofilizado e na casca da amêndoa de cacau.	112

Tabela 18. Efeito do tempo estático nas extrações com líquido pressurizado (10,35 MPa) de lipídeos da casca da amêndoa de cacau seca, realizadas a temperaturas de 60, 75 e 90° C utilizando como solvente etanol em grau absoluto com relação mássica sólido:solvente de 1:3.....	118
Tabela 19. Teor de ácidos graxos livres na gordura da casca da amêndoa de cacau seca extraída por PLE a 60, 75 e 90 °C com tempo estático de 5 minutos utilizando como solvente etanol absoluto.....	119
Tabela 20. Composição em ácidos graxos livres da gordura da casca da amêndoa de cacau seca (Lote 1) obtida pelo método Bligh e Dyer (1959) e pelos processos de extração por PLE nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C com tempo estático de 5 minutos utilizando como solvente etanol absoluto.....	120
Tabela 21. Tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau obtida por PLE nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C com tempo de extração de 5, 30 e 50 minutos.	122
Tabela 22. Parâmetros do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) ajustados aos dados experimentais da cinética de extração de lipídeos por PLE da casca da amêndoa de cacau e coeficientes de difusão.....	123
Tabela 23. Composição e rendimento de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) nos extratos oriundos da PLE obtidos com diferentes tempos estáticos e temperaturas de extração.	128
Tabela 24. Atividade antioxidante dos extratos da casca da amêndoa de cacau oriundos da PLE, usando as análises DPPH e FRAP.....	132
Tabela 25. Parâmetros do modelo de Peleg (1988) ajustados aos dados experimentais da cinética de extração de flavanóis totais por PLE da casca da amêndoa de cacau seca.	134
Tabela 26. Condições empregadas nos experimentos de extração sólido-líquido a pressão atmosférica.....	139
Tabela 27. Teor de água na fase extrato (% , em massa) para diferentes condições de extração.....	141
Tabela 28. Índice de retenção (kg solução aderida / kg sólidos inertes) na fase refinado para diferentes condições de extração.	143
Tabela 29. Índice de retenção (kg de solução/kg de sólidos inertes) das fases refinado obtidas por extração em batelada, em um estágio, de diferentes matérias-primas.	145
Tabela 30. Rendimento médio de extração de óleo (%) para diferentes condições de processo. ..	146
Tabela 31. Teor residual de gordura na fase refinado (%) para diferentes condições de processo.	147
Tabela 32. Composição em ácidos graxos das gorduras da casca da amêndoa de cacau obtidas após ATME com diferentes solventes.	151
Tabela 33. Tocoferóis na gordura da casca de cacau obtida por ATME a 90 °C.	152

Tabela 34. Rendimento de extração (%) de compostos fenólicos totais da casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos a 60, 75 e 90 °C.	156
Tabela 35. Rendimento de extração (%) de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos a 60, 75 e 90 °C.	156
Tabela 36. Composição e rendimento de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) para extratos obtidos por ATME a 90°C. ...	160
Tabela 37. Condições empregadas e desvios relativos médios para os experimentos de cinética de extração sob pressão atmosférica.....	163
Tabela 38. Teor de água na fase extrato (%) para diferentes condições de processo.....	165
Tabela 39. Rendimento relativo médio de extração de lipídeos (%) para diferentes condições de processo.	167
Tabela 40. Teor de compostos fenólicos totais (mg equivalente de ácido gálico/g de extrato) e flavanóis totais (mg equivalente de epicatequina/g de extrato) nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos a 75 e 90 °C, sob pressão atmosférica.....	171
Tabela 41. Rendimento relativo de extração (%) de compostos fenólicos totais e de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau por ATME utilizando Et0 e Et6, a 75 e 90 °C.....	173
Tabela 42. Composição e rendimento de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) nos extratos oriundos da ATME empregando etanol absoluto e etanol azeotrópico como solventes, obtidos em extrações conduzidas por 3 horas.	174
Tabela 43. Parâmetros do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) ajustados aos dados experimentais da cinética de extração de lipídeos por ATME da casca da amêndoa de cacau e os coeficientes de difusão.	175
Tabela 44. Teor de proteínas (% em base seca) na casca da amêndoa de cacau (Lote 3) e nas fases refinado oriundas das ATME para as diferentes condições de processo avaliadas após atingir condição de equilíbrio.	177
Tabela 45. Índice de solubilidade de nitrogênio da casca da amêndoa de cacau (Lote 3) e das fases refinado oriundas das ATME para as diferentes condições de processo avaliadas após atingir condição de equilíbrio, determinados no pH 11.....	178
Tabela 46. Condições empregadas nos experimentos de determinação de coeficiente de partição de gordura sob pressão atmosférica.	181
Tabela 47. Teor de água na fase extrato (% , em massa) para diferentes condições de extração.....	183

Tabela 48. Índice de retenção na fase extrato (kg de solução aderida/ kg de sólidos desengordurados) para diferentes razões mássicas sólido:solvente.	184
Tabela 49. Teores de gordura nas fases extrato (C^{FE}) e nas fases refinado (C^{FR}) para extrações conduzidas sob pressão atmosférica, nas temperaturas de 75 e 90 °C e diferentes razões mássicas sólido:solventes empregando etanol em grau absoluto e azeotrópico como solvente.....	188
Tabela 50. Coeficiente de partição nas temperaturas de 75 e 90 °C e diferentes razões mássicas sólido:solvente em extrações empregando etanol em grau absoluto e azeotrópico como solvente.	190
Tabela 51. Comparação entre os rendimentos de extração de lipídeos através das técnicas PLE e ATME empregando etanol absoluto como solvente.....	193
Tabela 52. Comparação dos parâmetros do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) ajustados aos dados experimentais de cinética de extração de lipídeos da casca da amêndoa de cacau por PLE e ATME e os coeficientes de difusão.....	194
Tabela 53. Comparação entre os teores de tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau obtida por PLEEQ e ATME1 na temperatura de 90 °C.	195
Tabela 54. Comparação entre os rendimentos relativos de extração de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau obtida por PLEEQ, ATME1 e ATM3.	196
Tabela 55. Comparação do rendimento relativo de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) das extrações PLEEQ, ATME1 e ATME3.....	197
Tabela 56. Comparação entre os valores de índice de solubilidade de nitrogênio das fases refinado obtidas por PLEEQ e ATME3, determinados no pH 11.	197

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS.....	26
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1	Cacau.....	28
3.2	Composição da amêndoa de cacau	29
3.3	Pré-processamento e processamento do cacau	33
3.3.1	Etapas de pré-processamento.....	33
3.3.2	Etapas do processamento.....	37
3.4	Manteiga de Cacau.....	40
3.5	Pó de cacau	42
3.6	Casca da amêndoa de cacau.....	42
3.6.1	Composição da casca da amêndoa de cacau.....	43
3.6.1.1	Fibras dietéticas	45
3.6.1.2	Lipídeos	47
3.6.1.3	Compostos Fenólicos.....	48
3.6.1.4	Metilxantinas	49
3.6.2	Micotoxinas na casca da amêndoa de cacau.....	49
3.6.3	Aplicações da casca da amêndoa de cacau	50
3.7	Extração de óleos vegetais	51
3.8	Extração com líquido pressurizado	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1	Materiais.....	58
4.1.1	Reagentes.....	58
4.1.2	Equipamentos	60
4.1.3	Diversos	61

4.2	Métodos.....	62
4.2.1	Caracterização da casca da amêndoa de cacau	66
4.2.1.1	Composição química	66
4.2.1.2	Composição em ácidos graxos da gordura da casca de amêndoa de cacau 66	
4.2.1.3	Determinação do teor de ácidos graxos livres na gordura da casca da amêndoa de cacau 67	
4.2.1.4	Determinação do teor de isômeros de tocoferóis.....	67
4.2.1.5	Determinação do teor de micotoxinas	68
4.2.1.6	Determinação do teor de cádmio	68
4.2.1.7	Determinação do índice de solubilidade de nitrogênio	68
4.2.1.8	Determinação da distribuição granulométrica e do tamanho médio das partículas da casca da amêndoa de cacau triturada.....	69
4.2.1.9	Densidade real das partículas da casca da amêndoa de cacau triturada	70
4.2.1.10	Obtenção de extrato para determinação de compostos fenólicos totais, flavanóis totais, alcaloides e atividade antioxidante.....	71
4.2.1.11	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	71
4.2.1.12	Determinação do teor de flavanóis totais	72
4.2.1.13	Determinação do teor de procianidinas totais – método por hidrólise ácida e formação de cor	72
4.2.1.14	Determinação do teor de alcaloides e flavanóis por UPLC – MS/MS	74
4.2.1.15	Atividade Antioxidante	75
4.2.1.16	Análise termogravimétrica	76
4.2.2	Experimentos de cinética extração sólido-líquido com líquido pressurizado (PLE) utilizando etanol absoluto.....	76
4.2.3	Experimentos de extração sólido-líquido à pressão atmosférica (ATME) utilizando solventes alcoólicos.....	78
4.2.4	Análises da fase extrato	82
4.2.4.1	Determinação do teor de água	82
4.2.4.2	Determinação do teor de solvente (álcool + água)	82
4.2.4.3	Determinação do teor de flavanóis totais	82
4.2.4.4	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	83

4.2.4.5	Determinação dos teores de alcaloides e flavanóis por UPLC – MS/MS	83
4.2.4.6	Atividade antioxidante dos extratos provenientes da PLE	83
4.2.5	Análises da fase refinado	83
4.2.5.1	Índice de retenção	83
4.2.5.2	Determinação do teor residual de lipídeos	83
4.2.5.3	Índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado	84
4.2.6	Análises da gordura de casca de amêndoas de cacau	84
4.2.6.1	Composição em ácidos graxos e teor de tocoferóis da gordura obtida do processo de extração	84
4.2.7	Cálculo do rendimento de extração de biocompostos	84
4.2.8	Cálculo do rendimento de extração de lipídeos	85
4.2.9	Modelagem matemática dos dados de cinética de extração de flavanóis totais por PLE	85
4.2.10	Modelagem matemática dos dados de cinética de extração de lipídeos por PLE e ATME	86
4.2.11	Análise estatística	87
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.1	Caracterização das matérias-primas: casca da amêndoa de cacau seca e casca da amêndoa de cacau torrada	88
5.1.1	Composição química da casca da amêndoa de cacau	88
5.1.2	Composição em ácidos graxos	91
5.1.3	Determinação do teor de tocoferóis	94
5.1.4	Determinação do teor de micotoxinas	97
5.1.5	Determinação do teor de cádmio	98
5.1.6	Determinação do índice de solubilidade de nitrogênio	99
5.1.7	Determinação da distribuição granulométrica e do tamanho médio das partículas da casca da amêndoa de cacau	102
5.1.8	Densidade real das partículas da casca da amêndoa de cacau triturada	105
5.1.9	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	105

5.1.10	Determinação do teor de flavanóis totais	106
5.1.11	Determinação do teor de procianidinas totais – método por hidrólise ácida e formação de cor.....	107
5.1.12	Determinação do teor de alcaloides e flavanóis por UPLC – MS/MS	109
5.1.13	Atividade Antioxidante	113
5.1.14	Análise termogravimétrica	114
5.2	Experimentos de cinética extração sólido-líquido com líquido pressurizado (PLE) utilizando etanol absoluto	116
5.2.1	Cinética extração de lipídeos por PLE utilizando etanol absoluto	116
5.2.2	Modelagem matemática da cinética extração de lipídeos por PLE.....	123
5.2.3	Cinética extração de flavanóis totais por PLE utilizando etanol absoluto	125
5.2.4	Modelagem matemática dos dados de cinética de extração de flavanóis totais por PLE	133
5.2.5	Índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado proveniente da PLE	135
5.2.6	Teor de água nos extratos provenientes da PLE.....	136
5.3	Experimentos de extração sólido-líquido à pressão atmosférica (ATME) utilizando solventes alcoólicos.....	138
5.3.1	Extração de gordura e biocompostos a pressão atmosférica utilizando Et0, Et6, IPA0 e IPA12	139
5.3.2	Cinética de extração da gordura da casca da amêndoa de cacau seca a pressão atmosférica utilizando Et0 e Et6	162
5.3.3	Determinação do coeficiente de partição da gordura da casca da amêndoa de cacau seca a pressão atmosférica utilizando Et0 e Et6	180
5.4	Comparação entre as técnicas de extração de gordura e biocompostos de casca da amêndoa de cacau: extração com líquido pressurizado (PLE) e a pressão atmosférica (ATME).....	192
6	CONCLUSÕES.....	199
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	202
8	MEMÓRIA DA PÓS-GRADUAÇÃO	203
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	207

1 INTRODUÇÃO

Os derivados de cacau são insumos extremamente importantes para a indústria de alimentos, uma vez que o sabor de chocolate está entre as principais preferências dos consumidores; dessa forma, muitos produtos alimentícios possuem esses derivados como ingredientes. Nos últimos anos, a produção de cacau vem sofrendo uma queda significativa (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2017). Em contraste, o consumo de seus derivados vem aumentando nas últimas décadas (JONFIA-ESSIEN et al., 2008) fato que tem tornado a oferta desta *commodity* insuficiente. Para a safra 2015/2016 este déficit atingiu 187 mil toneladas, ou seja, para que o mercado fosse totalmente abastecido, uma produção cerca de 5% maior seria necessária (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2017). Nesse cenário, uma das estratégias para melhorar a oferta é identificar e comercializar novos produtos ou dar novas aplicações a produtos e subprodutos existentes.

Uma parte do esforço para identificar outras aplicações do cacau e seus produtos se concentrou na utilização da casca da amêndoa. Ela é gerada na etapa de descascamento na qual é removida, juntamente com o gérmen, antes ou após a torra da semente, enquanto o cotilédone, na forma de *nibs*, é utilizado para produção de chocolate (EL-SAIED; MORSI; AMER, 1981). Estima-se que a produção mundial de amêndoas de cacau na safra 2015/2016 tenha sido de aproximadamente 3.981 mil toneladas. Considerando que a casca compreende aproximadamente 12% a 20% da semente (MENDES; LIMA, 2007), pode-se estimar que a produção anual deste subproduto atinja aproximadamente 640 mil toneladas (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2017). Todo este montante é comumente subutilizado, sendo sua principal aplicação como combustível para caldeiras (OSUNDAHUNSI; BOLADE; AKINBINU, 2007), motivo suficiente para os pesquisadores darem um destino mais útil e lucrativo para este subproduto.

A ideia de usar casca da amêndoa de cacau como aditivo para alimentos humanos tem sido relatada em vários estudos, porém a maior parte deles trata do uso da casca de cacau como fonte de fibra alimentar (COLLAR et al., 2009; LECUMBERRI et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2012; NSOR-ATINDANA; ZHONG; MOTHIBE, 2012) e de compostos fenólicos com atividade antioxidante (ALADEDUNYE, 2014; AMIM; YEE, 2006; ARLORIO et al., 2005). Em alguns trabalhos também encontra-se reportada a composição química da casca da amêndoa de cacau; estes trabalhos mostram que este material também possui um conteúdo significativo de proteínas e lipídios, sendo estes bastante variáveis e ficando entre 11 a 18% e 2 a 18,5%,

respectivamente (ARLORIO et al., 2001; LECUMBERRI et al., 2007; MARTÍN-CABREJAS et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2012) e alto teor de metilxantinas (ADAMAFIO, 2013). Embora o conteúdo desses compostos tenha sido relatado, poucos trabalhos onde estes tenham sido avaliados foram encontrados.

Os principais compostos fenólicos encontrados no cacau são flavanóis, principalmente catequinas, epicatequinas e procianidinas e, entre eles, o último grupo costuma aparecer em maior quantidade, sendo considerado o principal responsável pela atividade antioxidante do cacau (PAYNE et al., 2010). Com relação à casca da amêndoa especificamente, vários estudos relataram a atividade antioxidante de seus produtos, tais como pigmentos fenólicos (ARLORIO et al., 2005) e extratos etanólicos ou metanólicos (MARTÍNEZ et al., 2012). No entanto, embora os efeitos antioxidantes da casca da amêndoa de cacau estejam associados aos seus compostos fenólicos, não foram encontrados estudos nos quais estes compostos tenham sido analisados quantitativamente. Apenas as procianidinas foram descritas qualitativamente (PÉREZ et al., 2015).

As metilxantinas, especialmente os alcaloides cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) também são importantes compostos presentes no cacau e seus derivados. Eles são conhecidos por seus efeitos psicoativos (CONTI et al., 2012). Os derivados de cacau normalmente apresentam baixas concentrações de cafeína, entretanto a concentração de teobromina chega a ser aproximadamente dez vezes maior (CONTI et al., 2012). Este último alcaloide está presente em níveis tão elevados que Smit (2011) afirma que a casca de cacau é a principal matéria-prima utilizada para a produção de teobromina, embora estudos que reportem esta produção não tenham sido encontrados.

Sabe-se que o teor de proteínas apresentado pela casca da amêndoa de cacau é muito semelhante ao dos *nibs* (MARTÍN-CABREJAS et al., 1994). Mas, de acordo com Greenwood-Barton (1965) estas proteínas estão pouco disponíveis. Sendo assim, a produção de concentrados proteicos de casca da amêndoa de cacau é considerada inviável por este autor.

El-Saied, Morsi e Amer (1981) realizaram uma análise comparativa, em termos de composição lipídica, da gordura da casca da amêndoa de cacau torrada e da manteiga de cacau, provenientes da mesma amêndoa. Os resultados mostraram que as características físicas e químicas da gordura da casca do cacau eram quase idênticas às da manteiga de cacau. Este trabalho foi o único encontrado que relatou as características da gordura da casca do cacau, outras investigações relacionadas à composição dessa gordura, principalmente quanto à existência de compostos minoritários de interesse nutricional, não foram encontradas.

O uso de solventes para extração de óleos e gorduras vegetais é considerado bastante eficiente, pois é capaz de fornecer refinados com teores de lipídeos residuais bastante baixos. Tradicionalmente o solvente utilizado para a extração de óleos de matrizes vegetais é uma mistura de isômeros n-hexano, derivados do petróleo. Este solvente apresenta elevada estabilidade e alta capacidade de extração de óleo das matrizes oleaginosas, entretanto é considerado uma neurotoxina nos Estados Unidos (HAMMOND et al., 2005). Além disso, ele possui alta toxicidade, inflamabilidade e grande capacidade poluidora caso não seja recuperado de forma adequada (ANDERSON, 2005; JOHNSON; LUSAS, 1983; TIR; DUTTA; BADJAH-HADJ-AHMED, 2012).

Diversos estudos têm sido realizados utilizando solventes alternativos, como exemplo os álcoois de cadeia curta, com destaque para o etanol e isopropanol, em processos de extração de óleos vegetais (CAPELLINI et al., 2017; NAVARRO et al., 2016; RODRIGUES; ARACAVA; ABREU, 2010; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2010; SAWADA et al., 2014; TURGUT; ZHANG, 2003). Nestes trabalhos os álcoois de cadeia curta têm se mostrado eficientes e, além de aumentarem o valor nutricional do óleo, podem também ser parcialmente removidos do extrato com o resfriamento da miscela devido à redução da sua miscibilidade parcial com o óleo em temperaturas mais baixas (OLIVEIRA et al., 2012a). Além da extração de óleo, estes solventes têm se mostrado eficientes também na extração de compostos fenólicos (CACACE; MAZZA, 2003; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005; SCHARLACK; ARACAVA; RODRIGUES, 2017), indicando eficiência na extração simultânea tanto de compostos polares quanto apolares.

Uma alternativa para o processo de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau pode ser o emprego de líquido pressurizado, PLE (*Pressurized liquid extraction*), sendo esta tecnologia interessante para a realização de extrações rápidas de compostos orgânicos a partir de amostras complexas. A utilização de temperaturas mais elevadas, em conjunto com a escolha do solvente melhora a solubilidade dos solutos de interesse e a cinética de dessorção; assim, a extração torna-se rápida e eficiente (FREITAS et al., 2013), além de ser uma técnica de extração ambientalmente amigável com baixo consumo de solvente (MUSTAFA; TURNER, 2011).

A PLE tem sido aplicada com sucesso para a extração de óleo de várias matérias-primas, como sementes de melancia (COLIVET; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016), polpa de macaúba (TRENTINI et al., 2017) e milho e aveia (MOREAU; POWELL; SINGH, 2003). Os autores relatam altos rendimentos de extração em curto período de tempo de extração, indicando que essa técnica é eficiente para esse fim. Mas a principal aplicação da PLE tem sido reportada para extração de compostos polares, a qual é preferencialmente realizada empregando água e etanol

(GRAS) como solventes de extração, este último solvente tem sido utilizado com sucesso na obtenção de polifenóis (COLIVET; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016; FERNÁNDEZ-PONCE et al., 2016; GARCIA-MENDOZA et al., 2017) e alcaloides, especificamente cafeína (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA, 2005; JACQUES et al., 2008).

Neste contexto, foi proposta a realização desta tese de doutorado, a qual teve como objetivo o estudo experimental aprofundado da matéria-prima casca da amêndoa de cacau e de processos de extração sólido-líquido da sua gordura e de alguns biocompostos, utilizando como solvente álcoois de cadeia curta, etanol e isopropanol, em extratores que operam a pressão atmosférica (ATME) e a pressões mais elevadas, na condição de líquido pressurizado (PLE).

Através deste estudo foi possível avaliar e comparar o desempenho dos solventes alcoólicos, dos diferentes processos de extração e dos parâmetros de processos estudados em termos do rendimento de extração de gordura, de compostos fenólicos totais, flavanóis totais, alcaloides (cafeína e teobromina), catequina, epicatequina e procianidina B2 e da composição da gordura da casca da amêndoa de cacau, em termos do perfil de ácidos graxos e tocoferóis (isômeros α , $\beta+\gamma$ e δ). Também foram monitoradas as variáveis que impactam no projeto de extratores tais como hidratação da fase extrato e índice de retenção de solução aderida às fibras. Avaliou-se também o efeito dos processos de extração sobre a solubilidade proteica da matéria-prima, a fim de agregar valor ao material desengordurado.

2 OBJETIVOS

Com base nas considerações apresentadas, o desenvolvimento da presente tese de doutorado teve como objetivo principal a valorização da casca da amêndoa de cacau através do emprego de tecnologias de extração a pressão atmosférica e com líquido pressurizado para extração da gordura e biocompostos deste material, utilizando etanol e isopropanol como solventes, os quais são solventes GRAS com aplicação potencial como substitutos do hexano na extração de lipídeos.

Para atingir os objetivos propostos, as atividades realizadas se concentraram em:

- i. Caracterização química e física da matéria-prima casca da amêndoa de cacau;
- ii. Determinação experimental de dados de cinética de extração de gordura e biocompostos da casca da amêndoa de cacau por PLE (*Pressurized Liquid Extraction*) utilizando-se como solventes etanol em grau absoluto, nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C e avaliação do impacto das variáveis de processo de extração no rendimento de extração e composição química do material obtido em termos de perfil de ácidos graxos, conteúdo de flavanóis, alcaloides e tocoferóis, além da solubilidade proteica dos sólidos desengordurados;
- iii. Determinação experimental de dados de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau por extração conduzida sob pressão atmosférica utilizando-se como solventes etanol e isopropanol, em graus absoluto ou azeotrópico, com tempo de extração de uma hora, nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C e a avaliação do impacto das variáveis de processo no rendimento de extração e composição química dos produtos em termos de perfil de ácidos graxos, conteúdo de flavanóis, alcaloides e tocoferóis;
- iv. Determinação experimental de dados de cinética de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau por extração conduzida sob pressão atmosférica utilizando-se etanol em grau absoluto e azeotrópico como solventes, nas temperaturas de 75 e 90 °C e avaliação do impacto das variáveis de processo no rendimento de extração e composição química dos produtos em termos de conteúdo de flavanóis e alcaloides, além da solubilidade proteica dos sólidos desengordurados obtidos na condição de equilíbrio;

v. Determinação experimental de coeficientes de partição de gordura da casca da amêndoa de cacau sob pressão atmosférica, variando-se a relação mássica sólido:solvente e utilizando-se como solventes etanol em grau absoluto e azeotrópico, nas temperaturas de 75 e 90 °C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cacau

Cacau (*Theobroma cacao* L.) é o nome dado ao fruto do cacaueiro. Embora apresente polpa mucilaginosa com agradável sabor, a qual pode ser empregada na fabricação de sucos e geleias, a principal aplicação do cacau na indústria de alimentos se dá através de suas amêndoas, a partir das quais são fabricados diversos produtos, dentre eles o chocolate.

A importância econômica do cacau, internacionalmente, se dá pelo fato desta ser uma *commodity* com relevância no comércio mundial de produtos agrícolas, tanto em importações quanto exportações (EFRAIM, 2004). Em virtude das especulações dos mercados futuros, as amêndoas de cacau são consideradas, entre todas as *commodities* negociadas, um produto que apresenta grande índice de instabilidade em sua formação dos preços no mercado internacional (ZUGAIB *et al.*, 2007).

Os principais países produtores de cacau são a Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Equador, Camarões, Brasil e Nigéria, contribuindo com aproximadamente 90% do total produzido no mundo, como pode ser observado na Tabela 1. A produção mundial de grãos de cacau na safra 2014/2015 e a estimativa da safra 2015/2016 são também apresentadas na Tabela 1, nesta pode-se notar um decréscimo de produção de aproximadamente 6,5% já reportado por Jonfia-Essien *et al.* (2008) os quais relataram que na última década o consumo de cacau tem aumentado, opostamente à sua produção.

Na safra 2014/2015, o Brasil foi o sexto maior produtor mundial, e o segundo maior das Américas. Estima-se que para a safra 2015/2016 o país tenha apresentado uma queda de produção de aproximadamente 40%, fato que prejudica consideravelmente a oferta desta *commodity* no mercado nacional (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2017).

Conforme citado por Zugaib *et al.* (2007), o cacau é produzido no Brasil em mais de 40 mil propriedades rurais localizadas em 150 municípios diferentes. Dentre as empresas processadoras de cacau presentes no mercado nacional cinco se destacam: Cargill, Joanes, Barry Callebaut, Nestlé e Indeca, estas empresas fabricam diferentes produtos, dentre eles líquido, torta, manteiga e pó, os quais servem de insumo para as 57 indústrias de fabricação de chocolates, das quais 19 são grande porte com mais de 500 funcionários. Dentre estas empresas, quarenta respondem por 90 % das vendas externas de cacau já processado ou industrializado e chocolate, sendo a exportação na forma de amêndoas pouco relevante.

Tabela 1. Produção mundial de grãos de cacau.

	SAFRA 2014/2015		ESTIMATIVA PARA SAFRA 2015/2016	
	Mil toneladas	Porcentagem (%)	Mil toneladas	Porcentagem (%)
ÁFRICA	3074	72,3	2917	73,4
Camarões	232	5,5	211	5,3
Costa do Marfim	1796	42,2	1581	39,8
Gana	740	17,4	778	19,6
Nigéria	195	4,6	200	5,0
Outros	110	2,6	147	3,7
AMÉRICA	777	18,3	658	16,6
Brasil	230	5,4	140	3,5
Equador	261	6,2	232	5,9
Outros	286	6,7	286	7,2
ÁSIA E OCEANIA	400	9,4	397	10,0
Indonésia	325	7,7	320	8,1
Nova Guiné	36	0,8	36	0,9
Outros	39	0,9	41	1,0
TOTAL MUNDIAL	4251	100,0	3972	100,0

Fonte: adaptado de International Cocoa Organization (2017).

3.2 Composição da amêndoa de cacau

As sementes do cacau são comumente chamadas de amêndoas de cacau após perda do poder germinativo e são compostas por dois cotilédones, um pequeno gérmen e uma casca denominada casca da amêndoa de cacau ou testa de cacau (Figura 1). Fragmentos quebrados do cotilédone são chamados de *nibs*. A casca é considerada um material residual e é usualmente utilizada como combustível para caldeiras ou como composto para uso agrícola. Os *nibs*, de fato, são a parte mais valiosa da semente; é esta parte, moída e torrada, que origina a massa de cacau ou o licor de cacau, os quais são usados diretamente na indústria de chocolate. Alternativamente, os *nibs* podem ser prensados para se extrair a gordura, manteiga de cacau, um ingrediente essencial para fabricação de chocolates. O resíduo da prensagem é o pó de cacau o qual é usado principalmente na produção de bebidas, sobremesas e produtos de panificação (BECKETT, 2009).

Figura 1. Partes da amêndoa de cacau.

Fonte: adaptado de Robert (2012).

A composição química aproximada das amêndoas de cacau é apresentada na Tabela 2. Os valores podem apresentar grande variação em função da variedade plantada, do manejo e das particularidades do ambiente no qual foram cultivadas (KOBBLITZ, 2011).

Tabela 2. Composição da amêndoa de cacau *in natura*.

	Nibs		Casca da amêndoa	
	Média (%)	Variação (%)	Média (%)	Variação (%)
Umidade	3,7	2-5	7,0	4-11
Gordura	53,5	48-57	2,8	2-6
Proteínas	12,7	11-16	14,7	13-20
Amido	6,7	6-9	8,1	6,5-9
Fibras	2,5	2,1-3,2	16,6	13-19
Minerais	2,9	2,6-4,2	8,2	6,5-20,7
Teobromina	1,3	0,8-1,4	0,87	0,2-1,3
Cafeína	0,22	0,1-0,7	0,13	0,04-0,3

Fonte: adaptado de Minifie (1989) e Kirk e Sawyer (1991).

Dentre os biocompostos presentes na amêndoa de cacau, os compostos fenólicos destacam-se em especial devido a sua potencial atividade antioxidante. Estes compostos originam-se do metabolismo secundário das plantas sendo um dos grupos de substâncias mais numerosos e amplamente distribuídos dentre os vegetais. São essenciais às plantas, estando envolvidos em diversos processos fisiológicos, além de provê-las com mecanismos de resistência a patógenos e predadores (HASLAM, 2005).

A atividade antioxidante desses compostos envolve tanto a inibição da formação de radicais livres quanto a eliminação destes por meio da doação dos átomos de hidrogênio das

hidroxilas ligadas ao anel aromático (NAMIKI, 1990). Assim, os compostos fenólicos tem a capacidade de proteger partes das células de danos oxidativos e, com isso, podem evitar a ocorrência de diversas doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (SCALBERT et al., 2005).

Por pertencerem ao reino vegetal, os compostos fenólicos foram inseridos na dieta humana e são os compostos antioxidantes presentes em maior abundância em nossa alimentação, sendo encontrados em cereais, frutas, legumes, bebidas tais como vinhos, chás e cerveja e, também, nos derivados de cacau. São parcialmente responsáveis pela qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (SCALBERT et al., 2005).

A alta concentração de polifenóis nas sementes de cacau *in natura* conferem a ela um sabor extremamente amargo (TOMAS-BARBERAN et al., 2007). O teor de polifenóis pode diminuir de 100 % a 10 % no produto final (como no chocolate), essa redução se dá ao longo dos diferentes processos de produção, como na fermentação, torrefação e alcalinização (HANNUM; ERDMAN, 2000). Os compostos fenólicos do cacau são armazenados nos cotilédones das sementes (ANDRES-LACUEVA et al., 2008) e de acordo com Forsyth, Quesnel e Roberts (1958) as perdas dos polifenóis ocorrem devido à difusão destes compostos para fora dos cotilédones, podendo essa redução chegar a 58 % após 8 dias de fermentação.

Os principais compostos fenólicos encontrados no cacau são da classe dos flavanóis, incluindo catequina, epicatequina e procianidinas (KRUGER et al., 2014; MILLER et al., 2006; PAYNE et al., 2010). Dentre outros compostos já relatados como presentes na semente de cacau estão ácidos hidroxibenzóicos (gálico, siríngico, protocatequínico, vanilínico), ácidos hidroxicinâmicos e análogos (cafeico, ferúlico, cumárico, clopamida), flavonóis (quercitina), flavonas (luteolina, apigenina) e flavononas (naringenina) (BORCHERS et al., 2000; JERKOVIC et al., 2010), sendo que Counet; Callemien e Collin (2006) relataram pela primeira vez a ocorrência do estilbeno resveratrol.

Assim como ocorre com qualquer outro alimento derivado de plantas, o conteúdo fenólico dos produtos derivados do cacau é dependente da variedade cultivada, origem, práticas agrícolas e processamento (NIEMENAK et al., 2006; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Como exemplo dessa variação, pode-se citar o estudo realizado por Kim e Keeney (1984) que relatou diferenças no teor de epicatequina em amêndoas de cacau de diferentes países, os valores observados variaram de 2,66 mg/g, para o cacau de origem jamaicana, a 16,52 mg/g para o costa riquenho.

O elevado teor de compostos fenólicos encontrado no cacau faz com que grande atenção seja dada a estes estudos visto que há evidências reais dos efeitos benéficos desses compostos contra diversas doenças. Essas descobertas criaram expectativas gerando grande interesse na

indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos ricos em polifenóis utilizando cacau e seus derivados (BORCHERS *et al.*, 2000).

Dentre os compostos citados, as procianidinas têm recebido grande destaque devido aos recentes estudos que mostram que, além das diversas propriedades biológicas relacionadas com sua atividade antioxidante (COUNET; COLLIN, 2003; LEE *et al.*, 2003), estes também associam a esta classe de compostos excelentes atividades anti-inflamatórias e anti-arteroscleróticas, com a regulação da pressão sanguínea e das funções imunes e com a ativação plaquetária (KATZ; DOUGHTY; ALI, 2011; LATIF, 2013; RAMIRO *et al.*, 2005). Dentre as fontes alimentícias destes biocompostos, a amêndoa de cacau e a canela são as mais ricas, possuindo quantidades médias de procianidinas totais em torno de 9,5 e 8,1 g/100g, respectivamente (GU *et al.*, 2006). Especificamente nos produtos derivados do cacau avaliados por Payne *et al.* (2010) as quantidades totais de procianidinas, determinadas em B2 equivalentes, variaram entre 1,7 a 47 mg/g, sendo estes teores do pó de cacau alcalinizado e do pó de cacau natural, respectivamente.

Outros compostos que também recebem destaque no cacau são as metilxantinas, as quais são conhecidos por seus efeitos psicoativos e, por isso, o interesse em sua determinação em amostras de cacau. O cacau e seus derivados possuem alta concentração de metilxantinas, cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina. No entanto, este último composto é detectado no chocolate em níveis tão baixos que sua presença é geralmente ignorada (BECKETT, 2009; CONTI *et al.*, 2012).

Acredita-se que os compostos desta classe apresentem efeitos semelhantes no corpo humano, os quais incluem a estimulação do sistema nervoso central (SNC), músculo cardíaco e músculo esquelético, relaxamento da musculatura lisa e efeitos diuréticos. No entanto, eles diferem muito em sua força de ação em cada sistema do corpo. O cacau contém concentrações relativamente baixas de cafeína, porém seu teor de teobromina é elevado e cerca de dez vezes superior ao da cafeína (Beckett, 2009).

A teobromina é um estimulante moderado do sistema nervoso central com algumas propriedades antioxidantes (AZAM *et al.*, 2003; FREDHOLM, 2011), sendo a semente do cacau o principal local de sua síntese (ZHENG *et al.*, 2004). Enquanto os grãos de cacau estão sendo processados, o conteúdo da teobromina muda, principalmente durante o estágio de fermentação. Durante esse estágio, as metilxantinas migram do grão para a casca, causando uma diminuição no teor de teobromina do grão de cacau de cerca de 25% (TIMBIE; SECHRIST; KEENEY, 1978).

3.3 Pré-processamento e processamento do cacau

A produção dos derivados de cacau (massa, manteiga e pó de cacau) se dá em duas fases: o pré-processamento e o processamento do cacau. A primeira compreende as etapas realizadas em campo, pelo produtor de cacau, como a colheita, abertura dos frutos, retirada das sementes com a polpa, fermentação, secagem das amêndoas e armazenamento (SILVA, 2013). O processamento normalmente realizado nas indústrias compreende a segunda fase a qual é composta pela obtenção dos ingredientes utilizados para a fabricação de chocolate e derivados (PIMENTEL GOMES, 1972 apud CRUZ, 2002).

Todas as etapas envolvidas no pré-processamento e processamento do cacau podem ser observadas no fluxograma apresentado na Figura 2.

3.3.1 Etapas de pré-processamento

a) Colheita e abertura dos frutos

Os frutos do cacaueiro levam de 5 a 6 meses para crescer, desde a fecundação até a maturação. É fundamental que a colheita seja feita apenas dos frutos já amadurecidos, pois estes possuem sua composição em açúcar e outros substratos adequada para uma boa fermentação (BECKETT, 2008; CRUZ, 2002).

Os frutos são colhidos maduros e abertos manualmente, com auxílio de facões; a placenta é manualmente separada das sementes de modo a permitir uma adequada fermentação e, também, melhorar as características sensoriais da amêndoa, uma vez que apresenta gosto extremamente amargo. Nesta etapa as sementes possuem aproximadamente 65% de umidade. Para que reações química indesejáveis não aconteçam, o intervalo entre a quebra e o início da fermentação não deve exceder 24 horas (BECKETT, 2008; EFRAIM, 2004).

b) Fermentação

A etapa de fermentação é normalmente muito simples e é iniciada pela organização das sementes frescas em pilhas ou em caixas de madeiras (BECKETT, 2009). A duração da fermentação depende do tipo de cacau e das características do ambiente, entre outros fatores e podem variar de 2 a 8 dias. As sementes são revolvidas frequentemente para permitir a penetração de ar na massa de fermentação e para que o processo ocorra de forma homogênea (OWUSU; PETERSEN; HEIMDAL, 2012).

A polpa do cacau contém 82 – 87 % de água, 10 – 15 % de açúcares, 1 – 3 % de ácido cítrico e 1 – 1,5 % de pectina, a qual garante a coesão da polpa em volta das sementes e previne a penetração de ar no início da fermentação. Em virtude do seu baixo pH (aproximadamente 3,6), decorrente da presença de ácido cítrico, e de seu baixo nível de oxigênio disponível, devido ao fato da massa a ser fermentada estar coesa no interior da caixa, são criadas condições ideais para que leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica se desenvolvam. Posteriormente, com a penetração de oxigênio na massa de fermentação, as bactérias acéticas atuam sobre o álcool convertendo-o a ácido acético, o que provoca a redução do seu pH. Todas essas reações provocam o aumento da temperatura (45-50 °C). A difusão destes ácidos na semente do cacau, associada à elevação da temperatura culmina na morte do gérmen, neste momento a semente passa a ser chamada de amêndoa e ocorre também a formação de precursores do sabor, a saber, os aminoácidos e peptídeos, açúcares redutores, e oxidação dos polifenóis que formam complexos com proteínas e peptídeos levando à redução da do sabor adstringente e amargo e à transformação da cor púrpura dos cotilédones em marrom (AFOAKWA, 2010; CROSS, 1999; CRUZ, 2002; FOWLER, 2009).

A fermentação é um processo de suma importância na redução da acidez, adstringência e do amargor das amêndoas. É também fundamental para que se formem açúcares redutores e aminoácidos, os quais são os precursores da reação de Maillard durante a etapa de torrefação (HUANG; BARRINGER, 2010).

c) Secagem

Após a fermentação, as amêndoas de cacau precisam ser secas para depois poderem ser transportadas para as indústrias processadoras. Falhas na etapa de secagem podem provocar o desenvolvimento de bolores, o que origina aroma forte e desagradável fazendo com que estas sementes sejam inutilizadas para a produção de chocolate. Da mesma forma que também não podem ser secas em demasia, pois teores de umidade inferiores a 6 % as tornam muito frágeis, o que faz com que o processamento subsequente seja muito mais difícil (BECKETT, 2009).

Para a secagem do cacau duas técnicas são normalmente utilizadas, a secagem natural e a secagem artificial. A primeira é bastante simples e largamente empregada, é normalmente realizada em bandejas de madeira. Quando os frutos são colhidos em período de chuva, ou quando o espaço disponível para secagem natural é insuficiente, a secagem pode ser realizada em secadores, que realizam este processo utilizando o calor proveniente da queima de madeira ou outro combustível, ou ainda oriundo de coletores solares (CRUZ, 2002).

Um dos fatores essenciais durante a secagem é a velocidade de remoção da água, secagens realizadas de forma rápida podem deixar o interior da amêndoa úmido, o que a desvaloriza além de favorecer a proliferação de fungos, os quais produzem manchas brancas durante o período de armazenamento. Se apenas 3 % de amêndoas estiverem com este tipo de contaminação, já é possível notar um sabor desagradável da massa de cacau, o qual não se consegue remover em processos posteriores. Este mesmo problema pode acarretar também no endurecimento da amêndoa com possível ruptura da casca. Já para secagens realizadas em excesso pode ocorrer perda de peso, fazendo com que as sementes sejam facilmente quebradas. O processo de secagem do cacau, além de permitir a perda de água (chegando a um teor de umidade de aproximadamente 7%), reduz a acidez das amêndoas e dá continuidade às mudanças bioquímicas, iniciadas durante a fermentação, as quais contribuirão com o sabor e aroma característicos de chocolate (LOPES, 2000).

Figura 2. Fluxograma de pré-processamento e processamento do cacau.

Fonte: OKIYAMA; NAVARRO; RODRIGUES, 2017

d) Armazenamento

As amêndoas devem ser armazenadas de forma que não entrem em contato com a água, uma vez que teores de umidade superiores a 8% podem provocar o desenvolvimento de fungos. Tradicionalmente, elas são armazenadas em sacos de juta de 60-65 kg, os quais são resistentes, empilháveis e permeáveis a umidade. Como o cacau possui um aroma muito delicado, os grãos também devem ser armazenados bem longe de outros produtos que possam alterar seu aroma, o que pode resultar em *off-flavor* no chocolate (BECKETT, 2008).

3.3.2 Etapas do processamento

e) Limpeza

Como muitas das sementes são secas no chão, elas frequentemente estão misturadas a pedras, areia, metais, pedaços de plantas, etc, sendo que estas impurezas devem ser removidas basicamente por dois motivos: primeiramente, por que muitas delas são muito resistentes e irão danificar os equipamentos usados para moer as amêndoas; e, também, por que os contaminantes orgânicos serão queimados durante o processo de torrefação e emitirão gases que poderão prejudicar o aroma do cacau (BECKETT, 2008).

Normalmente existe uma série de procedimentos que são combinados para remover os diversos tipos de resíduos do material. Em linhas gerais, metais são removidos por ímãs, pedras e impurezas orgânicas por diferença de densidade e peneiras, etc (BECKETT, 2008).

f) Pré-tratamento térmico da amêndoa e descascamento

Segundo Beckett (2009), a remoção das cascas das amêndoas é uma importante etapa no processo de obtenção da massa de cacau. Sendo que em alguns países existe legislação que determina valor máximo que este resíduo pode estar presente na massa de cacau obtida. Além dos requerimentos legais, a remoção adequada da casca ou testa é um importante pré-requisito para um produto de boa qualidade, pois a casca é exposta a fatores externos o que faz com que possua contaminantes indesejáveis, além de não contribuir positivamente com o aroma e sabor do produto final podendo, ainda, ser responsável por *off-flavor*. Em adição, por ser um material fibroso, apresenta extremamente alta resistência fato que, consequentemente, dificulta a moagem, podendo causar abrasão nos equipamentos.

Além desses fatores, a eficaz separação das cascas dos *nibs* influencia o rendimento do processo, sendo indesejável financeiramente a perda de partículas pequenas de *nibs* juntamente com a casca. Idealmente, no descascamento, a casca deve ser separada perfeitamente, deixando pedaços grandes de casca e os *nibs* praticamente intactos.

Na prática, dois tipos de procedimentos industriais podem ser adotados: pré-tratamento térmico das amêndoas, o qual facilita a liberação das cascas, ou a torrefação da amêndoa de cacau inteira (com a casca) e posterior descascamento.

O pré-tratamento térmico (secagem) com posterior descascamento faz com que a torrefação seja mais homogênea, pois o material a ser submetido ao processo apresenta tamanhos semelhantes. Esta homogeneidade de tamanhos não ocorre quando se realiza a torrefação do grão inteiro. Neste

caso, devido à variação de tamanho das amêndoas pode-se obter grãos queimados (pequenos), grãos com ótimo desenvolvimento de aroma (médios) e grãos onde o centro não foi torrado adequadamente (grandes) (BECKETT, 2008).

O pré-tratamento térmico da amêndoa de cacau pode ocorrer em equipamentos como secadores de leito fluidizado, torrefadores de ar contínuo, secadores de infravermelho, etc (BECKETT, 2009). Em seguida, os grãos são quebrados e inicialmente separados, sendo que a quebra muitas vezes ocorre por impacto lançando-os em alta velocidade contra placas. Posteriormente, os grãos são encaminhados para peneiras vibratórias sendo que, durante esse processo, é desejável manter os *nibs* em pedaços, os maiores possíveis, de modo que eles possam se separar mais facilmente da casca. Após a separação têm-se como resultado as cascas que são um material bastante fibroso e estão normalmente na forma plana ou em pó; e os *nibs* que são mais esféricos e mais densos. Dessa forma, eles podem ser separados por diferença de densidade através de sopro de ar (BECKETT, 2008).

Assim tem-se que a amêndoa de cacau submetida ao pré-tratamento térmico originará a casca da amêndoa de cacau seca, já a amêndoa que não sofreu pré-tratamento térmico e foi diretamente submetida a torrefação dará origem a casca da amêndoa de cacau torrada. Esses dois tipos de casca foram as matérias-primas inicialmente avaliadas, entretanto para realização dos experimentos de extração sólido-líquido nesta tese de doutorado apenas a casca da amêndoa de cacau seca foi utilizada.

g) Torrefação

O desenvolvimento do sabor de chocolate na amêndoa do cacau é o efeito mais importante da torrefação. O tempo e a temperatura empregados neste processo são essenciais para determinar a concentração e os tipos dos compostos de aromas e sabor que serão gerados. Os diferentes parâmetros de torrefação são empregados conforme o tipo de produto que se pretende fabricar (OWUSU; PETERSEN; HEIMDAL, 2012).

A torrefação é um processo térmico caracterizado pela redução do teor de água; diminuição dos ácidos voláteis indesejáveis (principalmente ácido acético); inativação enzimática, a qual evita a degradação da manteiga de cacau; desenvolvimento de aromas através da reação de Maillard, partindo dos precursores formados na etapa de fermentação e já discutidos anteriormente, e pelo desenvolvimento da cor marrom (EFRAIM, 2004; LOPES; GARCIA; VASCONCELOS, 2003).

Para ser torrado, o cacau pode se apresentar de diferentes formas: como amêndoas inteiras, como *nibs* (amêndoas fragmentadas em pedaços menores) e, em alguns casos, como

massa de cacau. Na torrefação dos *nibs* consegue-se uma melhor transferência de calor, por consequência a diferença de intensidade de torra é diminuída tendo-se assim redução do consumo de energia. A massa de cacau tem a vantagem de ter uma estrutura homogênea, com relação à granulometria de suas partes sólidas, o que evita as diferenças de intensidade de torrefação quando comparada ao grão inteiro e aos *nibs* (LOPES, 2000). O método convencional de torrefação em amêndoas inteiras, seja por processo contínuo ou batelada, apresenta algumas desvantagens críticas. A primeira delas seria a grande demanda de energia necessária para penetrar a casca e atingir o cotilédone. Outra desvantagem é que a torrefação nunca é uniforme devido à variação nos tamanhos dos grãos, alguns podem ser sobre torrados ou então sofrer uma torrefação insuficiente, entretanto a vantagem de torrar as amêndoas inteiras, é que esse processo facilita a remoção da casca (CRUZ, 2002).

h) Moagem e obtenção da massa de cacau

Existem dois objetivos principais na moagem dos *nibs* de cacau: o primeiro é tornar as partículas de cacau pequenas o suficiente de modo que com elas possa ser feito o chocolate, nesse caso existem outros processos durante a fabricação do chocolate que também promoverão a moagem, dessa forma não é necessário que os *nibs* sejam moídos até estarem muito finos; a segunda e mais importante razão, é que a moagem permite remover a maior quantidade possível de gordura das células que compõem o cotilédone. A gordura é necessária para ajudar o chocolate a fluir, essa característica é importante tanto no preparo de doces quanto na sensação causada pelo seu derretimento na boca. A gordura é, também, o ingrediente mais caro no chocolate, dessa forma, economicamente, é necessário aproveitar ao máximo toda a gordura presente (BECKETT, 2008).

i) Prensagem e obtenção de torta e manteiga de cacau

Através da prensagem da massa de cacau obtém-se a manteiga de cacau natural e a torta, esta última com teor mínimo de gordura por volta de 10 %. A torta pode passar pelo processo de alcalinização, ser misturada à lecitina e, posteriormente, empregada na produção de diversos alimentos em pó tais como chocolate, achocolatados e *cappuccinos*, e na fabricação de chocolates compostos ou confeitados (LUCCAS, 2001).

3.4 Manteiga de Cacau

A maioria dos óleos e gorduras é submetida a várias etapas de refino com o objetivo de adequar o material ao grau comestível. Estas etapas são compostas em linhas gerais pela degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização, no entanto, a manteiga de cacau é utilizada, na maioria das vezes, em sua forma natural ou somente desodorizada. Sua extração é realizada em prensa hidráulica, sendo posteriormente filtrada, centrifugada e desodorizada (para eliminação de parte dos ácidos graxos livres e compostos voláteis), não necessitando de neutralização e clarificação. Porém, para a fabricação do chocolate branco, os processos de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização da manteiga de cacau são necessários, visto que a ausência de refino nesta matéria-prima pode causar sabor desagradável ao produto final (MCGAULEY; MARANGONI, 2002).

A composição da manteiga de cacau se dá basicamente por triacilgliceróis (aproximadamente 98%), mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres e outros compostos minoritários como esteróis e tocoferóis. Sua composição em ácidos graxos é muito importante devido aos seus aspectos nutricionais e funcionais. Os principais ácidos graxos encontrados na manteiga de cacau são o palmítico (24 – 35,5 %), o esteárico (31–38 %), o oleico (31–35,3 %) e o linoleico (1,4– 4,2 %) (FIRESTONE, 2013; GILABERT-ESCRIVÁ et al., 2002).

A identidade da amostra não depende apenas da composição em ácidos graxos, mas também da forma como estes estão organizados na molécula do glicerol. Com isso há necessidade de verificação da composição em triacilgliceróis, que são os componentes majoritários dos óleos e gorduras. Quase todo o ácido oleico apresenta-se esterificado na posição central da molécula de glicerol, já os ácidos saturados apresentam-se com mais frequência nas posições 1 e 3. A manteiga de cacau possui três principais triacilgliceróis simétricos, POP (1,3- dipalmito-2-oleina triacilglicerol), POS (1-palmito-2-oleina-3-estearo triacilglicerol) e SOS (1,3-diestearo-2-oleina triacilglicerol) os quais juntos, podem representar mais de 75 % da composição da gordura (QUAST et al., 2011; OLIVEIRA, 2013).

Porém a composição em ácidos graxos da manteiga de cacau natural muda dependendo de uma série de fatores, entre eles pode-se mencionar o país de origem do fruto. Essa variação pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição em termos dos ácidos graxos (%) principais de manteigas de cacau natural produzidas a partir amêndoas provenientes de diferentes países.

País	Ácidos Graxos (%)			
	Esteárico	Oleico	Palmítico	Linoleico
Costa do Marfim	36,9	32,9-33	25,8-26,6	2,6-2,8
Gana	36,7-37,6	32,7-33,0	25,3-25,5	2,5-2,8
Indonésia	36,9-37,3	33,1-34,3	24,1-25,1	2,5-2,7
Brasil	33,3-33,8	34,5-36,5	25,1-27,9	3,5-3,6
Equador	34,6-36	34,6-34,91	25,2-25,6	2,6-3,0
Malásia	36-37,4	33,5-34,0	24,9-26,0	2,6-3,0

Fonte: adaptado de Jahurul et al. (2013).

A proporção entre os teores de ácidos graxos saturados e insaturados presentes na manteiga de cacau é importante para suas características físicas, dentre elas a consistência. Teores mais elevados de ácidos graxos saturados, em relação aos insaturados, favorece a elevação da consistência da gordura do cacau e do aumento do ponto de fusão o que, consequentemente, influencia na estabilidade dos chocolates melhorando sua qualidade (MELO; CHITARRA, 1999).

Embora os triacilgliceróis representem grande porcentagem dessa matéria-prima, há outros componentes de origem lipídica, representados na Tabela 4, que podem influenciar as propriedades da manteiga de cacau.

Tabela 4. Composição lipídica da manteiga de cacau.

Classe de Lipídeos	Faixa (%)	Média (%)
Triacilgliceróis	96,21-97,30	96,97
Fosfolipídeos	0,13	0,13
Dialcilgliceróis	0,8-1,79	1,30
Monoacilgliceróis	0,02-0,04	0,03
Ácidos graxos livres	0,88-1,46	1,17
Esteróis	0,10-0,14	0,12

Fonte: Dimick (1999).

No Brasil, as principais características exigidas para a manteiga de cacau comercial são as seguintes: que ela seja dura e friável (capacidade de se partir com facilidade, de se fragmentar) a 25 °C; que seja untuosa ao tato, com ponto de fusão de no mínimo 28 °C e de no

máximo 35 °C. Deve possuir um comportamento regular durante o congelamento, índice de iodo de 35 a 43 e baixa acidez, até 5 % (OETTERER, 2002).

Dentre os antioxidantes presentes naturalmente na manteiga de cacau, pode-se citar os tocoferóis, os quais são precursores da vitamina E. Dentre eles o majoritário presente na manteiga é o γ -tocoferol (18-196 mg/kg), seguido do α -tocoferol (1-19 mg/kg) e do δ -tocoferol (0-17 mg/kg) (FIRESTONE, 2013). Estes compostos não são muito estáveis nas etapas envolvidas no refino de óleos, entre elas a desodorização que é capaz de reduzir os teores em até 15% (CREWS, 2002).

3.5 Pó de cacau

O pó de cacau é obtido pela moagem da torta prensada de cacau. A massa de cacau, alcalinizada ou não, é prensada e a torta resultante passa entre dois rolos e, posteriormente, passa por um moinho de pinos resfriados os quais promovem uma moagem bastante fina, transformando o material em pó (BECKETT, 2009). O material é então transportado por uma corrente de ar através de tubos longos garantido que a gordura ainda presente seja solidificada até a embalagem. Ao final dos tubos o cacau em pó passa por um separador ciclone, onde as partículas finas são removidas.

A maior parte do pó de cacau produzido possui teor de gordura entre 20-22 %, mas quantidades inferiores também podem ser observadas, inclusive há a comercialização de pó de cacau livre de gordura que é produzido e vendido para fabricação de produtos com baixo teor de gordura ou mesmo produtos sem gordura (BECKETT, 2008).

3.6 Casca da amêndoa de cacau

As cascas da amêndoa de cacau são parte da semente, elas são separadas dos cotilédones junto com o gérmen durante o processo de pré-torrefação ou após o processo de torrefação (ARLORIO et al., 2005), como previamente discutido no item 3.3. Como a semente de cacau contém de 12-20 % de casca é evidente que a produção mundial deste subproduto é considerável (KNAPP, 1920; MENDES; LIMA, 2007). Levando em consideração a produção mundial de grãos de cacau na safra 2014/2015, já apresentada na Tabela 1, a produção de cascas das amêndoas ficaria em torno de 680 mil de toneladas.

A casca da amêndoa de cacau é normalmente subutilizada, sendo que na indústria é empregada principalmente como combustível para caldeiras (ARLORIO et al., 2005), embora também tenha sido utilizada como fonte secundária de teobromina, cafeína e lipídios de cacau (que não são considerados como "manteiga de cacau", devido à sua elevada acidez e alto teor de insaponificáveis) (ARLORIO et al., 2001).

A valorização dos subprodutos agrícolas, como é o caso da casca da amêndoa de cacau, tem recebido crescente atenção, devido à escassez de recursos naturais e a sérios problemas ambientais. Muitos pesquisadores propõem a utilização de tais subprodutos em aplicações como ingredientes alimentícios ou em outras aplicações com valor agregado (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010). Assim, uma exploração adicional desses subprodutos como aditivos em alimentos ou suplementos de alto valor nutricional tem ganhado cada vez mais interesse, primeiramente devido as características nutricionais e, segundo, por que sua recuperação pode ser economicamente atraente (MURTHY; NAIDU, 2012). Apesar disso poucos estudos têm sido realizados com este material.

3.6.1 Composição da casca da amêndoa de cacau

A composição da casca da amêndoa de cacau é bastante variável, assim como a própria amêndoa, e dependerá, entre outros fatores, da sua origem e do processamento ao qual foi submetida. Alguns autores relatam em seus trabalhos a composição da casca da amêndoa de cacau, como pode ser observado na Tabela 5.

O teor de proteínas da casca é bastante similar ao do *nibs* de cacau (MARTÍN-CABREJAS et al., 1994; MINIFIE, 1989). Sobre este composto, Greenwood-Barton (1965) inferiu que 90% do nitrogênio alfa-amino da casca da amêndoa de cacau está fortemente ligado aos polifenóis oxidados encontrados neste material, sendo estes convertidos em polifenoquinonas. Estes compostos combinam-se com a proteína através de ligações covalentes, dessa forma, apenas cerca de 1% das proteínas na casca da amêndoa de cacau existiria no estado livre, sendo considerada uma matéria-prima pouco indicada para a produção de concentrados proteicos.

Tabela 5. Composição da casca ou testa da amêndoa de cacau.

	Lecumberri et al. (2007) % b.s. ^a	Martínez et al. (2012) % b.s. ^b	Silva et al. (2005) % b.s. ^b	Arlorio et al. (2001) g/kg em b.s. ^c	Martín-Cabrejas (1994) g/kg em b.s. ^c
Proteínas	16,71 ± 0,18	15,05 ± 0,17	13,62	181,2 ± 8,1	116 ± 2
Fibras	60,54 ± 0,32	—	—	606 ± 6,4	504 ± 21
Gordura	6,62 ± 0,38	2,02±0,03	11,09	68,1 ± 2,5	185 ± 12
Açúcares solúveis	0,35 ± 0,04	—	—	—	—
Fenólicos	5,78 ± 0,29	—	—	18,2 ± 8,4	—
Carboidratos	—	17,8±0,09	67,93	—	—
Teobromina	—	—	—	12,9 ± 1,8	—
Umidade	—	7,71±0,12	—	101,2 ± 6,0	47 ± 1
Cinzas	11,42 ± 0,04	7,35±0,15	7,36	81 ± 3,9	75 ± 1

^a Casca da amêndoa de cacau não torrada.^b Casca da amêndoa de cacau não especificada se torrada ou não.^c Casca da amêndoa de cacau torrada.

O teor de cinzas da casca é similar ao conteúdo de minerais reportado por Saura-Calixto; Cafiellas; Garcia-Raso (1983) para uma série de sementes. As cinzas da casca da amêndoa de cacau avaliada por Osundahunsi, Bolade e Akinbinu (2007) mostrou aproximadamente 7% de sódio, 3% de potássio, 33% de carbonato de sódio e pH de 10,8. Neste estudo, os autores aplicaram as cinzas da casca da amêndoa de cacau nos *nibs* como agente alcalinizante e avaliaram a manteiga e o pó de cacau produzido com eles. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os parâmetros sensoriais apresentados pelo pó de cacau alcalinizado com as cinzas e o controle; embora o aroma de chocolate tenha sido considerado menos pronunciado isso não afetou a aceitabilidade.

Como pode ser observado na Tabela 5, os níveis de açúcar solúveis nas cascas podem ser negligenciados, o que representa uma vantagem neste produto, considerando seu reduzido valor calórico (LECUMBERRI et al., 2007). O teor de fibras na casca da amêndoa de cacau é aproximadamente três vezes superior ao teor do mesmo composto nos *nibs* e consiste em aproximadamente 50% de todo o material (MARTÍN-CABREJAS et al., 1994).

O teor de lipídeos apresenta grande variação, ficando entre 20 a 185 g/kg da casca seca (Tabela 5), e é bastante inferior ao teor de lipídeos dos *nibs*. Neste caso, pode ser sugerido como alternativa a extração deste composto com o uso de solventes, um processo amplamente aplicado para matérias-primas oleaginosas com baixo teor de lipídeos (KEMPER, 2005). Considerando a média dos teores de lipídeos na casca da amêndoa de cacau apresentados na Tabela 5, de aproximadamente 9%, com base nos índices de produção apresentados pela

International Cocoa Organization (2017) e considerando que aproximadamente 16% dessa produção seja descartada como casca, pode-se estimar que a partir deste material poderiam ser produzidos anualmente aproximadamente 61 mil toneladas de gordura a partir do processamento deste subproduto, valor expressivo que poderia ajudar a abastecer o mercado com um produto “similar” a manteiga de cacau.

Os compostos fenólicos presentes na casca da amêndoa de cacau são bastante interessantes e apresentam propriedades antioxidante relevantes. Estes compostos associados ao perfil de composição química da casca da amêndoa de cacau demonstram que este subproduto pode ter aplicabilidade na indústria de alimentos.

3.6.1.1 *Fibras dietéticas*

De acordo com a AACC (American Association of Cereal Chemists), fibra dietética (FD) é a parte das plantas ou carboidratos análogos que não é digerível e nem pode ser absorvida no intestino delgado humano, e que pode ser fermentada, completa ou parcialmente no intestino grosso. A ingestão de FD tem sido associada nos últimos anos com um grande número de efeitos benéficos à saúde (HOWLETT et al., 2010). Recentemente, pesquisas foram realizadas para validar os efeitos benéficos da fibra dietética da casca da amêndoa de cacau para a saúde. Nsor-Atindana, Zhong e Mothibe (2012) prepararam três pós de fibra alimentar a partir de cascas da amêndoa de cacau por tratamento enzimático: FD solúvel, FD insolúvel e FD total. Esses produtos foram avaliados quanto aos seus efeitos na absorção de glicose, difusão de glicose, hidrólise de amido, ligação ao colesterol, ligação ao colato de sódio e capacidade de ligação a óleo, usando sistemas modelo *in vitro* simulando condições intestinais gástricas. Eles concluíram que a casca da amêndoa de cacau pode ser uma alternativa barata de fibra dietética com benefícios adicionais, ela poderia ser incorporada como um ingrediente de baixo valor calórico em uma dieta rica em fibras para reduzir os níveis de calorias e de colesterol e controlar os níveis de glicose no sangue.

Os efeitos da fibra dietética solúvel presente na casca de cacau também foram estudados em ratos por Sánchez *et al.* (2010). Dois grupos de ratos obesos foram alimentados com dieta padrão (controle) e com dieta contendo 5% de fibra alimentar solúvel de casca de cacau, designada como dieta enriquecida. Os ratos alimentados com a dieta enriquecida apresentaram menor ganho de peso e menor ingestão de alimentos do que aqueles alimentados com a dieta padrão. Este grupo também apresentou valores mais baixos de colesterol total, triacilgliceróis

e pressão arterial se comparado ao grupo controle. Além disso, a fibra dietética solúvel de casca da amêndoa de cacau reduziu a glicose plasmática e a insulina e, como consequência, a resistência à insulina também diminuiu. Nesse sentido, os autores mencionaram que a fibra dietética solúvel da casca da amêndoa de cacau resultou em melhora dos fatores de risco estudados, associados a distúrbios cardio-metabólicos.

Lecumberri et al. (2007), avaliando a casca da amêndoa de cacau, observou que a fibra dietética total determinada 60,54% em base seca (d.m.), apenas 10,09% (d.m.) consistia em fibra dietética solúvel. Explorando as propriedades de hidratação (inchaço e capacidade de retenção de água) e o índice de retardamento da glicose, observaram que os resultados obtidos com fibra dietética da casca de cacau foram semelhantes aos obtidos com celulose e fibra de alfarroba, sendo estas fontes de fibra dietética insolúvel fornecidas comercialmente. Neste estudo, os autores sugerem que as propriedades da casca da amêndoa de cacau a tornam um produto adequado para ser usado na preparação de alimentos ricos em fibras e de baixa caloria, como biscoitos de chocolate, bolos de chocolate, suplementos dietéticos, etc., nos quais a cor e o sabor desta fibra dietética de cacau podem ser vantajosos.

Redgwell *et al.* (2003) caracterizaram a composição da fibra dietética da casca da amêndoa de cacau por análise composicional e de ligação. Os resultados mostraram que os tipos de polissacarídeos eram diversos e incluíam os polissacarídeos pécticos (~ 45%), que eram compostos de uma mistura heterogênea de ramnogalacturonanos com graus variáveis de ramificação. As hemiceluloses também foram contabilizadas (~ 20%) e consistiram de uma mistura de xiloglucano fucosilado, galactoglucomananos e glucuronoarabinoxilano, enquanto a celulose foi responsável por ~ 35% dos polissacarídeos da parede celular. Neste estudo, o conteúdo total de FD foi de aproximadamente 40%, não tão alto quanto o relatado anteriormente. Este nível mais baixo foi atribuído ao fato de que, neste estudo, uma fração de 'Lignina Klason' foi excluída da estimativa da fibra dietética total. Esta fração forneceu evidências de que ela continha pouca ou nenhuma lignina e, presumivelmente, consistia principalmente de complexos de proteína-tanino. Os autores concluíram que, infelizmente, os procedimentos gravimétricos atualmente em uso são incapazes de distinguir esses complexos da lignina legítima. De fato, seu uso para determinar a fibra dietética levará invariavelmente à superestimação da fibra dietética em material derivado do cacau.

A casca da amêndoa de cacau também é uma fonte de pectina, contendo aproximadamente 9% (b.s.). Mollea, Chiampo e Conti (2008) estudaram a otimização da extração de pectina deste subproduto, obtendo a maior produtividade, aproximadamente 8%, quando foram utilizadas cascas picadas, após 1 h de extração, em pH 2,5.

3.6.1.2 *Lipídeos*

Com relação aos lipídeos da casca da amêndoa de cacau apenas El-Saied et al. (1981) realizaram uma análise comparativa entre a gordura da testa de cacau e a manteiga de cacau provenientes das mesmas amêndoas. Os resultados mostraram que as constantes físicas e químicas da gordura da casca da amêndoa de cacau foram quase idênticas às da manteiga de cacau (Tabela 6) obtidas a partir dos mesmos grãos de cacau, exceto no que diz respeito à acidez. As classes de lipídios encontradas foram praticamente as mesmas com exceção do fato da casca da amêndoa possuir um componente não identificado, que não foi encontrado na manteiga de cacau (Tabela 7).

A acidez elevada para a gordura proveniente da testa de cacau, observada na Tabela 7, pode ser resultado da hidrólise de triacilgliceróis. Isso pode ser decorrente das elevadas temperaturas as quais as amêndoas são submetidas durante o processo de torrefação, visto que o material no qual foi realizada a análise correspondia a casca das amêndoas inteiras submetidas à torra.

Tabela 6. Constantes físicas e químicas da manteiga de cacau e da casca da amêndoa de cacau.

	Manteiga de cacau	Gordura da casca da amêndoa de cacau
Constantes Físicas:		
Densidade relativa a 40 °C	0,9012	0,9034
Ponto de fusão °C	34,10	31,00
Constantes Químicas:		
Acidez (como % de oleico)	1,68	9,12
Índice de saponificação	191,21	205,71
Índice de iodo	35,58	38,73

Fonte: adaptado de El-Saied et al. (1981).

Os ácidos graxos predominantes na manteiga de cacau são o palmítico, esteárico e o oleico, enquanto que na gordura da testa de cacau são palmítico e oleico. O valor nutricional da gordura da casca da amêndoa de cacau é maior do que a manteiga de cacau, isso por conta de o teor de ácido linoleico ser quase o dobro em comparação com a manteiga de cacau (EL-SAIED et al., 1981).

Tabela 7. Composição em ácidos graxos da manteiga de cacau e da gordura da casca da amêndoa de cacau (%).

	Gordura da casca da amêndoa	Manteiga de Cacau
C 10:0 cáprico	16,89	12,95
C 12:0 láurico	Traços	Traços
C 13:0 tridecanóico	Traços	Traços
C 14:0 mirístico	3,19	4,32
C 16:0 palmítico	22,27	23,31
C 17:0 Margárico	Traços	Traços
C 18:0 esteárico	12,05	24,51
C 14:1 miristoléico	2,43	1,29
C 16:1 palmitoléico	2,55	0,95
C 18:1 oléico	28,16	28,74
C 18:2 linoléico	7,49	3,93

Fonte: adaptado de El-Saied et al. (1981).

3.6.1.3 *Compostos Fenólicos*

Dos produtos e subprodutos obtidos a partir do cacau, a casca da amêndoa apresenta elevada concentração de compostos fenólicos com efeito antioxidante significativo e tem demonstrado ser uma fonte boa e barata destes biocompostos (AZIZAH; NIK RUSLAWATI; SWEE TEE, 1999; BRUNA *et al.*, 2009).

Estudando a casca da amêndoa de cacau, Lecumberri et al. (2007) verificaram a presença de compostos polifenólicos associados (polifenóis solúveis e taninos condensados), os quais fornecem a este material capacidade antioxidante intrínseca. Arlorio et al. (2005) investigaram a atividade antioxidante e biológica de pigmentos fenólicos extraídos da casca da amêndoa de cacau utilizando CO₂ supercrítico. Os resultados demonstraram que os extratos ricos em compostos fenólicos são bastante interessantes e podem ter aplicação como corante e como compostos bioativos com propriedades funcionais. Estes compostos também seriam responsáveis pela atividade antimicrobiana observada por Nsor-Atindana, Zhong e Mothibe (2012) os quais notaram diferença significativa do alo de inibição relativo a extratos da casca da amêndoa de cacau em relação ao controle negativo.

Pérez et al. (2015) avaliando subprodutos do cacau identificaram procianidinas, entre outros compostos, por análise qualitativa dos metabólitos secundários encontrados na casca da amêndoa de cacau. As procianidinas encontradas no cacau são taninos, os quais podem variar

de tamanho partindo desde monômeros até polímeros de cadeia longa (ORTEGA et al., 2010), sendo seu tamanho descrito pelo grau de polimerização (GU et al., 2006).

3.6.1.4 *Metilxantinas*

Grande parte dos estudos encontrados avaliam o teor de metilxantinas e/ou teobromina nas amêndoas inteiras ou em seus subprodutos comercializáveis (BUCHELI et al., 2001; RISNER, 2008). A maioria dos estudos que avaliaram esses compostos na casca da amêndoa de cacau está na área de nutrição animal, pois este subproduto é frequentemente utilizado como alimento para animais (CARVALHO JUNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2005). Infelizmente, experimentos na área de nutrição animal desencorajaram seu uso devido ao fato de sua aplicação em altas concentrações na dieta estar relacionadas à toxicidade, notadamente considerando a teobromina como o principal composto responsável pelos efeitos tóxicos (ADAMAFIO, 2013).

3.6.2 *Micotoxinas na casca da amêndoa de cacau*

Os grãos de cacau são suscetíveis à contaminação fúngica durante muitas das etapas de processamento. O crescimento microbiano é afetado por parâmetros intrínsecos dos grãos de cacau, como pH, atividade de água e os vários ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação. Além de causar alteração deteriorativa das propriedades sensoriais, a presença de fungos filamentosos no cacau e no chocolate também é preocupante pois podem dar origem à micotoxinas. Tanto a aflatoxina quanto a ocratoxina A foram relatadas em cacau e chocolate (COPETTI *et al.*, 2012, 2013).

A maioria dos fungos contaminantes está presente na casca da amêndoa de cacau, especialmente espécies de *Aspergillus*, *Eurotium* e *Absidia*, e são quase completamente removidos no descascamento (COPETTI *et al.*, 2010). Tem sido relatado que a ocratoxina A (OTA) está concentrada na casca, de modo que apenas uma pequena parte desta toxina pode vir a contaminar os *nibs* (COPETTI *et al.*, 2013; MANDA *et al.*, 2009). Segundo Gilmour e Lindblom (2008), o descascamento mecânico remove em média 48% (variando entre 27% e 72%) da ocratoxina A, enquanto o descasque manual pode reduzir até 100% (MANDA *et al.*, 2009).

Em outro estudo de Copetti *et al.* (2012), a ocorrência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 nos subprodutos do cacau foi avaliada. Descobriu-se que essas micotoxinas eram mais frequentes na casca do cacau, aparecendo em 11% das amostras. Portanto, pode-se inferir que a eficiência no peneiramento é um ponto crítico para reduzir o nível de contaminantes, mas, ao mesmo tempo, os resíduos gerados nesse estágio resultam em um material rico em micotoxinas.

A micotoxina mais comumente relatada no cacau é a ocratoxina, consequentemente esta classe de micotoxinas é a mais estudada na casca da amêndoa do cacau. Alguns estudos avaliaram a eficácia dos métodos de extração com solvente para a remoção de ocratoxina A da casca, os métodos avaliados mostraram-se eficientes (AMÉZQUETA *et al.*, 2008; ARLORIO *et al.*, 2001).

3.6.3 Aplicações da casca da amêndoa de cacau

Além das aplicações convencionais e a avaliação de diversos compostos presentes na casca da amêndoa de cacau (ARLORIO *et al.*, 2005; NSOR-ATINDANA; ZHONG; MOTHIBE, 2012; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2010), outros estudos vêm sendo realizados com a casca da amêndoa de cacau, dentre eles a utilização para alimentação animal (ANDRADE *et al.*, 2010; CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2010) cujos estudos se concentram no Brasil, e a utilização como adsorvente de diferentes compostos (THEIVARASU; MYLSAMY; SIVAKUMAR, 2011a, 2011b) aplicado em geral para tratamento de resíduos.

Em paralelo, empresas vêm concentrando esforços para dar um destino mais nobre a este resíduo e, devido a isso, algumas patentes utilizando a casca da amêndoa de cacau foram registradas nos últimos anos.

Em 2006 a Kraft Foods patenteou um processo de extração de teobromina e compostos fenólicos da casca da amêndoa de cacau. Neste processo, inicialmente, a casca da amêndoa de cacau já desengordurada é submetida a extração com uma solução aquosa de acetona. Na sequência a acetona é eliminada, obtendo-se assim um extrato aquoso. Posteriormente, o material segue para uma coluna de filtração em gel que separa a teobromina dos compostos fenólicos, lava-se então a coluna para obter-se a fração enriquecida em teobromina, dessa forma têm-se as frações separadas de compostos fenólicos e teobromina. Neste processo pode-se utilizar a testa de cacau fermentada ou não, torrada ou não (BRADBURY; KOPP, 2006).

Ainda a Kraft Foods em 2011, registrou uma patente que consiste na alcalinização da casca da amêndoa de cacau e sua utilização como um aditivo alimentício. Observou-se que a

aplicação deste material em alimentos promove o aumento da viscosidade, tal característica pode ser bastante interessante para aplicação em derivados lácteos acidificados como iogurtes e *cream cheese* e, também, para acentuação do sabor de chocolate quando o produto no qual é aplicado possui como um dos ingredientes o pó de cacau (CHRONOPOULOS et al., 2011).

Outra patente registrada pela Barry Callebaut em 2013 trata da produção de pó de casca da amêndoa de cacau isento de metais pesados (BERNAET; RUYSSCHER, 2013). Este processo, assim como o patenteado pela Kraft Foods (2011), consiste na alcalinização com subsequente lavagem para retirada dos metais. O pó de casca da amêndoa de cacau sem metais pesados pode ser utilizado como ingrediente na indústria de alimentos ou como substituto do pó de cacau. Além destes empregos, a Barry Callebaut citou também que este material, quando utilizado na fabricação de chocolate, evita a ocorrência de *fat bloom*.

3.7 Extração de óleos vegetais

A gordura contida na casca da amêndoa de cacau pode se tornar uma matéria-prima para a indústria de alimentos, se o processo de extração empregado for o adequado para sua obtenção, e, desta forma, a casca poderia não mais ser considerada como um simples resíduo do processamento do cacau. De maneira geral, a casca da amêndoa de cacau possui um teor de óleo considerado baixo, assim como outras matérias-primas oleaginosas, tal como a soja que apresenta de 15 a 20 % de lipídeos. Nestes casos, estas matérias-primas devem ser submetidas ao processo de extração sólido-líquido utilizando-se um solvente adequado. A Figura 3 apresenta um esquema simplificado das etapas de extração de óleos vegetais utilizando solvente e recuperação do solvente (ANDERSON, 2005)

A extração sólido-líquido é caracterizada pela extração do material solúvel presente em uma matriz sólida, utilizando um solvente específico (TAKEUCHI et al., 2009). A extração de óleos vegetais por solvente consiste em um processo de transporte de massa de uma fase para a outra, envolvendo mecanismos de lixiviação, lavagem, difusão e diálise. Para um processo de extração ser considerado eficiente a fase refinado, ou seja o sólido desengordurado que deixa o extrator, deve apresentar um teor de óleo menor que 1 % (WILLIAMS, 2005).

A maioria dos extratores industriais utilizados e estudados para extração de óleos vegetais com solvente possui multiestágios e opera com fluxos em contra-corrente. O princípio básico de funcionamento é semelhante em todos os casos. Em geral, eles operam com base no princípio de fluxos cruzados em contra-corrente da matéria-prima (um meio poroso sólido que contém a

substância a ser extraída) e a miscela ou extrato, solução de óleo em solvente (KEMPER, 1997). Em virtude do gradiente de concentração, a fase solvente (denominada ainda de fase extrato ou miscela) se enriquece continuamente com o componente extraível até que o estado de equilíbrio é atingido (SAWADA, 2012).

Figura 3. Processos de extração de óleos vegetais com solvente e recuperação do farelo desengordurado.

Fonte: adaptado de Anderson (2005).

O contato em contra-corrente pode ser representado esquematicamente como apresentado na Figura 4. No processo esquematizado, no estágio n, primeiro contato do solvente com a matéria-prima oleaginosa, inicia-se o processo de extração, o solvente passa a conter certa quantidade de óleo e a se chamar extrato ou miscela. No estágio 1 dar-se-á o contato entre a alimentação (material oleaginoso) e o extrato proveniente do estágio subsequente (E_2). As correntes de saída, provenientes deste estágio são E_1 , extrato ou miscela concentrada, e R_1 , fase refinado que contém, além do material insolúvel (fibras, proteínas, etc) e óleo não extraído, parte da corrente E_2 que fica aderida ao sólido.

Figura 4. Representação esquemática do ESL com n estágios operando em contracorrente.

Fonte: própria autoria.

Os óleos vegetais são normalmente extraídos com solventes orgânicos sendo que esta técnica de extração permite obter refinados com baixo teor de óleo residual. O solvente tradicionalmente empregado para a extração de óleos vegetais é o n-hexano, o qual embora apresente elevada estabilidade e grande capacidade de extração de óleo de matrizes vegetais é considerado uma neurotoxina nos Estados Unidos. Além disso, este solvente possui elevada toxicidade, inflamabilidade e apresenta grande potencial de poluição caso não seja recuperado adequadamente (ANDERSON, 2005; JOHNSON; LUSAS, 1983; TIR; DUTTA; BADJAH-HADJ-AHMED, 2012).

Alguns solventes alternativos têm sido avaliados com a finalidade de substituir o n-hexano, dentre eles podem ser citados os álcoois de cadeia curta como, por exemplo, o etanol e o isopropanol os quais têm sido amplamente investigados. Por apresentarem maior polaridade, estes álcoois são capazes de extrair maior quantidade de material insaponificável da matriz oleaginosa, dentre eles esteróis, pigmentos, tocoferóis, hidrocarbonetos e álcoois alifáticos (NAGENDRA PRASAD *et al.*, 2011) fazendo com que o valor nutricional dos óleos aumente. Além disso, os álcoois de cadeia curta podem ser removidos do extrato apenas com o abaixamento da temperatura em razão de sua miscibilidade parcial com o óleo (JOHNSON; LUSAS, 1983), possibilitando a separação parcial dos lipídeos e solvente sem que seja necessário que todo o extrato passe pelo processo de evaporação/destilação, o que pode reduzir em cerca de 25 % a necessidade energética quando comparada à extração utilizando n-hexano.

Além das vantagens apresentadas, estes solventes também possuem grande eficiência na extração de biocompostos, em especial na extração de compostos fenólicos (CACACE; MAZZA, 2003; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005). Devido a essas vantagens, o emprego de solventes alcoólicos para extração de óleos vegetais já foi avaliado para diversas matérias-primas tais como farelo de milho (MOREAU; HICKS, 2005), farelo de gérmen de milho (NAVARRO *et al.*, 2016), torta de macadâmia (NAVARRO; RODRIGUES, 2018),

farelo de arroz (BESSA et al., 2017; CAPELLINI et al., 2017), massa expandida de soja (TODA; SAWADA; RODRIGUES, 2016), microalgas (YAO; GERDE; WANG, 2012), torta de sementes de girassol (SCHARLACK; ARACAVA; RODRIGUES, 2017), dentre outras.

3.8 Extração com líquido pressurizado

A extração com líquido pressurizado, PLE (*Pressurized liquid extraction*), é uma técnica que envolve a extração utilizando solventes líquidos à temperatura e pressão elevadas, o que melhora o desempenho do processo, quando comparada com as técnicas realizadas à temperatura ambiente e pressão próxima da atmosférica (CAMEL, 2001; KNOWLES; RICHTER, 2010). As vantagens de se utilizar solventes a temperaturas acima do seu ponto de ebulição, a pressões superiores a atmosférica, é a possível melhora de sua capacidade de solubilização e de suas propriedades de transferência de massa (MUSTAFA; TURNER, 2011).

De acordo com Mustafa e Turner (2011), de uma forma resumida, a eficiência da extração depende da natureza da matriz oleaginosa, do composto a ser extraído e do local onde este se encontra no interior da matriz. O processo de extração em matrizes heterogêneas foi ilustrado por Pawliszyn (2003) por um modelo que assume que o material a ser submetido ao processo de extração é constituído por partículas porosas e estas são rodeadas por uma camada do solvente orgânico. Inicialmente, o soluto é desorvido; em seguida, ele difunde através da matriz sólida até atingir a interface matriz-fluido (CAMEL, 2001; PAWLISZYN, 2003).

Um diagrama esquemático de um sistema de PLE é apresentado na Figura 5. Segundo Danlami *et al.* (2014), o equipamento PLE envolve uma célula de extração onde a amostra é introduzida. A célula é preenchida com um solvente ou mistura de solventes que são aquecidos e pressurizados. Os altos valores de temperatura e pressão são então mantidos para que processo de extração seja facilitado e ocorra de forma mais rápida. O equipamento possui uma válvula de alívio de pressão que protege contra o excesso de pressurização da célula. O nitrogênio é utilizado para limpar todos os solventes residuais no final da extração (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002). O tipo de solvente, a razão sólido/solvente, a temperatura, a pressão, o número de ciclos e tempo de processo influenciam o rendimento e a taxa de extração (NIETO et al., 2010).

Figura 5. Diagrama esquemático da PLE para o extrator Dionex ASE 150.

Fonte: Thermo Fisher Scientific (2011)

A PLE tem demonstrado oferecer diversas vantagens sobre os outros métodos de extração convencionais, tais como a possibilidade de automação, baixos volumes de solvente e a redução do tempo de extração (EIKANI *et al.*, 2013). Estas vantagens têm feito a técnica ser testada em diversos produtos com diferentes finalidades. Neste contexto, estudos também têm sido realizados objetivando a extração de óleos vegetais.

Algumas sementes oleaginosas como canola, milho, linhaça, algodão, soja, entre outras, têm sido submetidas ao processo de extração com líquido pressurizado (KNOWLES; RICHTER, 2010). Knowles e Richter (2010) analisaram a influência de temperaturas elevadas na qualidade do óleo obtido pelo método PLE. Os autores verificaram que os valores de índice de peróxido foram menores que 5 mg/kg, o que indica pouca oxidação em comparação com óleo obtido via Soxhlet.

A tecnologia PLE também foi utilizada para extrair os lipídios polares e não polares de milho e aveia utilizando hexano, cloreto de metileno, etanol e isopropanol como solventes (MOREAU; POWELL; SINGH, 2003). Em geral, os autores observaram que o aumento da temperatura de extração e a polaridade do solvente utilizado resultaram no aumento do rendimento de lipídios polares. No caso do milho, o total de fitosteróis encontrado foi de 0,6 e 2,1 %, em massa nos extratos obtidos a partir de etanol e cloreto de metileno, respectivamente.

No caso da aveia, o lipídeo polar mais abundante foi o digalactosildiacilglicerol, com níveis que variaram de 1,6 %, em massa nos extratos de hexano e 4,3 % em massa nos extratos de etanol.

Freitas et al. (2008) estudaram o processo de extração do óleo de sementes de uva utilizando métodos convencionais (Soxhlet e extração por prensagem mecânica) e a tecnologia PLE utilizando hexano como solvente. Os autores observaram que a técnica utilizando líquido pressurizado mostrou melhor rendimento de extração em termos do teor de vitamina E (FREITAS *et al.*, 2008).

Jesus *et al.* (2013) investigaram a extração de óleo de palma utilizando etanol, propano e suas misturas como solventes comprimidos. Os efeitos da temperatura, da pressão, taxa de fluxo de solvente e composição da mistura de solvente foram avaliados quanto ao rendimento de extração do óleo e perfil químico dos óleos extraídos. Rendimentos de aproximadamente 70% foram obtidos nas extrações, indicando que ambos os solventes são líquidos potenciais para a extração de óleo de palma. Os autores observaram também que a composição em ácidos graxos dos óleos de palma obtidos foi bastante similar, independentemente do método de extração ou do solvente empregado.

Lozano-Sánchez et al. (2014) estudaram a extração de compostos bioativos provenientes da torta resultante da fabricação de azeite de oliva extra virgem. A técnica PLE foi utilizada considerando como solventes misturas de etanol e água, dois solventes reconhecidos como seguros (GRAS, *generally recognized as safe*). Segundo os autores, o melhor rendimento de extração da fração fenólica foi obtido utilizando etanol e água (50:50, em volume), a 120 °C. Os principais compostos fenólicos identificados nas amostras foram caracterizados como álcoois ou derivados fenólicos, secoiridóides, flavonas e derivados do ácido elenólico. Os autores concluíram que o processo de extração com líquido pressurizado (PLE) pode ser aplicado para a produção de extratos enriquecidos em compostos bioativos e nutracêuticos.

Especificamente para a extração de lipídios diversos solventes têm sido testados sendo que os solventes apolares, tendo o hexano como o mais comumente utilizado (TURGUT; ZHANG, 2003), são bons solventes para a extração de compostos apolares, porém pode-se observar uma capacidade reduzida quando se avalia a extração de lipídeos polares, tais como fosfolipídios. Neste caso, a utilização de misturas binárias ou ternárias de solventes provou ser uma escolha bem-sucedida para a extração total dos lipídeos. O efeito dessas diferentes misturas sobre a extração de gordura total foi descrito por vários autores (TOSCHI et al., 2003).

Moreau, Powell e Singh (2003) estudaram a extração com líquido pressurizado de lipídeos polares e não polares de grãos de milho moídos e aveia fresca usando quatro diferentes solventes orgânicos: hexano, diclorometano, isopropanol e etanol. Para o milho moído os autores observaram que maiores rendimentos foram alcançados à medida que a polaridade do solvente aumentou, já para a aveia moída o efeito da polaridade do solvente foi mais complexo. Entretanto para ambas as matérias-primas o diclorometano forneceu melhores resultados na extração de lipídeos não polares enquanto que aumento da polaridade do solvente resultou no aumento do rendimento de extração dos lipídios polares.

Colivet, Oliveira e Carvalho (2016) avaliaram a influência do volume do leite na cinética de extração de óleo e compostos fenólicos totais de semente de melancia com etanol pressurizado e concluíram que diferentes células de extração não afetaram o rendimento total da extração, entretanto influenciaram os parâmetros obtidos através dos modelos propostos para descrever a cinética de extração.

Trentini et al. (2017) investigaram a extração de óleo de polpa de macaúba utilizando etanol e isopropanol pressurizados como solventes. Os rendimentos máximos obtidos por PLE foram 44,78% e 37,12% para o etanol e isopropanol, respectivamente, sendo que a PLE com etanol fornece óleos com níveis mais elevados de β -caroteno, enquanto que as extrações conduzidas com isopropanol levaram a teores mais elevados de flavonóis.

Em geral, os autores supracitados relatam altos rendimentos de extração em curto espaço de tempo de extração, indicando o potencial da técnica na extração de óleos e gorduras de matrizes vegetais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- 3 lotes de cascas de amêndoas de cacau fermentadas e secas (gentilmente doada por empresa processadora de cacau A – Ilhéus/BA) e 1 lote de cascas de amêndoas de cacau fermentadas, secas e torrada (gentilmente doada por empresa processadora de cacau B – Ilhéus/BA),
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha, pureza $\geq 99,9\%$, CAS 64-17-5),
- Etanol absoluto (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,5\%$, CAS 64-17-5),
- 2-Propanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha, pureza $\geq 99,5\%$, CAS 67-63-0),
- n-Hexano (Merck, Darmstadt, Alemanha, pureza $\geq 98,5\%$, CAS 110-54-3),
- n-Butanol (Merck, Darmstadt, Alemanha, pureza $\geq 99,5\%$, CAS 71-36-3),
- Hidróxido de Sódio (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 97,0\%$, CAS 1310-73-2),
- Solução Karl Fischer isenta de piridina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, mínimo 4,5-5,5 mg/mL),
- Clorofórmio (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,8\%$, CAS 67-66-3),
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha, pureza $\geq 99,9\%$, CAS 67-56-1),
- Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, pureza $\geq 95\%$, CAS 64-18-6),
- Éter etílico (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 98,0\%$, CAS 60-29-7),
- Ácido clorídrico (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 36,5-38,0\%$, CAS 7647-01-0),
- Hexanol absoluto (Merck, Hohenbrunn, Alemanha, pureza $\geq 98,0\%$, CAS 111-27-3),
- Acetonitrila (CAS 75-05-8),
- Acetona (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,5\%$, CAS 67-64-1),
- Ácido acético glacial (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,7\%$, CAS 64-19-7),
- Reagente de Folin & Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA),
- Ácido Gálico (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, pureza $\geq 98,0\%$, CAS 149-91-7),
- Carbonato de Sódio Anidro (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,5\%$, CAS 497-19-8),

- Reagente cromogênico 4-(dimetilamino) cinamaldeído (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, pureza $\geq 98,0\%$, CAS 6203-18-5),
- Cloreto de Sódio (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,0\%$, CAS 7647-14-5),
- EDTA (Leco, Sant Joseph, Michigan, EUA),
- Com aid (Leco, Sant Joseph, Michigan, EUA),
- Sulfato de sódio (Synth, Diadema/SP, Brasil, pureza $\geq 99,0\%$, CAS 7757-82-6),
- Reagente de esterificação BF₃ (Merck, Darmstadt, Alemanha, 20% em metanol),
- Mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma-Aldrich, Bellefonte, Pensilvânia, EUA),
- Padrão interno metil tridecanoato (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, pureza $\geq 97\%$, CAS 1731-88-0),
- Padrão 15 A (Nu-chek, Minnessota, EUA),
- Padrão 17 A (Nu-chek, Minnessota, EUA),
- Padrão procianidina B2 (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 29106-49-8),
- Padrão (-)-epicatequina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 490-46-0),
- Padrão (+)-catequina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 154-23-4),
- Padrão teobromina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 83-67-0),
- Padrão cafeína (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 58-08-2),
- Reagente DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 1898-66-4),
- Trolox (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 53188-07-1),
- TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA CAS 3682-35-7),
- Acetato de sódio (Synth, Diadema, Brazil, CAS 127-09-3),
- Cloreto de ferro (III) hexahidratado (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Missouri, EUA, CAS 10025-77-1),
- Padrão de alfa-tocoferol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, pureza $\geq 96\%$, CAS 10191-41-0),
- Padrão de delta-tocoferol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, pureza $\geq 90\%$, CAS 119-13-1),
- Padrão de gama-tocoferol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, pureza $\geq 96\%$, CAS 54-28-4).

4.1.2 Equipamentos

- Células de equilíbrio em vidro pyrex (FGG, Brasil),
- Banho termo estático digital (Marconi, modelo MA184, Brasil),
- Banho ultrassônico (Unique, Ultracleaner 1400, São Paulo, Brasil)
- Estufa de vácuo (Tecnal, modelo TE395, Brasil),
- Estufa de convecção forçada (Nova Orgânica, modelo N035/3, Brasil),
- Bomba de vácuo (Tecnal, modelo TE058, Brasil),
- Balança analítica eletrônica (0,0001 g) (Adam, modelo PW254, Reino Unido),
- Balança semi-analítica (Adam, modelo PGW1502i, Reino Unido),
- Agitador magnético (IKA, modelo RH basic 2, Alemanha),
- Analisador de tamanho de partícula por difração à laser (Shimadzu, modelo SALD-201V, Japão),
- Peneiras Tyler (Bertel, maq:16919 série: 0401, Brasil),
- Cromatógrafo gasoso com injetor automático (Shimadzu, modelo GC2010, Japão),
- Extrator para PLE (Dionex, modelo ASE-150, EUA),
- Titulador Karl Fischer (Metrohm, modelo 787 KF Titrino, EUA),
- Titulador potenciométrico automático (Metrohm, modelo 848 Titrino Plus, Suíça),
- Bureta automática (Metrohm, modelo Dosimat 775, Suíça),
- Agitador de tubos (Multi Reax, Heidolph, Alemanha),
- Vórtex (Lab Dancer, IKA, Alemanha),
- Centrífuga de bancada com sistema de refrigeração (Thermo Electron, modelo CR3i multifunction, EUA),
- Sistema completo para determinação de nitrogênio/proteína por combustão (Leco, modelo FP-528, EUA),
- Deionizador de água (Millipore, modelo Direct-Q 3, EUA),
- pHmetro (Mettler Toledo, modelo Seven Compact, EUA),
- Tacômetro digital (Icel, modelo TC-5010, Brasil),
- Sistema de extração de gordura a alta temperatura (Ankom, modelo XT10, EUA),
- Espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu, UV-1650PC, Japão),

- Extrator em aço inoxidável (Marconi, modelo MA-483/EC2, Brasil),
- Rotaevaporador (Heidolph, modelo Hei-VAP Precision, Alemanha),
- Liofilizador (modelo 10-NB, Ningbo Scientz, China),
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo Prominence, Japão) equipado com detector de fluorescência (Shimadzu, modelo Prominence RL20-A, Japão),
- Cromatógrafo líquido de ultra desempenho Waters Acquity (UPLC, Waters, Milford, EUA), equipado com um sistema de bomba quaternária (Waters, EUA) e com um analisador de fragmento de massa quadrupolo Xevo TQ-S tandem (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI),
- Bomba quaternária (Waters, Milford, EUA),
- Pipetas automáticas (Gilson, modelos P20G, P200G e P1000G, França),
- Analisador termogravimétrico (Netzsch, model STA 449 F3, Selb, Alemanha).

4.1.3 *Diversos*

- Vidros de amostra,
- Gases especiais para cromatografia gasosa (ar sintético, hélio, hidrogênio), para determinação de nitrogênio pelo método de combustão (ar comprimido, hélio, oxigênio) (Linde) e para análise termogravimétrica (nitrogênio),
- Vials para cromatografia gasosa e líquida,
- Vidrarias em geral (béqueres, erlenmeyers, placas de Petri, balões volumétricos calibrados, tubos de polipropileno para centrifugação, etc.),
- Termômetros calibrados,
- Ponteiras para pipetas automáticas,
- Pipetas Pasteur,
- Seringas com agulhas para amostragem,
- Papel filtro nº 1 (Whatman),
- Papel filtro XT4 (Ankom),
- Papel filtro 30 mm (Dionex),
- Folhas e cápsulas de estanho (Leco),
- Filtro seringa de nylon 0,45 μm (Allcrom),
- Filtro seringa de nylon 0,22 μm (Allcrom),
- Septo ultra clean (Dionex),

- Cubetas plásticas para espectrofotômetro,
- Pipetas de Pasteur plásticas,
- Coluna C18, 250mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, (Waters, Millford, MA, EUA)
- Coluna de sílica de alta resistência T3 (HSS) (Waters, Milford, MA, EUA).

4.2 Métodos

Os quatro solventes alcoólicos utilizados nas determinações dos dados experimentais estão designados por siglas nas diversas Figuras e Tabelas que serão apresentadas na sequência desta tese: Et0, Et6, IPA0 e IPA12, representando os solventes etanol absoluto, etanol azeotrópico (contendo aproximadamente 6% de água, em massa, em sua composição), isopropanol absoluto e isopropanol azeotrópico (contendo cerca de 12% de água, em massa, em sua composição), respectivamente.

A Tabela 8 apresenta, de forma geral, as atividades experimentais realizadas durante a execução da presente tese de doutorado em termos de caracterização das matérias-primas, condições para realização dos experimentos de extração sólido-líquido e caracterização das fases extrato, refinado e das gorduras obtidas após processo de extração. Vale ressaltar que foram realizados dois tipos distintos de extração, a pressão atmosférica e com líquido pressurizado, e para se referir a eles serão utilizadas as siglas ATME e PLE, respectivamente.

Tabela 8. Conjuntos experimentais e caracterizações realizadas.

Casca da amêndoa de Cacau	Experimentos de extração sólido-líquido	Caracterização
Umidade	PLE Extração de gordura da casca da amêndoa de cacau em estágio único com líquido pressurizado (Et0 como solvente, razão mássica sólido:solvente 1:3, temperaturas de 60, 75 e 90 °C e tempo estático de extração variando entre 3 e 50 minutos)	Teor de água
Teor de lipídeos		Teor de solvente
Teor de proteínas		Teor de flavanóis totais
Teor de cinzas		Teor de catequina
Teor de fibras dietéticas totais, solúveis e insolúveis		Teor de epicatequina
Perfil de ácidos graxos ¹		Teor de procianidina B2
Densidade real		Teor de cafeína
Solubilidade proteica		Teor de teobromina
Presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A		Atividade Antioxidante
Teor de cádmio	Fase Refinado	Teor de gordura residual
Teor de compostos fenólicos totais ²		Teor de proteínas
Teor de flavanóis totais ²	Gordura	Solubilidade proteica
Teor de catequina ³		
Teor de epicatequina ³		
Teor de procianidina B2 ³		Perfil de ácidos graxos
Teor de cafeína ³		Teor de ácidos graxos livres
Teor de teobromina ³		Teor de tocoferóis (α , $\beta+\gamma$, δ)
Teor de tocoferóis (α , $\beta+\gamma$, δ) na gordura ¹		
Atividade Antioxidante (DPPH e FRAP) ²		

¹ Determinado na gordura extraída da casca da amêndoa de cacau pela metodologia de Bligh e Dyer (1959); ² Determinado no extrato obtido como descrito Seção 4.2.1.10; ³ Determinado no extrato liofilizado obtido como descrito Seção 4.2.1.10

Tabela 8. Continuação.

Casca da amêndoa de Cacau	Experimentos de extração sólido-líquido	Caracterização
Umidade	<p>ATME</p> <p>Extração de gordura da casca da amêndoa de cacau em estágio único a pressão atmosférica (Et0, Et6, IPA0 e IPA12 como solventes, razão mássica sólido solvente 1:3, temperaturas de 60, 75 e 90 °C e tempo de extração de uma hora)</p>	Teor de água
Teor de lipídeos		Teor de solvente
Teor de proteínas		Teor de fenólicos totais
Teor de cinzas		Teor de flavanóis totais
Teor de fibras dietéticas totais, solúveis e insolúveis		Teor de catequina
Perfil de ácidos graxos ¹		Teor de epicatequina
Densidade real		Teor de procianidina B2
Solubilidade proteica		Teor de cafeína
Presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A		Teor de teobromina
Teor de cádmio		
Teor de compostos fenólicos totais ²	Fase Refinado	Teor de solvente
Teor de flavanóis totais ²		Teor de gordura residual
Teor de catequina ³	Gordura	
Teor de epicatequina ³		
Teor de procianidina B2 ³		Perfil de ácidos graxos
Teor de cafeína ³		Teor de tocoferóis (α , $\beta+\gamma$, δ)
Teor de teobromina ³		
Teor de tocoferóis (α , $\beta+\gamma$, δ) na gordura ¹		

¹ Determinado na gordura extraída da casca da amêndoa de cacau pela metodologia de Bligh e Dyer (1959); ² Determinado no extrato obtido como descrito Seção 4.2.1.10; ³ Determinado no extrato liofilizado obtido como descrito Seção 4.2.1.10

Tabela 8. Continuação.

Umidade	Experimentos de extração sólido-líquido		Caracterização
Teor de lipídeos	<p>ATME</p> <p>Extração de gordura da casca da amêndoa de cacau em estágio único a pressão atmosférica (Et0 e Et6 como solventes, razão mássica sólido solvente 1:3, temperaturas de 75 e 90 °C e tempo de extração variando entre 30 e 240 minutos)</p>	Fase Extrato	Teor de água
Teor de proteínas			Teor de solvente
Teor de cinzas			Teor de fenólicos totais
Teor de fibras dietéticas totais, solúveis e insolúveis			Teor de flavanóis totais
Perfil de ácidos graxos ¹		Fase Refinado	Teor de catequina
Densidade real			Teor de epicatequina
Solubilidade proteica			Teor de procianidina B2
Presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A			Teor de cafeína
Teor de cádmio			Teor de teobromina
Teor de compostos fenólicos totais ²		Fase Refinado	Teor de solvente
Teor de flavanóis totais ²			Teor de gordura residual
Teor de catequina ³			Teor de proteínas
Teor de epicatequina ³			Solubilidade proteica
Teor de procianidina B2 ³	<p>ATME</p> <p>Extração de gordura da casca da amêndoa de cacau em estágio único a pressão atmosférica (Et0 e Et6 como solventes, razão mássica sólido solvente variando de 1:2,5 a 1:10, temperaturas de 75 e 90 °C e tempo de extração de 180 minutos)</p>	Fase Extrato	Teor de água
Teor de cafeína ³			Teor de solvente
Teor de teobromina ³		Fase Refinado	Teor de solvente
Teor de tocoferóis (α , β + γ , δ) na gordura ¹			Teor de gordura residual

¹ Determinado na gordura extraída da casca da amêndoa de cacau pela metodologia de Bligh e Dyer (1959); ² Determinado no extrato obtido como descrito Seção 4.2.1.10; ³ Determinado no extrato liofilizado obtido como descrito Seção 4.2.1.10

Fonte: Própria autoria.

4.2.1 *Caracterização da casca da amêndoa de cacau*

Inicialmente foram avaliadas duas cascas da amêndoa de cacau de origem distintas, todas elas foram gentilmente fornecidas por empresas, sendo a casca da amêndoa de cacau seca (CS) fornecida pela Empresa processadora de cacau A e a casca da amêndoa de cacau torrada (CT) pela Empresa processadora de cacau B, ambas situadas em Ilhéus, na Bahia.

4.2.1.1 *Composição química*

As matérias-primas foram caracterizadas em termos de umidade (Ac 2-41, AOCS, 1998), teor de lipídeos através de sistema de extração com solvente à alta temperatura (Am 5-04, AOCS, 1998), cinzas (AOAC, 2007), fibras (ASP et al., 1983) e teor de nitrogênio total (Ba 4e-93, AOCS, 1998). Para conversão do teor de nitrogênio total em proteínas, este foi multiplicado pelo fator 6,25 (AOAC, 2007).

Com base nas análises supramencionadas e, principalmente, com base no teor de lipídeos apresentado pelas cascas, resultados discutidos na seção 5.1.1, os experimentos descritos a partir da Seção 4.2.1.4 foram conduzidos apenas com as cascas da amêndoa de cacau secas, doadas pela Empresa processadora de cacau A. Vale destacar que para a realização de toda a tese de doutorado foram solicitados diversos lotes desta matéria-prima, desta forma, todos os lotes recebidos foram submetidos às caracterizações supracitadas. Para a casca da amêndoa de cacau seca também foram realizadas análises e determinações adicionais as quais são apresentadas na sequência.

4.2.1.2 *Composição em ácidos graxos da gordura da casca de amêndoa de cacau*

As gorduras das cascas das amêndoas de cacau, seca e torrada, foram extraídas das respectivas matérias-primas pelo método a frio sugerido por Bligh e Dyer (1959). Em seguida, estas foram submetidas à hidrólise e esterificação para serem analisadas em termos de sua composição em ácidos graxos. A análise do perfil de ácidos graxos foi feita por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos, segundo os métodos oficiais Ce 1-62 e Ce 2-66 da AOCS (1998), sendo utilizado como padrão interno o metiltridecanoato (ZENEBO; PASCUET; TIGELA, 2008).

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010 AF acoplado a um injetor automático e detector de ionização em chama. As condições experimentais empregadas foram:

coluna capilar altamente polar de biscianopropil polisiloxano 0,20 µm, 100 m x 0,25 mm i.d. (SP – 2560, Supelco, EUA), hélio como gás de arraste (com velocidade linear de 19,5 cm/seg); temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da coluna de 140 °C (durante 5 minutos), de 140 a 240 °C (a uma taxa de 4 °C/min), 240 °C (durante 15 minutos); temperatura do detector de 260 °C e volume de injeção de 1,0 µL; split 100:1. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões externos adquiridos da Supelco e Nu Chek. A quantificação foi realizada comparando-se a área de cada ácido graxo com a área do padrão interno, utilizando os fatores de correção de resposta do detector de ionização em chama e de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos.

4.2.1.3 *Determinação do teor de ácidos graxos livres na gordura da casca da amêndoa de cacau*

Para determinação do teor de ácidos graxos livres (AGL) na gordura da casca da amêndoa de cacau foi realizada extração pelo método Bligh e Dyer (1959). Após a obtenção do extrato, este foi rotaevaporado a 50 °C e 200 mbar, obtendo-se assim a gordura da casca da amêndoa de cacau; essa gordura foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) pelo método a frio 2201 da IUPAC (1979) modificado, utilizando um titulador potenciométrico automático. Para a determinação da acidez livre utilizou-se a massa molar média dos ácidos graxos livres, calculada com base na análise cromatográfica.

A porcentagem de acidez livre das amostras foi calculada conforme a Equação 1.

$$\text{AGL na gordura (\%)} = \frac{\text{MM} \times N_{\text{NaOH}} \times V}{M \times 10} \quad (1)$$

Na qual MM é a massa molar média dos ácidos graxos livres (g/mol); N_{NaOH} é a normalidade da solução de NaOH (eq-g/L); V é o volume de NaOH gasto na titulação (mL); e M é a massa de amostra de gordura (g), obtida pela metodologia de Bligh e Dyer (1959).

4.2.1.4 *Determinação do teor de isômeros de tocoferóis*

Para determinação dos teores de α -, (β + γ)- e δ - tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau foi realizada extração pelo método Bligh e Dyer (1959). Após a obtenção do extrato, este foi rotaevaporado a 50 °C e 200 mbar, obtendo-se assim a gordura da casca da

amêndoa de cacau. A gordura foi pesada (0,05 g) e dissolvida em 2 mL de 2-propanol. A mistura foi então homogeneizada em banho ultrassônico durante 10 minutos, a 30 °C, foi então centrifugada a 3000 g, por 5 minutos, a 5 °C, e filtrada em filtro seringa de nylon de 0,45 µm. Uma alíquota da amostra foi então analisada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector de fluorescência, de acordo com metodologia sugerida por Gimeno et al. (2000) e Gliszczynska-Świgło e Sikorska (2004), com modificações em termos composição da fase móvel.

A análise foi realizada injetando 10 µL da amostra em um sistema HPLC acoplado com uma coluna C18 (250mm × 4.6 mm, 5µm, Waters, Millford, MA, USA) mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta por 4% de acetonitrila (solvente A), 90% de metanol (solvente B) e 6% de água deionizada (solvente C), foi utilizada taxa de fluxo de 0,9 mL/min durante 20 minutos. A detecção foi realizada por fluorescência com excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Uma curva padrão foi preparada com solução padrão de α , δ e γ -tocoferóis, variando de 0,625 a 40 µg/mL, sendo que a curva padrão fornecida pelo isômero γ fornece valores dos teores dos tocoferóis $\beta+\gamma$ visto que esses isômeros não são separados na coluna utilizada. Para determinação do teor de tocoferóis totais os teores dos isômeros avaliados (α , $\beta+\gamma$ e δ) foram somados.

4.2.1.5 *Determinação do teor de micotoxinas*

A presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A na casca da amêndoa de cacau seca e na casca da amêndoa de cacau torrada foi determinada pelo Instituto de Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas Ltda (SAMITEC, Santa Maria/RS), seguindo a metodologia descrita por Malachová et al. (2014).

4.2.1.6 *Determinação do teor de cádmio*

A presença do mineral cádmio na casca da amêndoa de cacau foi determinada pelo laboratório CBO Análises Laboratoriais (Campinas/SP), seguindo a metodologia descrita por Sindirações (2013).

4.2.1.7 *Determinação do índice de solubilidade de nitrogênio*

O índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) corresponde à relação entre o conteúdo de nitrogênio dissolvido e o seu conteúdo na amostra inicial. O índice de solubilidade de nitrogênio

foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Morr et al. (1985) e utilizada para a matéria-prima soja por Sawada et al. (2014), sendo que algumas modificações foram realizadas apenas para melhorar a repetibilidade da análise, conforme segue. Cerca de 1,0 g da casca da amêndoa de cacau, previamente seca a 60 °C durante 24 horas e triturada, foi colocada em célula de equilíbrio de vidro pyrex e dispersa em 50 g de NaCl 0,1 M. Os valores dos pHs das dispersões foram ajustados em 2,0; 4,0; 4,5; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 13,0 utilizando HCl 0,1 N e/ou NaOH 0,1 N. Após o ajuste do valor do pH, as dispersões foram mantidas sob agitação com auxílio de um agitador magnético, por 2 horas. A utilização de células de equilíbrio possibilita o controle da temperatura, a qual foi mantida a $25,0 \pm 0,1$ °C ao longo de todo o período de agitação. Em seguida, a agitação foi desligada e as dispersões permaneceram em repouso por 5 minutos, os sobrenadantes foram então transferidos com ajuda de uma pipeta para tubos de centrifuga e centrifugadas a 5000 g por 30 minutos, a temperatura de 4 °C. Após este procedimento, com o auxílio de uma seringa, os líquidos sobrenadantes foram retirados e, na sequência, foram filtrados em papel de filtro qualitativo nº 1 (Whatman). Alíquotas do material filtrado foram tomadas para determinação do teor de nitrogênio pelo método de combustão (Ba 4f-00, AOCS, 1998). O índice de solubilidade de nitrogênio foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{ISN (\%)} = \frac{\text{Nitrogênio}_{\text{filtrado}} \times M_{\text{NaCl}}}{\text{Nitrogênio}_{\text{amostra}} \times M_{\text{amostra}}} \quad (2)$$

Na qual $\text{Nitrogênio}_{\text{filtrado}}$ é a porcentagem mássica de nitrogênio no filtrado (%); M_{NaCl} é a massa de NaCl 0,1 M (g); $\text{Nitrogênio}_{\text{amostra}}$ é a porcentagem mássica de nitrogênio na amostra (%); e M_{amostra} é a massa de amostra (g).

4.2.1.8 *Determinação da distribuição granulométrica e do tamanho médio das partículas da casca da amêndoa de cacau triturada*

A determinação da distribuição granulométrica e do tamanho médio das partículas da casca de amêndoa de cacau, seca e triturada com o uso de um liquidificador, foi realizada utilizando peneiras Tyler, com meshs 10, 14, 20, 28, 35, e 48, e o equipamento de difração a laser. A determinação do tamanho das partículas foi necessária para o cálculo do coeficiente de difusão da gordura, como pode ser observado no item 4.2.10.

Para a primeira análise pesou-se cerca de 150 g de casca da amêndoa de cacau triturada. Essa massa foi mantida sob agitação por 10 minutos e, na sequência, verificou-se a massa de amostra retida em cada peneira e no fundo, sendo que o material retido no fundo foi recolhido. Uma pequena fração do material retido no fundo foi suspensa em vaselina líquida para realização da análise por difração a laser para verificação da distribuição granulométrica deste material.

Após concluídas as duas análises, o diâmetro médio das partículas retidas nas peneiras Tyler (dm_{ty}) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por ASAE (1995) utilizando a Equação 3:

$$dm_{ty} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n w_i \log(d_i \times d_{i+1})^{0.5}}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad (3)$$

Onde w_i é a massa retida na i -ésima peneira (g), d_i é a abertura da i -ésima peneira (mm) e d_{i+1} é a abertura da peneira $i+1$ (mm).

O diâmetro médio das partículas de fundo analisadas por difração a laser (dm_{dl}) é fornecido pelo próprio equipamento o qual utiliza as Equações 4 e 5 para o cálculo:

$$dm_{dl} = 10^\mu \quad (4)$$

$$\mu = \frac{1}{100} \sum_{j=1}^n q_j \frac{\log_{10} x_j + \log_{10} x_{j+1}}{2} \quad (5)$$

Onde x_j é o diâmetro da partícula (μm) e q_j é a distribuição diferencial (%).

Após a obtenção dos diâmetros médios das partículas, calculados a partir das equações descritas acima, fez-se a média ponderada dos valores obtidos para determinação do diâmetro médio das partículas da amostra (dm_p).

4.2.1.9 *Densidade real das partículas da casca da amêndoa de cacau triturada*

A densidade real (d_r) da casca da amêndoa de cacau (CS) foi determinada pelo método de picnometria com gás hélio pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. Esta informação é importante para determinar a porosidade do leite, a qual é necessária para diversas determinações e scale-up do processo de extração.

4.2.1.10 *Obtenção de extrato para determinação de compostos fenólicos totais, flavanóis totais, alcaloides e atividade antioxidante*

A casca da amêndoa de cacau foi inicialmente triturada e desengordurada a frio com hexano, como descrito por Oracz, Nebesny e Zyzelewicz (2015). A solução hexânica sobrenadante foi descartada e o restante de solvente aderido ao sólido foi evaporado em estufa de convecção forçada, a 30 °C, até massa constante.

A casca da amêndoa de cacau desengordurada foi então submetida à extração com solução acetona/água/ácido acético glacial (70/29,5/0,5, v/v/v) como sugerido por Payne et al. (2010) e Oracz, Nebesny & Zyzelewicz (2015). Para isso pesou-se 0,5 g do sólido desengordurado em tubo de centrífuga e adicionou-se 5 mL de solução de extração, sendo a mistura agitada em agitador de tubos por 10 minutos. Na sequência, a amostra foi colocada em banho ultrassônico a 37 ± 3 °C por 10 minutos. O tubo foi novamente agitado e, posteriormente, mantido em repouso por 25 minutos; após o repouso o tubo foi novamente agitado e, mais uma vez, submetido ao repouso por mais 25 minutos. Em seguida, o tubo foi agitado novamente e posteriormente centrifugado a 200 g por 5 minutos. O extrato (nomeado como CSPE) foi então filtrado em filtro seringa de 0,45 µm.

Para determinação do teor de alcaloides e flavanóis (Seção 4.2.1.14), de sua atividade antioxidante (Seção 4.2.1.15) e de sua estabilidade térmica (Seção 4.2.1.16), o solvente orgânico (acetona acidificada) contido no CSPE foi removido por rotaevaporação (200 mbar, a 30 °C) e, posteriormente, o extrato aquoso remanescente foi liofilizado, obtendo-se dessa forma o CSPE liofilizado.

4.2.1.11 *Determinação do teor de compostos fenólicos totais*

O teor de compostos fenólicos totais no extrato da casca de amêndoas de cacau foi determinado pelo método de Folin – Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) com modificações, as quais se deram quanto a relação água:reagente Folin-Ciocalteu e a concentração da solução de carbonato de sódio. O extrato CSPE (obtido conforme descrito na Seção 4.2.1.10) foi inicialmente diluído em água e 0,5 mL da amostra diluída foi adicionado a 2,5 mL de solução água:reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Após 5 minutos, adicionou-se 2 mL de solução carbonato de sódio:água (7,5:100 m/v), a amostra foi então submetida à agitação em vórtex. Anteriormente à determinação da absorbância, a solução foi mantida na ausência de luz (temperatura ambiente) por 2 horas. A absorbância da solução resultante foi determinada em espectrofotômetro a 760 nm. A quantificação de fenólicos totais

foi realizada utilizando curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico/g de casca.

4.2.1.12 *Determinação do teor de flavanóis totais*

O teor de flavanóis totais foi determinado pelo método do 4- dimetilaminocinamaldeído (DMAC) de acordo com Payne et al. (2010), com modificações em termos de volume de amostra e de reagentes utilizados, sendo estes aumentados proporcionalmente em 10 vezes para que o volume total utilizado fosse adequado para leitura em cubeta de 4 mL utilizada em espectrofotômetro UV-visível, no qual foram realizadas as análises. Após análises realizadas em UPLC para quantificação dos flavanóis presentes na casca da amêndoa de cacau seca (conforme discutido na Seção 4.2.1.14), constatou-se que a casca possui aproximadamente 2,5 vezes mais epicatequinas do que procianidina B2. Dessa forma, como a absorbância desses dois padrões em análise utilizando DMAC é bastante diferente, sendo que a epicatequina absorve com maior intensidade, optou-se por utilizar o padrão (-)-epicatequina, para que o resultado da análise espectrofotométrica fosse mais condizente com a realidade, evitando superestimações.

Para essa determinação, 0,5 mL dos extratos diluídos em etanol absoluto ou da solução padrão diluída nas concentrações de 0 a 0,054 mg/g, foram colocados em cubetas plásticas e, logo na sequência, acrescentou-se 2,5 mL da solução reagente de DMAC, sendo a solução reagente composta de 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC) 0,001 g/mL em etanol absoluto acidificado com 10% v/v de HCl concentrado. As cubetas foram então rapidamente agitadas e imediatamente foi acompanhada a leitura da absorbância a 640 nm durante 5 minutos com intervalos de 5 segundos, em espectrofotômetro. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro e o zero da curva foi composto de 0,5 mL de etanol absoluto e 2,5 mL da solução reagente de DMAC. Como o padrão utilizado foi a (-)-epicatequina (Sigma Aldrich), os resultados foram expressos em mg equivalentes de epicatequina/g de casca.

4.2.1.13 *Determinação do teor de procianidinas totais – método por hidrólise ácida e formação de cor*

- Obtenção de Extratos metanólicos de procianidinas

Inicialmente 1,0 grama da amostra de casca da amêndoa de cacau seca previamente triturada foi pesado em erlenmeyer. Na sequência foram adicionados 20 mL de uma solução de metanol 70% v/v, a mistura foi então submetida à agitação em agitador magnético por 1 hora. Após este tempo a solução foi transferida quantitativamente para um tubo de centrífuga de 50

mL e foi centrifugada a 1600 g por 15 minutos a 10 °C, o sobrenadante foi então transferido para balão volumétrico de 50 mL. Foi realizada a re-extração do material no próprio tubo de centrífuga com adição de mais 20 mL de solução de metanol 70% v/v. O tubo foi submetido a agitação em vórtex em intervalos de 1 minuto de extração por 3 vezes e foi centrifugado nas mesmas condições já descritas. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume do balão foi completado com solução de metanol 70% v/v. Através deste procedimento obteve-se o extrato metanólico com procianidinas solúveis (EPS). O mesmo procedimento foi realizado para obter o extrato metanólico com procianidinas totais (EPT), no entanto, neste caso, após as agitações em vórtex a solução foi transferida integralmente, sem separação dos sólidos por centrifugação, para o balão volumétrico de 50 mL o qual foi igualmente completado com a solução de metanol 70 % v/v.

- Preparação de solução sulfato ferroso em n-butanol/HCl

Em balão volumétrico de 500 mL foram adicionados 200 mL de HCl completando-se o volume com n-butanol. A esta solução foram acrescentados 77 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Na sequência a solução foi agitada, transferida para um frasco âmbar e armazenada a 4 °C.

- Preparação de solução de tanino quebracho

Inicialmente foi preparada uma solução de metanol contendo 1% de HCl. A 10 mL desta solução foram adicionados 12 mg de tanino quebracho. A solução foi então transferida para um frasco âmbar e armazenada a -18 °C.

- Determinação do teor de procianidinas solúveis e totais

O teor de procianidinas totais foi determinado pelo método do butanol-HCl de acordo com Porter, Hrstich e Chan (1985). Diluições de cada extrato obtido anteriormente, EPS e EPT foram realizadas. Alíquotas de 250 µL de cada solução diluída foram colocadas, em triplicata, em tubos de ensaio com rosca e adicionadas de 2,5 mL de uma solução de sulfato. Os tubos foram levados a um banho com água a 95 °C, por 15 minutos. Após esse período os tubos foram colocados em banho de gelo. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. Amostras diluídas em 2,5 mL de acetona 80% foram utilizadas como controle. A mesma reação também foi realizada para diferentes concentrações da solução de tanino quebracho, permitindo a construção de uma curva padrão. Os resultados para as amostras foram obtidos com a diferença da absorbância da amostra após hidrólise com relação ao controle

correspondente. O resultado final foi expresso em mg equivalente de tanino quebracho/g de casca da amêndoa de cacau.

4.2.1.14 *Determinação do teor de alcaloides e flavanóis por UPLC – MS/MS*

A metodologia utilizada para análise de alcaloides e flavanóis por UPLC - MS/MS foi baseada em trabalho publicado por Ortega et al. (2010) com modificações em termos do volume de solução utilizado para a dissolução do padrão teobromina e da fase móvel (composição e gradientes), conforme segue. As soluções estoque dos padrões foram preparadas dissolvendo individualmente 1 mg de (-) - epicatequina, 1 mg de (+) - catequina, 1 mg de procianidina B2 e 1 mg de cafeína em 1 mL de acetonitrila e 1 mg de teobromina em 10 mL de acetona/água deionizada/ácido acético (70/29,5/0,5 v/v/v). As soluções padrão foram preparadas semanalmente e armazenadas em frascos de vidro âmbar a - 4 °C. A partir destas soluções padrão preparou-se uma mistura padrão contendo 500 ng/mL de cada composto e, a partir desta solução padrão, foram realizadas diluições em metanol para se obter a curva de calibração.

O CSPE liofilizado, preparado como descrito na Seção 4.2.1.10, foi dissolvido no solvente de extração, 1 mg/mL de acetona/água deionizada/ácido acético (70/29,5/0,5 v/v/v). A solução foi então filtrada através de um filtro de seringa de PTFE de 0,22 µm e diluída em metanol antes da análise cromatográfica.

A separação cromatográfica foi obtida em um sistema de cromatografia líquida de ultra desempenho Waters Acquity, equipado com um sistema de bomba quaternária (Waters, EUA) e uma coluna de sílica de alta resistência T3 (HSS) (100 mm × 2.1 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 1,8 µm) (Waters, EUA). A temperatura do forno da coluna foi mantida a 37 °C, com volume de injeção de 5 µL. Foi utilizada uma fase móvel binária constituída por água (eluente A) e metanol/ácido fórmico (0,05% v/v) (eluente B) com um gradiente de eluição como segue: 0,0-1,0 min 5-40% B; 1,0-4,0 min 40% B; 4,0-5,0 min 40-90% B, 5,0-5,1 min 90-5% B, 5,1-10,0 min 5% B, a uma vazão de 0,35 mL·min⁻¹.

A análise dos fragmentos de massa foi realizada em um quadrupolo Xevo TQ-S tandem (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os flavanóis foram analisados em modo negativo enquanto os alcaloides em modo positivo, simultaneamente. Todas as amostras foram analisadas no modo SRM (selected reaction monitoring).

As condições de trabalho da fonte de ionização foram as seguintes: tensão capilar de 3,2 e 2,5 kV para o modo positivo e negativo, respectivamente; temperatura da fonte de 150 °C; taxa de fluxo de gás no cone de 150 L·h⁻¹; taxa de fluxo de gás de dessolvatação de 600 L·h⁻¹; temperatura de dessolvatação de 350 °C. O tempo de permanência estabelecido para cada transição foi de 0,239 s, e o atraso do interscan foi definido para o modo automático. Os dados MS resultantes foram processados com o software MassLynx v4.1 (Waters, EUA). Os resultados foram expressos como µg/g ou mg/g de CSPE liofilizado e como µg/g ou mg/g casca de cacau seca.

4.2.1.15 *Atividade Antioxidante*

A atividade antioxidante do CSPE liofilizado (Seção 4.2.1.10) foi avaliada *in vitro* por meio de análises de FRAP e seu efeito antioxidante nos radicais livres sintéticos DPPH • (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Para a análise, o CSPE liofilizado foi diluído em etanol e os resultados são relatados como µmol equivalente de Trolox por grama de casca de cacau seca.

4.2.1.15.1 DPPH

Foram preparadas misturas de reação contendo solução metanólica de DPPH • (65 µM) e diferentes concentrações da amostra. Um ensaio controle (ausência de extrato) foi realizado para determinar o valor da absorbância inicial, a 515 nm no tempo de reação zero. Após 3 horas de incubação a 25 °C, tempo necessário para estabilizar a reação, as absorbâncias das misturas reacionais foram determinadas a 515 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata e o reagente Trolox foi usado como o antioxidante padrão. A atividade antioxidante da amostra foi avaliada reduzindo a absorbância de DPPH a 515 nm, em comparação com a absorbância inicial do ensaio controle.

4.2.1.15.2 FRAP

A determinação do poder de redução de íons férricos foi conduzida de acordo com Benzie e Strain (1996) com modificações, como segue. O reagente FRAP foi preparado a partir de solução tampão de acetato 300 mM (pH 3,6, ajustado com ácido acético glacial), solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) (em HCl 40 mM) e solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM), na relação volume 10: 1: 1, respectivamente. Um volume de 50 μL de amostra (0,2 g/mL) foi incubado com 950 μL do reagente FRAP. A absorbância a 593 nm foi determinada após 30 minutos a 37 °C, sendo o reagente Trolox usado como o antioxidante padrão.

4.2.1.16 *Análise termogravimétrica*

A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar alterações químicas, como degradação térmica, no CSPE liofilizado e nos padrões teobromina, cafeína, catequina, epicatequina e procianidina B2. Aproximadamente 3 mg de cada amostra foi usado para determinar a porcentagem de perda de massa em um analisador termogravimétrico. As condições experimentais empregadas foram: taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e fluxo de nitrogênio de 40 mL min^{-1} . As amostras foram avaliadas na faixa de temperatura de 25–600 °C em uma taxa constante (DU et al., 2014; GUJAR et al., 2010; WESOLOWSKI; SZYNKARUK, 2008), fornecendo as curvas TGA e DTG.

4.2.2 *Experimentos de cinética extração sólido-líquido com líquido pressurizado (PLE) utilizando etanol absoluto*

Para a execução dos experimentos de extração de gordura e biocompostos da casca da amêndoa de cacau foi utilizado um extrator para líquido pressurizado (Dionex, modelo ASE-150), célula em aço inoxidável de 100 mL e filtro de celulose (Figura 6).

A célula de extração foi montada colocando-se o papel filtro em sua parte inferior, de forma a evitar qualquer tipo de entupimento. Adicionou-se à célula uma massa conhecida de casca da amêndoa de cacau moída e, posteriormente, o solvente alcoólico, etanol em grau absoluto na proporção mássica 1:3 (massa de casca / massa de solvente), montando-se assim o sistema sólido-líquido a ser avaliado. A quantidade de matéria-prima utilizada foi pesada em béquer e posteriormente transferida para a célula de extração, enquanto a quantidade de solvente foi injetada automaticamente e informada pelo equipamento. Vale ressaltar que as condições

de razão sólido:solvente estão baseadas em trabalhos prévios desenvolvidos no Laboratório de Engenharia de Separações (OLIVEIRA et al., 2012b; RODRIGUES; ARACAVA; ABREU, 2010).

Figura 6. (a) Extrator Dionex ASE 150 para líquido pressurizado localizado no Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/ZEA/FZEA/USP). (b) Células de extração de 100 mL e filtro de celulose 30 mm.

Fonte: Própria autoria.

A célula foi então pressurizada a aproximadamente 10,35 MPa e mantida sob aquecimento constante a 60, 75 e 90 °C por tempos estáticos que variaram entre 3 e 50 minutos, para a temperatura de 90 °C e entre 5 e 50 minutos para as demais temperaturas avaliadas. O volume “rinse” foi de 0 % para todas as extrações e ciclo estático foi igual a 1 (um único estágio de extração). Posteriormente, o extrato da PLE (PLEE) foi automaticamente coletado em um recipiente próprio e a célula de extração foi retirada do equipamento.

Após a extração, a massa de fase sólida foi pesada em uma balança de precisão para determinação do teor de solução aderido às fibras (índice de retenção, item 4.2.5.1) e seca em estufa de convecção forçada a 60 °C durante 24 horas. As amostras da fase extrato foram submetidas às análises de teor de água (Seção 4.2.4.1), teor de solvente (Seção 4.2.4.2) e teor

de flavanóis totais (Seção 4.2.4.3). A fase refinado foi submetida à análise do teor residual de lipídeos (Seção 4.2.5.2), e também do índice de solubilidade de nitrogênio (Seção 4.2.4.3), sendo que esta análise foi realizada para os refinados obtidos das extrações com 50 minutos de duração.

Os experimentos de extração foram repetidos para os tempos de 5, 30 e 50 minutos para as três temperaturas avaliadas. Para estes experimentos os PLEE foram separados e parte foi rotaevaporada para a obtenção da gordura a qual foi submetida a análise do perfil de ácidos graxos e determinação do teor de tocoferóis (Seção 4.2.6.1); a outra parte foi filtrada através de filtros seringas de 0,22 μm e utilizada para a análise UPLC-MS/MS (Seção 4.2.4.5) e para determinação da atividade antioxidante (Seção 4.2.4.6). O PLEE foi submetido às análises imediatamente após o processo de extração.

Para estimar a massa da fase extrato obtida da PLE, a qual é necessária para o cálculo do rendimento relativo de extração (Seções 4.2.7 e 4.2.8), o balanço de massa global foi realizado (Equação 6), na qual massa da fase de extrato (M^{FE}), massa da fase refinado (M^{FR}), massa da quantidade do solvente inicial (M^S) e massa da de matéria-prima (M^{MP}).

$$M^S + M^{MP} = M^{FE} + M^{FR} \quad (6)$$

O desvio relativo global, δ , entre a soma ($M^{FE} + M^{FR}$) e M^{PM} , pode ser calculado de acordo com a Equação 7:

$$\delta = \left[\left(M^{FR} + M^{FE} \right) - \left(M^{PM} \right) \right] \div M^{PM} \times 100 \quad (7)$$

4.2.3 Experimentos de extração sólido-líquido à pressão atmosférica (ATME) utilizando solventes alcoólicos

Para a realização dos experimentos de extração de lipídeos e compostos minoritários de casca da amêndoa de cacau seca foi utilizado um extrator construído em aço inoxidável e vedado hermeticamente, evitando perdas de massa por evaporação. A foto do equipamento existente no Laboratório de Engenharia de Separações (LES/ZEA/FZEA/USP) está apresentada na Figura 7a. O tampo do equipamento é dotado de manômetro, válvula de escape (sistema de segurança) e rotor. Os controles de temperatura e velocidade de agitação são realizados por controladores próprios do equipamento.

Os sistemas sólido-líquido foram obtidos adicionando-se massa conhecida da matéria-prima em cesto de aço inox, resistente ao ataque pelo solvente orgânico e temperatura, e permeável ao solvente e ao extrato (Figura 7b), contactando-a com massa conhecida de solvente alcoólico, etanol em grau absoluto (Et0), etanol em grau azeotrópico (Et6), isopropanol em grau absoluto (IPA0) ou isopropanol em grau azeotrópico (IPA12), mantendo a proporção mássica sólido:solvente em 1:3. A quantidade pré-estipulada da matriz oleaginosa foi pesada em filtro de papel, e este acondicionado no cesto de inox, posteriormente o solvente foi pesado em béquer e transferido para o extrator. O equipamento foi submetido à agitação constante de 175 rpm até a temperatura atingir o valor desejado, após isto o sistema foi mantido sob esta velocidade de agitação.

Os experimentos de ATME realizados podem ser divididos em três conjuntos experimentais:

- 1) O primeiro grupo corresponde aos experimentos de extrações realizadas com Et0, Et6, IPA0 e IPA12 por um tempo de extração de uma hora;
- 2) O segundo conjunto compreende a cinética de extração de lipídeos a 75 e 90 °C utilizando Et0 e Et6 como solventes, sendo que estes experimentos foram realizados objetivando verificar o tempo necessário para que o sistema entrasse em equilíbrio e, com isso, garantir a máxima extração do composto de interesse na condição avaliada;
- 3) O terceiro grupo é composto por experimentos de extração a pressão atmosférica (ATME) realizados variando-se a relação mássica sólido:solvente em 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:10 nas temperaturas de 75 e 90 °C com tempo de extração de três horas utilizando Et0 e Et6 como solventes. Este conjunto experimental teve como objetivo avaliar como o composto gordura se particiona entre as fases sólida e líquida.

Vale ressaltar que as condições de razão mássica sólido:solvente empregadas no primeiro e segundo conjuntos de experimentos, bem como a condição de agitação estão baseadas em trabalhos prévios desenvolvidos no Laboratório de Engenharia de Separações (OLIVEIRA et al., 2012b; RODRIGUES; ARACAVA; ABREU, 2010). Bem como o tempo de extração de uma hora, empregado no primeiro conjunto experimental (CAPELLINI, 2013; NAVARRO 2016; TODA, 2016).

O primeiro conjunto experimental de extração a pressão atmosférica (ATME) resultou em amostras de fase extrato as quais foram submetidas às análises de teor de água (Seção 4.2.4.1), teor de solvente (Seção 4.2.4.2), teor de compostos fenólicos (Seção 4.2.4.4), teor de flavanóis totais (Seção 4.2.4.3) e determinação dos teores de alcaloides e flavanóis (Seção 4.2.4.5). Além disso, os extratos obtidos a temperatura de 90 °C utilizando os 4 solventes

avaliados (Et0, Et6, IPA0 e IPA12) foram submetidos a rotaevaporação para obtenção da gordura bruta da casca da amêndoa de cacau (GBCS) a qual foi submetida a análise do perfil de ácidos graxos e do teor de tocoferóis (Seção 4.2.6.1). A fase refinado foi deixada em repouso por 5 minutos para drenagem e sem seguida foi pesada, em balança semi-analítica para determinação do índice de retenção (teor de solução aderido às fibras), conforme descrito na seção 4.2.5.1 e, também, submetida às análises de teor residual de lipídeos (Seção 4.2.5.2).

Figura 7. (a) Extrator confeccionado em aço inox localizado no Laboratório de Engenharia de Separações (LES/ZEA/FZEA/USP). (b) Cesto utilizado para acondicionamento da matéria-prima oleaginosa.

Fonte: Capellini (2013)

As amostras de extrato e refinado provenientes do segundo conjunto experimental foram submetidas às mesmas análises do primeiro conjunto, sendo que as análises do teor de alcaloides e flavanóis e do ISN foram realizadas apenas com os extratos oriundo de extrações com 3 horas de duração e, para este conjunto experimental, não foram realizadas análises nas amostras de gordura bruta da casca.

O terceiro conjunto experimental de extração a pressão atmosférica (ATME) resultou em amostras de fase extrato que foram submetidas às análises de teor de água (Seção 4.2.2.1.1) e teor de solvente (Seção 4.2.2.1.2). A fase refinado foi pesada, em balança semi-analítica para determinação do teor de solução aderido às fibras (Seção 4.2.5.1) e, também, submetida às análises de teor residual de lipídeos (Seção 4.2.5.2).

A repetibilidade e precisão dos resultados dos experimentos de extração sólido-líquido foi testada conforme metodologia sugerida por Marcilla, Ruiz e García (1995) a qual foi

previamente aplicada para sistemas de extração sólido-líquido por Rodrigues e Oliveira (2010), Rodrigues, Aracava e Abreu (2010) e Sawada et al. (2014).

No processo de extração sólido-líquido, a matéria-prima, CS que contém os sólidos solúveis, foi colocada em contato com o solvente (etanol ou isopropanol, em grau absoluto ou azeotrópico) e, após o período de extração, este contato resultou em duas fases distintas: uma denominada extrato e outra refinado.

O extrato caracteriza-se pela fase líquida, rica em solvente que está enriquecida dos compostos de interesse, e o refinado possui todos os sólidos que são insolúveis no solvente alcoólico, mas, ainda assim, agregado de uma fração do extrato que fica retida na matéria sólida. Para os experimentos de extração em um estágio de contato, podem ser escritos i balanços independentes por componente do sistema (MARCILLA; RUIZ; GARCÍA, 1995):

$$M^{PM} w_i^{PM} = M^{FR} w_i^{FR} + M^{FE} w_i^{FE} \quad (8)$$

Na qual, M^{PM} é a massa da mistura inicial ou ponto de mistura, M^{FE} e M^{FR} são as massas das fases extrato e refinado, respectivamente; w_i^{PM} é a fração mássica do componente i na mistura inicial e w_i^{FE} e w_i^{FR} são as frações mássicas do componente i nas fases extrato e refinado, respectivamente. Através destas i equações torna-se possível calcular os valores de w_i^{FR} e M^{FE} com base nos valores experimentais de w_i^{FE} e M^{FR} , pelo método dos mínimos quadrados. Se M é a matriz formada pelos valores de w_i^{PM} , B é a matriz transformação (composta pelos valores de w_i^{FE} e w_i^{FR}) e P é a matriz formada pela massa de cada fase (M^{FE} e M^{FR}), o sistema pode ser escrito como:

$$M = B \times P \quad (9)$$

Cálculos matemáticos levam à seguinte expressão:

$$P = (B^T B)^{-1} B^T M \quad (10)$$

Na qual B^T é a matriz transposta de B e $(B^T B)^{-1}$ é a matriz inversa de $(B^T B)$. Desta forma, os valores de M^{FE} e w_i^{FR} que minimizam os erros do sistema podem ser calculados.

Vale ressaltar que M^{FR} foi avaliada para cada sistema e pelo balanço de massa global:

$$M^{PM} = M^{FR} + M^{FE} \quad (11)$$

O desvio relativo global, δ , entre a soma ($M^{FE} + M^{FR}$) e M^{PM} , pode ser calculado de acordo com a Equação 7 apresentada na seção 4.3.2.

4.2.4 *Análises da fase extrato*

4.2.4.1 *Determinação do teor de água*

O teor de água nos solventes alcoólicos e nos extratos obtidos dos experimentos foi determinado pelo método oficial de titulação Karl Fischer Ca 2e-84 (AOCS, 1998). A porcentagem mássica de água nas amostras foi calculada através da Equação 12.

$$\text{Água (\%)} = \frac{V_{KF} \times \text{Título}_{KF}}{M \times 100} \quad (12)$$

Na qual V_{KF} é o volume de solução de reagente Karl Fisher gasto na titulação (mL); e M é a massa de amostra (g).

4.2.4.2 *Determinação do teor de solvente (álcool + água)*

O teor de solvente no extrato foi determinado por evaporação em estufa de convecção forçada, a temperatura de 60 °C, durante 24 horas. A porcentagem de solvente na fase extrato foi calculada pela Equação 13.

$$\text{Solvente(\%)} = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}}) \times 100}{M_{\text{inicial}}} \quad (13)$$

4.2.4.3 *Determinação do teor de flavanóis totais*

O teor de flavanóis totais nos extratos foi determinado de acordo com Payne et al. (2010) com modificações quanto ao padrão e ao volume de amostra e solvente utilizado. O extrato foi resfriado a -18 °C e posteriormente filtrado em filtro seringa de 0,45 µm. Após filtragem o extrato foi diluído em etanol absoluto e procedeu-se a análise como descrito na Seção 4.2.1.12.

4.2.4.4 *Determinação do teor de compostos fenólicos totais*

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi determinado de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) com modificações em termos da relação água:reagente Folin-Ciocalteu e a concentração da solução de carbonato. Os extratos foram resfriados a -18 °C e posteriormente filtrados em filtro seringa de 0,45 µm. Após filtragem foram diluídos em água e procedeu-se a análise como descrito na Seção 4.2.1.11.

4.2.4.5 *Determinação dos teores de alcaloides e flavanóis por UPLC – MS/MS*

Os extratos oriundos da PLE e das ATME foram diluídos em metanol e a análise cromatográfica foi conduzida como previamente descrita na Seção 4.2.1.14.

4.2.4.6 *Atividade antioxidante dos extratos provenientes da PLE*

O PLEE obtido conforme descrito na Seção 4.2.2 foi diluído em etanol e as análises de atividade antioxidante, DPPH e FRAP foram conduzidas como previamente descrito na Seções 4.2.1.15.1 e 4.2.1.15.2, respectivamente.

4.2.5 *Análises da fase refinado*

4.2.5.1 *Índice de retenção*

Os teores de solvente (etanol + água ou isopropanol + água) presentes nas fases refinado oriundas das extrações de casca da amêndoa de cacau foram determinados por evaporação em estufa de convecção forçada a temperatura de 60 °C, durante 24 horas, conforme descrito no item 4.2.4.2.

4.2.5.2 *Determinação do teor residual de lipídeos*

O teor residual de lipídeos nas fases refinado foi determinado utilizando-se um sistema de extração com solvente à alta temperatura (método Am 5-04, AOCS, 1998) empregando hexano como solvente de extração e temperatura de 90 °C, durante uma hora. O conteúdo de óleo residual nas amostras foi calculado a partir da Equação 14.

$$\text{Lipídeos residuais (\%)} = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}}) \times 100}{M_{\text{inicial}}} \quad (14)$$

4.2.5.3 *Índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado*

A análise de índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) foi realizada para os sólidos desengordurados provenientes do processo de extração com líquido pressurizado (PLE) para tempo estático de 50 minutos e temperaturas de 60, 75 e 90 °C e para os sólidos desengordurados provenientes ATME para os solventes Et0 e Et6 para extrações conduzidas durante 3 horas. Para as amostras mencionadas o ISN foi determinado somente na condição de pH 11, de acordo com a Seção 4.2.1.7. Para o seu cálculo é necessário previamente realizar a determinação da porcentagem mássica de nitrogênio na amostra, conforme apresentado na Equação 2. Dessa forma, nas amostras cujo o ISN foi determinado os refinados foram submetidos previamente a determinação de nitrogênio total (Ba 4f-00, AOCS, 1998).

4.2.6 *Análises da gordura de casca de amêndoas de cacau*

4.2.6.1 *Composição em ácidos graxos e teor de tocoferóis da gordura obtida do processo de extração*

Os extratos oriundos das extrações por PLE e ATME, foram rotaevaporados (100 mbar, a 30 °C). As gorduras de alguma dessas amostras foram submetidas a análise do teor de tocoferóis (Seção 4.2.1.4) e perfil de ácidos graxos (Seção 4.2.1.2.). As condições sob as quais as amostras avaliadas foram obtidas são descritas nas seções 4.2.2 e 4.2.3.

4.2.7 *Cálculo do rendimento de extração de biocompostos*

O rendimento de extração dos biocompostos avaliados neste estudo (flavanóis totais, catequina, epicatequina, procianidina B2, cafeína e teobromina) foi calculado a partir da massa em mg do composto presente na matéria-prima e a massa determinada na fase extrato. Esses dados foram inseridos na Equação 15.

$$\text{Rendimento de extração (\%)} = \frac{M^{FE}(w_{comp}^{FE})}{M^{MP}(w_{comp}^{MP})} \times 100 \quad (15)$$

Onde M^{MP} é a massa da matéria-prima, M^{FE} é a massa da fase extrato, w_{comp}^{MP} é a fração mássica do composto de interesse na matéria-prima, w_{comp}^{FE} é a fração mássica do composto de interesse na fase extrato.

4.2.8 Cálculo do rendimento de extração de lipídeos

O rendimento de extração de lipídeos foi calculado a partir da massa em gramas de gordura presente na matéria-prima e a massa residual de gordura determinada na fase refinado; esses dados foram inseridos na seguinte equação:

$$\text{Rendimento de extração de lipídeos (\%)} = \frac{M^{MP}(w_{lip}^{MP}) - M^{FR}(w_{lip}^{FR})}{M^{MP}(w_{lip}^{MP})} \times 100 \quad (16)$$

Onde M^{MP} e M^{FR} são as massas de matéria-prima e da fase refinado, respectivamente, w_{lip}^{MP} é a fração mássica de lipídeos na matéria-prima e w_{lip}^{FR} é a fração mássica lipídeos na fase refinado.

4.2.9 Modelagem matemática dos dados de cinética de extração de flavanóis totais por PLE

O modelo matemático proposto para descrever a cinética de extração de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau foi o modelo sugerido por Peleg (1988), com modificações. Este modelo foi escolhido pois tem sido amplamente utilizado para representar curvas de extração de biocompostos de matérias-primas vegetais (JOKIC et al., 2010; KARACABEY et al., 2013; PLANINIĆ et al., 2005).

Os parâmetros do modelo foram ajustados aos dados experimentais utilizando o programa SAS® (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e método de ajuste não linear de Marquardt, com um nível de confiança de 95%. O desempenho do modelo foi avaliado através do cálculo do desvio relativo médio (ARD) de acordo com a Equação 17:

$$ARD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{exp_i - calc_i}{exp_i} \right| \times 100 \quad (17)$$

onde n é o número total de dados experimentais, $calc_i$ é o valor calculado pelo modelo e exp_i é o valor determinado experimentalmente para a condição i .

O modelo proposto por Peleg (1988) foi baseado na similaridade entre as curvas de extração e as curvas de sorção, as quais são descritas utilizando modelos matemáticos de transferência de massa para a representação dos dados experimentais.

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + (K_2 \times t)} \quad (18)$$

onde:

$C(t)$ – Rendimento de extração de flavanóis totais no tempo t (mg eq. epicatequina/g CS)

t – tempo de extração (min)

K_1 – Constante de velocidade de Peleg (g CS min / mg eq. epicatequina)

K_2 – Constante de capacidade de Peleg (g CS / mg eq. epicatequina)

A constante de velocidade de Peleg K_1 se relaciona com a velocidade de extração (B_0) no começo do processo de extração ($t = 0$):

$$B_0 = \frac{1}{K_1} \quad (\text{mg eq. epicatequina/ g CS min}) \quad (19)$$

A constante de capacidade de Peleg K_2 se relaciona com o máximo rendimento de extração:

$$C_{max} = \frac{1}{K_2} \quad (\text{mg eq. epicatequina/ g CS}) \quad (20)$$

4.2.10 Modelagem matemática dos dados de cinética de extração de lipídeos por PLE e ATME

O modelo matemático sugerido por Perez, Carelli e Crapiste (2011) foi utilizado para descrever os dados experimentais de cinética de extração de lipídeos por líquido pressurizado e sob pressão atmosférica. Os parâmetros do modelo foram estimados usando o programa SAS® (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), método de ajuste não linear da Marquardt com um nível de significância de 5%. O desempenho do modelo foi avaliado através do cálculo do desvio relativo médio (ARD) de acordo com a Equação 17.

O modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) consiste em uma modificação do modelo matemático da lei de difusão de Fick no estado não-estacionário, aplicada a partículas com geometria esférica, suspensas em um meio homogêneo de concentração constante, sem restrição de volume. Nestas condições, o resultado da equação de Fick é dado pela Equação 21:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} A_n \exp(-B_n t) \quad (21)$$

onde t é o tempo de difusão, em segundos; M_t e M_∞ são as massas do composto de interesse (g de gordura/g de sólido desengordurado) que difundiram no tempo t e no tempo infinito, respectivamente.

Este modelo considera uma etapa inicial de lavagem (M_0) na qual o solvente remove rapidamente a gordura na superfície da partícula de forma não difusiva, sendo as condições para esta fase as seguintes:

$$t = 0 \quad M = 0 \quad (22)$$

$$t = t_0 \quad M = M_0 \quad (23)$$

$$t = t \quad M = M_t \quad (24)$$

$$t \rightarrow \infty \quad M = M_\infty \quad (25)$$

Assumindo estas condições, a Equação 21 pode ser reescrita como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty} \right) \sum_{n=1}^{\infty} A_n \exp[-B_n(t - t_0)] \quad (26)$$

Considerando um tempo suficientemente longo a Equação 26 pode ser simplificada para:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - A \exp[-B_1 t] \quad (27)$$

Sendo o termo pré-exponencial, A, dado pela Equação 28:

$$A = \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty} \right) A_1 \exp(B_1 t_0) \quad (28)$$

Apenas para partículas de geometria esférica, os parâmetros A_1 e B_1 podem ser calculados como:

$$A_1 = 6/\pi^2 \quad (29)$$

$$B_1 = D\pi^2/R^2 \quad (30)$$

Onde R é o raio médio da partícula esférica, em m, e D o coeficiente de difusão, em m²/s. Para esta equação os parâmetros ajustados foram A e B₁.

4.2.11 Análise estatística

Os valores médios dos resultados provenientes dos experimentos de extração foram comparados por análise de variância utilizando o teste de Duncan ao nível de significância de 5% (DUNCAN, 1955), com o auxílio do programa SAS® (Versão 9.3, SAS Institute Inc., EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das matérias-primas: casca da amêndoa de cacau seca e casca da amêndoa de cacau torrada

A Figura 8 apresenta a matéria-prima casca da amêndoa de cacau seca, cedida gentilmente pela empresa processadora de cacau A, antes e após a trituração. Inicialmente foram caracterizadas as cascas da amêndoa de cacau seca, cedida gentilmente pela empresa, e da amêndoa de cacau torrada, fornecida por outra empresa processadora (empresa B), sendo as matérias-primas visualmente semelhantes, mas conforme resultados apresentados na Seção 5.2, devido ao baixo teor de lipídios a casca da amêndoa de cacau torrada foi descartada. Dessa forma, a casca da amêndoa de cacau seca e triturada foi utilizada para a realização dos experimentos, inclusive os de extração sólido-líquido, descritos nesta tese de doutorado. Vale destacar que para a realização dos experimentos de extração foram utilizados lotes diferentes e/ou moagens diferentes de um mesmo lote, portanto os resultados apresentados nesta seção podem ser mostrados separadamente para cada lote ou então a média dos valores apresentados por eles, isso de acordo com a necessidade para discussão.

Figura 8. Casca da amêndoa de cacau seca (a) após descascamento (b) triturada.

Fonte: Própria autoria.

5.1.1 Composição química da casca da amêndoa de cacau

As composições químicas dos diferentes lotes das cascas de amêndoas de cacau torrada (CT) e seca (CS) podem ser observadas na Tabela 9. Na coluna da Tabela 9 nomeada como

“Lote T” são apresentados resultados de caracterização da matéria-prima casca da amêndoa de cacau torrada. Os demais lotes referem-se à caracterização da casca da amêndoa de cacau seca, sendo que na coluna “Lote 1” são apresentados resultados de caracterização da matéria-prima utilizada nas extrações com líquido pressurizado (PLE). Os dados apresentados na coluna nomeada como “Lote 2” são correspondentes ao lote de CS utilizado para o primeiro conjunto experimental de extrações a pressão atmosférica (ATME). Finalmente, na coluna nomeada como “Lote 3”, são apresentadas as características do material utilizado no segundo e no terceiro conjunto experimental de extrações ATME, que compreende a cinética de extração de lipídeos a pressão atmosférica e os experimentos para determinação do coeficiente de partição, respectivamente.

De maneira geral, os valores da umidade, teor de proteínas, cinzas e fibras das cascas de amêndoas de cacau torrada e seca estão de acordo com resultados encontrados na literatura, porém o teor de lipídeos continua sendo bastante superior aos relatados em trabalhos prévios (ARLORIO et al., 2001; LECUMBERRI et al., 2007; MARTÍN-CABREJAS et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2012). As quantidades de lipídeos determinadas para CS e CT diferiram bastante, sendo que essa diferença pode estar associada à eficiência do processo de descascamento aplicado pelas empresas fornecedoras destas matérias-primas e/ou à etapa do descascamento na qual foram coletadas, visto que as amostras podem ser retiradas logo após o descascamento ou após a passagem por peneiras, fato que altera a composição deste subproduto. Estas informações não foram fornecidas pela empresa B, a qual forneceu a casca da amêndoa de cacau torrada. Já a empresa A, fornecedora das cascas das amêndoas de cacau secas, informou que a coleta foi realizada logo após o descascamento, fato que pode estar associado à elevada quantidade de lipídeos observada para as cascas secas. Nesta etapa do processamento da amêndoa o resíduo é composto em sua maior parte por cascas, porém, possui também, em menor quantidade, gérmen e *nibs* que eventualmente podem ter ficado retidos na testa. Ambos, gérmen e *nibs*, podem ser os responsáveis pela elevação do teor de lipídeos, tornando o resíduo ainda mais rico em gordura.

Variações na composição química das cascas da amêndoa de cacau são comuns, assim como para todos os materiais vegetais. Estas diferenças são, possivelmente, decorrentes de variações climáticas regionais, tipos de solo em que os cacaueiros são cultivados, variabilidade genética dos cultivares, tempo de colheita, manejo e particularidades culturais da região produtora (KOBBLITZ, 2011). As mesmas variações podem impactar, em adição, nos teores dos demais compostos avaliados nesta tese.

Tabela 9. Composição química de diferentes lotes de casca da amêndoa de cacau. Lote T – Casca da amêndoa de cacau torrada. Lote 1 – CS empregada para PLE. Lote 2 – CS empregada para ATME. Lote 3 – CS empregada para cinética de extração de lipídeos por ATME e determinação do coeficiente de partição.

	Casca da amêndoa de cacau torrada (%)	Casca da amêndoa de cacau seca (%)		
	Lote T	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Umidade	5,0 ± 0,7	7,73 ± 0,09	9,6 ± 0,3	10,6 ± 0,2
Fibras solúveis ^a	44 ± 1	43 ± 1	39,4 ± 0,2	43,2 ± 0,4
Fibras insolúveis ^a	8 ± 1	8 ± 1	7,0 ± 0,3	7,70 ± 0,02
Lipídeos ^a	6,8 ± 0,5	21,5 ± 0,4	18,2 ± 0,6	21 ± 1
Proteínas ^{a,b}	17,3 ± 0,2	18,5 ± 0,7	17,0 ± 0,3	16,6 ± 0,5
Minerais ^a	9,19 ± 0,02	6,82 ± 0,06	6,30 ± 0,06	6,08 ± 0,02
Outros ^{a,c}	15 ± 3	3 ± 3	2 ± 3	5 ± 3
AGL ^d	13 ± 1	20,8 ± 0,5	27,5 ± 0,4	3,7 ± 0,1

^a em base seca

^b N x 6,25

^c carboidratos não fibrosos, calculados por diferença

^d teor determinado na gordura extraída por método Bligh e Dyer (1959)

Fonte: Própria autoria.

Os valores da acidez livre presente nas gorduras das matérias-primas dos Lotes 1 e 2 da Tabela 9 foram bastante superiores ao descrito por El-Saied et al. (1981), o qual foi 9,2%, já o valor apresentado pelo Lote T foi relativamente próximo. A elevada acidez na gordura da casca da amêndoa de cacau seca apresentada pelos Lotes 1 e 2 pode estar associada à hidrólise lipídica deste material, fenômeno influenciado por uma série de fatores, como a atividade de água (a_w) e a presença de lipoxigenases as quais têm sido descritas em diversos tecidos vegetais (ZHUANG; BARTH; HILDEBRAND, 2002). Estes fatores também justificariam o fato de a caracterização da gordura feita por El-Saied et al. (1981) e feita para o Lote T fornecer valor menor de acidez. Considerando que estes materiais tratavam-se de cascas das amêndoas de cacau torradas, tem-se que estes foram submetidos a elevada temperatura. Dessa forma, o processo de torra pode ter reduzido a atividade de água do material e, também, inativado parte das lipoxigenases presentes. A torrefação é um processo que ocorre a temperaturas entre 100-150 °C por no máximo duas horas (WOLLGAST; ANKLAM, 2000); já o processo de secagem ocorre em temperaturas mais brandas que variam entre 30-60 °C (EFRAIM et al., 2010). Desta forma, o processo de torrefação pode ter sido mais eficaz no sentido da inativação destas enzimas.

Não se pode descartar o fato de que o material avaliado é um resíduo industrial, sendo muito provavelmente armazenado em condições que podem favorecer a hidrólise lipídica. Objetivando reduzir a acidez livre na gordura da casca da amêndoa, ao solicitar envio de novo lote de casca da amêndoa de cacau à Empresa A, a doutoranda sugeriu ao fornecedor que a matéria-prima fosse coletada e refrigerada imediatamente após a remoção da casca na unidade industrial. O adequado acondicionamento da CS reduziu consideravelmente o teor de AGL na gordura deste novo lote enviado, como pode ser visto na coluna nomeada como Lote 3 da Tabela 9. Este procedimento fez com que este novo lote de matéria-prima apresentasse teor de acidez bastante inferior ao reportado por El-Saied et al. (1981) e ao apresentado para o Lote T e, também, muito menor do que os valores determinados para os lotes anteriores de CS (Lotes 1 e 2) utilizados neste trabalho. Esta alteração influenciou de forma extremamente positiva a composição da gordura presente na CS, tornando esta matéria-prima mais adequada para a extração de lipídeos e para sua utilização como ingrediente alimentício.

No que diz respeito às proteínas da casca da amêndoa de cacau, apenas Greenwood-Barton (1965) inferiu que 90 % do nitrogênio alfa-amino da casca da amêndoa de cacau está fortemente ligado aos polifenóis oxidados encontrados neste material, sendo estes convertidos em polifenoquinonas. Estes compostos combinam-se com a proteína através de ligações covalentes. Dessa forma, apenas cerca de 1% das proteínas na casca da amêndoa de cacau existiria no estado livre, sendo considerada uma matéria-prima pouco indicada para a produção de concentrados proteicos.

5.1.2 Composição em ácidos graxos

As composições em ácidos graxos das gorduras obtidas por meio de extração pelo método Bligh e Dyer (1959) para cascas da amêndoa de cacau referentes aos Lotes T, 1 e 2 são apresentadas na Tabela 10.

A partir dos dados apresentados na Tabela 10 verifica-se que o perfil de ácidos graxos foi semelhante ao descrito por El-Saied, Morsi e Amer (1981). Segundo estes dados, os ácidos graxos saturados presentes majoritariamente são o ácido palmítico e o ácido esteárico e os principais ácidos graxos insaturados são o ácido oleico e linoleico, sendo que estes dois últimos juntos representam aproximadamente de 50,7, 40,3 e 47,9 % da composição das gorduras da casca da amêndoa avaliadas nos Lotes T, 1 e 2, respectivamente. O perfil lipídico apresentou-se semelhante ao da manteiga de cacau (FIRESTONE, 2013) exceto quanto ao valor inferior de ácido esteárico apresentado pelos Lotes T e 2. Porém, pode-se inferir que o valor nutricional

da gordura da CS e da CT mostrou-se superior em consequência do elevado teor de ácido linoleico em comparação com a manteiga de cacau.

Os valores dos índices de iodo foram superiores ao descrito na literatura por Firestone (2013) para a manteiga de cacau e próximos ao apresentado por El-Saied et al (1981) para a casca da amêndoa de cacau. Entretanto, a gordura da CS Lote 1 apresentou índice de iodo dentro da faixa esperada para a manteiga de cacau (35 – 43), de acordo com a Resolução CNNPA número 12, da ANVISA (1978), que regulamenta padrões de identidade para manteiga de cacau. A relação Insaturados/Saturados foi baixa, o que é característico de gorduras.

Tabela 10. Composição em ácidos graxos da gordura da casca da amêndoa de cacau, extraída por Bligh e Dyer (1959) comparada a composição da manteiga de cacau (FIRESTONE, 2013).

Símbolo	Ácido Graxo	C x:y ^a	MM ^b (g.mol ⁻¹)	Gordura da casca de cacau torrada – Lote T		Gordura da casca de cacau seca – Lote 1		Gordura da casca de cacau seca – Lote 2		Manteiga de Cacau
				Mol (%)	Massa (%) ^c	Mol (%)	Massa (%) ^c	Mol (%)	Massa (%) ^c	Massa (%) ^d
M	Mirístico	C14:0	228,38	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0 – 0,2
P	Palmítico	C16:0	256,43	30,5 ± 0,1	28,5 ± 0,1	26,5 ± 0,4	24,6 ± 0,4	29 ± 1	27 ± 1	24 – 35,5
Po	Palmitoleico	C16:1	254,41	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0,0 – 0,3
	Margárico	C17:0	270,46	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0,1
S	Estearico	C18:0	284,49	20 ± 2	21 ± 2	31,8 ± 0,3	32,8 ± 0,3	23,0 ± 0,7	23,8 ± 0,8	31 – 38
O	Oléico	C18:1	282,47	36,6 ± 0,3	37,7 ± 0,3	33,6 ± 0,2	34,3 ± 0,2	35 ± 2	36 ± 2	31 – 35,3
Li	Linoleico	C18:2	280,45	12 ± 2	13 ± 3	5,9 ± 0,5	6,0 ± 0,6	11,70 ± 0,02	11,93 ± 0,04	1,4 – 4,2
Ln	Linolênico	C18:3	278,44	n.i.	n.i.	0,34 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,1
Ar	Araquídico	C20:0	278,44	n.i.	n.i.	1,26 ± 0,09	1,27 ± 0,09	0,93 ± 0,07	0,94 ± 0,07	0 – 1,1
Massa molar média (g.mol ⁻¹)				275,7 ± 0,1		277,7 ± 0,1		276,1 ± 0,3		n.d.
Índice de iodo				56 ± 4		42 ± 1		54 ± 1		32 – 42
Razão Insaturados/Saturados				1,1 ± 0,1		0,71 ± 0,02		0,97 ± 0,08		n.d.

n.i. = não identificado

n.d. = não descrito pelo autor

^a Cx:y, x = número de carbonos e y = número de duplas ligações.

^b Massa molar.

^c Gordura extraída da casca da amêndoa de cacau pela metodologia de Bligh e Dyer (1959).

^d Firestone (2013)

Fonte: Própria autoria e Firestone (2013)

5.1.3 Determinação do teor de tocoferóis

A determinação do teor de tocoferóis na matéria-prima foi realizada na gordura da CS obtido por meio de extração pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959) a partir das cascas provenientes do Lote 1 e do Lote 2, conforme descrito na Seção 4.2.1.4. Para isso, primeiramente foi necessária a determinação experimental das curvas de calibração utilizando-se os padrões de tocoferóis α , γ e δ , conforme mostrado na Figura 9, 10 e 11, respectivamente.

Figura 9. Curva de calibração em HPLC para α -tocoferol em 2-propanol.

Fonte: Própria autoria.

Figura 10. Curva de calibração em HPLC para δ -tocoferol em 2-propanol.

Fonte: Própria autoria.

Figura 11. Curva de calibração em HPLC para γ -tocoferol em 2-propanol.

Fonte: Própria autoria.

Os pontos experimentais mostrados nas Figuras 9, 10 e 11 foram submetidos à regressão linear sendo obtidos os coeficientes de correlação (R^2) iguais a 0,99913, 0,99655 e 0,99697 para as curvas padrão dos isômeros α , δ e γ , respectivamente. As relações lineares obtidas para as áreas dos picos em função das concentrações estão representadas pelas Equações 31, 32 e 33.

$$\text{Área dos picos} = 1.061.770 \times \text{Teor (mg de } \alpha \text{ – tocoferol/mL de solução padrão)} \quad (31)$$

$$\text{Área dos picos} = 2.287.240 \times \text{Teor (mg de } \delta \text{ – tocoferol/mL de solução padrão)} \quad (32)$$

$$\text{Área dos picos} = 2.656.260 \times \text{Teor (mg de } \gamma \text{ – tocoferol/mL de solução padrão)} \quad (33)$$

Os resultados dos teores de tocoferóis nas gorduras podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Teor de tocoferóis nas gorduras das cascas das amêndoas de cacau secas.

ISÔMEROS	LOTE 1	LOTE 2
	mg de tocoferol/ kg de gordura da CS	
α-Tocoferol	363 $\pm$ 23	402 $\pm$ 12
δ-Tocoferol	52 $\pm$ 4	119 $\pm$ 1
(γ+β)-Tocoferol	600 $\pm$ 18	752 $\pm$ 16
Tocoferóis totais	1016 $\pm$ 25	1273 $\pm$ 29

Fonte: Própria autoria.

Os tocoferóis são precursores de vitamina E e exercem a mesma atividade contra radicais e contra peroxidação lipídica, em solução e em membranas lipossomais, desta forma, são reconhecidos por sua função como antioxidantes em sistemas lipídicos vegetais, aumentando sua estabilidade (GOFFMAN; BÖHME, 2001).

O conteúdo de tocoferóis na gordura proveniente da casca da amêndoa de cacau não foi reportado na literatura anteriormente, mas os valores encontrados neste trabalho, apresentados na Tabela 11, podem ser considerados bastante altos, principalmente se comparados com os

teores destes mesmos compostos reportados para a manteiga de cacau. O teor de tocoferóis na manteiga de cacau fica em torno de 25-300 mg/kg, sendo os isômeros γ -tocoferol e δ -tocoferol os que aparecem em maior (18-196 mg/kg) e menor (0-17 mg/kg) quantidade, respectivamente (CREWS, 2002; FIRESTONE, 2013). Pode-se inferir, desta forma, que a presença de tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau apresenta o perfil semelhante ao da manteiga de cacau, visto que os tocoferóis encontrados em maior e menor teor foram também os isômeros gama e delta, respectivamente. Crews (2002) cita em seu trabalho que o teor de tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau é bastante elevado, dessa forma, quando a manteiga de cacau apresenta altos níveis destes compostos, considera-se que ela esteja adulterada com gordura proveniente da casca. Assim, para que essa contaminação não ocorra, estipula-se que a presença de casca nos grãos a serem moídos para originarem a manteiga seja inferior a 1%. O trabalho descrito por Crews (2002) foi o único encontrado na literatura que dá um indicativo de que o teor de tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau poderia ser elevado, o que está de acordo com os teores encontrados neste trabalho.

5.1.4 Determinação do teor de micotoxinas

Os resultados obtidos para a determinação do teor de micotoxinas nas cascas das amêndoas de cacau seca estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Determinação dos teores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A na casca da amêndoa de cacau seca

	µg de micotoxina/kg de CS	Técnica de análise	LQ^a (µg/kg)	CR^b (%)
Aflatoxina B1	1,0 ± 0,05	LC-MS/MS	1	94,5
Aflatoxina B2	< LQ	LC-MS/MS	1	80,0
Aflatoxina G1	< LQ	LC-MS/MS	1	88,5
Aflatoxina G2	< LQ	LC-MS/MS	1	88,1
Ocratoxina A	< LQ	HPLC	2	80,0

^a Limite de quantificação

^b Coeficiente de recuperação

Fonte: Própria autoria.

Ao contrário do reportado por Copetti et al. (2014), as cascas das amêndoas de cacau seca não apresentaram contaminação significativa por micotoxinas do tipo aflatoxina B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A.

Os limites regulamentares para a ocratoxina A e/ou aflatoxinas em grãos de cacau e produtos derivados do cacau foram estabelecidos por poucos países. Especialistas da União Europeia recomendaram a determinação de um limite máximo para a ocratoxina A de 1 µg/kg no chocolate, chocolate em pó e bebidas à base de chocolate e 2 µg/kg nos grãos de cacau, nibs de cacau, massa de cacau, torta de cacau e cacau em pó (TAFURI; FERRACANE; RITIENI, 2004). No entanto, a Comissão Europeia tem descartado a necessidade de estabelecimento de um limite máximo para esta micotoxina nestes produtos.

No Brasil, considerando o consumo significativo de produtos derivados do cacau por crianças e devido aos resultados publicados Copetti et al. (2010, 2011), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites de 10 µg/kg em amêndoas de cacau e de 5 µg/kg para produtos derivados de cacau vendidos no Brasil, tanto para a ocratoxina A quanto para o total de aflatoxinas (ANVISA, 2011). Dessa forma, de acordo com os teores de aflatoxinas e ocratoxina reportados na Tabela 12, o uso desta matéria-prima como matriz alimentícia não forneceria risco de intoxicação alimentar por micotoxinas.

5.1.5 Determinação do teor de cádmio

Amostras de casca da amêndoa de cacau do Lote 1 foram submetidas a análise do teor de cádmio, não sendo detectada contaminação desta matéria-prima por este metal (< LQ sendo LQ de 0,1 mg/kg).

O cádmio é um dos metais pesados mais frequentemente encontrados em produtos derivados do cacau. Os metais pesados representam uma ameaça séria a saúde humana, por isso precisam ser investigados.

No ano 2000, a Comissão Reguladora Europeia propôs que o valor máximo permitido de cádmio em chocolate deveria ser de 0,8 mg / kg. Esse valor representa um problema para parte do cacau latino-americano, visto que vários países da América Latina, particularmente a Colômbia, apresentam contaminação do cacau com metais pesados (PÉREZ et al., 2015).

Sabe-se que o teor de cádmio no cacau está diretamente relacionado com a presença deste metal no solo de cultivo (FOWLER, 2009). Alguns solos, especialmente os vulcânicos, podem conter altos níveis de cádmio, e se este metal estiver na forma “disponível”, ele pode ser absorvido pela planta e se concentrar nas sementes (FOWLER, 2009). Dessa forma, a não contaminação da amostra por cádmio provavelmente deve estar relacionada com a ausência deste metal em seu solo de cultivo.

5.1.6 Determinação do índice de solubilidade de nitrogênio

Na Tabela 13 é apresentada a análise estatística, realizada a partir do Teste de Duncan ao nível de 95% de confiança, para os valores de índice de solubilidade de nitrogênio para a casca da amêndoa de cacau seca (Lote 1 e Lote 3), em função de cada pH avaliado. A partir desses valores, construiu-se uma curva de solubilidade das proteínas, expressa como índice de solubilidade de nitrogênio, em função do pH para este material, a qual está apresentada na Figura 12.

Pode-se observar que a curva de solubilidade apresenta um valor mínimo para o pH 4,0. A partir do pH 7,0 observa-se aumento da solubilidade até o pH 11,0, valor de pH a partir do qual é estabelecido o valor máximo de solubilidade. Para o valor de pH ácido igual a 1 a solubilidade é intermediária e para o pH 2, verifica-se um índice de solubilidade bem próximo aos valores determinados para os pHs 7 e 9, sendo esses três pontos considerados estatisticamente iguais, conforme Tabela 13.

Tabela 13. Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) para a casca da amêndoa de cacau seca, para os diferentes valores de pH avaliados.

pH	ISN (%)
1	22,84 ± 0,07 B
2	17,5 ± 0,5 C
4	11,0 ± 0,1 E
4,5	13,2 ± 0,8 D
5	13,3 ± 0,5 D
7	16 ± 1 C
9	17 ± 2 C
11	52 ± 0,3 A
13	51,6 ± 0,6 A

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Figura 12. Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) em função do pH para a casca da amêndoa de cacau seca.

Fonte: própria autoria.

O comportamento observado é semelhante ao apresentados para as proteínas de castanha de caju (*Anacardium occidentale*) e macadâmia, sendo que para estas valores menores de solubilidade são observados próximo ao pH 4 e valores maiores em pHs básicos (NAVARRO; RODRIGUES, 2018; OLALEKAN et al., 2009). Zayas (1997) sugere que a solubilidade das proteínas é influenciada pela temperatura, composição e sequência de aminoácidos, massa molar e conformação e conteúdo de grupos polares e apolares nos aminoácidos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o índice de solubilidade proteica na casca da amêndoa de cacau; apenas Bertazzo et al. (2011) tentaram solubilizar as proteínas da casca da amêndoa de cacau em água e analisar realizar análise MALDI, entretanto não obtiveram resultados notáveis devido a baixa solubilidade das proteínas da matéria-prima avaliada na água. Porém, Abecia-Soria, Pezoá-Garcia e Amaya-Farfan (2006) estudaram o perfil de solubilidade de proteínas de amêndoas de cacau fermentada em diferentes pHs. Neste estudo foi observado que as proteínas deste material apresentaram menor solubilidade na faixa de pH entre 3,5-5,5, ficando este valor um pouco abaixo de 10 %. Valores máximos de solubilidade proteica foram observados para os pHs mais ácidos e mais básicos avaliados, sendo eles 2,5 e 7,5, respectivamente, sendo que nestes valores de pH a solubilidade observada ficou em torno de 75%. O perfil da curva de solubilidade descrito por estes autores foi semelhante ao observado na Figura 12, sendo que a elevada solubilidade em pHs básicos também foi observada para a casca de cacau, no pH ácido a solubilidade não foi tão elevada, porém foi bem superior ao valor de mínima solubilidade observado no pH 4.

No que diz respeito às proteínas da casca da amêndoa de cacau, Greenwood-Barton (1965) sugere que 90 % do nitrogênio alfa-amino da casca da amêndoa de cacau está fortemente ligado aos polifenóis oxidados encontrados neste material, sendo estes convertidos em polifenoquinonas. Estes compostos combinam-se com a proteína através de ligações covalentes, dessa forma, apenas cerca de 1% das proteínas na casca da amêndoa de cacau existiria no estado livre, sendo considerada uma matéria-prima pouco indicada para a produção de concentrados proteicos.

Bonvehôa e Coll (1999), estudando as proteínas e aminoácidos da casca da amêndoa de cacau, identificou que as proteínas que se encontram em maior proporção nesta matéria-prima são as albuminas e globulinas (~79 %), seguida pelas glutelinas (~18%) e pelas prolaminas (< 3%). Sathe et al. (2009) afirmaram que as globulinas e as albuminas representam também a maior fração das proteínas presentes na macadâmia, assim como na castanha de caju, que apresenta como principais proteínas as albuminas e globulinas seguidas pelas glutelinas (SATHE, 1994). Pode-se

inferir dessa forma que o perfil do índice de solubilidade de nitrogênio em função do pH está diretamente relacionado com os tipos de proteínas presentes no material avaliado.

5.1.7 Determinação da distribuição granulométrica e do tamanho médio das partículas da casca da amêndoa de cacau

Na determinação da distribuição granulométrica e tamanho médio de partículas a amostra avaliada foi a casca da amêndoa de cacau triturada do Lote 1. A determinação da distribuição granulométrica e do tamanho médio das partículas foi realizada através da utilização de peneiras Tyler, sendo que o produto de fundo desta primeira análise foi avaliado por difração a laser de forma complementar os resultados. O primeiro método analisa de uma forma geral a matéria-prima, de 297 a 1680 μm de tamanho de partícula, enquanto que o equipamento por difração a laser, disponível no Laboratório de Processos de Engenharia de Alimentos do ZEA/ FZEA/ USP, possibilita a determinação do tamanho de partículas menores, na faixa de 0,25 a 350 μm .

A distribuição dos tamanhos de partícula da casca da amêndoa de cacau seca triturada está apresentada na Figura 13, através da qual se pode observar que a maior porcentagem das partículas possui tamanho na faixa de 0 a 297 μm , totalizando aproximadamente 41,5 % do total em massa. Deste modo, realizou-se a análise desta fração por difração a laser com o objetivo de averiguar a distribuição granulométrica das partículas com tamanho inferior a 297 μm . Entretanto, ao realizar a análise foram obtidos dois perfis distintos para este material, os quais podem ser observados na Figura 14.

Figura 13. Distribuição granulométrica da casca da amêndoa de cacau triturada por peneiras Tyler.

Fonte: própria autoria.

Figura 14. Distribuição granulométrica por difração a laser da casca da amêndoa de cacau seca obtida como produto de fundo das peneiras Tyler.

(a)

(b)

Fonte: própria autoria.

Embora a análise tenha sido repetida várias vezes a metade delas demonstrou-se como a Figura 14 (a), na qual a maior parte das partículas apresenta tamanho entre 6 e 10 μm , e a outra metade como a Figura 14 (b), onde a maioria das partículas apresenta tamanhos entre 60 e 150 μm , não sendo possível fazer uma leitura em que ambos os perfis estivessem demonstrados. Dessa forma optou-se por considerar que do material obtido no fundo 50% apresentava distribuição granulométrica como a Figura 14 (a) e os outros 50% como a Figura 14 (b).

Com os dados apresentados na Tabela 14 e a Equação 3 foi possível calcular o diâmetro médio das partículas que ficaram retidas nas peneiras Tyler, sendo $dm_{ty} = 684 \pm 19 \mu\text{m}$.

Tabela 14. Distribuição granulométrica da casca da amêndoa de cacau seca triturada.

Mesh	Massa retida em cada peneira (g)	d_i^* (mm)	d_{i+1}^* (mm)
8	0,00	2,280	
10	$1,8 \pm 0,2$	1,680	2,280
14	$6,88 \pm 0,08$	1,190	1,680
20	25 ± 3	0,841	1,190
28	21 ± 2	0,595	0,841
35	$12,76 \pm 0,05$	0,420	0,595
48	20 ± 1	0,297	0,420
Fundo	$63,1 \pm 0,9$		

* d_i e d_{i+1} correspondem às aberturas das peneiras

Fonte: própria autoria

Para os perfis granulométricos do material retido no fundo das peneiras apresentados na Figura 14, os valores de dm_{dl} foram de $7,63 \pm 0,01$ e $90 \pm 2 \mu\text{m}$, para a Figura 14 (a) e 14 (b), respectivamente.

Realizando-se uma média ponderada simples dos diâmetros médios apresentados, incluindo o obtido para as peneiras Tyler e os fornecidos pela difração a laser chega-se ao valor do diâmetro médio das partículas presentes na amostra (dm_p), sendo este igual a $420 \pm 11 \mu\text{m}$.

5.1.8 Densidade real das partículas da casca da amêndoa de cacau triturada

A análise por picnometria de gás hélio foi realizada na Central Analítica, no Instituto de Química da UNICAMP, e determinou valor de densidade real, de uma média de dez determinações, para a casca da amêndoa de cacau seca, de $1320 \pm 10 \text{ kg/m}^3$.

5.1.9 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada para as cascas da amêndoa de cacau provenientes dos Lotes 1, 2 e 3 conforme descrito na Seção 4.2.1.11. Esta análise foi realizada através de espectrofotometria na região do visível, para qual foi necessária inicialmente a obtenção de uma curva de calibração utilizando padrão ácido gálico, conforme mostrado na Figura 15. Vale ressaltar que esta curva foi repetida periodicamente, no entanto não houve variação significativa entre as diversas curvas determinadas.

Figura 15. Curva de calibração para ácido gálico em água no comprimento de onda de 760 nm.

Fonte: própria autoria.

Os pontos experimentais mostrados na Figura 15 foram submetidos a regressão linear sendo obtido um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9983. A relação linear obtida para a absorvância em função do conteúdo na amostra diluída está representada pela Equação 34.

$$\text{Absorvância} = 11,22 \times \text{Teor (mg/g)} \quad (34)$$

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado para as cascas da amêndoa de cacau seca dos Lotes 1, 2 e 3, sendo os valores obtidos de $67,7 \pm 0,7$, 45 ± 1 e $20,4 \pm 0,3$ mg/g de CS, respectivamente. Estes valores se mostraram coerentes, pois foram superiores aos teores determinados para flavanóis totais (Seção 5.1.10), e são próximos ao reportado na literatura por Lecumberri et al. (2007), (58 ± 3 mg/g). A variação nos teores de compostos fenólicos dos diferentes lotes pode estar associada a fatores como clima, solo, tipo de processamento da amêndoa, etc.

5.1.10 Determinação do teor de flavanóis totais

A determinação do teor de flavanóis totais foi realizada para as cascas da amêndoa de cacau provenientes dos Lotes 1, 2 e 3 conforme descrito na Seção 4.2.1.12. Esta análise foi realizada através de espectrofotometria na região do visível, para qual foi necessária inicialmente a obtenção de uma curva de calibração utilizando padrão epicatequina, conforme mostrado na Figura 16. Vale ressaltar que esta curva foi repetida periodicamente, no entanto, não houve variação significativa entre as diferentes curvas.

Os pontos experimentais mostrados na Figura 15 foram submetidos à regressão linear sendo obtido um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9989. A relação linear obtida para a absorvância em função do teor está representada pela Equação 35.

$$\text{Absorvância} = 62,265 \times \text{Teor (mg/g)} \quad (35)$$

O teor de flavanóis totais na matéria-prima foi determinado semanalmente, antes dos processos de extração, para permitir uma melhor precisão no cálculo do rendimento referente a estes compostos. Os teores determinados foram de $10,0 \pm 0,3$, $9,8 \pm 0,1$ e $4,24 \pm 0,01$ mg equivalente de epicatequina/g de casca, para os Lotes 1, 2 e 3, respectivamente. Não foram encontrados trabalhos que tenham quantificado o teor de flavanóis totais na casca da amêndoa de cacau seca. A presença de procianidinas e a ausência de catequinas, as quais fazem parte do

grupo dos flavanóis, foram descritas qualitativamente na casca da amêndoa de cacau torrada por Pérez et al. (2015), mas não são encontrados na literatura trabalhos que avaliaram quantitativamente estes compostos fenólicos nesta matéria-prima.

Figura 16. Curva de calibração para (-)- epicatequina em etanol absoluto no comprimento de onda de 640 nm.

Fonte: própria autoria.

5.1.11 Determinação do teor de procianidinas totais – método por hidrólise ácida e formação de cor

Para determinação do teor de procianidinas na casca da amêndoa de cacau seca (Lote 1) optou-se pela utilização da metodologia por hidrólise ácida, pois esta permite verificar não apenas as procianidinas extraídas pela solução de metanol (procianidinas solúveis) mas também a avaliação direta da amostra bruta (procianidinas totais), como já descrito por Porter et al. (1985). Assim, a utilização deste método seria um modo de reduzir erros causados pela insolubilização dos taninos de alta massa molar. Para determinação do teor destes compostos através de espectrofotometria na região do visível, obteve-se experimentalmente uma curva de calibração utilizando padrão tanino quebracho, sintetizado em laboratório, conforme mostrado na Figura 17.

Figura 17. Curva de calibração para tanino quebracho no comprimento de onda de 540 nm.

Fonte: própria autoria.

Os pontos experimentais mostrados na Figura 17 foram submetidos a regressão linear sendo obtido um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9974. A relação linear obtida para a absorbância em função do conteúdo está representada pela Equação 36.

$$\text{Absorbância} = 0,6062 \times \text{Teor}(\text{mg/g}) \quad (36)$$

Os teores de procianidinas solúveis e totais obtidos pelo método de hidrólise ácida foram de 125 ± 3 e 226 ± 7 mg/g de casca, respectivamente. Utilizando a mesma metodologia para a determinação das procianidinas totais, Pugliese (2010) encontrou valores de 109 ± 4 e 499 ± 16 mg/g de amostra, respectivamente, avaliando a polpa do cacau e a semente de cacau. Dessa forma, têm-se que os resultados obtidos foram coerentes com os encontrados por este autor, entretanto foram bastante superiores aos obtidos pela metodologia proposta por Payne et al. (2010) para flavanóis totais e pela análise em UPLC que será posteriormente discutida. Se o valor elevado obtido tivesse sido notado apenas na quantificação dos taninos totais, poderia se justificar que muitos taninos, entre eles as procianidinas, estariam ainda retidos na matriz e não teriam sido extraídos. Entretanto, na avaliação das procianidinas solúveis o valor também foi bastante superior ao determinado pela metodologia de Payne et al. (2010) e pela análise em

UPLC (Seção 5.1.12), indicando que a diferença está associada principalmente ao método empregado.

A quantificação do teor de taninos pela metodologia utilizando o butanol acidificado avalia a antocianidina, percebida pela coloração avermelhada, formada a partir da quebra das procianidinas presentes no analito, seja ele moído ou seu extrato. Esta reação ocorre por auto-oxidação, seguida de clivagem das ligações interflavonóide catalisada por ácido. A produção de antocianidina é grandemente afetada por traços de metais de transição, sendo os sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} os melhores catalisadores. Estes íons metálicos aceleram a reação através da formação de radicais livres, normalmente via espécies de peróxido, tanto por etapas de oxidação como de redução (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1985). Já a reação de condensação de DMAC com flavanóis demonstrou ser bastante específica, entretanto no trabalho de Payne et al. (2010) os autores testam a absorbância da reação com DMAC apenas para compostos disponíveis comercialmente, sendo que para as procianidinas são avaliados apenas dímeros, trímeros e tetrâmeros, uma vez que oligômeros maiores não estão disponíveis comercialmente. Dessa forma, não é conhecido o comportamento desta metodologia na avaliação de procianidinas de cadeia mais longa. Assim, pode-se inferir que a presença em quantidade significativa destes oligômeros pode estar provocando a grande diferença na quantificação das procianidinas e dos flavanóis totais entre as duas metodologias.

5.1.12 Determinação do teor de alcaloides e flavanóis por UPLC – MS/MS

Os CSPE liofilizados, oriundos das matérias-primas dos Lotes 1, 2 e 3, obtidos como descrito na Seção 4.2.1.10 foram analisados por UPLC – MS/MS para determinação do teor de flavanóis (catequina, epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína). As estruturas químicas dos compostos analisados podem ser observadas na Figura 18.

Os teores de flavanóis e metilxantinas já havia sido reportado na literatura (KOTHE; ZIMMERMANN; GALENSA, 2013; ORTEGA et al., 2008, 2010), mas apenas para as amêndoas de cacau e alguns derivados, os quais não incluíam a casca da amêndoa. Dessa forma, o método cromatográfico adaptado de Ortega et al. (2010) para identificar e quantificar estes compostos na casca da amêndoa de cacau foi aplicado como previamente descrito na Seção 4.2.1.14, sendo que os parâmetros instrumentais para a quantificação de cada composto podem ser observados na Tabela 15.

Figura 18. Estrutura química da (-)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina-B2, teobromina e cafeína.

Fonte: Sigma-Aldrich (2017).

Tabela 15. Parâmetros instrumentais do método UPLC-MS/MS para cada composto quantificado.

Padrão	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion produzido (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Tempo de retenção (min)
(-)-catequina	289,2	203,1	76	18	2,87
(-)-epicatequina	289,2	203,1	76	20	3,27
Procianidina-B2	577,4	407,1	2	22	2,81
Teobromina	181,1	163,1	45	15	2,65
Cafeína	195,1	137,8	45	20	3,28

Fonte: própria autoria.

Para esta análise foi necessária inicialmente a obtenção de curvas de calibração para cada composto avaliado, estas foram repetidas periodicamente, sempre que uma nova análise era realizada. Os pontos experimentais das curvas foram submetidos à regressão linear; as relações lineares para cada composto, obtidas para as respostas em função das concentrações do padrão nas soluções diluídas, estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Curvas de calibração dos compostos (-)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina-B2, teobromina e cafeína obtida por UPLC-MS/MS.

Padrão	Curva de calibração*	R²
(-)-catequina	Resposta = 198,935 x + 350,243	0,9973
(-)-epicatequina	Resposta = 225,341 x + 107,700	0,9982
Procianidina-B2	Resposta = 512,768 x - 880,341	0,9952
Teobromina	Resposta = 1.045,64 x + 9.316,23	0,9983
Cafeína	Resposta = 6.290,2 x + 22.507,4	0,9955

*x é a concentração do padrão na solução dada em ng/mL

Fonte: própria autoria.

Com a análise em UPLC - MS/MS foi possível quantificar o teor de alguns flavanóis e alcaloides presentes no CSPE liofilizado e, a partir dos valores obtidos, foi possível determinar o teor de cada composto na casca da amêndoa de cacau para cada lote avaliado. Estes resultados podem ser observados na Tabela 17.

Em geral, os resultados relativos à cafeína e à catequina estão de acordo com os reportados na literatura para derivados do cacau (KOTHE; ZIMMERMANN; GALENSA, 2013; ORTEGA et al., 2008, 2010). O teor de teobromina determinado é menor do que o observado por Abiola e Tewe (1991) para a casca da amêndoa de cacau, no entanto é maior do que o relatado para os demais derivados de cacau (KOTHE; ZIMMERMANN; GALENSA, 2013; ORTEGA et al., 2008, 2010). O alto teor de teobromina observado é esperado, visto que durante o processamento dos grãos de cacau, as metilxantinas migram da amêndoa para a casca, provocando um aumento do teor deste composto na casca (TIMBIE; SECHRIST; KEENEY, 1978).

Tabela 17. Quantificação por UPLC-MS/MS de flavanóis (catequina, epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) no CSPE liofilizado e na casca da amêndoa de cacau.

Composto	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	CSPE liofilizado	CS	CSPE liofilizado	CS	CSPE liofilizado	CS
<i>Flavanóis</i>	mg de flavanóis por grama		mg de flavanóis por grama		mg de flavanóis por grama	
Catequina	0,99 ± 0,02	0,178 ± 0,003	1,632 ± 0,007	0,28 ± 0,001	0,85 ± 0,06	0,15 ± 0,01
Epicatequina	19,5 ± 0,8	3,5 ± 0,1	18 ± 1	3,02 ± 0,02	14 ± 1	2,5 ± 0,2
Procianidina B2	7,7 ± 0,3	1,38 ± 0,06	8,21 ± 0,03	1,411 ± 0,005	5,9 ± 0,2	1,06 ± 0,04
<i>Alcaloides</i>	mg de alcaloides por grama		mg de alcaloides por grama		mg de flavanóis por grama	
Teobromina	54,8 ± 0,5	9,89 ± 0,09	99 ± 1	17,0 ± 0,2	44,9 ± 0,5	8,11 ± 0,09
Cafeína	7,99 ± 0,08	1,44 ± 0,01	10,3 ± 0,1	1,77 ± 0,02	5,6 ± 0,5	1,01 ± 0,09

O teor de epicatequina foi bastante superior ao relatado para diferentes derivados do cacau (ORTEGA et al., 2008, 2010), por outro lado, o teor de procianidina B2 foi consideravelmente menor. No entanto, ambos os valores estão de acordo com o relatado para amêndoas de cacau não fermentadas descrito por Kothe et al. (2013). A relação epicatequina/procianidina B2 observada para a casca de cacau seca foi de aproximadamente 2,5, a mesma relação apresentada por Kothe et al. (2013). Por outro lado, as relações apresentadas por Ortega et al. (2008) e Ortega et al. (2010) ficaram entre 0,22 e 0,47. Assim, pode-se sugerir duas hipóteses para a ocorrência de variações tão grandes nos níveis de epicatequina e procianidina B2 presentes na CS em relação aos diferentes tipos de derivados do cacau. A primeira hipótese seria que as diferenças no conteúdo desses compostos poderiam estar associadas a variações na composição química devido a diferenças climáticas regionais, tipos de solo em que são cultivados os cacaueiros, variabilidade genética dos cultivares, tempo de colheita, manejo e características específicas da cultura, região produtora, entre outros fatores (KOBELITZ, 2011). E a segunda hipótese estaria relacionada ao fato de que parte dos compostos fenólicos presentes nos cotilédones pode migrar para a casca, gerando um material enriquecido nestes biocompostos (FORSYTH; QUESNEL; ROBERTS, 1958). Como as epicatequinas são moléculas menores do que as procianidinas B2, sua transferência para a casca se daria de forma mais fácil, fato que enriqueceria a CS com epicatequina e empobreceria o cotilédone, enquanto as procianidinas permaneceriam mais concentradas nos *nibs*.

Somando os teores de catequina, epicatequina e procianidina B2 determinados pela análise UPLC-MS/MS (Tabela 17), o teor total de flavanóis determinados foi de $5,1 \pm 0,1$, $4,71 \pm 0,03$, $3,7 \pm 0,2$ mg/g CS para os Lotes, 1, 2 e 3, respectivamente. Esse teor é inferior ao valor fornecido pela análise espectrofotométrica de flavanóis totais (Seção 5.1.10). Este resultado é esperado, uma vez que outros flavanóis não foram determinados pela análise UPLC, assim como também não foram determinados outros dímeros, trímeros e oligômeros de procianidinas, bem como galato de epigallocatequina e epicatequina-3-galato, compostos que também absorvem luz na reação com DMAC.

5.1.13 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do CSPE liofilizado foi realizada para o Lote 1 de CS por dois métodos diferentes, o ensaio de redução férrica/poder antioxidante (FRAP) e o ensaio de eliminação de radicais livres DPPH, sendo que os resultados obtidos foram $186,4 \pm 0,1$ e 379 ± 8 mg eq. Trolox / g CS, respectivamente. A avaliação da atividade antioxidante pode exigir

uma combinação de diferentes métodos, pois existem diferenças substanciais entre os vários tipos descritos na literatura. De fato, mesmo quando se usa o mesmo método, em análises realizadas em diferentes laboratórios, é possível observar diferenças significativas nos resultados, o que torna a comparação entre eles muito difícil (VIUDA-MARTOS et al., 2010).

Os resultados observados para ambas as análises foram superiores aos descritos por Martínez et al. (2012) para os métodos DPPH e FRAP e por Lecumberri et al. (2007) para o método FRAP. Entretanto, os valores foram menores do que os descritos por Gültekin-Özgüven, Berktaş e Özçelik (2016) na avaliação de alguns derivados de cacau (amêndoas não torradas, amêndoas torradas, licor de cacau natural, licor de cacau alcalinizado e pó de cacau).

Desta forma, pode-se inferir que os extratos provenientes da casca de cacau possuem capacidade antioxidante. A atividade antioxidante dos subprodutos do cacau pode ser atribuída aos compostos fenólicos, principalmente flavanóis, como os monômeros catequina e epicatequina, e o dímero procianidina B2 (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005).

5.1.14 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para avaliar a estabilidade térmica de alguns compostos presentes na matéria-prima bem como do CSPE liofilizado (Lote 1). A Figura 19 apresenta a perda de massa (TG) e perda de massa diferencial (DTG) dos padrões, catequina, epicatequina, procianidina B2, cafeína e teobromina e do CSPE liofilizado.

Dentre os flavanóis avaliados, o que apresentou maior estabilidade térmica foi a epicatequina (Figura 19c), a qual permaneceu estável até aproximadamente 230 °C. A catequina e a procianidina B2 (Figura 19b e 19d, respectivamente) apresentaram perda de massa a partir de 60 e 50 °C, respectivamente, indicando que estes compostos degradam nas temperaturas de extração empregadas nesta tese de doutorado, conforme apresentado nas Seções 4.2.2 e 4.2.3. Resultados semelhantes de TGA para epicatequina e catequina foram observados por Gujar et al. (2010). Temperaturas de degradação da cafeína e da teobromina (Figura 19e e 19f, respectivamente) foram observadas a 275 e 325 °C, respectivamente, o que está de acordo com o reportado por Wesolowski and Szykaruk (2008) para estes mesmos compostos.

Figura 19. Curvas TG/DTG da decomposição térmica sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$: (a) CSPE liofilizado, (b) catequina, (c) epicatequina, (d) procianidina B2, (e) cafeína e (f) teobromina.

Fonte: própria autoria.

Ao avaliar a degradação térmica do CSPE liofilizado, percebe-se que esta ocorre em 5 estágios. O primeiro estágio de degradação térmica inclui a faixa de temperatura de 50-110 °C; as perdas de massa observadas nesta faixa podem ser decorrentes da perda de umidade e também da degradação de alguns flavanóis, como catequinas e procianidinas, que mostraram se degradar nessa faixa de temperatura. Os três estágios seguintes foram notados nos picos de 150, 175 e 200 °C, estes coincidem apenas com os apresentados pela procianidina B2, mas também podem estar associados a outros compostos não avaliados neste trabalho. Finalmente, o último estágio de degradação térmica inclui o intervalo de 250-325 °C; nessa faixa de temperatura todos os compostos avaliados apresentaram picos de perda de massa, principalmente os alcaloides.

5.2 Experimentos de cinética de extração sólido-líquido com líquido pressurizado (PLE) utilizando etanol absoluto

Para o estudo da cinética de extração por PLE de lipídeos e flavanóis totais a casca da amêndoa de cacau seca (Lote 1) foi submetida à extração utilizando como solvente etanol em grau absoluto. Os parâmetros fixos de processo foram: pressão de 10,35 MPa, relação mássica sólido:solvente de 1:3, volume “rinse” igual a 0 % e ciclo estático igual a 1. As variáveis avaliadas foram o tempo estático e temperatura (60, 75 e 90 °C). Nesta etapa do trabalho foram realizados 66 experimentos, sendo que cada condição experimental foi repetida ao menos duas vezes. Os valores dos desvios relativos (δ), calculados de acordo com a Equação 7, variaram de 0,14% a 0,48%, indicando boa precisão e repetibilidade dos resultados experimentais.

5.2.1 Cinética de extração de lipídeos por PLE utilizando etanol absoluto

A Figura 20 apresenta a cinética de extração de lipídeos por PLE da casca da amêndoa de cacau seca (Lote 1) empregando etanol absoluto como solvente. Nesta figura pode ser observado, inicialmente, que a gordura contida na casca de cacau migra rapidamente para a fase extrato; após estes instantes iniciais, o processo de extração torna-se mais lento e a taxa de extração diminui. O aumento rápido do teor de gordura na fase extrato no início do processo de extração ocorre principalmente devido à lavagem dos componentes presentes na superfície externa das partículas. Após este processo inicial observa-se que, embora o teor de lipídeos na fase extrato continue aumentando, há uma redução na taxa de transferência deste composto. Nesta segunda etapa, o processo de difusão do interior da partícula para a superfície é o

principal responsável pelo aumento do rendimento, como processos difusivos são mais lentos estes impactam no decaimento da taxa de extração (SO; MACDONALD, 1986; XI; YAN; HE, 2014).

Adicionalmente observa-se que a condição de equilíbrio para a extração de gordura foi alcançada em torno de 40 min de extração a temperatura de 60 °C, 25 min a 75 °C e 10 min a 90 °C. A partir desses tempos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os rendimentos relativos de extração para cada temperatura avaliada, como pode ser observado na Tabela 18.

Figura 20. Cinética de extração de lipídeos por PLE da casca da amêndoa de cacau seca. Dados Experimentais utilizando como solvente etanol absoluto: ■, 60,0 ± 0,1 °C; △, 75,0 ± 0,1 °C; ●, 90,0 ± 0,1 °C. Valores calculados:-----, modelo proposto por Perez et al. (2011).

Fonte: própria autoria.

Tabela 18. Efeito do tempo estático nas extrações com líquido pressurizado (10,35 MPa) de lipídeos da casca da amêndoa de cacau seca, realizadas a temperaturas de 60, 75 e 90 °C utilizando como solvente etanol em grau absoluto com relação mássica sólido:solvente de 1:3.

Tempo estático (minutos)	Rendimento de extração de lipídeos (%)		
	60 °C	75 °C	90 °C
3	-----	-----	82 ± 2 ^D
5	77,0 ± 0,2 ^G	78,33 ± 0,06 ^E	85,0 ± 0,6 ^C
8	-----	-----	86 ± 3 ^{B,C}
10	79,11 ± 0,09 ^F	81 ± 1 ^D	88,00 ± 0,02 ^B
13	-----	-----	90 ± 1 ^A
15	80,4 ± 0,4 ^E	83,4 ± 0,1 ^C	90,88 ± 0,01 ^A
20	82,0 ± 0,1 ^D	86,0 ± 0,3 ^B	91 ± 2 ^A
25	83,3 ± 0,6 ^C	88 ± 1 ^A	91 ± 1 ^A
30	84,4 ± 0,2 ^B	89,8 ± 0,03 ^A	91 ± 1 ^A
40	86,0 ± 0,6 ^A	89,7 ± 0,02 ^A	90,6 ± 0,7 ^A
50	86,2 ± 0,4 ^A	89,8 ± 0,6 ^A	90,6 ± 0,5 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo teste de Duncan.

Fonte: Própria Autoria.

O rendimento de extração de lipídeos foi bastante elevado mesmo em tempos estáticos curtos, o mesmo comportamento foi reportado para extração por PLE de óleo de sementes oleaginosas como canola, milho, algodão, soja e linhaça (DANLAMI et al., 2014).

De maneira geral, observa-se que a elevação da temperatura provocou aumento do rendimento relativo de extração de lipídeos, foi também observada uma forte influência desta variável na taxa de extração, sendo que temperaturas mais altas levaram a uma extração mais rápida. Estes resultados estão de acordo os reportados por Colivet et al. (2016) para extração de óleo de sementes de melancia com etanol pressurizado. De acordo com Mustafa e Turner (2011) as temperaturas elevadas ajudam a perturbação das interações matriz-soluto da amostra, além disso, reduzem a tensão superficial do solvente melhorando assim a molhabilidade da matriz oleaginosa, permitindo uma dissolução mais rápida da gordura e, consequentemente, extrações

rápidas. Entretanto, altas temperaturas podem afetar compostos termolábeis que estão sujeitos a desintegração e degradação hidrolítica (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2008)

No que diz respeito aos lipídeos, este efeito negativo do aumento da temperatura pode ter refletido no aumento do teor de AGL na gordura extraída da casca da amêndoa de cacau (determinado como apresentado na seção 4.2.1.2), como pode ser observado na Tabela 19, entretanto o aumento do teor de AGL pode também ser decorrente da degradação da matéria prima, conforme discutido na Seção 5.1.1. Como o teor de AGL na matéria-prima não foi monitorado, estas gorduras, oriundas do processo de extração por PLE com duração de 5 minutos, foram as únicas avaliadas. Com relação ao efeito da PLE sob o teor de AGL, Knowles e Richter (2010), em estudo que avaliou a influência da temperatura na extração de lipídeos por PLE, concluíram que os teores de peróxido e AGL gerados não foram significantes quando comparados aos altos valores obtidos pelo processo de extração por Soxhlet.

Tabela 19. Teor de ácidos graxos livres na gordura da casca da amêndoa de cacau seca extraída por PLE a 60, 75 e 90 °C com tempo estático de 5 minutos utilizando como solvente etanol absoluto.

	Temperatura		
	60 °C	75 °C	90 °C
AGL na gordura (%)^a	24 ± 1 ^b	30,19 ± 0,03 ^a	31 ± 1 ^a

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo teste de Duncan.

^a Acidez expressa em %, com base na massa molar dos ácidos graxos apresentada na Tabela 10 para o Lote 1.

As gorduras obtidas após PLE, com tempo estático de extração de 50 minutos das três temperaturas avaliadas, foram caracterizadas quanto ao seu perfil de ácidos graxos, como pode ser observado na Tabela 20. Comparando o perfil de ácidos graxos da gordura da CS (Lote 1) obtida pelo método de extração a frio (BLIGH; DYER, 1959) apresentada na Tabela 10 e os mostrados na Tabela 20 não foi possível observar diferença estatisticamente significativa. Assim, pode-se inferir que o método de extração por PLE utilizando etanol absoluto como solvente não afeta significativamente a composição de ácidos graxos das gorduras obtidas.

As gorduras obtidas após PLE com tempo estático de extração de 5, 30 e 50 minutos, em todas as temperaturas, foram avaliadas também quanto ao seu teor de isômeros de tocoferóis (Tabela 21). Em geral, o efeito do tempo de extração não é estatisticamente significativo para a maioria dos isômeros avaliados. O aumento da temperatura permitiu um aumento no teor de tocoferóis totais nas gorduras. Dessa forma, as gorduras com maior teor de tocoferóis foram as

obtidas com temperatura de extração de 90 °C. Também é possível notar na Tabela 21 que as gorduras obtidas após processo de extração por PLE apresentam teor de tocoferóis superiores aos da gordura obtida pelo método de Bligh and Dyer (1959) (Tabela 11, Lote 1), principalmente pelo aumento dos isômeros ($\beta + \gamma$), os quais aparecem em maior concentração neste material.

Tabela 20. Composição em ácidos graxos livres da gordura da casca da amêndoa de cacau seca (Lote 1) obtida pelo método Bligh e Dyer (1959) e pelos processos de extração por PLE nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C com tempo estático de 5 minutos utilizando como solvente etanol absoluto.

Ácidos Graxos	Gordura da casca da amêndoa de cacau seca (% em massa)		
	60 °C	75 °C	90 °C
C14:0	n.e.	n.e.	n.e.
C16:0	25,4 ± 0,2 a	26,7 ± 0,7 a	26,1 ± 0,4 a
C16:1	n.e.	0,41 ± 0,04 a	0,46 ± 0,02 a
C17:0	n.e.	n.e.	n.e.
C18:0	33,5 ± 0,5 a, b	32,8 ± 0,1 b	30,4 ± 0,5 c
C18:1	34 ± 1 a, b	34,4 ± 0,8 a, b	35,52 ± 0,01 a
C18:2	5 ± 1 a	5,52 ± 0,06 a	5,89 ± 0,01 a
C18:3	0,5 ± 0,2 a	n.e.	0,6 ± 0,2 a
C20:0	1,0 ± 0,4 a	1,11 ± 0,01 a	0,98 ± 0,06 a
C22:0	0,37 ± 0,03	n.e.	n.e.
C24:0	n.e.	n.e.	n.e.
Massa molar média dos ácidos graxos da gordura da CS (g.mol ⁻¹)	276,58 ± 0,02 a	276,2 ± 0,2 a,b	276,0 ± 0,2 b
Índice de Iodo	40 ± 3 a	39,6 ± 0,8 a	42,9 ± 0,5 a
Razão insaturado/saturado	0,66 ± 0,02 b	0,68 ± 0,02 b	0,74 ± 0,00 a

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo teste de Duncan.

Os valores experimentais são apresentados como média ± desvio padrão.

n.e. – não encontrado.

Fonte: própria autoria.

Dessa forma, pode-se inferir que o emprego do etanol pressurizado como solvente, na faixa de temperatura avaliada, impactou positivamente o teor de tocoferol na gordura da CS. Estes resultados eram esperados visto que diversos autores citam a PLE empregando solventes alcoólicos como uma técnica de extração extremamente eficiente para a obtenção de tocoferóis a partir de diferentes materiais (BUSTAMANTE-RANGEL et al., 2007; GENTILI; CARETTI, 2017; PÉRES et al., 2006), sendo, para esta técnica, o tempo estático de 5 minutos suficiente para extração destes compostos (BUSTAMANTE-RANGEL et al., 2007), fato que corrobora com os resultados apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau obtida por PLE nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C com tempo de extração de 5, 30 e 50 minutos.

		60 °C		75 °C		90 °C	
Isômeros	Tempo estático (minutos)	mg de tocoferol por quilograma de gordura da casca da amêndoa de cacau proveniente das PLE					
α -tocoferol	5	337 ± 6	A, c	368 ± 9	A, b	364 ± 2	A, a
	30	338 ± 64	A, a	399 ± 49	A, a	458 ± 18	A, a
	50	372 ± 17	A, cb	404 ± 8	A, b	425 ± 79	A, a
δ -tocoferol	5	56 ± 2	B, b	64 ± 6	A, ab	82 ± 16	A, a
	30	59 ± 2	B, ba	67 ± 8	A, ba	75 ± 6	AB, a
	50	66.9 ± 0.6	A, ba	71 ± 8	A, ba	84 ± 10	A, a
$(\gamma + \beta)$ -tocoferol	5	971 ± 25	B, b	1037 ± 43	B, b	1284 ± 41	B, a
	30	1124 ± 5	A, a	1092 ± 67	AB, a	1215 ± 200	AB, a
	50	1051 ± 2	AB, b	1178 ± 53	A, ab	1230 ± 27	A, a
Tocoferóis totais	5	1363 ± 29	A, c	1470 ± 45	A, b	1824 ± 7	A, a
	30	1521 ± 66	A, a	1558 ± 108	A, a	1714 ± 285	A, a
	50	1490 ± 108	A, b	1654 ± 54	A, ab	1764 ± 56	A, a

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna e médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

5.2.2 Modelagem matemática da cinética extração de lipídeos por PLE

Os parâmetros do modelo matemático proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) foram ajustados aos dados experimentais mostrados na Figura 20. Baixos valores de desvios relativos médios foram obtidos, mostrando boa concordância do modelo proposto com os dados experimentais. Os parâmetros A e B₁ (Equação 28) ajustados aos dados experimentais de extração por PLE nas condições avaliadas podem ser vistos na Tabela 22.

Tabela 22. Parâmetros do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) ajustados aos dados experimentais da cinética de extração de lipídeos por PLE da casca da amêndoa de cacau e coeficientes de difusão.

T (°C)	Coeficiente A		Coeficiente B ₁ x 10 ³		ARD ^b	D ^c (m ² s ⁻¹) x 10 ¹²
	Valor estimado	CV ^a	Valor estimado	CV ^a		
60	1,0397	5,08	1,02	8,92	0,50	4,56
75	1,0493	7,19	1,33	11,88	0,85	5,94
90	1,0861	4,36	2,72	10,07	0,46	12,15

^a Coeficiente de variação

^b Desvio relativo médio calculado de acordo com a Equação 17.

^c Coeficiente de difusão.

No processo de ajuste dos parâmetros, considerou-se que a etapa de lavagem ocorreu nos primeiros 300 s de contato entre a CS e o solvente. Nesta etapa, verificou-se que os rendimentos relativos de extração de gordura atingiram valores que variaram de 87 a 91% do máximo rendimento de extração. Toda, Sawada e Rodrigues (2016) aplicando este mesmo modelo para avaliar a cinética de extração de óleo de massa expandida de soja à pressão atmosférica utilizando etanol absoluto e hidratado como solventes, consideraram os primeiros 600 segundos como tempo de etapa de lavagem para todas as temperaturas avaliadas, obtendo-se rendimentos de extração de óleo entre 69 a 85% do máximo rendimento de extração.

Na Tabela 22 pode-se observar que o parâmetro A não é influenciado pela temperatura ($p > 0,05$). A partir do coeficiente B₁, o coeficiente de difusão pode ser calculado usando a Equação 30, e pode ser observado que este coeficiente aumenta com o aumento da temperatura, como previamente reportado por Colivet, Oliveira e Carvalho (2016), Fernández et al. (2012), Kamimura et al. (2017) e Toda, Sawada e Rodrigues (2016).

Os valores do coeficiente de difusão da gordura da CS estão coerentes, em termos de magnitude, com os reportados por Fernández et al. (2012) e Dibert e Cros (1989), os quais calcularam este parâmetro para a extração de óleo de sementes *in natura* de canola e café verde, respectivamente, sendo as matrizes sólidas apenas trituradas, sem submissão a nenhum pré-tratamento. Por outro lado, os coeficientes de difusão foram menores do que os valores reportados por Toda, Sawada e Rodrigues (2016) e Kamimura et al. (2017) que estudaram a cinética da extração de óleos de massa expandida de soja e de farelo de arroz em *pellets*, respectivamente, ambas matérias-primas industrialmente pré-tratadas. O pré-tratamento industrial consiste basicamente em submeter o material oleaginoso à extrusão mecânica, transformando-o em pinças ou *pellets* porosos de alta densidade, visando melhorar as propriedades de extração dos solventes (ANDERSON, 2005), facilitando a permeabilidade do solvente e do extrato. Esta diferença na magnitude dos coeficientes de difusão é esperada, uma vez que a casca da amêndoa de cacau seca, utilizada para a realização dos experimentos desta tese de doutorado, é um resíduo agroindustrial o qual, como mencionado na Seção 5.1, passou apenas pelo processo de redução de tamanho (moagem), não tendo sido submetida a nenhum pré-preparo para a extração.

Quanto à dependência do coeficiente de difusão em relação a temperatura, foi possível aplicar a equação de Arrhenius (Equação 37) e estimar a energia de ativação da difusão para o processo de extração de gordura da CS.

$$D = D_0 e^{-\left[\frac{E_{diff}}{RT}\right]} \quad (37)$$

Onde D_0 (m^2/s) é o coeficiente pré-exponencial, E_{diff} (J/mol) é a energia de ativação da difusão, R (J/mol K) é a constante dos gases, T (K) é a temperatura absoluta na qual o processo de extração foi conduzido e D é o coeficiente de difusão estimado à partir do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) (Tabela 22).

Após correlação, o coeficiente pré-exponencial D_0 apresentou valor de $5,55 \times 10^{-7} m^2/s$ e energia de ativação de 32,6 kJ/mol ($R^2 = 0.922$). Este valor estimado de energia de ativação da difusão está de acordo, em termos de ordem de magnitude, com os valores previamente reportados por diferentes autores, 33,95, 19,1 e 21,8 kJ/mol, manipulando diferentes matrizes oleaginosas, como sementes de girassol moídas, sementes de canola moídas e girassol silvestre, respectivamente, sob pressão atmosférica (BAÜMLER; CRAPISTE; CARELLI, 2010; FERNÁNDEZ et al., 2012; PEREZ; CARELLI; CRAPISTE, 2011).

5.2.3 *Cinética de extração de flavanóis totais por PLE utilizando etanol absoluto*

Os dados experimentais de extração de flavanóis totais por PLE usando etanol absoluto como solvente são apresentados na Figura 21. É possível notar que no início do processo de extração a remoção dos compostos extraíveis da CS para a fase extrato é mais rápida, na sequência a taxa de extração decresce até que a condição de equilíbrio é estabelecida. A condição de equilíbrio da extração foi alcançada após aproximadamente 25 minutos para as extrações conduzidas a 60 e 75 °C e após 15 minutos a 90 °C. Para a temperatura de 60 °C, o rendimento de extração de flavanóis totais permaneceu constante; entretanto para as temperaturas de 75 e 90 °C uma queda acentuada foi observada após 40 minutos de extração.

Liu et al. (2014) usaram água quente pressurizada para realizar extração dinâmica de cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo de cebolas vermelhas e observaram que após um certo tempo de extração, específico para cada condição avaliada, o rendimento de extração deste composto alcançou o equilíbrio. Fernández-Ponce et al. (2016) estudaram a PLE de compostos fenólicos de folhas de manga utilizando etanol como solvente e não observaram equilíbrio durante os 350 minutos em que o rendimento de extração foi monitorado; dessa forma, a taxa de extração foi praticamente constante. Com base nisso, os autores observaram que quanto maior o tempo de extração, maior a concentração do composto de interesse na fase extrato. No entanto, deve-se notar que os compostos fenólicos avaliados por estes autores não são os mesmos quantificados pela análise do teor de flavanóis totais, portanto, o comportamento apresentado pode diferir.

Figura 21. Cinética de extração de flavanóis totais por PLE da casca da amêndoa de cacau seca. Dados experimentais utilizando etanol absoluto como solvente: $\square$, $60,0 \pm 0,1$ °C; Δ , $75,0 \pm 0,1$ °C; e $\circ$, $90,0 \pm 0,1$ °C. Valores calculados: -----, modelo proposto por Peleg (1988).

Fonte: própria autoria.

Davidov-Pardo, Arozarena e Marín-Arroyo (2011) analisaram a cinética de extração a 60, 90 e 120 °C, sob pressão atmosférica, de compostos fenólicos de sementes de uva, como catequina, epicatequina e procianidinas B1 e B2. A 90 °C, as catequinas e epicatequinas estavam presentes em maior quantidade nos extratos até 20 minutos de extração, quando comparados aos extratos obtidos a 60 °C. Após esse tempo, uma inversão do comportamento foi observada, e a menor temperatura produziu maiores teores desses flavanóis. O conteúdo aumentou com o tempo, seguido por uma queda no conteúdo das catequinas e epicatequinas. Em contrapartida, ainda nas temperaturas de 60 e 90 °C, as procianidinas B1 e B2 apareceram em concentrações mais elevadas nos extratos obtidos com temperaturas de extração mais elevadas em todos os tempos avaliados, e a tendência ao longo do tempo foi um aumento na extração destes compostos com posterior estabilização. Como comentado anteriormente, a técnica utilizada neste trabalho para a determinação do teor total de flavanóis quantificou vários

tipos de compostos desta classe. Assim, as curvas de cinética de extração caracterizam o comportamento de uma mistura de catequinas, epicatequinas, procianidinas, entre outros flavanóis.

De acordo com estudos anteriores, o rápido aumento no rendimento de extração durante a etapa inicial de extração foi atribuído principalmente à lavagem dos componentes extraídos localizados na superfície externa das partículas. Após a lavagem, pode-se notar uma diminuição na taxa de extração, nesta etapa o aumento no teor dos compostos de interesse na fase extrato é controlado principalmente pelo processo de difusão do soluto dentro das partículas (XI; YAN; HE, 2014). Rendimentos maiores observados em temperaturas mais altas foram justificados pelo fato de que temperaturas mais altas melhoraram a molhabilidade da matriz oleaginosa devido ao aumento na perturbação das interações matriz-soluto da amostra e à redução da tensão superficial do solvente, permitindo uma dissolução mais rápida da gordura, como já discutido na Seção 5.2.1 (MUSTAFA; TURNER, 2011). No entanto, a redução no teor flavanóis totais nas temperaturas de 75 e 90 °C após 40 minutos de extração pode estar associada ao emprego de temperatura e pressão elevadas. A associação dessas variáveis pode ter afetado os compostos termolábeis que estavam sujeitos a desintegração e degradação hidrolítica (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Assim, para entender o comportamento dos diferentes flavanóis e alcaloides avaliados no processo de PLE, bem como os efeitos das variáveis avaliadas, os extratos da PLE coletados nos tempos de extração de 5, 30 e 50 minutos foram analisados utilizando UPLC-MS/MS.

Os teores de flavanóis e alcaloides no extrato da PLE bem como os rendimentos de extração são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23. Composição e rendimento de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) nos extratos oriundos da PLE obtidos com diferentes tempos estáticos e temperaturas de extração.

	Tempo (min)	60 °C	75 °C	90 °C	60 °C	75 °C	90 °C
Flavanóis		µg de flavanóis por grama de extrato			Rendimento de extração (µg de flavanóis por grama de CS)		
(+) catequina	5	8,7 ± 0,1 C, c	20 ± 3 B, b	32,0 ± 0,3 C, a	26 ± 2 C, c	61 ± 12 B, b	101,3 ± 0,2 C, a
	30	15,1 ± 0,6 B, c	29 ± 3 A, b	38,7 ± 0,8 B, a	43 ± 2 B, c	84 ± 6 A, b	122 ± 4 B, a
	50	20 ± 2 A, c	27,7 ± 0,5 A, b	42,90 ± 0,08 A, a	58 ± 3 A, c	83,6 ± 0,9 A, b	135 ± 2 A, a
		mg de flavanóis por grama de extrato			Rendimento de extração (mg de flavanóis por grama de CS)		
(-)-epicatequina	5	0,452 ± 0,01 C, c	0,63 ± 0,01 B, b	0,88 ± 0,02 B, a	1,36 ± 0,09 C, c	1,89 ± 0,03 B, b	2,79 ± 0,04 B, a
	30	0,85 ± 0,04 B, b	1,17 ± 0,04 A, a	1,09 ± 0,2 A, a	2,1 ± 0,3 B, b	3,48 ± 0,01 A, a	3,45 ± 0,5 A, a
	50	0,99 ± 0,04 A, b	1,3 ± 0,1 A, a	1,03 ± 0,03 A, ab	2,9 ± 0,2 A, b	3,8 ± 0,3 A, a	3,25 ± 0,04 A, ab
procianidina B2	5	0,123 ± 0,001 C, c	0,163 ± 0,007 B, b	0,204 ± 0,005 C, A	0,37 ± 0,02 C, c	0,49 ± 0,01 B, b	0,65 ± 0,02 C, a
	30	0,19 ± 0,01 B, b	0,291 ± 0,001 A, a	0,307 ± 0,006 A, a	0,55 ± 0,05 B, c	0,86 ± 0,02 A, b	0,973 ± 0,07 A, a
	50	0,24 ± 0,01 A, a	0,26 ± 0,03 A, a	0,230 ± 0,006 B, a	0,73 ± 0,06 A, a	0,8 ± 0,1 A, a	0,73 ± 0,01 B, a
Alcaloides		mg de alcaloides por grama de extrato			Rendimento de extração (mg de alcaloides por grama de CS)		
teobromina	5	1,21 ± 0,07 B, b	1,9 ± 0,2 A, a	1,8 ± 0,2 B, a	3,68 ± 0,4 A, c	6,7 ± 0,2 B, a	5,6 ± 0,4 B, a
	30	1,7 ± 0,1 A, b	2,23 ± 0,02 A, b	3,3 ± 0,2 A, a	4,9 ± 0,7 A, c	5,8 ± 0,5 AB, b	10,3 ± 0,4 A, a
	50	1,8 ± 0,1 A, b	2,4 ± 0,1 A, b	3,5 ± 0,3 A, a	5,2 ± 0,5 A, c	7,1 ± 0,3 A, b	11,0 ± 0,7 A, a
cafeína	5	0,168 ± 0,004 B, c	0,42 ± 0,01 B, b	0,60 ± 0,04 B, a	0,51 ± 0,04 B, c	1,27 ± 0,08 B, a	1,91 ± 0,11 B, a
	30	0,41 ± 0,02 A, c	0,60 ± 0,02 A, b	0,79 ± 0,01 A, b	1,18 ± 0,04 A, c	1,782 ± 0,001 A, b	2,50 ± 0,01 A, a
	50	0,45 ± 0,02 A, c	0,65 ± 0,07 A, b	0,87 ± 0,07 A, b	1,34 ± 0,11 A, c	1,96 ± 0,16 A, b	2,73 ± 0,17 A, a

Valores na mesma coluna, seguidos de letras maiúsculas diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$), para cada parâmetro avaliado, sendo eles o conteúdo do composto e o rendimento da extração. Valores na mesma linha seguidos por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$), para cada composto avaliado.

Fonte: própria autoria.

Dentre os flavanóis avaliados, os teores de catequina e epicatequina nos extratos aumentaram com o aumento da temperatura e do tempo estático. Quanto à procianidina B2, embora a mesma tendência tenha sido observada, em altas temperaturas e maiores tempos estático o conteúdo diminuiu, indicando possível degradação desse composto. Esse comportamento foi observado para a temperatura de extração de 90 °C. Claramente, como visto na Tabela 23, a diminuição no conteúdo deste composto no extrato teve efeito negativo na eficiência de extração destes compostos.

O comportamento destes compostos durante o processo PLE, influenciado pela temperatura e tempo de extração, diferiu em alguns aspectos do estudo relatado por Davidov-Pardo, Arozarena e Marín-Arroyo (2011) para extrações realizadas à pressão atmosférica. Esses autores mencionaram que o aumento da temperatura de 60 para 90 °C favoreceu a extração de flavanóis, o que está de acordo com o observado para as extrações por PLE, exceto pelos resultados usando um tempo estático de 50 minutos para a procianidina B2. No entanto, em função do tempo de extração, os comportamentos diferiram daqueles relatados por esses autores. Para o teor de catequina notou-se variação do teor no extrato da PLE em função do tempo e da temperatura; já para o conteúdo de epicatequina observou-se aumento seguido de estabilização para as extrações a 75 e 90 °C. Para procianidina B2, o teor aumentou a 60 °C para todos os tempos avaliados; a 75 °C, o teor aumentou, seguido de estabilização; e a 90 °C, o teor aumentou, seguido de um declínio, provavelmente devido à sua degradação. As diferenças observadas entre os comportamentos relatados por Davidov-Pardo, Arozarena e Marín-Arroyo (2011) e os descritos neste estudo podem estar associados a diferenças experimentais entre os tipos de extração e solventes utilizados. Garcia-Mendoza et al. (2017) avaliando a influência da temperatura na extração de antocianinas utilizando PLE com etanol como solvente observaram redução na extração desses compostos com o aumento da temperatura. No estudo realizado por Viganó et al. (2016) que analisou a PLE de compostos fenólicos de casca de maracujá, utilizando etanol hidratado, foi notado que o aumento da temperatura resultou em um alto teor dos fenólicos alvo.

Portanto, pode-se inferir que o rendimento de extração de flavanóis varia conforme o tipo de composto e as condições de extração utilizadas, e que o emprego de altas temperaturas e tempos estáticos longos pode resultar em uma influência negativa nos valores de rendimento da extração.

Em relação à extração de alcaloides, cafeína e teobromina, o aumento da temperatura favoreceu sua extração; entretanto, o aumento do tempo estático promoveu aumento da extração desses compostos apenas entre 5 e 30 minutos e, posteriormente, foi seguido de estabilização.

No estudo realizado por Jacques et al. (2008), que abordou a PLE de folhas de chá mate usando hexano e metanol como solventes, este comportamento em função da temperatura também foi notado, sendo obtidos maiores rendimentos de extração de cafeína a 100 °C em comparação com 50 °C. Também em acordo com nosso trabalho, Dawidowicz and Wianowska (2005) avaliaram os efeitos de tempo e temperatura usando PLE para a análise em HPLC de cafeína em folhas de chá verde usando água como solvente, os autores observaram que o aumento na temperatura resultou em um aumento no rendimento de extração deste composto, enquanto o aumento no tempo estático promoveu aumento no rendimento de extração seguido pela estabilização.

Temperaturas mais altas podem ajudar na extração de compostos de alta massa molar devido ao favorecimento das propriedades de transporte à medida que a temperatura é aumentada (JACQUES et al., 2008). No entanto, o efeito do tempo no desempenho da extração dos alcaloides avaliados foi maior no início da PLE. Dessa forma, acredita-se que após um certo tempo, a condição de equilíbrio tenha sido alcançada. Esse efeito pode ser observado na Tabela 23 onde, em geral, o rendimento de extração de cafeína e teobromina com tempo estático de 5 minutos difere dos demais, mas os tempos de extração após 30 e 50 minutos não diferem entre si.

Os rendimentos de extração de flavanóis e alcaloides foram bastante elevados e muitas vezes ultrapassaram o teor determinado na composição da matéria-prima; esse comportamento foi observado para os compostos epicatequina, teobromina e cafeína. Tais resultados foram atribuídos à técnica de extração, ao uso do etanol e às temperaturas e tempos de extração otimizados. Dessa forma, o método avaliado foi mais eficiente para a extração destes compostos do que a metodologia utilizada para a produção do CSPE liofilizado apresentada na Seção 4.2.1.10. Assim, o processo de PLE segundo os parâmetros avaliados foi eficiente para extrair os compostos de interesse da CS.

Os rendimentos de extração dos flavanóis quantificados a partir da análise UPLC-MS/MS foram comparados com os resultados do método DMAC. Verificou-se que a análise espectrofotométrica representou adequadamente o comportamento da mistura dos flavanóis avaliados durante o processo de PLE. Isto indica que o método espectrofotométrico foi adequado para avaliar qualitativamente a extração de flavanóis totais. Claramente, para uma avaliação quantitativa, a análise realizada usando UPLC-MS/MS foi mais adequada devido à sua maior precisão.

Conforme observado na Figura 21, o declínio no rendimento de extração de flavanóis em algumas das temperaturas avaliadas pode estar associado à degradação de alguns compostos.

Neste contexto, a análise termogravimétrica apresentada na Seção 5.1.13 nos auxilia a confirmar tal hipótese pois demonstra que os flavanóis catequina e procianidina B2 apresentam degradação térmica a partir de 50 e 60 °C, enquanto os demais compostos (epicatequina, cafeína e teobromina) possuem temperaturas de degradação térmica superiores a 200 °C.

Dessa forma, os resultados obtidos para a TGA estão de acordo com os apresentados pela análise de UPLC-MS / MS que avaliou os extratos obtidos nos tempos de extração de 5, 30 e 50 minutos para todas as temperaturas estudadas, exceto no que diz respeito ao conteúdo de catequinas.

Na Tabela 23, pode-se observar que a 75 e 90 °C, a partir de 30 minutos do processo de extração, houve uma estabilização no rendimento de extração dos compostos epicatequina, cafeína e teobromina, o que está de acordo com a TGA, uma vez que, conforme já apresentado, estes compostos não apresentam degradação nesta faixa de temperatura. Por outro lado, a procianidina B2 apresentou uma diminuição no rendimento de extração a partir de 30 minutos de extração, à temperatura de 90 °C, fato que também corrobora com a TGA, visto que este composto apresentou degradação térmica a partir de 50 °C. No entanto, as catequinas, que apresentaram uma concentração de ordem de grandeza 100 vezes menor que a epicatequina e a procianidina B2, apresentaram um aumento na sua concentração, embora a TGA tenha mostrado que esse composto apresenta pico de degradação a 75 °C. Esse comportamento pode ser melhor compreendido considerando o estudo de Taeye et al. (2014), o qual mostrou que em meio aquoso a 60 °C, a epicatequina foi epimerizada principalmente em catequina. Neste mesmo estudo a procianidina B2 também provou se epimerizar, especialmente a 90 °C em meio aquoso, e produzir monômeros (catequinas e epicatequinas).

Assim, com base na TGA e na análise UPLC-MS/MS, é possível inferir que dos compostos avaliados apenas a catequina e a procianidina B2 podem se degradar nas condições de extração empregadas. Embasando-se também no estudo realizado por Taeye et al. (2014), pode-se afirmar que alguns flavanóis, como epicatequinas e procianidinas presentes no extrato, podem ser degradados, gerando catequinas e epicatequinas. Como as catequinas estão presentes no extrato em uma quantidade expressivamente menor, nota-se aumento no seu teor pelo fato deste composto ser produto da degradação de outros flavonóis, com isso seu rendimento expressa um aumento estatisticamente significativo ao longo do tempo de extração, mesmo em temperaturas mais altas nas quais, de acordo com a TGA, o composto estaria se degradando.

Com o objetivo de enriquecer a discussão sobre a extração de flavanóis totais por PLE utilizando etanol absoluto como solvente, a atividade antioxidante dos extratos oriundos das

PLE com tempo de extração de 5, 30 e 50 minutos também foi avaliada. Os resultados podem ser observados na Tabela 24.

Tabela 24. Atividade antioxidante dos extratos da casca da amêndoa de cacau oriundos da PLE, usando as análises DPPH e FRAP

Método	Tempo (min)	60 °C	75 °C	90 °C
		μmol eq. Trolox por grama de CS		
DPPH	5	36 ± 3 ^{B, c}	47 ± 3 ^{B, b}	64 ± 3 ^{A, a}
	30	47 ± 3 ^{A, b}	56 ± 5 ^{AB, ab}	65 ± 2 ^{A, a}
	50	55 ± 3 ^{A, b}	63 ± 3 ^{A, a}	63,9 ± 0,6 ^{A, a}
FRAP	5	47 ± 2 ^{C, b}	67 ± 8 ^{C, a}	72 ± 2 ^{A, a}
	30	58,4 ± 0,5 ^{B, b}	76 ± 3 ^{B, a}	84 ± 4 ^{A, a}
	50	77 ± 3 ^{A, b}	82 ± 5 ^{A, a}	76 ± 6 ^{A, a}

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas diferentes e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes (p <0,05).

Fonte: própria autoria.

Nota-se na Tabela 24 que o extrato da PLE apresentou atividade antioxidante (AA) e que, em geral, o aumento da temperatura aumentou a atividade antioxidante dos extratos para ambas as análises. Para os resultados do DPPH, a estabilização foi observada após 30 minutos, e para o mesmo tempo estático, o aumento na temperatura de 75 °C para 90 °C não impactou a atividade antioxidante. Na análise de FRAP, em todos os tempos avaliados, verificou-se que o aumento da temperatura de 75 para 90 °C não impactou a atividade antioxidante dos extratos. Além disso, para esta mesma análise, foi possível observar que o uso de altas temperaturas e tempos longos de extração (50 minutos e 90 °C) afetou negativamente a AA.

Como descrito anteriormente, a atividade antioxidante está diretamente relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos presentes na amostra. No caso dos derivados do cacau, estes são principalmente flavanóis (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005). Comparando os dados apresentados na Tabela 23 e a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos DPPH e FRAP (Tabela 24), um aumento na concentração dos flavanóis levou a um aumento na atividade antioxidante dos extratos. Também pode ser verificado que a degradação da procianidina B2, e possivelmente de outros flavanóis, refletiu na atividade antioxidante dos extratos avaliados pelo método FRAP.

O mesmo comportamento tem sido observado por outros autores, fato que corrobora com os resultados obtidos. Rodríguez-Pérez et al. (2016) otimizaram a extração por líquido pressurizado de compostos fenólicos de folhas de *Moringa oleifera* e avaliaram a AA. Os autores observaram que os extratos obtidos nas mesmas condições, variando apenas a temperatura (50, 115 e 180 °C), em geral, apresentaram aumento seguido de redução na atividade antioxidante. Viganó et al. (2016) estudaram a PLE para obtenção de compostos bioativos de casca de maracujá e avaliaram a atividade antioxidante utilizando ensaios com DPPH, FRAP e ORAC para extrações conduzidas a 30, 45 e 60 °C; foi observado um aumento na AA com um aumento na temperatura. Colivet, Oliveira e Carvalho (2016) estudando a cinética de extração de óleo de sementes de melancia com etanol pressurizado, avaliaram a influência do tempo e da temperatura na atividade antioxidante utilizando o método DPPH e verificaram que a temperatura e o tempo de extração tiveram efeito significativo sobre a atividade antioxidante dos compostos no óleo extraído. Eles observaram que a AA aumentou consideravelmente com o aumento da temperatura, sendo que o óleo obtido a 60 °C apresentou atividade antioxidante mais elevada em relação ao obtido nas temperaturas de 40 ou 80 °C.

5.2.4 Modelagem matemática dos dados de cinética de extração de flavonóis totais por PLE

Os dados experimentais considerados para o procedimento de modelagem pela equação de Peleg (1988) foram diferentes de acordo com a temperatura de extração avaliada. A 60 °C, na qual o rendimento de extração do total de flavonóis permaneceu constante após atingir o equilíbrio, todos os dados foram considerados; entretanto, nas temperaturas de 75 e 90 °C, nos quais foram observados decréscimos acentuados, os dados obtidos em 50 minutos e em 40 e 50 minutos, respectivamente, foram desconsiderados.

Os parâmetros obtidos a partir do modelo proposto por Peleg (K_1 , K_2 , B_0 e C_{max}), o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio médio relativo (ARD) podem ser vistos na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros do modelo de Peleg (1988) ajustados aos dados experimentais da cinética de extração de flavanóis totais por PLE da casca da amêndoa de cacau seca.

T (°C)	Coeficiente K ₁		Coeficiente K ₂		B ₀	C _{max}	R ^{2a}	ARD ^b
	Valor estimado	CV ^c	Valor estimado	CV ^c				
60	2,1 ± 0,4	19,0	0,39 ± 0,02	5,28	0,48	2,56	0,9335	8,08
75	1,9 ± 0,3	15,4	0,27 ± 0,01	5,54	0,52	3,70	0,9719	6,64
90	0,9 ± 0,1	14,5	0,22 ± 0,01	4,07	1,11	4,54	0,9930	3,10

^a Coeficiente de determinação.

Fonte: própria autoria.

^b Desvio relativo médio calculado de acordo com a Equação 17.

^c Coeficiente de variação.

Tradicionalmente no modelo proposto por Peleg, o parâmetro C_{max} seria denominado como o rendimento de extração no equilíbrio; entretanto, como em algumas condições de temperatura avaliadas houve degradação, decidiu-se evitar este termo e nomeá-lo como rendimento máximo de extração. Em outras palavras, é o maior rendimento obtido nas condições avaliadas antes que qualquer degradação ocorra.

Os coeficientes de correlação foram altos em todos os conjuntos de dados experimentais (0,9335–0,9930), e os valores do desvio relativo médio (ARD) ficaram na faixa de 3,10 a 8,08%, o que indica uma concordância razoável e aceitável entre os dados experimentais e calculados.

O aumento na temperatura resultou em uma diminuição nas constantes de Peleg, indicando que as extrações de flavanóis totais da CS foram favorecidas com a temperatura. O efeito da temperatura também impactou positivamente o rendimento máximo de extração de flavanóis totais, temperaturas mais altas resultaram em maior C_{max}. Resultados semelhantes foram apresentados por Karacabey et al. (2013) ao aplicar o modelo de Peleg para descrever os dados experimentais de extração de resveratrol e viniferina a partir de galhos ou ramos de videiras.

As curvas de extração construídas com base nas constantes do modelo de Peleg, bem como comparação com os dados experimentais, podem ser observadas na Figura 21. A Figura 21 demonstra uma boa concordância dos dados experimentais com os calculados usando o modelo de Peleg para extração por PLE de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau. Comportamento parecido foi apresentado para extração sólido-líquido de polifenóis totais de sementes de uva (BUCIC-KOJIC et al., 2007). Dessa forma, pode-se inferir que o modelo de Peleg mostrou-se adequado para descrever a cinética de extração sólido-líquido dos flavanóis totais da casca do grão de cacau seca.

5.2.5 *Índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado proveniente da PLE*

Os valores para o índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) obtidos para os sólidos desengordurados provenientes da PLE a 60, 75 e 90 °C após tempo estático de extração de 50 minutos foram de 54 ± 1 , $51,6 \pm 0,1$ e $44 \pm 1\%$, respectivamente. Estes valores foram determinados apenas em pH 11,0, visto que esta condição permitiu altos valores de ISN para CS (Figura 12).

A determinação do ISN é uma análise muito importante para a avaliação dos sólidos desengordurados, uma vez que esses valores podem estar diretamente relacionados à solubilidade das proteínas e isso, por sua vez, influencia as propriedades funcionais do material. (NAVARRO et al., 2016; NAVARRO; RODRIGUES, 2018). Dentre todas as características funcionais da proteína, a solubilidade é uma das propriedades mais importantes, pois exerce uma forte influência sobre várias outras propriedades, como a capacidade de formar emulsões e espumas, por exemplo (BERA; MUKHERJEE, 1989). Baker e Sullivan (1983) afirmaram que baixos valores de índice de solubilidade de nitrogênio indicam que as proteínas presentes no material analisado podem estar desnaturadas. Assim, neste estudo, o baixo valor de ISN observado para os refinados oriundos das extrações conduzidas a 90 °C, podem estar associados ao aumento da desnaturação da proteína devido ao processo de extração.

Verifica-se que o valor do ISN referente ao material desengordurado obtido após PLE realizada a 90 °C é significativamente menor ($p < 0,05$) que o da matéria-prima ($52,0 \pm 0,3\%$). Em contraste, os valores de solubilidade das proteínas dos refinados obtidos a partir dos processos de extração a 60 e 75 °C foram estatisticamente iguais ao valor da matéria-prima.

O trabalho de Vojdani (1996) sugere que a solubilidade das proteínas diminui devido ao contato com solventes orgânicos miscíveis com água, os quais desnaturam as proteínas em altas

temperaturas. De acordo com Moure et al. (2006), a solubilidade é influenciada pelo balanço hidrofílico/hidrofóbico na superfície das proteínas. Assim, como o etanol apresenta características hidrofílicas e hidrofóbicas este solvente desestabiliza as proteínas pelo enfraquecimento das interações hidrofóbicas entre os resíduos não-polares e por perturbar a estrutura da água ao redor das moléculas de proteínas, podendo levar a redução do ISN (SESSA; NELSEN; SNYDER, 1998).

Navarro e Rodrigues (2018) avaliaram a solubilidade proteica da torta de macadâmia submetida ao processo de extração de óleo a pressão atmosférica usando etanol e isopropanol com diferentes graus de hidratação como solventes. As autoras notaram que quando o solvente etanol absoluto foi utilizado os sólidos desengordurados, oriundos de extrações conduzidas a 60, 75 e 90 °C, apresentaram redução significativa do ISN se comparada ao ISN da matéria-prima. Capellini et al. (2017) para extrações de óleo de *pellets* de farelo de arroz, realizadas à pressão atmosférica utilizando solventes alcoólicos, observou redução da solubilidade proteica para refinados oriundos de extrações realizadas a partir de 50 °C, sendo acentuada esta redução com o aumento da temperatura.

Embora os estudos supracitados mostrem o efeito negativo do emprego do solvente etanol no valor de ISN sobre os sólidos desengordurados, com relação aos dados experimentais apresentados, percebe-se que a redução do ISN ocorreu apenas em extrações realizadas a 90 °C indicando que a redução do ISN ocorreu provavelmente devido ao aumento da temperatura.

Em um trabalho realizado por Marcone, Kakuda e Yada (1998) que avaliou a temperatura de desnaturação de globulinas em várias matérias-primas, observou-se que este efeito ocorre principalmente na faixa de temperatura de 88 a 97 °C. Essas temperaturas coincidem com a temperatura de extração na qual observou-se uma diminuição do ISN dos sólidos desengordurados; sabendo que as proteínas da CS são compostas em grande parte por globulinas, tal fato nos leva a concluir que provavelmente esse efeito está associado principalmente à desnaturação dessas proteínas.

A exposição do material a elevadas temperaturas poderia deixar os resíduos não-polares mais expostos, o que contribuiria com a redução da solubilidade proteica (AIDER; BARBANA, 2011).

5.2.6 Teor de água nos extratos provenientes da PLE

Na Figura 22 são apresentados os resultados referentes à quantidade de água presente na fase extrato em função do tempo estático de extração, para as três condições de temperatura

avaliadas. Verifica-se que, mesmo utilizando-se etanol em grau absoluto como solvente, há presença de água na fase extrato. Pode-se inferir que esta fração de água é oriunda da matéria-prima, sua umidade intrínseca, uma vez que esta não foi submetida à secagem antes das extrações, vale ressaltar que a água presente na matéria-prima também é um solvente e que pode, ou não, contribuir para a extração de determinados compostos. De acordo com estudos realizado por Rodrigues e Oliveira (2010) e Rodrigues, Aracava e Abreu (2010), nos quais trabalhou-se com a extração de óleos de farelo de arroz em *pellets* e de soja em lâminas, respectivamente, utilizando-se etanol como solvente, nota-se que não há dependência entre a temperatura e a quantidade de água transferida para o extrato durante o processo de extração de óleo.

Figura 22. Teor de água nos extratos obtidos por PLE da casca da amêndoa de cacau seca utilizando como solvente etanol absoluto nas temperaturas de 60, 75 e 90 °C.

Fonte: Própria autoria.

Pode-se observar na Figura 22 que os teores de água nos extratos ficaram entre 2 e 4 % e não apresentaram tendência definida de comportamento. Estudos descritos por Capellini (2013), Scharlack (2015) e Toda (2016) para farelo de arroz em *pellets* (~5,8% de umidade em b.s.), torta de sementes de girassol (~7,8% de umidade em b.s.) e borra de café (~10,4% de umidade em b.s.), respectivamente, estudando a extração de lipídeos desses materiais com

etanol absoluto a pressão atmosférica obtiveram teores de água entre 2,0 e 2,5%. Dessa forma, pode-se inferir que a condição de pressão mais elevada da PLE favorece a extração de água da matéria-prima, visto que os teores de água dos extratos obtidos por esta técnica de extração foram maiores.

5.3 Experimentos de extração sólido-líquido à pressão atmosférica (ATME) utilizando solventes alcoólicos

Foram realizados 132 experimentos de extração sólido-líquido a pressão atmosférica, sendo 27 correspondentes ao primeiro conjunto experimental (extrações realizadas com Et0, Et6, IPA0 e IPA12 por um tempo de extração de uma hora), 65 correspondentes ao segundo conjunto experimental (cinética de extração de lipídeos a 75 e 90 °C utilizando Et0 e Et6 como solventes) e 40 correspondentes ao terceiro conjunto de experimentos (extrações realizadas variando-se a relação mássica sólido:solvente em 1:2,5, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:10, a 75 e 90 °C com tempo de extração de três horas utilizando Et0 e Et6 como solventes). Os resultados referentes aos três conjuntos serão discutidos separadamente.

Os objetivos dos diferentes conjuntos experimentais de ATME foram distintos. O primeiro conjunto (Seção 5.3.1) objetivou avaliar principalmente os efeitos dos diferentes solventes de extração (Et0, Et6, IPA0 e IPA12) em diferentes temperaturas sobre o rendimento de extração de gordura, compostos fenólicos totais e flavanóis totais e sobre a composição de tocoferóis na gordura obtida. O segundo conjunto experimental teve por objetivo avaliar a cinética de extração de lipídeos nas temperaturas de 75 e 90 °C empregando os solventes Et0 e Et6 e, com isso, verificar o tempo mínimo para que o sistema sólido:solvente atingisse a condição de equilíbrio para que, dessa forma, os maiores rendimentos de extração dos compostos correspondentes a cada condição fossem alcançados. Já o terceiro conjunto experimental teve por objetivo avaliar como os lipídeos da casca da amêndoa de cacau se particionam no sistema sólido:solvente após o equilíbrio ser atingido empregando Et0 e Et6 como solvente nas temperaturas de 75 e 90 °C; com esse conjunto experimental foi possível calcular o coeficiente de partição para cada condição avaliada e assim fornecer dados para simulação do processo de extração contra-corrente em múltiplos estágios.

5.3.1 Extração de gordura e biocompostos a pressão atmosférica utilizando Et0, Et6, IPA0 e IPA12

As condições de extração empregadas nos experimentos de extração a pressão atmosférica (ATME) deste primeiro conjunto experimental podem ser observadas na Tabela 26. Os experimentos foram conduzidos utilizando casca da amêndoa de cacau seca proveniente do Lote 2, etanol e isopropanol em graus absoluto e azeotrópico como solventes, com razão mássica sólido:solvente de 1:3, temperaturas de 60, 75 e 90 °C e tempo de extração de 1 hora, contado a partir do momento em que o interior do extrator atingiu a temperatura de extração desejada. Todas as condições experimentais foram repetidas, no mínimo, duas vezes.

Como pode ser observado na Tabela 26, os valores de desvio relativo (δ) médio, calculados de acordo com a Equação 7, variaram de 0,05 a 2,63%. Estes desvios são referentes ao cálculo do balanço de massa, ou seja, à comparação entre as massas do ponto de mistura inicial e as massas das duas fases obtidas, extrato e refinado. Os baixos valores de desvio calculados, ou seja, bem inferiores a 10%, indicam que os experimentos foram realizados com precisão e apresentaram resultados com boa qualidade e repetibilidade.

Ainda na Tabela 26 pode-se observar que os teores de água nos solventes de extração são os esperados para os tipos de solventes propostos, ou seja, etanol e isopropanol em grau absoluto com aproximadamente 0% de água e etanol e isopropanol azeotrópicos com valores bem próximos a 6 e 12%, respectivamente.

Tabela 26. Condições empregadas nos experimentos de extração sólido-líquido a pressão atmosférica.

T (°C)	Solvente de extração	Teor de água no solvente alcoólico (% em massa)	Faixa de δ (desvio relativo) médio ^a (%)	Repetições
60,0 ± 0,1	Etanol	0,19 ± 0,01	0,33 – 0,79	3
		6,01 ± 0,02	0,73 – 1,31	2
	Isopropanol	0,16 ± 0,02	0,28 – 2,24	2
		12,14 ± 0,08	0,94 – 1,20	2
75,0 ± 0,1	Etanol	0,19 ± 0,01	0,05 – 0,46	2
		6,01 ± 0,02	0,78 – 1,25	3
	Isopropanol	0,16 ± 0,02	0,20 – 1,10	2
		12,14 ± 0,08	0,29 – 1,45	2
90,0 ± 0,1	Etanol	0,19 ± 0,01	1,20 – 1,28	2
		6,01 ± 0,02	0,97 – 1,15	3
	Isopropanol	0,16 ± 0,02	0,70 – 2,63	2
		12,14 ± 0,08	1,68 – 1,69	2

^a Desvio calculado conforme Equação 7.

Fonte: própria autoria.

Para cada experimento foram realizadas análises das fases extrato e refinado e na gordura obtida após o processo de extração. Na fase extrato monitorou-se o teor de água, teor de flavanóis totais, compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, procianidina B2, cafeína e teobromina; para a fase refinado foi calculado o índice de retenção de solução e o teor residual de lipídeos e a gordura foi avaliada quanto ao seu perfil de ácidos graxos e quanto ao seu teor de tocoferóis.

Na Figura 23 são apresentados os resultados referentes à quantidade de água na fase extrato proveniente de cada condição experimental. Pode-se verificar que, mesmo utilizando-se etanol ou isopropanol em grau absoluto como solventes, há presença de água na fase extrato. E como já comentado no contexto da PLE, esta fração de água é oriunda da matéria-prima, de sua umidade intrínseca, uma vez que esta não foi submetida à secagem antes das extrações. Para os solventes em grau azeotrópico, etanol contendo 6% de água, em massa, e isopropanol contendo 12% de água, em massa, a umidade presente na fase extrato é proveniente, basicamente, da água contida no solvente.

Figura 23. Teor de água nos extratos obtidos por ATME em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (△) IPA0; (▲) IPA12.

Fonte: Própria autoria.

Rodrigues e Oliveira (2010) relacionaram a umidade contida na matriz oleaginosa e o teor de água no solvente utilizado para a extração do óleo. Quando etanol em grau absoluto foi utilizado como solvente, notou-se que este extraiu maior quantidade de água da matéria-prima do que os solventes mais hidratados. Comportamento também observado nos trabalhos de Abraham et al. (1993), Franco et al. (2007), Sawada (2012) e Capellini (2013), nos quais foram utilizadas as matérias-primas algodão, Rosa rubiginosa, massa expandida de soja e farelo de arroz em *pellets* para extração alcoólica, respectivamente.

Em coincidência ao reportado na literatura citada, o incremento do teor de água nos extratos em relação ao solvente utilizado no processo foi maior quando foram empregados etanol e isopropanol em grau absoluto, como pode ser observado na Figura 23 e na Tabela 27. Nesta tabela também se pode observar a comparação estatística entre os valores médios de quantidade de água na fase extrato para as diferentes condições empregadas. Estas comparações foram realizadas utilizando-se o Teste de Duncan, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 27. Teor de água na fase extrato (% , em massa) para diferentes condições de extração.

Temperatura (°C)	Etanol		Isopropanol	
	Et0	Et6	IPA0	IPA12
60	1,28 ± 0,07 ^B	6,82 ± 0,02 ^A	0,96 ± 0,01 ^B	11,7 ± 0,4 ^B
75	1,52 ± 0,09 ^B	7,0 ± 0,1 ^A	1,29 ± 0,03 ^B	12,6 ± 0,2 ^A
90	1,85 ± 0,08 ^A	7,1 ± 0,2 ^A	2,0 ± 0,2 ^A	13,0 ± 0,1 ^A

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados apresentados na Tabela 27 mostram que o teor de água presente nos extratos aumenta levemente com o aumento da temperatura. Entretanto, em geral, as diferenças estatísticas são pouco proeminentes. Para os solventes etanol e isopropanol em grau absoluto, apenas na temperatura de extração de 90 °C foram observados teores de água na fase extrato superiores estatisticamente. O solvente etanol azeotrópico não resultou em diferença para a faixa de temperatura avaliada e o solvente isopropanol em grau azeotrópico apresentou menor teor de água para a temperatura de 60 °C a qual diferiu estatisticamente das demais.

Diversos autores, trabalhando com os mesmos solventes para extração de óleo de diferentes matrizes oleaginosas, observaram também que, de maneira geral, não há dependência

entre a temperatura e a quantidade de água transferida para o extrato durante o processo de extração de óleo (CAPELLINI, 2013; NAVARRO, 2016, SCHARLACK, 2015; TODA, 2016).

Nesta tese de doutorado foi realizada a determinação do índice de retenção de solução na fase refinado, que é dado pela quantidade de solução extrato aderida à massa de sólidos inertes, expresso em quilogramas de solução aderida por quilogramas de sólidos inertes (TAKEUCHI et al., 2009).

De acordo com Rodrigues e Oliveira (2010), o índice de retenção exerce forte influência sobre o dimensionamento dos equipamentos de extração, uma vez que influencia no número de estágios de contato necessários para a adequada extração de óleo das matrizes oleaginosas, além de impactar no processo de dessolventização da fase refinado.

Na Figura 24 são apresentados os valores de índice de retenção para cada condição experimental estudada e na Tabela 7, os valores médios de índice de retenção são avaliados estatisticamente por meio do Teste de Duncan, ao nível de 95% de confiança.

Figura 24. Índice de retenção em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.

Fonte: Própria autoria

Tabela 28. Índice de retenção (kg solução aderida / kg sólidos inertes) na fase refinado para diferentes condições de extração.

	Etanol		Isopropanol	
	Et0	Et6	IPA0	IPA12
60	$0,98 \pm 0,02$ ^{Ac^b}	$1,03 \pm 0,01$ ^{B^b}	$0,91 \pm 0,05$ ^{Ac}	$1,17 \pm 0,06$ ^{Aa}
75	$1,07 \pm 0,02$ ^{Ab}	$1,20 \pm 0,05$ ^{Aab}	$0,885 \pm 0,002$ ^{Ac}	$1,24 \pm 0,08$ ^{Aa}
90	$1,01 \pm 0,05$ ^{Ab}	$1,20 \pm 0,01$ ^{Aa}	$0,81 \pm 0,03$ ^{Ac}	$1,22 \pm 0,02$ ^{Aa}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 28, é possível observar que a temperatura de processo não exerce influência significativa sobre os valores de índice de retenção nas fases refinado oriundas do processo de extração com os diferentes solventes utilizados. Apenas o etanol azeotrópico demonstrou diferença estatisticamente significativa para a temperatura de 60 °C na qual o índice de retenção foi menor. Quanto ao grau de hidratação do solvente alcoólico, para uma mesma temperatura de processo, observa-se um aumento estatisticamente significativo no índice de retenção quando o solvente utilizado passa de etanol ou isopropanol absoluto para etanol ou isopropanol em grau azeotrópico. Pode-se verificar que entre os solventes absolutos, para o etanol observou-se maior índice de retenção do que para o isopropanol; já para os solventes hidratados o isopropanol azeotrópico, o qual possui maior teor de água em relação ao etanol azeotrópico, forneceu índices de retenção da fase refinado superiores.

Resultados semelhantes foram discutidos nos trabalhos de Navarro et al. (2016) e Capellini (2013), nos quais extraiu-se óleo de gérmen de milho e de farelo de arroz em *pellets*, respectivamente, utilizando-se etanol e isopropanol com diferentes teores de água em sua composição, nas temperaturas de 50 a 80 °C. As autoras observaram que o índice de retenção é dependente do teor de água presente no solvente, ou seja, houve um aumento da quantidade de solução aderida conforme aumentou-se a hidratação do solvente. Estes autores sugeriram que a polaridade dos solventes que contêm grande quantidade de água é maior, resultando em maior interação da fase extrato com as proteínas e carboidratos que compõem a porção hidrofílica da matriz sólida.

Rittner (1992) e Wlsniak et al. (1987) compararam os valores de índice de retenção para os solventes etanol e isopropanol nos processos de extração de óleo de soja e de jojoba,

respectivamente, em relação ao solvente hexano. Os valores de índice de retenção reportados para os solventes alcoólicos apresentaram-se maiores e discutiu-se que a forte atração entre os solventes alcoólicos polares e a matriz sólida seria a responsável pelos resultados.

A partir dos valores de índice de retenção apresentados na Tabela 28 verifica-se que, para o processo de extração de lipídeos de casca da amêndoa de cacau, o fator avaliado que exerce maior influência sobre o índice de retenção é o tipo de solvente utilizado. Os menores índices de retenção foram observados para o solvente isopropanol absoluto e os maiores para o solvente isopropanol em grau azeotrópico, sendo que os valores obtidos foram de 0,81 a 0,91 e 1,17 a 1,24 kg de solução aderida / kg de sólidos inertes, respectivamente.

Cuevas et al. (2009), em estudo sobre o efeito da temperatura e hidratação do solvente etanólico sobre o comportamento de sistemas graxos, sugerem que quando a quantidade de água no solvente etanólico é elevada, podem ser gerados aglomerados moleculares, originários de ligações de hidrogênio entre etanol e água, resultando em uma influência moderada da temperatura sobre o comportamento do sistema lipídico.

As propriedades físicas, como densidade e viscosidade, do extrato também podem ser correlacionadas ao índice de retenção, de acordo com o estudo realizado por Kocatas e Cornell (1954). Neste caso, os autores sugerem que maiores valores de índice de retenção serão observados para extratos mais viscosos resultando em menores rendimentos de extração. Desta forma, equipamentos com maior número de estágios de contato serão necessário para que a fase refinado apresente o menor teor possível de lipídeos residuais (WLSNIAK et al., 1987).

No contexto do presente trabalho, pode-se inferir que com o aumento da temperatura de extração há uma diminuição da viscosidade da fase extrato, dessa forma, o índice de retenção tem seu valor diminuído. Toda (2016) realizou a determinação experimental de densidade e viscosidade dos solventes etanol e isopropanol em grau absoluto e azeotrópico, comprovando que o aumento da temperatura resulta na redução dos valores de ambas as propriedades físicas.

Em geral, os valores do índice de retenção são bastante variáveis e dependem, além do solvente utilizado para extração, principalmente das características do material sólido a ser desengordurado. Na Tabela 29 pode-se observar valores de índice de retenção para diferentes matérias-primas oleaginosas para as quais utilizou-se como solventes de extração etanol e isopropanol, em graus absoluto e azeotrópico. Com base nos dados apresentados nas Tabelas 28 e 29 pode-se inferir que matérias-primas que foram preparadas para o processo de extração, como é o caso dos *pellets* de farelo de arroz e de milho, apresentam valores de índice de retenção menores. Já para as matérias-primas sem preparo prévio, como é o caso da casca da amêndoa de cacau triturada, da borra de café e da torta de macadâmia esses valores são bastante

superiores. Wlsniak et al. (1987) sugerem que o índice de retenção é inversamente proporcional à velocidade com a qual o líquido sai do leito, portanto a partir dos altos valores encontrados no presente estudo pode-se inferir que o leito de casca da amêndoa de cacau apresenta baixa permeabilidade quando comparado a outros materiais que sofreram pré-tratamento.

Tabela 29. Índice de retenção (kg de solução/kg de sólidos inertes) das fases refinado obtidas por extração em batelada, em um estágio, de diferentes matérias-primas.

	Farelo de arroz em <i>pellets</i> (Capellini, 2013) ^a	Borra de café (Toda, 2016) ^b	Gérmen de milho em <i>pellets</i> (Navarro, 2016) ^a	Torta de macadâmia parcialmente desengordurada (Navarro, 2016) ^b
Et0	0,44 – 0,48	1,72 – 1,90	0,41 – 0,43	2,7 – 2,8
Et6	0,55 – 0,57	1,84 – 1,97	0,49 – 0,52	2,88 – 3,1
IPA0	0,36 – 0,42	1,56 – 1,78	0,30 – 0,37	2,1 – 2,3
IPA12	0,67 – 0,68	1,87 – 2,01	0,54 – 0,58	2,84 – 3,2

^a Índices obtidos para temperaturas avaliadas entre 50 e 80 °C

^b Índices obtidos para temperaturas avaliadas entre 60 e 90 °C

Os resultados para extração de compostos lipídicos foram expressos em termos de rendimento, ou seja, porcentagem do composto extraído em relação à quantidade inicial do composto presente na matéria-prima. Para tanto, foi considerado o teor inicial de lipídeos presente na matéria-prima e o teor de residual gordura que permaneceu na fase refinado. Os resultados de rendimento de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau e de teor residual de gordura na fase refinada obtida após o processo de extração utilizando etanol ou isopropanol, em grau absoluto ou azeotrópico, como solventes, são apresentados nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Nas Tabelas 30 e 31 estão apresentadas as análises estatísticas para os valores de rendimento médio de extração de gordura de casca da amêndoa de cacau e teor residual de gordura na fase refinado, respectivamente, para todas as condições avaliadas, pelo Teste de Duncan ao nível de 95% de confiança.

Figura 25. Rendimento relativo de extração (%) de gordura da casca da amêndoa de cacau em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.

Fonte: própria autoria.

Tabela 30. Rendimento médio de extração de óleo (%) para diferentes condições de processo.

Temperatura (°C)	Etanol		Isopropanol	
	Et0	Et6	IPA0	IPA12
60	26 ± 2 ^{Cb}	14,4 ± 0,3 ^{Cd}	32,3 ± 0,6 ^{Ba}	19,1 ± 0,4 ^{Bc}
75	34 ± 3 ^{Ba}	25,6 ± 0,9 ^{Bb}	39 ± 2 ^{Ba}	36,2 ± 0,4 ^{Aa}
90	47 ± 1 ^{Aa}	42 ± 2 ^{Aa}	48 ± 4 ^{Aa}	40 ± 2 ^{Aa}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Figura 26. Teor residual de lipídeos (%) na fase refinado em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (△) IPA0; (▲) IPA12.

Fonte: própria autoria.

Tabela 31. Teor residual de gordura na fase refinado (%) para diferentes condições de processo.

Temperatura (°C)	Etanol		Isopropanol	
	Et0	Et6	IPA0	IPA12
60	15,6 ± 0,1 ^{Ab}	17,7 ± 0,4 ^{Aa}	13,93 ± 0,05 ^{Ac}	16,3 ± 0,4 ^{Ab}
75	13,8 ± 0,2 ^{Bb}	15,4 ± 0,3 ^{Ba}	12,8 ± 0,1 ^{Ac}	13,5 ± 0,2 ^{Bb}
90	11,6 ± 0,4 ^{Ca}	12,8 ± 0,4 ^{Ca}	11,2 ± 0,8 ^{Ba}	12,6 ± 0,6 ^{Ba}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Com base na análise estatística apresentada na Tabela 30, pode-se inferir que o aumento da hidratação do solvente alcoólico influencia negativamente o rendimento de extração de compostos lipídicos, independentemente da temperatura utilizada no processo. Este fato é devido, possivelmente, à diminuição da solubilidade dos componentes lipídicos com o aumento da quantidade de água no sistema. Sendo assim, o solvente isopropanol em grau absoluto

apresentou a maior capacidade de extração de gordura de casca da amêndoa de cacau, enquanto o etanol em grau azeotrópico resultou nos menores valores de rendimento.

Como pode ser visto na Figura 25 e na Tabela 30, o rendimento de extração de lipídeos é favorecido com o aumento da temperatura, obtendo-se os valores máximos na temperatura de 90 °C. Nesta temperatura observou-se variação de 40 a 48% nos valores de rendimento de extração, e não houve diferença significativa entre os quatro tipos de solventes avaliados pelo teste de Duncan a 95% de confiança.

É sabido que o rendimento de extração de lipídeos é decorrente da redução do teor de lipídeos residuais presentes no refinado, com isso tem-se que os valores mínimos de óleo residual foram verificados para os pontos onde os rendimentos máximos foram observados, ou seja, para a temperatura de 90 °C, na qual os valores variaram entre 11,2 e 12,8%, conforme pode ser visualizado na Figura 26 e na Tabela 31.

O favorecimento da extração de lipídeos com elevação da temperatura é provocado por uma série de fatores. De acordo com Rao e Arnold (1956, 1957), as temperaturas elevadas ajudam a perturbação da interação da matriz com o composto de interesse presente na amostra, além disso, reduzem a tensão superficial do solvente melhorando assim a molhabilidade da amostra e permitindo uma dissolução mais rápida do soluto. Temperaturas elevadas também melhoram a taxa de difusão do solvente permitindo extrações rápidas. Entretanto, altas temperaturas podem afetar compostos termolábeis que estão sujeitos a desintegração e degradação hidrolítica.

É possível observar que os rendimentos das extrações de lipídeos não foram muito elevados, visto que ficaram entre aproximadamente 14,4 e 48% para a pior e a melhor condição, respectivamente. Da mesma forma, em consequência do baixo rendimento de extração, foram obtidos refinados ainda bastante ricos em gordura, o que é indesejável.

Entretanto, sabe-se que extratores industriais operam em contracorrente com múltiplos estágios de contato e baixas proporções de solvente em relação ao sólido, dessa forma eles garantem altos rendimentos de extração e refinados em teores de lipídeos iguais ou inferiores a 1% (KEMPER, 2005). Como o trabalho em questão foi realizado considerando-se apenas um único estágio de contato entre sólido e solvente, para que fosse possível alcançar rendimentos semelhantes aos obtidos industrialmente, seria necessária a utilização de um volume maior de solvente em relação ao sólido, o que tornaria o processo inviável economicamente em vista do custo energético para sua recuperação (WLSNIAK; HILLEL; KATZ, 1987). Com isso tem-se que, apesar dos rendimentos de extração apresentados não serem muito altos eles podem ser considerados satisfatórios em vista das condições de processo empregadas neste estudo.

Resultados similares foram observados por Capellini (2013), Scharlack (2015) e Toda (2016) na extração de óleos de farelo de arroz, torta de sementes de girassol e borra de café, respectivamente. Estes trabalhos utilizaram etanol ou isopropanol, em grau absoluto ou azeotrópico, como solventes e temperaturas de processo variando entre 50 e 90 °C e observaram que a presença de água no sistema exerce influência negativa no rendimento da extração.

Tir, Dutta e Badjah-Hadj-Ahmed (2012) estudaram o desempenho da extração de óleo de gergelim e mencionam que a constante dielétrica, a qual mede a polaridade da molécula, é importante na determinação da interação entre o soluto e o solvente. Navarro (2016) também observou resultados de rendimento semelhantes em relação à presença de água e calculou as constantes dielétricas para os solventes, etanol e isopropanol em grau absoluto e azeotrópico, relatando que o isopropanol absoluto apresenta valores de constante dielétrica menores que os dos outros solventes utilizados, independentemente da temperatura, o que poderia justificar o melhor desempenho deste solvente na extração de óleo.

Os rendimentos de extração de gordura também podem estar associados às características da matéria-prima submetida ao processo de extração, a qual foi somente triturada, sem ser submetida a qualquer tipo de pré-tratamento. De fato, a ausência de pré-tratamento pode ter dificultado a permeabilidade do solvente e, consequentemente, a transferência de massa, levando a obtenção de baixos valores de rendimento de extração. Valores semelhantes de rendimento de extração de lipídeos foram obtidos por Navarro (2016) na extração de óleo de torta de macadâmia (6,39 – 66%) e Toda (2016) na extração de óleo de borra de café (0 – 80%), ambos materiais submetidos aos processos de extração sem tratamento prévio.

É possível observar o efeito das características da matriz oleaginosa sobre o rendimento de extração analisando o trabalho de Navarro (2016). Neste estudo a autora submeteu ao processo de extração de lipídeos duas matérias-primas distintas, o gérmen de milho e a torta de macadâmia parcialmente desengordurada, sendo a primeira pré-preparada industrialmente na forma de *pellets* e a segunda sem pré-tratamento. A autora utilizou como solventes etanol e isopropanol, em grau absoluto e azeotrópico, na faixa de temperatura de 50 a 90 °C. Os rendimentos de extração de lipídeos para os diferentes solventes e temperaturas empregados ficaram entre, aproximadamente, 40 e 85% para o gérmen de milho em *pellets* e entre 6,4 e 66% para a torta de macadâmia parcialmente desengordurada. Com isso nota-se que o desempenho dos solventes alcoólicos foi, em geral, melhor quando a matéria-prima se apresentava na forma de *pellets*. Desta forma, pode-se inferir que a matéria-prima sem pré-

tratamento, torta de macadâmia, forneceu baixos valores de rendimentos de extração, assim como os encontrados para a casca da amêndoa de cacau seca triturada utilizada neste trabalho.

Chien et al. (1990) sugerem que o rendimento de extração de óleo diminui significativamente com o aumento do tamanho das partículas. Os autores sugerem que nas partículas finas o óleo fica mais exposto sobre a superfície destas, facilitando a extração. Seth et al. (2007) compararam os rendimentos de extração de óleo de soja a partir de soja laminada e soja moída com diâmetro de partículas médio de 2,44 mm. O rendimento de extração com a soja moída grossa foi menor e os autores atribuíram este comportamento ao fato de as paredes das células não estarem abertas e o material apresentar maior resistência para a difusão do solvente e óleo. Neste contexto, é importante comentar que as operações industriais de pré-tratamento das matrizes oleaginosas, tais como laminação, pelletização, entre outras, visam, de maneira geral, a ruptura de esferossomas ou corpos lipídicos deixando o óleo mais acessível para a extração.

De fato, é importante mencionar que o mecanismo de extração da gordura da matriz sólida envolve uma sequência de etapas: a transferência do solvente sobre a superfície sólida, a difusão do solvente na matriz sólida, a dissolução da gordura vegetal, a difusão da solução composta por gordura e solvente (extrato) para a superfície do sólido e, finalmente, a transferência desta solução a partir da superfície para o seio da solução, através de convecção natural ou forçada (TAKEUCHI et al., 2009). Dessa forma, qualquer que seja a variável (matriz oleaginosa, temperatura, tipo de solvente, agitação do sistema, etc.) que venha a interferir em alguma das etapas acima mencionadas terá impacto no processo de extração e, conseqüentemente, influenciará no rendimento do mesmo.

Os extratos obtidos dos experimentos de extração conduzidas a 90 °C com os solventes Et0, Et6, IPA0 e IPA12 foram submetidos a rotaevaporação dando origem à gordura bruta da casca da amêndoa de cacau seca. Esta gordura foi avaliada quanto ao seu perfil de ácidos graxos e ao seu teor de tocoferóis. Na Tabela 32 pode-se observar os perfis de ácidos graxos dessas gorduras, os quais podem ser comparados com a gordura da CS (Lote 2) obtida pelo método de extração a frio (BLIGH; DYER, 1959) apresentada na Tabela 10.

Tabela 32. Composição em ácidos graxos das gorduras da casca da amêndoa de cacau obtidas após ATME com diferentes solventes.

Ácido Graxo	C x:y ^a	MM ^b (g.mol ⁻¹)	Et0		Et6		IPA0		IPA12	
			Mol (%)	Massa (%) ^c	Mol (%)	Massa (%) ^c	Mol (%)	Massa (%)	Mol (%)	Massa (%)
Mirístico	C14:0	228,38	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0,1
Palmítico	C16:0	256,43	33,1 ± 0,6	30,9 ± 0,6 ^a	32,9 ± 0,4 ^{a,b}	30,8 ± 0,4 ^{a,b}	31,4 ± 0,4	29,3 ± 0,4 ^b	29,7 ± 0,8	27,7 ± 0,7 ^c
Palmitoleico	C16:1	254,41	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Margárico	C17:0	270,46	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Estearico	C18:0	284,49	26,9 ± 0,4	27,9 ± 0,4 ^a	24,0 ± 0,3	25 ± 2 ^a	27,8 ± 0,2	28,8 ± 0,2 ^a	28 ± 1	29 ± 1 ^a
Oléico	C18:1	282,47	32,2 ± 0,8	33,1 ± 0,8 ^b	34 ± 1	35 ± 1 ^a	34,0 ± 0,1	34,9 ± 1 ^{a,b}	34,1 ± 0,4	35,0 ± 0,3 ^{a,b}
Linoleico	C18:2	280,45	6,2 ± 0,4	6,3 ± 0,4 ^a	7 ± 1	7 ± 1 ^a	5,37 ± 0,07	5,49 ± 0,07 ^a	6,3 ± 0,8	6,4 ± 0,8 ^a
Linolênico	C18:3	278,44	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2 ^a	0,62 ± 0,2	0,64 ± 0,01 ^{a,b}	0,41 ± 0,04	0,42 ± 0,04 ^{a,b}	0,36 ± 0,1	0,36 ± 0,1 ^b
Araquídico	C20:0	278,44	0,87 ± 0,01	0,88 ± 0,01 ^b	0,84 ± 0,08	0,86 ± 0,07 ^b	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,01 ^{a,b}	1,02 ± 0,01	1,02 ± 0,01 ^a
Massa molar média (g.mol ⁻¹)			275,3 ± 0,2 ^b		275,3 ± 0,2 ^b		275,8 ± 0,1 ^{a,b}		276,1 ± 0,2 ^a	
Índice de Iodo			42,5 ± 0,7 ^a		45 ± 3 ^a		41,7 ± 0,3 ^a		43 ± 1 ^a	
Razão insaturados/saturados			0,703 ± 0,004 ^a		0,79 ± 0,08 ^a		0,72 ± 0,01 ^a		0,75 ± 0,01 ^a	

Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

n.i. = não identificado

^a Cx:y, x = número de carbonos e y = número de duplas ligações.

^b Massa molar.

Fonte: própria autoria.

Os dados apresentados na Tabela 32 permitem avaliar a influência dos solventes utilizados para extração sobre a qualidade da gordura da casca da amêndoa de cacau obtida após ATME, medida em função da composição em ácidos graxos, massa molar média, índice de iodo e pela relação entre as quantidades de ácidos graxos insaturados e saturados. A partir da análise estatística dos dados verifica-se que, de maneira geral, não há diferença significativa entre os conteúdos dos ácidos graxos, independentemente do tipo de solvente empregado, sendo que as poucas diferenças que aparecem podem estar associadas a variações na composição da matéria-prima e à variabilidade da análise. De acordo com estes dados, o ácido graxo saturado presente majoritariamente é o ácido palmítico (~30%), e o principal ácido graxo insaturado é o ácido oleico (~34%) seguido pelo linoleico (~6%). Estes resultados estão de acordo com os observados para a gordura extraída pelo método a frio (BLIGH e DYER, 1959) da matéria-prima (Lote 2) apresentados na Tabela 10.

Dessa forma, não foram observadas mudanças significativas no perfil de ácidos graxos da gordura da casca da amêndoa de cacau obtidos via extração alcoólica por ATME, assim como observado para óleo de soja (SAWADA et al., 2014), óleo de gérmen de milho (NAVARRO et al., 2016) e óleo de farelo de arroz (CAPELLINI et al., 2017) extraídos com etanol ou isopropanol em temperaturas variando de 60 a 90 °C.

Na Tabela 33 podem ser observados os teores de tocoferóis para a gorduras da casca da amêndoa de cacau obtidas através da ATME com Et0, Et6, IPA0 e IPA12 na temperatura de 90 °C. Nesta tabela pode-se observar que os isômeros ($\beta + \gamma$)-tocopherol estão presentes em maior proporção em todos os óleos, o que está de acordo com o reportado por Firestone (2013).

Tabela 33. Tocoferóis na gordura da casca de cacau obtida por ATME a 90 °C.

	α -Tocoferol		δ -Tocoferol		$(\gamma + \beta)$ -Tocoferol		Tocoferóis totais	
	mg de tocoferol por quilograma de gordura da casca da amêndoa de cacau obtida por ATME							
Et0	390 $\pm$ 8	A	77 $\pm$ 4	C	969 $\pm$ 50	B	1436 $\pm$ 63	B
Et6	485 $\pm$ 77	A	97 $\pm$ 12	B	1236 $\pm$ 151	A	1818 $\pm$ 239	A
IPA0	285 $\pm$ 12	B	51 $\pm$ 1	D	753 $\pm$ 21 d	BC	1089 $\pm$ 38	C
IPA12	282 $\pm$ 34	B	51 $\pm$ 5	D	690 $\pm$ 90 d	C	1023 $\pm$ 128	C

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Nota-se que o etanol azeotrópico é o solvente que possibilita a extração de gordura com maiores teores de tocoferóis quando comparado aos demais solventes alcoólicos empregados. Este comportamento pode ser decorrente da polaridade destes compostos bioativos. De fato, os isômeros de tocoferóis consistem de um anel cromanol com padrões diferentes de substituição de grupos metil, sendo o isômero α caracterizado por três grupos metil, β e γ por dois grupos metil e δ por apenas um substituinte metil (NAVARRO, 2016); a polaridade dos tocoferóis aumenta na ordem $\alpha < \beta = \gamma < \delta$, ou seja, aumenta com a diminuição do número de grupos metil ligados ao anel cromanol (MENDONÇA et al., 2005). De acordo com Chen e Bergman (2005) a quantidade de grupos metil substituintes no anel cromanol pode ter efeito sobre o grau de extratibilidade dos compostos bioativos de acordo como tipo de solvente orgânico utilizado. Estudos prévios de avaliação da extração de vitamina E com solventes com diferentes polaridades foram desenvolvidos por Hu et al. (1996) para a matéria-prima farelo de arroz com solventes hexano e isopropanol, por Miraliakbari e Shahidi (2008) para sete tipos de nozes com solventes de extração hexano e misturas de metanol-clorofórmio e por Navarro et al. (2016) para farelo de grão de milho com etanol e isopropanol em graus absoluto e azeotrópico. Estes estudos indicaram que o emprego de solventes de extração com maior polaridade permitiu maior extração de tocoferóis.

Ainda na Tabela 33 observa-se que, em comparação com os resultados apresentados na Tabela 11 para a gordura da casca da amêndoa de cacau extraída pelo método a frio (BLIGH; DYER, 1959), em geral, a gordura obtida pelo método Bligh e Dyer (1959) apresentou teor de tocoferóis totais inferior a gordura obtida com os solventes etanol em grau absoluto e azeotrópico. Porém, este teor foi estatisticamente maior do que nas gorduras obtidas por ATME com isopropanol absoluto e azeotrópico; comportamento esperado em virtude da polaridade dos solventes utilizados em cada método.

Nas Figuras 27 e 28 são apresentados os rendimentos de extração para compostos fenólicos totais e flavanóis totais, respectivamente. Para ambos os compostos pode-se observar que o aumento da temperatura favoreceu a extração. Isso é confirmado nas Tabelas 34 e 35, nas quais se pode verificar que, estatisticamente, a temperatura de 90 °C foi melhor tanto para a extração de compostos fenólicos totais quanto de flavanóis totais para todos os solventes avaliados. Dentre os solventes utilizados claramente o etanol em grau azeotrópico resultou em melhor desempenho, enquanto os piores rendimentos foram observados com o emprego do isopropanol em grau absoluto.

Navarro et al. (2016) calculou a constante dielétrica para o etanol e o isopropanol em graus absoluto e azeotrópico, nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C, e observou que as constantes dielétricas diminuíram com o aumento da temperatura, indicando que os solventes tornam-se menos polares com o aumento da temperatura. As autoras observaram também que os valores desta propriedade para os solventes avaliados crescem na seguinte ordem: isopropanol absoluto, isopropanol azeotrópico, etanol absoluto e etanol azeotrópico, independentemente da temperatura avaliada.

A constante dielétrica, que é uma medida da polaridade, influencia a capacidade de dissolução de um determinado composto no solvente, deste modo um soluto apolar é mais solúvel num solvente apolar, enquanto um soluto polar é mais solúvel num solvente polar (JOHNSON; LUSAS, 1983). É sabido que os compostos fenólicos são compostos polares, dessa forma, a extração destes seria favorecida para solventes com constantes dielétricas maiores, sendo que este comportamento pode ser claramente observado nas Tabelas 34 e 35.

O tipo de solvente utilizado para favorecer a extração de compostos fenólicos tem sido amplamente investigado, sendo que os solventes alcoólicos têm sido comumente empregados para esta finalidade, isto porque fornecem rendimentos bastante elevados (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007).

Yilmaz e Toledo (2006) empregaram etanol com diferentes graus de hidratação para extração de compostos fenólicos de coprodutos da indústria vinícola. Os autores relataram que o etanol e a água puros não foram efetivos na extração destes biocompostos, entretanto os solventes etanol hidratado em 50, 40 e 30% forneceram maiores rendimentos de extração.

Spigno, Tramelli e De Faveri (2007) também avaliaram o efeito da hidratação do etanol na extração de compostos fenólicos de bagaço de uva. Os autores concluíram que a adição de água ao etanol favorece a extração de compostos fenólicos, porém teores de água muito elevados provocam a redução do rendimento e favorecem a extração de outros compostos não interessantes. Adicionalmente, os autores relatam que o teor de água no solvente não altera composição dos extratos obtidos quanto ao tipo de compostos fenólicos presentes.

Figura 27. Rendimento de extração (%) de compostos fenólicos totais da casca da amêndoa de cacau em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA; (▲) IPA12.

Fonte: própria autoria.

Figura 28. Rendimento de extração (%) de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA; (▲) IPA12.

Fonte: própria autoria.

Tabela 34. Rendimento de extração (%) de compostos fenólicos totais da casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos a 60, 75 e 90 °C.

Temperatura (°C)	Etanol		Isopropanol	
	Et0	Et6	IPA0	IPA12
60	5,7 ± 0,1 ^{Cb}	7,5 ± 0,4 ^{Ca}	1,9 ± 0,3 ^{Cd}	4,40 ± 0,08 ^{Bc}
75	8,0 ± 0,6 ^{Bb}	11,2 ± 0,3 ^{Ba}	3,5 ± 0,4 ^{Bc}	7,3 ± 0,5 ^{Ab}
90	10,5 ± 0,7 ^{Ab}	16,7 ± 0,7 ^{Aa}	5,0 ± 0,6 ^{Ad}	8,4 ± 0,5 ^{Ac}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Considerando o efeito da temperatura sobre a polaridade dos solventes, conforme apresentado por Navarro et al. (2016), era esperado que os rendimentos de extração, tanto de compostos fenólicos totais quanto de flavanóis totais fossem tornando-se menores à medida que a temperatura se elevasse, porém este efeito não foi o observado. Dessa forma, outros fatores, que não a polaridade dos solventes, relacionados ao aumento da temperatura podem estar influenciando positivamente o rendimento de extração, entre eles pode-se citar a redução da viscosidade e da tensão superficial do solvente e melhora da taxa de difusão (RAO; ARNOLD, 1956).

Tabela 35. Rendimento de extração (%) de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos a 60, 75 e 90 °C.

Temperatura (°C)	Etanol		Isopropanol	
	Et0	Et6	IPA0	IPA12
60	9,6 ± 0,4 ^{Cb}	11,4 ± 0,9 ^{Ca}	2,4 ± 0,3 ^{Cd}	7,39 ± 0,7 ^{Bc}
75	13 ± 1 ^{Bb}	18,2 ± 0,1 ^{Ba}	5,01 ± 0,01 ^{Bc}	12,6 ± 0,5 ^{Ab}
90	18 ± 2 ^{Ab}	29,6 ± 0,1 ^{Aa}	7,93 ± 0,06 ^{Ad}	13 ± 1 ^{Ac}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Em coincidência com os resultados apresentados, muitos autores concordam com o fato de que o aumento na temperatura favorece a extração destes tipos de compostos, mas também que, além de um certo valor, os compostos fenólicos podem ser degradados (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; YILMAZ; TOLEDO, 2006). Dessa forma, apesar de observarem maior rendimento de extração em temperaturas maiores, para evitar degradação

dos compostos e melhorar a eficiência energética, muitas vezes são selecionadas temperaturas de operação intermediárias (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007).

Em estudo realizado por Davidov-Pardo, Arozena e Marín-Arroyo (2011) o qual avaliou a cinética das modificações térmicas em extrato de semente de uva, foi feito o acompanhamento da cinética de extração de alguns compostos fenólicos, entre eles catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e ácido gálico para as temperaturas de 60, 90 e 120 °C. Nestas temperaturas as catequinas e epicatequinas apresentaram maior rendimento de extração na menor temperatura, enquanto o ácido gálico e a procianidina B1 e B2 forneceram melhores resultados para a temperatura de 120 °C. Assim, tem-se que cada tipo de composto fenólico apresenta um comportamento específico em função da temperatura a qual é exposto, influenciando de forma diferente os rendimentos das extrações.

Analizando as Tabelas 34 e 35 é possível observar que para todas as condições estudadas o rendimento de extração de flavanóis totais (FLA) foi superior ao rendimento de extração de compostos fenólicos totais, dessa forma podemos inferir que, em geral, os parâmetros de extração empregados foram mais seletivos para os FLA do que para os FT.

Nas Figuras 29 e 30 estão apresentados os teores de compostos fenólicos totais e flavanóis totais, respectivamente, nos extratos obtidos.

A metodologia empregada para determinação de FLA é muito mais seletiva do que a empregada para determinação de FT. Neste sentido, vale ressaltar que a técnica utilizada neste presente trabalho para a quantificação das flavanóis totais foi a proposta por Payne et al. (2010) a qual utiliza como reagente DMAC. Este reagente reage com proantocianidinas, epicatequinas e catequinas entre outros flavanóis fazendo com que estes compostos apresentem absorbância a 640 nm. Desta forma, tem-se que a Figura 30 apresenta o teor de uma mistura de proantocianidinas, catequinas e epicatequinas. Do mesmo modo, a metodologia de Singleton et al. (1999) avalia a mistura de todos os compostos fenólicos extraídos e, apesar de fornecer bons indicativos do comportamento dos compostos fenólicos, costuma superestimar seus teores na amostra uma vez que o reagente Folin - Ciocalteu reage também com alguns compostos não fenólicos (Payne et al., 2010).

Os principais compostos fenólicos encontrados no cacau são os flavanóis, que incluem catequinas, epicatequinas e procianidinas, e estes últimos foram descritos como os que aparecem em maior quantidade (PAYNE et al., 2010). Entretanto, investigando a composição dos flavanóis presentes na casca da amêndoa de cacau em análise em UPLC-MS/MS (Tabela 17) percebeu-se que, ao contrário do que era esperado para um derivado do cacau, a casca da amêndoa de cacau possui teor maior de epicatequina do que de procianidina B2.

Diversos autores relataram respostas variadas com catequina, epicatequina e polímeros para DMAC (PAYNE et al., 2010). Foi descoberto por Payne et al. (2010) que, em concentrações iguais, a catequina e a epicatequina produziram respostas semelhantes, enquanto que os três padrões de procianidina B2, trímero e tetrâmero renderam respostas menores. Devido às diferenças nas respostas entre monômero e oligômeros tem-se que, conhecendo a composição em flavanóis da matéria-prima empregada no processo de extração, o uso de epicatequina como padrão para análises espectrofotométricas forneceu valores mais coerentes.

Observando o teor de compostos fenólicos totais e flavanóis totais, pode-se inferir que as fases extrato obtidas são ricas nestes biocompostos, apresentando assim grande valor do ponto de vista nutricional.

Figura 29. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.

Fonte: própria autoria.

Figura 30. Teor de flavanóis totais nos extratos oriundo da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: (□) Et0; (■) Et6; (Δ) IPA0; (▲) IPA12.

Fonte: própria autoria

Em complementação às análises do teor de compostos fenólicos totais e flavanóis totais, os extratos obtidos por ATME a 90 °C com os solventes Et0, Et6, IPA0 e IPA12 foram submetidos a análise de UPLC-MS/MS. Esta análise permitiu avaliar o efeito dos solventes na extração de catequina, epicatequina procianidina B2, cafeína e teobromina. Os resultados podem ser observados na Tabela 36.

Tabela 36. Composição e rendimento de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) para extratos obtidos por ATME a 90°C.

	Et0	Et6	IPA0	IPA12	Et0	Et6	IPA0	IPA12
Flavanóis	mg de flavanóis por grama de extrato				Rendimento de extração (mg de flavanóis por grama de CS)			
(+)-catequina	0,03 ± 0,001 ^b	0,038 ± 0,003 ^a	0,019 ± 0,001 ^c	0,029 ± 0,001 ^b	0,077 ± 0,002 ^b	0,10 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,004 ^c	0,077 ± 0,002 ^b
(-)-epicatequina	0,451 ± 0,009 ^b	0,53 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,03 ^c	0,37 ± 0,01 ^c	1,15 ± 0,01 ^b	1,35 ± 0,07 ^a	0,79 ± 0,07 ^c	0,94 ± 0,03 ^c
procianidina B2	0,111 ± 0,000 ^b	0,15 ± 0,01 ^a	0,051 ± 0,003 ^d	0,079 ± 0,003 ^c	0,282 ± 0,004 ^b	0,37 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,01 ^d	0,20 ± 0,01 ^c
Alcaloides	mg de alcaloides por grama de extrato				Rendimento de extração (mg de alcaloides por grama de CS)			
Teobromina	1,8 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,2 ^a	1,28 ± 0,04 ^c	1,3 ± 0,1 ^c	4,6 ± 0,3 ^b	5,5 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,1 ^c	3,4 ± 0,3 ^c
Cafeína	0,37 ± 0,02 ^{a,b}	0,40 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,01 ^c	0,32 ± 0,04 ^{b,c}	0,94 ± 0,04 ^{a,b}	1,04 ± 0,04 ^a	0,70 ± 0,04 ^c	0,82 ± 0,08 ^{b,c}

Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$), para cada parâmetro avaliado, sendo eles o teor de composto e o rendimento de extração.

Fonte: própria autoria.

Nota-se na Tabela 36 que o desempenho dos solventes na extração de flavanóis e alcaloides está relacionado com a polaridade dos mesmos, sendo que o etanol forneceu maior rendimento de extração do que o isopropanol e, dentre eles, os solventes hidratados forneceram melhores resultados, ou seja, quanto maior a polaridade do solvente, melhor o seu desempenho na extração dos biocompostos avaliados.

Em estudo realizado por Chirinos et al. (2007) o qual avaliou, entre outras coisas, a eficiência de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos de mashua, pode-se verificar que o metanol foi melhor do que o etanol que por sua vez forneceu rendimentos superiores ao do hexano. Liyana-Pathirana e Shahidi (2005), estudando o desempenho de metanol, etanol e acetona com diferentes teores de água na extração de compostos fenólicos de trigo, concluíram que o etanol hidratado foi o mais eficiente. Lapornik, Prošek e Golc Wondra (2005) comparando a eficiência dos solventes etanol e metanol com 30% de água e apenas água na extração de compostos fenólicos dos subprodutos do processamento de frutas vermelhas, notaram que, dentre os solventes avaliados, o etanol hidratado foi o que forneceu melhores resultados.

Os resultados mostrados nesta tese de doutorado quanto a extração de flavanóis corroboram com os apresentados pelos autores supracitados, com os quais pode-se concluir que uma maior polaridade reflete em maior extração de compostos fenólicos. No entanto, dentre os solventes testados pelos autores, a água sozinha não apresenta o melhor resultado, entretanto seu uso combinado com outros solventes orgânicos possibilitou que um meio moderadamente polar fosse criado garantindo a eficiência na extração de polifenóis (LAPORNIK; PROŠEK; GOLC WONDRA, 2005; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005).

Pan, Niu e Liu (2003) avaliaram o emprego de diferentes solventes (acetona, acetona+água, metanol, metanol+água, etanol, etanol+água e água) na extração de cafeína de folhas de chá verde. Quando os solventes foram utilizados puros o maior rendimento de extração foi obtido com o metanol, seguido da água e do etanol, no entanto quando adicionou-se 50% de água, o etanol hidratado foi o que forneceu melhor desempenho entre todos os solventes avaliados, seguido do metanol hidratado e da água. Este resultado está de acordo com os apresentados nesta tese de doutorado a qual, de acordo com a Tabela 36, indica que o etanol azotrópico apresenta melhor desempenho na extração de alcaloides, seguido do etanol absoluto, isopropanol azeotrópico e isopropanol absoluto, sendo este último o de menor polaridade e menor constante dielétrica conforme descrito por Navarro et al. (2006).

Dessa forma, dentre os solventes avaliados neste trabalho, tanto para a extração de alcaloides quanto para a extração de flavanóis, o etanol demonstrou melhor desempenho sendo o etanol azeotrópico o que resultou em maiores rendimentos de extração destes biocompostos.

5.3.2 *Cinética de extração da gordura da casca da amêndoa de cacau seca a pressão atmosférica utilizando Et0 e Et6*

Com os dados obtidos no primeiro conjunto experimental pode-se observar que, apesar do bom desempenho dos diferentes solventes na extração de compostos fenólicos, flavanóis totais e lipídeos, os rendimentos apresentaram-se abaixo do esperado, em especial quanto à extração de lipídeos. A casca da amêndoa de cacau apresentou rendimento bastante inferior quando comparada às demais matérias-primas estudadas pelo grupo de pesquisa no qual a aluna está inserida, mesmo quando comparada àquelas que também não são pré-preparadas para extração, como a borra de café, por exemplo (TODA, 2016). Além disso não foi possível observar uma estabilização do rendimento de extração de lipídeos nas temperaturas mais elevadas para os diferentes solventes empregados. Tais fatos levaram a proposição do estudo da cinética de extração de lipídeos a pressão atmosférica. Foram conduzidos 56 experimentos de ATME utilizando a casca da amêndoa de cacau seca (Lote 3) empregando etanol em graus absoluto e azeotrópico, com razão mássica sólido:solvente de 1:3, temperaturas de 75 e 90 °C e tempos de extração de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. Todos os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata. As condições avaliadas são apresentadas na Tabela 37 juntamente com os valores de desvios relativos médios, os quais se referem ao cálculo do balanço de massa, ou seja, à comparação entre as massas do ponto de mistura inicial e as massas das duas fases obtidas, extrato e refinado. Os desvios calculados apresentados na Tabela 37 são baixos, indicando precisão e boa qualidade e repetibilidade na obtenção dos dados experimentais.

Tabela 37. Condições empregadas e desvios relativos médios para os experimentos de cinética de extração sob pressão atmosférica.

Solvente de Extração	T (°C)	Teor de água no Solvente alcoólico (% em massa)	Faixa de δ (desvio relativo) médio ^a (%)	Tempo de extração (min)	Repetições
Etanol absoluto	75,0 ± 0,1	0,19 ± 0,02	2,59 – 2,85	30	2
		0,19 ± 0,01	0,05 – 0,77	60	4
		0,19 ± 0,02	0,06 – 1,04	120	2
		0,21 ± 0,02	1,05 – 1,18	180	2
		0,21 ± 0,01	0,01 – 0,05	240	2
	90,0 ± 0,1	0,19 ± 0,02	2,15 – 2,21	30	2
		0,18 ± 0,01	1,31 – 1,43	60	4
		0,17 ± 0,02	1,05 – 1,33	120	4
		0,21 ± 0,02	1,01 – 1,35	180	2
		0,17 ± 0,02	1,01 – 1,35	240	4
Etanol azeotrópico	75,0 ± 0,1	5,68 ± 0,03	0,25 – 0,81	30	2
		6,05 ± 0,01	0,84 – 1,12	60	4
		6,33 ± 0,03	0,63 – 0,69	120	2
		5,98 ± 0,02	0,37 – 0,66	180	4
		5,87 ± 0,02	0,61 – 0,70	240	2
	90,0 ± 0,1	5,87 ± 0,02	0,32 – 0,99	30	2
		6,05 ± 0,01	1,03 – 1,24	60	4
		6,31 ± 0,02	0,43 – 0,78	120	2
		5,98 ± 0,02	0,42 – 0,77	180	4
		5,87 ± 0,02	1,01 – 1,43	240	2

^aDesvio calculado conforme Equação 7.

Fonte: própria autoria.

Ainda na Tabela 37 nota-se que os teores de água nos solventes de extração são os esperados para os tipos de solventes usados.

Na Figura 31 são apresentados os resultados referentes à quantidade de água presente na fase extrato proveniente da ATME em função do tempo de extração, para ambos os solventes. Como previamente discutido na Seção 5.3.1, nota-se que, mesmo utilizando-se etanol em grau absoluto, há presença de água na fase extrato, o que indica que esta fração de água é proveniente da matéria-prima, devido sua umidade intrínseca, uma vez que esta não foi submetida à secagem antes das extrações.

Figura 31. Teor de água na fase extrato em função do tempo de processo: Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6, em massa – 75 °C; (Δ) Et6 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Como discutido anteriormente, em estudo realizado por Rodrigues e Oliveira (2010), quando etanol em grau absoluto foi utilizado como solvente, notou-se que este extraiu maior quantidade de água da matéria-prima do que os solventes mais hidratados. Este comportamento também foi observado nos trabalhos de Abraham et al. (1993), Capellini (2013), Franco et al. (2007) e Sawada, (2012), nos quais foram utilizadas as matérias-primas sementes de algodão, rosa rubiginosa, massa expandida de soja e farelo de arroz em *pellets*, respectivamente.

Os dados apresentados na Figura 31 mostram que as variáveis tempo e temperatura não exerceram influência no teor de água presente nos extratos, o que pode ser confirmado com a análise estatística realizada pelo teste de Duncan a 95% de confiança, apresentada na Tabela 38. Sendo assim, pode-se inferir que o equilíbrio de extração de água é atingido a partir de 30 minutos de extração, independentemente do tipo de solvente e temperatura.

Tabela 38. Teor de água na fase extrato (%) para diferentes condições de processo.

Temperatura (°C)	Et0		Et6	
	75 °C	90 °C	75 °C	90 °C
30	1,29 ± 0,08 ^{A, a}	2,2 ± 0,3 ^{A, a}	7,1 ± 0,1 ^{A, a}	7,40 ± 0,06 ^{A, a}
60	1,51 ± 0,09 ^{A, a}	1,85 ± 0,08 ^{A, a}	7,3 ± 0,2 ^{A, a}	7,0 ± 0,2 ^{A, a}
120	1,7 ± 0,2 ^{A, a}	2,4 ± 0,9 ^{A, a}	9 ± 1 ^{A, a}	7,7 ± 0,4 ^{A, a}
180	1,6 ± 0,2 ^{A, a}	2,5 ± 0,2 ^{A, a}	7,9 ± 0,1 ^{A, a}	7,5 ± 0,2 ^{A, a}
240	1,6 ± 0,2 ^{A, b}	2,58 ± 0,08 ^{A, a}	8,1 ± 0,6 ^{A, a}	7,7 ± 0,3 ^{A, a}

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúsculas iguais na mesma linha (para cada solvente) não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Neste conjunto de experimentos determinou-se também o índice de retenção de solução na fase refinado (quilogramas de solução aderida por quilogramas de sólidos inertes) sendo os valores apresentados na Figura 32 (TAKEUCHI et al., 2009).

Figura 32. Índice de retenção em função do tempo de processo: (■) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6 – 75 °C; (Δ) Et6 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Na Figura 32 é possível notar que tanto a temperatura quanto o tempo de processo não exercem influência sobre o índice de retenção de solução nas fases refinado oriundas do processo de extração com os diferentes solventes utilizados. No entanto, este índice é influenciado pelo grau de hidratação do solvente, havendo um aumento da quantidade de

solução aderida com o aumento de sua hidratação, sugerindo que o aumento da polaridade dos solventes pela adição de água resulta em maior interação da fase extrato com as proteínas e carboidratos que compõem a porção hidrofílica da matriz sólida (CAPELLINI, 2013; NAVARRO et al., 2016).

Quanto à extração de gordura da casca da amêndoa de cacau, os resultados deste segundo conjunto experimental foram expressos em termos de rendimento de extração (g de gordura/kg de casca) e rendimento relativo de extração (% mássica, porcentagem de gordura extraída com relação a massa de gordura presente inicialmente na matéria-prima) e estão apresentados na Figura 33 e na Tabela 39, respectivamente, eles permitem visualizar a tendência de comportamento do rendimento relativo com o decorrer do tempo

Figura 33. Cinética de extração de lipídeos por ATME da casca da amêndoa de cacau seca. Dados Experimentais Et0: ▲, 90.0 ± 0.1 °C; ■, 75.0 ± 0.1 °C. Dados Experimentais Et6: △, 90.0 ± 0.1 °C; □, 75.0 ± 0.1 °C. Valores calculados:-----, modelo proposto por Perez et al. (2011).

Fonte: própria autoria.

Tabela 39. Rendimento relativo médio de extração de lipídeos (%) para diferentes condições de processo.

Tempo (minutos)	Et0		Et6	
	75 °C	90 °C	75 °C	90 °C
30	26 ± 3 ^{Ca}	31 ± 2 ^{Da}	16,3 ± 0,2 ^{Cb}	29,0 ± 0,2 ^{Ca}
60	42 ± 2 ^{Ba}	51 ± 3 ^{Ca}	24 ± 1 ^{Bb}	42 ± 2 ^{Ba}
120	55 ± 4 ^{Aa}	62 ± 2 ^{Ba}	28,4 ± 0,1 ^{Bb}	43 ± 2 ^{Ba}
180	57 ± 4 ^{Aa}	65 ± 2 ^{ABa}	36 ± 3 ^{Aa}	49 ± 3 ^{Aa}
240	61 ± 1 ^{Ab}	70,1 ± 0,6 ^{Aa}	40 ± 2 ^{Ab}	50 ± 1 ^{Aa}

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha (para cada solvente) não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Como pode ser observado na Figura 33, o rendimento de extração de lipídeos em função do tempo aumenta até que notar-se uma estabilização, a qual indica que a condição de equilíbrio no processo de extração foi atingida. Conforme previamente discutido por Toda et al. (2016) e Kamimura et al. (2017), este comportamento ocorre devido ao fato de no início da extração sólido-líquido ocorrer um processo de lavagem dos lipídeos superficiais, o qual resulta em uma alta taxa de extração. No entanto, com o decorrer do tempo, a taxa de extração sofre redução, predominando neste período a etapa difusional, a qual se torna o mecanismo predominante no processo, atingindo-se assim a condição de equilíbrio, condição na qual obtém-se o máximo rendimento, para uma determinada temperatura, solvente e razão sólido:líquido.

O aumento da temperatura proporcionou maior rendimento de extração, porém não interferiu no tempo necessário para atingir o equilíbrio. Sendo assim, nota-se que a condição de equilíbrio foi alcançada a partir de 120 minutos de extração para o etanol absoluto e a partir de 180 minutos de extração para o etanol azeotrópico. Isto pode ser observado mais precisamente através dos dados apresentados na Tabela 39, a qual apresenta análise estatística para comparação dos valores de rendimento para os diferentes tempos de extração, pelo teste de Duncan a 95% de confiança.

Os rendimentos máximos observados se deram nas extrações conduzidas a 90 °C após o equilíbrio ser atingido. Nestas condições observou-se rendimento de extração de 49 a 50% para o etanol azeotrópico e de 62 a 70% para o etanol absoluto.

O aumento da temperatura provoca um consequente aumento na extração de gordura da casca da amêndoa de cacau. De acordo com Rao e Arnold (1957, 1956), como já comentado anteriormente, as temperaturas elevadas auxiliam na interação entre o solvente e o composto de interesse presente na amostra, além de reduzir a tensão superficial do solvente melhorando a

molhabilidade da amostra e de melhorar a taxa de difusão, permitindo uma dissolução mais rápida do soluto.

Em relação aos diferentes graus de hidratação do solvente, nota-se que a presença de água causa redução da extração de gordura, independente da temperatura do processo, o que está relacionado, possivelmente, com a redução da solubilidade dos lipídeos, por conta da alteração da polaridade do solvente. Estudos realizados por Toda et al. (2016) com extração de óleo de massa expandida de soja e por Rodrigues e Oliveira (2010) e Oliveira et al. (2012b) para *pellets* de farelo de arroz relataram o mesmo comportamento.

O aumento do rendimento de extração com o tempo ocorre devido à migração do óleo contido na matéria-prima para a fase extrato no início do processo, porém com o passar do tempo essa taxa de migração diminui, atingindo a condição de equilíbrio (TODA et al., 2016). No entanto, cada matéria-prima possui características próprias, como composição, formato, disponibilidade dos componentes, assim como cada solvente possui uma capacidade de extração diferente, sendo esses fatores que interferem no tempo necessário para se atingir o equilíbrio.

Resultados semelhantes também foram observados em estudos utilizando hexano para extração de óleo de girassol (BAÜMLER; CRAPISTE; CARELLI, 2010; PEREZ; CARELLI; CRAPISTE, 2011) e óleo de canola (FERNÁNDEZ et al., 2012) e também utilizando etanol para a extração de óleo de torta de oliveira (MEZIANE; KADI, 2008) entre outros. Todos os autores citados observaram uma transferência de compostos para o solvente no início do processo e, em seguida, uma redução da taxa de transferência, tendendo a estabilização, momento característico do máximo rendimento obtido.

Como comentado anteriormente, a elevação do rendimento de extração é acompanhada da redução do teor de lipídeos na fase refinado. Desta forma, analisando os valores de óleo residual nas fases refinado observa-se os valores mínimos nas melhores condições de extração lipídica, ou seja, na temperatura de 90 °C e após condição de equilíbrio obtiveram-se teores de gordura residual variando entre 6,2 e 8,2% para o etanol absoluto e entre 10,7 e 10,8% para o etanol azeotrópico. Estes resultados podem ser observados na Figura 34.

Figura 34. Teor de gordura residual na fase refinado em função do tempo de processo: (■) Et0 – 75 °C; (▲) Et0 – 90 °C; (□) Et6 – 75 °C; (△) Et6 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Nos extratos obtidos após condição de equilíbrio pré-estabelecida (180 minutos, 75 e 90 °C) foram determinados os teores de flavanóis totais, compostos fenólicos totais, catequinas, epicatequinas, procianidinas B2, cafeína e teobromina nos extratos oriundos de extrações conduzidas por 180 minutos, a 75 e 90 °C, empregando como solventes Et0 e Et6.

Os teores obtidos para compostos fenólicos totais e flavanóis totais nos extratos estão apresentados nas Figuras 35 e 36, respectivamente.

Figura 35. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: (□) Et0; (▨) Et6.

Fonte: própria autoria

Figura 36. Teor de flavanóis totais nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos em função da temperatura de processo: Et0; (▨) Et6.

Fonte: Própria autoria.

Para ambos os compostos pode-se observar que aumento da temperatura favoreceu levemente sua extração, pois os extratos obtidos a 90 °C apresentam teores superiores. No entanto, essa diferença não é considerada significativa para o teor de flavanóis, com base na

análise estatística pelo teste de Duncan ao nível de 95% de confiança, a qual está apresentada na Tabela 40. O mesmo ocorre para a comparação entre a hidratação dos solventes utilizados, não havendo diferença significativa entre os solventes na extração de biocompostos para as duas análises realizadas.

Tabela 40. Teor de compostos fenólicos totais (mg equivalente de ácido gálico/g de extrato) e flavanóis totais (mg equivalente de epicatequina/g de extrato) nos extratos oriundos da extração de casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos a 75 e 90 °C, sob pressão atmosférica.

	Temperatura (°C)	Et0	Et6
Fenólicos totais	75	1,59 ± 0,03 ^{Ba}	1,54 ± 0,02 ^{Ba}
	90	1,781 ± 0,005 ^{Aa}	1,73 ± 0,03 ^{Aa}
Flavanóis totais	75	0,44 ± 0,02 ^{Aa}	0,494 ± 0,006 ^{Aa}
	90	0,48 ± 0,02 ^{Aa}	0,52 ± 0,02 ^{Aa}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna e por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan, para cada análise apresentada.

Fonte: própria autoria.

Os resultados apresentados mostram-se adequados com relação à comparação entre os teores de compostos fenólicos totais e teores de flavanóis totais, sendo o primeiro superior, o que é coerente visto que a análise de fenólicos totais abrange uma gama maior de compostos do que a análise de flavanóis totais.

Com base no teor de compostos fenólicos e flavanóis totais na matéria-prima apresentados nas Seções 5.1.9 e 5.1.10 para o Lote 3, respectivamente, e nos extratos analisados (Tabela 40) foi possível calcular o rendimento de extração destes biocompostos, conforme descrito na seção 4.2.7, sendo os valores apresentados na Figura 37.

Figura 37. Rendimento de extração: (a) fenólicos totais (FT) e (b) flavanóis totais (FLA) da casca da amêndoa de cacau (%) em função da temperatura de processo: (□) Et0; (▨) Et6.

Fonte: própria autoria.

Para ambos os compostos pode-se observar que aumento da temperatura favoreceu levemente sua extração, porém para a extração de flavanóis totais a diferença de rendimento não é considerada significativa, com base na análise estatística pelo teste de Duncan ao nível de 95% de confiança. Em relação à hidratação do solvente também se nota um pequeno aumento

no rendimento com o aumento da hidratação, porém também não considerado significativo. As análises estatísticas encontram-se na Tabela 41.

Tabela 41. Rendimento relativo de extração (%) de compostos fenólicos totais e de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau por ATME utilizando Et0 e Et6, a 75 e 90 °C.

	Temperatura (°C)	Et0	Et6
Fenólicos totais	75	24,5 ± 0,6 ^{Ba}	23,8 ± 0,5 ^{Ba}
	90	27,8 ± 0,1 ^{Aa}	26,8 ± 0,4 ^{Aa}
Flavanóis totais	75	33 ± 1 ^{Aa}	36,8 ± 0,3 ^{Aa}
	90	36 ± 2 ^{Aa}	39 ± 0,2 ^{Aa}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna e por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan, para cada análise apresentada.

Fonte: própria autoria.

Analisando os rendimentos de extração na Tabela 41, nota-se que o emprego do solvente etanol, tanto em grau absoluto quanto em grau azeotrópico, é mais seletivo para a extração de compostos da classe dos flavanóis do que para os fenólicos em geral. Em complementação às análises do teor de compostos fenólicos totais e flavanóis totais, os extratos obtidos por ATME empregando Et0 e Et6 como solvente com tempo de extração de 180 minutos foram submetidos a análise de UPLC-MS/MS, esta análise permitiu avaliar o efeito dos solventes e da temperatura na extração de catequina, epicatequina procianidina B2, cafeína e teobromina. Os resultados podem ser observados na Tabela 42.

Tabela 42. Composição e rendimento de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) nos extratos oriundos da ATME empregando etanol absoluto e etanol azeotrópico como solventes, obtidos em extrações conduzidas por 3 horas.

Composto	ET0		ET6	ET0	ET6
	Temperatura (°C)	Teor no extrato (mg/g de extrato)		Rendimento de extração (mg/g de CS)	
Flavanóis					
(+) catequina	75	0,0091 ± 0,0001 B,b	0,0125 ± 0,0008 B,a	0,0284 ± 0,0001 B,b	0,0388 ± 0,0002 B,a
	90	0,0130 ± 0,0004 A,b	0,0141 ± 0,0003 A,a	0,0407 ± 0,0001 A,b	0,04394 ± 0,00004 A,a
(-)-epicatequina	75	0,21 ± 0,06 A,a	0,25 ± 0,02 A,a	0,660 ± 0,003 B,b	0,784 ± 0,003 B,a
	90	0,24 ± 0,02 A,a	0,28 ± 0,04 A,a	0,738 ± 0,001 A,b	0,8756 ± 0,0007 A,a
procianidina B2	75	0,06 ± 0,02 A,a	0,077 ± 0,006 A,a	0,1742 ± 0,0006 B,b	0,238 ± 0,001 B,a
	90	0,07 ± 0,01 A,a	0,089 ± 0,009 A,a	0,2179 ± 0,0003 A,b	0,2797 ± 0,0002 A,a
Alcaloides					
Cafeína	75	0,18 ± 0,02 A,a	0,21 ± 0,02 A,a	0,560 ± 0,002 B,b	0,646 ± 0,003 B,a
	90	0,19 ± 0,05 A,a	0,24 ± 0,02 A,a	0,5847 ± 0,0009 A,b	0,7415 ± 0,0006 A,a
Teobromina	75	1,1 ± 0,2 B,b	1,2 ± 0,1 A,a	3,51 ± 0,01 B,b	3,86 ± 0,02 B,a
	90	1,35 ± 0,04 A,a	1,4 ± 0,2 A,a	4,233 ± 0,006 A,b	4,365 ± 0,004 A,a

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, para cada composto, a nível de 95% de significância pelo teste de Duncan. Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si, a nível de 95% de significância pelo teste de Duncan.

Na Tabela 42 nota-se que, em geral, o aumento da temperatura não influenciou o teor do composto presente nos extratos, no entanto quando avalia-se o rendimento de extração, as extrações conduzidas a 90 °C forneceram rendimentos estatisticamente superiores às extrações conduzidas a 75 °C para todos os solventes avaliados. Com relação ao desempenho dos solventes, o solvente Et6 forneceu valores superiores tanto em relação aos teores dos compostos avaliados no extrato, quanto ao rendimento de extração. O que era esperado visto que, como já discutido anteriormente, os biocompostos avaliados são polares, dessa forma a extratibilidade tende a ser maior para solventes mais polares, o que é o caso do etanol azeotrópico em comparação com o etanol absoluto.

Os dados experimentais apresentados na Figura 33 foram usados para ajustar os parâmetros do modelo matemático proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011). Baixos valores de desvios relativos médios foram obtidos, mostrando boa concordância do modelo proposto com os dados experimentais. Os parâmetros A e B₁ (Equação 28) podem ser vistos na Tabela 43.

Tabela 43. Parâmetros do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) ajustados aos dados experimentais da cinética de extração de lipídeos por ATME da casca da amêndoa de cacau e os coeficientes de difusão.

Solvente	T (°C)	Coeficiente A		Coeficiente B ₁ x 10 ⁴		ARD ^b	D ^c (m ² s ⁻¹) x 10 ¹²
		Valor estimado	CV ^a	Valor estimado	CV ^a		
Et0	75	1,0206	3,74	3,2	6,96	1,55	1,41
	90	1,0281	4,67	4,8	5,83	0,65	2,14
Et6	75	0,9706	4,90	2,2	12,11	1,66	1,00
	90	1,0115	6,28	3,4	7,52	3,42	1,53

^a Coeficiente de variação

^b Desvio relativo médio calculado de acordo com a Equação 17.

^c Coeficiente de difusão.

Para o ajuste dos parâmetros aos dados experimentais, considerou-se que a etapa de lavagem ocorreu nos primeiros 3600 s de contato entre a CS e o solvente. Nesta etapa, verificou-se que os rendimentos de extração de gordura variaram de 60 a 84% do máximo rendimento de extração (Tabela 39). Toda, Sawada e Rodrigues (2016) aplicando este mesmo modelo para avaliar a cinética de extração de óleo de massa expandida de soja à pressão atmosférica utilizando etanol absoluto e hidratado como solventes, consideraram os primeiros 600 segundos como tempo de lavagem para todas as temperaturas avaliadas, obtendo-se rendimento de extração de óleo entre 69 a 85% do máximo rendimento de extração. Neste trabalho a condição

de equilíbrio foi atingida muito mais rapidamente, tendo sido alcançada em 40 e 60 minutos para o etanol absoluto e hidratado respectivamente, tempo este bastante inferior ao observado na cinética de extração de gordura de CS por ATME, fato que justifica a diferença do tempo de lavagem empregado.

Na Tabela 43 pode-se observar que o parâmetro A não sofre influência da temperatura nem do solvente empregado no processo de extração, já o coeficiente B_1 e, conseqüentemente o coeficiente de difusão, calculado a partir de B_1 conforme Equação 30, são influenciados pelos dois parâmetros de processo avaliados. Ambos apresentam aumento com a elevação da temperatura e redução com o aumento do grau de hidratação do solvente. O mesmo comportamento foi previamente reportado por Kamimura et al. (2017) e Toda, Sawada e Rodrigues (2016).

Os valores do coeficiente de difusão da gordura da CS estão coerentes em termos de magnitude com os reportados por Fernández et al. (2012) e Dibert e Cros (1989), os quais calcularam este parâmetro para a extração de óleo de sementes *in natura* de canola e café verde, respectivamente, apenas trituradas. Entretanto, foram menores do que os valores reportados por Kamimura et al. (2017) e Toda, Sawada e Rodrigues (2016) que estudaram a cinética da extração de óleo de massa expandida de soja e farelo de arroz em *pellets*, respectivamente, ambas matérias-primas industrialmente tratadas para facilitar a permeabilidade do solvente e do extrato. Esta diferença na magnitude dos coeficientes de difusão é esperado, uma vez que a casca da amêndoa de cacau seca, utilizada para a realização dos experimentos desta tese de doutorado, é um resíduo agroindustrial o qual, como mencionado na Seção 5.1, passou apenas pelo processo de redução de tamanho (moagem), não tendo sido submetida a nenhum pré-preparo para a extração.

Com o intuito de avaliar o efeito do processo de extração por ATME sobre os sólidos desengordurados e agregar valor aos subprodutos do processo de extração, a fase refinado foi caracterizada quanto ao seu teor de proteínas e o seu índice de solubilidade de nitrogênio.

Na Tabela 44 são apresentados os teores de proteínas contidos na fase refinado, oriundas do processo de extração da gordura da casca da amêndoa de cacau por ATME com Et0 e Et6, a 75 e 90 °C, após atingir o equilíbrio (180 min), bem como a análise estatística realizada ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Tabela 44. Teor de proteínas (% em base seca) na casca da amêndoa de cacau (Lote 3) e nas fases refinado oriundas das ATME para as diferentes condições de processo avaliadas após atingir condição de equilíbrio.

Temperatura (°C)		Et0	Et6
	CS	16,6 ± 0,5 ^C	16,6 ± 0,5 ^A
75	16,6 ± 0,5 ^b	17,7 ± 0,1 ^{Ba}	16,5 ± 0,4 ^{Ab}
90	16,6 ± 0,5 ^b	18,66 ± 0,06 ^{Aa}	16,35 ± 0,04 ^{Ab}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria

Os teores de proteínas nas fases refinado obtidas com a utilização do etanol absoluto como solvente de extração são estatisticamente superiores ao teor de proteínas presente inicialmente na matriz oleaginosa (CS); entretanto, para o etanol azeotrópico não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao teor da matéria-prima. A elevação do teor de proteínas nos refinados oriundos do processo de extração com Et0 ocorre pelo fato deste solvente extrair maior quantidade de lipídeos, causando concentração das proteínas na fase refinado. Quando este comportamento não é observado, como é o caso dos refinados oriundos dos processos de extração por ATME com Et6, pode indicar que esteja ocorrendo extração simultânea de proteínas e lipídeos.

Quanto ao efeito da temperatura, apenas com o solvente absoluto há diferença estatisticamente significativa; para este solvente nota-se uma tendência de aumento do teor proteínas com o aumento da temperatura, o que deve estar associado ao aumento do rendimento da extração de compostos lipídicos.

Os valores do índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) nas fases refinado obtidas na condição de equilíbrio foram determinados a fim de avaliar o impacto das variáveis do processo de extração nas propriedades funcionais da fração proteica. Conforme discutido na Seção 5.1.6, a curva de solubilidade para a casca da amêndoa de cacau demonstrou que o pH 11, é o mais adequado para a determinação do ISN das fases refinado, visto que este indicou maior solubilização de proteínas, desta forma atribuindo menores incertezas associadas à esta condição experimental.

Na Figura 38 podem ser observados os resultados para o ISN no pH 11,0 para a CS (Lote 3) e para as fases refinado provenientes do processo de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau na condição de equilíbrio, utilizando Et0 e Et6 como solventes, nas

temperaturas de 75 e 90 °C. Os ISN foram comparados estatisticamente utilizando o Teste de Duncan ao nível de 95% de confiança, e estão apresentados na Tabela 45.

Figura 38. Índice de solubilidade de nitrogênio da casca da amêndoa de cacau (Lote 3) e das fases refinado oriundas das ATME para as diferentes condições de processo avaliadas após atingir condição de equilíbrio, determinados no pH 11: (□) Et0; (▨) Et6; - - - matéria-prima.

Fonte: própria autoria.

Tabela 45. Índice de solubilidade de nitrogênio da casca da amêndoa de cacau (Lote 3) e das fases refinado oriundas das ATME para as diferentes condições de processo avaliadas após atingir condição de equilíbrio, determinados no pH 11.

Temperatura (°C)		Et0	Et6
CS		47 ± 2 A	47 ± 2 A
75	47 ± 2 a	32 ± 1 Bb	25,07 ± 0,06 Bc
90	47 ± 2 a	25,3 ± 0,4 Cb	20,4 ± 0,3 Cc

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Observando os dados apresentados na Tabela 45, pode-se verificar uma redução do ISN com o aumento da temperatura e do grau de hidratação do solvente. Dessa forma, pode-se inferir que o processo de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau utilizando solventes alcoólicos por ATME afeta negativamente a funcionalidade das proteínas dos sólidos desengordurados nas temperaturas avaliadas.

O efeito negativo do contato da matéria-prima com solventes alcoólicos sobre a solubilidade proteica foi justificado por Moure et al. (2006). Os autores citaram que a solubilidade sofre influência do balanço hidrofílico/hidrofóbico na superfície das proteínas; dessa forma, como os solventes empregados apresentam uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica eles alteram o balanço de cargas das proteínas e enfraquecem as interações hidrofóbicas entre as partes apolares podendo levar a redução do ISN (SESSA; NELSEN; SNYDER, 1998).

A influência da temperatura sobre o ISN do material quando solventes alcoólicos são utilizados foi reportada por Vojdani (1996), o qual sugeriu que a solubilidade das proteínas diminui em função da desnaturação de parte delas, o que ocorre como consequência do contato do material com solventes orgânicos miscíveis com água em altas temperaturas. Para a matéria-prima casca da amêndoa de cacau é sabido (conforme apresentado na Seção 5.1.6) que os tipos de proteínas em maior concentração são as globulinas e albuminas. Em estudo conduzido por Marcone, Kakuda e Yada (1998), o qual avaliou a temperatura de desnaturação de globulinas em várias matérias-primas, observou-se que este efeito é notado principalmente na faixa de temperatura de 88 a 97 °C. Dessa forma, na temperatura de extração de 90 °C parte das globulinas pode ter desnaturado o que levou a uma redução considerável do ISN para esta condição, em relação a matéria-prima e às extrações conduzidas a 75 °C.

O estudo do efeito da extração de lipídeos com solventes alcoólicos sobre a solubilidade proteica de matrizes vegetais foi estudado por Capellini et al. (2017), Navarro e Rodrigues (2018) e Navarro *et al.* (2016), para extrações de óleo de *pellets* de farelo de arroz, de torta de macadâmia, e farelo de gérmen de milho, respectivamente. Em todos os trabalhos os autores notaram que os sólidos desengordurados obtidos após o processo de extração com etanol absoluto e etanol azeotrópico apresentaram ISN menor do que o da matéria-prima, sendo que com o solvente mais polar, Et6, este efeito foi ainda mais acentuado. Os mesmos autores ainda notaram que o aumento da temperatura de extração também prejudicou o ISN sendo que, em geral, temperaturas mais elevadas levaram a uma redução mais acentuada do ISN. Tais

resultados corroboram com os reportados nesta tese de doutorado para as extrações conduzidas por ATME a 75 e 90 °C, com Et0 e Et6.

5.3.3 Determinação do coeficiente de partição da gordura da casca da amêndoa de cacau seca a pressão atmosférica utilizando Et0 e Et6

Com base na determinação do tempo necessário para se atingir a condição de equilíbrio, realizada na Seção 5.3.2, deu-se sequência aos experimentos para determinação dos coeficientes de partição da gordura da casca da amêndoa de cacau. As condições de extração empregadas neste conjunto experimental podem ser observadas na Tabela 46. Foram conduzidos 43 experimentos utilizando a casca da amêndoa de cacau seca proveniente do Lote 3, etanol em grau absoluto e azeotrópico como solventes, razões mássicas sólido:solvente que variaram em 1:2,5, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:10, temperaturas de 75 e 90 °C e tempo de extração de 3 horas (conforme definido na seção 5.3.2). Todas as condições experimentais foram repetidas, no mínimo, duas vezes.

Como pode ser observado na Tabela 46, os valores de desvio relativo (δ) médio, calculados de acordo com a Equação 7, variaram de 0,15 a 4,87%. Estes desvios são referentes ao cálculo do balanço de massa, ou seja, à comparação entre as massas do ponto de mistura inicial e as massas das duas fases obtidas, extrato e refinado. Os baixos valores de desvio calculados, ou seja, inferiores a 10%, indicam que os experimentos foram realizados com precisão e apresentaram resultados com boa qualidade e repetibilidade.

Para cada experimento foram realizadas análises das fases extrato e refinado sendo que na fase extrato monitorou-se o teor de água e para fase refinado calculou-se o índice de retenção de solução e determinou-se o teor residual de lipídeos.

Na Figura 39 são apresentados os resultados referentes à quantidade de água na fase extrato proveniente de cada condição experimental, sendo estes resultados coerentes com os reportados na Figura 31.

Tabela 46. Condições empregadas nos experimentos de determinação de coeficiente de partição de gordura sob pressão atmosférica.

Solvente de extração	T (°C)	Razão mássica sólido:solvente	Teor de água no solvente alcoólico (% em massa)	Faixa de δ (desvio relativo) médio ^a (%)	Repetições
Etanol absoluto	75,0 $\pm$ 0,1	1:2,5	0,13 $\pm$ 0,02	1,98 – 3,87	2
		1:3	0,13 $\pm$ 0,02	1,46 – 2,95	3
		1:4	0,13 $\pm$ 0,02	0,93 – 1,75	2
		1:5	0,13 $\pm$ 0,02	1,13 – 1,87	2
		1:10	0,18 $\pm$ 0,02	0,56 – 0,92	2
Etanol absoluto	90,0 $\pm$ 0,1	1:2,5	0,18 $\pm$ 0,02	1,35 – 2,76	3
		1:3	0,13 $\pm$ 0,02	0,94 – 3,39	2
		1:4	0,13 $\pm$ 0,02	0,21 – 0,87	2
		1:5	0,18 $\pm$ 0,02	0,15 – 1,04	3
		1:10	0,18 $\pm$ 0,02	0,56 – 1,79	2
Etanol azeotrópico	75,0 $\pm$ 0,1	1:2,5	6,07 $\pm$ 0,06	2,74 – 4,87	2
		1:3	6,07 $\pm$ 0,06	0,45 – 2,53	2
		1:4	6,07 $\pm$ 0,06	1,12 – 1,77	2
		1:5	6,07 $\pm$ 0,06	0,69 – 1,56	2
		1:10	6,11 $\pm$ 0,02	0,86 – 2,97	2
Etanol azeotrópico	90,0 $\pm$ 0,1	1:2,5	6,07 $\pm$ 0,06	1,49 – 2,19	2
		1:3	6,07 $\pm$ 0,06	1,18 – 3,59	2
		1:4	6,07 $\pm$ 0,06	1,45 – 4,57	2
		1:5	6,07 $\pm$ 0,06	1,26 – 2,38	2
		1:10	6,11 $\pm$ 0,02	0,72 – 1,59	2

^a Desvio calculado conforme Equação 7.

Fonte: própria autoria.

Figura 39. Teor de água na fase extrato em função da razão mássica sólido:solvente empregada na ATME: (Δ) Et0 – 75 °C; ($\blacktriangle$) Et0 – 90 °C; ($\square$) Et6 – 75 °C; ($\blacksquare$) Et6 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Como já discutido na Seção 5.3.1, diversos autores relatam que o etanol em grau absoluto extrai maior quantidade de água da matriz oleaginosa em comparação ao emprego do etanol azeotrópico (ABRAHAM et al., 1993; CAPELLINI et al., 2017; FRANCO et al., 2007; SAWADA, 2012). Da mesma forma, como o reportado na literatura citada, o incremento do teor de água nos extratos em relação ao solvente utilizado no processo foi maior quando foi empregado etanol em grau absoluto, como pode ser observado na Figura 39 e na Tabela 47. Nesta tabela também se pode observar a comparação estatística entre os valores médios de quantidade de água na fase extrato para as diferentes condições empregadas. Estas comparações foram realizadas utilizando-se o Teste de Duncan, ao nível de 95% de confiança. Ainda na Figura 39 pode-se notar que, conforme ocorre um aumento da proporção de solvente em relação a matéria-prima, verifica-se uma tendência de decréscimo na quantidade de água na fase extrato, isso acontece, pois, a água extraída do material dilui-se no solvente, dessa forma quanto mais solvente utilizado, mais a água estará diluída, fato que justifica a queda observada. Este efeito é notado para ambos os solventes empregados, embora para o solvente etanol em grau absoluto a redução no teor de água do extrato com o aumento da proporção de solvente seja um pouco mais acentuada.

Tabela 47. Teor de água na fase extrato (% , em massa) para diferentes condições de extração.

Solvente	Temperatura (°C)	Razão mássica sólido:solvente				
		1:2,5	1:3	1:4	1:5	1:10
Et0	75	3,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4 ^{B,b}	2,1 ± 0,2	1,65 ± 0,05	0,92 ± 0,06
		C,a		B,bc	B,c	B,d
	90	3,5 ± 0,1	2,9 ± 0,1 ^{B,b}	2,3 ± 0,3 ^{B,c}	1,67 ± 0,09	1,29 ± 0,08
		C,a			B,d	B,d
Et6	75	7,7 ± 0,3	7,49 ± 0,02	7,2 ± 0,3 ^{A,a}	7,60 ± 0,08	6,74 ± 0,06
		B,a	A,a		A,ab	A,b
	90	8,7 ± 0,4	8,2 ± 0,3 ^{A,ab}	7,8 ± 0,3	7,56 ± 0,07	7,11 ± 0,09
		A,a		A,bc	A,bc	A,c

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Na Tabela 47 pode-se notar também que as principais diferenças estatísticas observadas se dão na comparação da razão mássica sólido:solvente empregada na ATME; o efeito da temperatura, a qual variou de 75 para 90 °C, em geral, não forneceu resultados estatisticamente diferentes para o teor de água dos extratos obtidos. Como já discutido anteriormente, diversos autores, trabalhando com os mesmos solventes para extração de óleo de diferentes matrizes oleaginosas, também não observaram diferença quanto ao efeito da temperatura (CAPELLINI et al., 2017; NAVARRO et al., 2016; NAVARRO; RODRIGUES, 2018). Dessa forma, pode-se inferir que não há relação entre a temperatura e a quantidade de água transferida para o extrato durante o processo de extração de lipídeos.

Para este conjunto experimental também foi realizada a determinação do índice de retenção de solução na fase refinado. O índice de retenção tem grande impacto sobre o número de estágios de contato necessários para a adequada extração de óleo de matrizes vegetais, pois impactará no dimensionamento do extrator e na etapa de dessolventização do material desengordurado (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2010).

Na Figura 40 são apresentados os valores de índice de retenção para cada condição experimental avaliada e na Tabela 48 são observadas as médias destes valores e a comparação estatística utilizando-se o Teste de Duncan, ao nível de 95% de confiança.

Figura 40. Índice de retenção em função da razão mássica sólido:solvente empregada na ATME: (Δ) Et0 – 75 °C; ($\blacktriangle$) Et0 – 90 °C; ($\square$) Et6 – 75 °C; ($\blacksquare$) Et6 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Tabela 48. Índice de retenção na fase extrato (kg de solução aderida/ kg de sólidos desengordurados) para diferentes razões mássicas sólido:solvente.

Solvente	Temperatura (°C)	Razão mássica sólido:solvente				
		1:2,5	1:3	1:4	1:5	1:10
Et0	75	1,1 ± 0,1 ^{B,a}	1,04 ± 0,5 ^{B,a}	1,07 ± 0,08 ^{B,a}	1,06 ± 0,02 ^{BC,a}	1,10 ± 0,03 ^{B,a}
	90	1,0 ± 0,1 ^{B,a}	0,94 ± 0,01 ^{C,a}	0,94 ± 0,09 ^{B,a}	0,90 ± 0,01 ^{C,a}	1,1 ± 0,1 ^{B,a}
Et6	75	1,31 ± 0,1 ^{A,b}	1,30 ± 0,02 ^{A,b}	1,29 ± 0,04 ^{A,b}	1,25 ± 0,02 ^{A,b}	1,51 ± 0,07 ^{A,a}
	90	1,04 ± 0,01 ^{B,b}	1,02 ± 0,04 ^{BC,b}	1,01 ± 0,04 ^{B,b}	1,11 ± 0,1 ^{AB,ab}	1,22 ± 0,07 ^{B,a}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

Com base nos resultados apresentados na Figura 40 e na Tabela 48, é possível observar a razão mássica sólido:solvente empregada no processo de extração não exerce influência estatisticamente significativa sobre os valores de índice de retenção nas fases refinado oriundas do processo de extração para os diferentes solventes utilizados. Apenas o uso do etanol azeotrópico resultou em diferença estatisticamente significativa para ambas as temperaturas avaliadas na razão sólido:solvente 1:10, o qual forneceu maiores valores de índice de retenção se comparado com as demais razões avaliadas. Com relação as temperaturas avaliadas, em geral nota-se que o aumento da temperatura leva a uma redução do índice de retenção. Pode-se notar ainda que, para uma mesma temperatura de processo e mesma razão mássica sólido:solvente, observa-se um aumento estatisticamente significativo no índice de retenção quando o solvente utilizado passa de etanol absoluto para etanol em grau azeotrópico.

Para este conjunto experimental, os resultados para extração de compostos lipídicos foram expressos em termos do particionamento da gordura, ou seja, a quantidade de gordura extraída presente no extrato (C^{FE}), calculada por balanço de massa, e o teor de gordura residual que permaneceu na fase refinado (C^{FR}), determinado experimentalmente, ambos expressos em base livre de compostos lipídicos. Os resultados obtidos para o etanol em grau absoluto e azeotrópico, como solventes, são apresentados nas Figuras 41 e 42, respectivamente. Os teores de gordura da fase extrato e a gordura residual na fase refinado são apresentados na Tabela 49.

Figura 41. Diagrama de distribuição da gordura para sistemas compostos por cascas de amêndoas de cacau e etanol absoluto: (Δ) Et0 – 75 °C; ($\blacktriangle$) Et0 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Figura 42. Diagrama de distribuição da gordura para sistemas compostos por cascas de amêndoas de cacau e etanol azeotrópico: (□) Et0 – 75 °C; (■) Et0 – 90 °C.

Fonte: própria autoria.

Tabela 49. Teores de gordura nas fases extrato (C^{FE}) e nas fases refinado (C^{FR}) para extrações conduzidas sob pressão atmosférica, nas temperaturas de 75 e 90 °C e diferentes razões mássicas sólido:solventes empregando etanol em grau absoluto e azeotrópico como solvente.

Solvente	Temperatura (°C)	Razão mássica sólido:solvente									
		1:2,5		1:3		1:4		1:5		1:10	
		$C^{FE*}_x 10^2$	C^{FR**}_x	C^{FE*}_x	C^{FR**}_x	C^{FE*}_x	C^{FR**}_x	C^{FE*}_x	C^{FR**}_x	C^{FE*}_x	$C^{FR**}_x 10^2$
			10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	
Et0	75	$2,0 \pm$	$15,8 \pm$	$1,93 \pm$	$14,2 \pm$	$1,76 \pm$	$12,9 \pm$	$1,58 \pm$	$11,9 \pm$	$1,06 \pm$	$8,2 \pm$
		$0,2^a$	$0,9^A$	$0,02^a$	$0,6^B$	$0,06^{ab}$	$0,4^{BC}$	$0,01^b$	$0,4^C$	$0,03^c$	$0,6^D$
	90	$2,9 \pm$	$12,6 \pm$	$2,8 \pm$	$11,0 \pm$	$2,49 \pm$	$8,6 \pm$	$2,00 \pm$	$7,78 \pm$	$1,15 \pm$	$6,0 \pm$
		$0,1^a$	$0,5^A$	$0,1^a$	$0,7^B$	$0,01^b$	$0,1^C$	$0,01^c$	$0,06^C$	$0,01^d$	$0,1^D$
Et6	75	$0,59 \pm$	$21,3 \pm$	$0,59 \pm$	$21,06 \pm$	$0,59 \pm$	$20,3 \pm$	$0,56 \pm$	$19,3 \pm$	$0,44 \pm$	$16 \pm$
		$0,08^a$	$0,5^A$	$0,02^a$	$0,09^B$	$0,02^a$	$0,7^{AB}$	$0,01^a$	$0,2^B$	$0,04^b$	1^C
	90	$0,98 \pm$	$20,0 \pm$	$0,99 \pm$	$18,8 \pm$	$0,99 \pm$	$18,0 \pm$	$0,94 \pm$	$16 \pm$	$0,81 \pm$	$11,8 \pm$
		$0,07^a$	$0,2^A$	$0,09^a$	$0,5^{AB}$	$0,08^a$	$0,3^B$	$0,03^a$	1^C	$0,02^b$	$0,3^D$

Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan para C^{FE} .
Médias seguidas por letra maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan para C^{FR} .

*kg gordura/kg fase extrato em base livre de gordura

**kg gordura/kg fase refinado em base livre de gordura

Fonte: própria autoria.

Nas Figuras 41 e 42 pode-se observar que para ambos os solventes a capacidade de extração de gordura melhora quanto aumenta-se a temperatura e a quantidade relativa de solvente em relação ao sólido. Isto também pode ser verificado na Tabela 49, na qual nota-se que o aumento da quantidade de solvente no processo de extração resulta em refinados mais pobres em gordura.

Entretanto, embora o teor de lipídeos na fase refinado diminua com a diminuição da razão sólido:solvente, o teor do composto na fase extrato é estatisticamente igual para as razões 1:2,5, 1:3 e 1:4 para Et0 a 75 °C, para 1:2,5, 1:3 para Et0 a 90 °C e para 1:2,5, 1:3, 1:4 e 1:5 para Et6 a 75 e 90 °C. Para explicar este comportamento pode-se fazer um paralelo da ATME com o processo de dessorção, no qual as moléculas do soluto estão presentes em uma superfície sólida e são transferidas para uma fase fluida. Este processo baseia-se no princípio de que o composto dessorvido apresentará maior afinidade pela fase fluida tornando possível sua migração da superfície sólida, a distribuição do composto entre as fases envolve um equilíbrio de fases. No entanto, cada solvente apresenta um limite de solubilidade do composto dessorvido e quando este limite de solubilidade é atingido a fase fluida encontra-se saturada e, desta forma, o composto não consegue mais dessorver da superfície sólida (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016; TREYBAL, 1986). Para cada solvente e temperatura avaliados este limite é alcançado quando não é possível diferir estatisticamente o teor do composto de interesse na fase extrato. Quando esta saturação é atingida a redução no teor de gordura residual na fase refinado ocorre devido ao aumento da quantidade de solvente utilizada no processo ATME.

O conceito de adsorção/dessorção também foi utilizado por Bessa et al. (2017) para descrever a extração de óleo de farelo de arroz utilizando etanol absoluto como solvente. Os autores reportam que a natureza polar do solvente pode restringir a máxima capacidade de extração de componentes não polares, no caso lipídeos, esta justificativa explica o fato do comportamento do solvente etanol azeotrópico (Figura 42), ser diferente do etanol em grau absoluto (Figura 41), sendo que para este último a saturação da fase fluida ocorre apenas para as maiores proporções sólido:solvente avaliadas. Ainda analisando as Figuras 41 e 42 e aplicando o conceito de dessorção é possível notar que as curvas são convexas para cima o que, de acordo com a classificação de Brunauer, indica são desfavoráveis a dessorção do soluto (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016).

Pode-se observar ainda nas Figuras 41 e 42 que maiores proporções de solvente fornecem uma força motriz maior para a extração do composto de interesse e, com isso, nota-se que para proporções menores de solvente, o teor de óleo residual na fase refinado é maior.

Estes resultados estão de acordo com os reportados por Thobani e Diosady (1997) e Perez, Carelli e Crapiste (2011) para extração de óleo de canola e de girassol, respectivamente.

A constante de equilíbrio definida como sendo a relação entre o material extraível presente na fase extrato em equilíbrio e o material extraível residual na fase refinado é dada por:

$$k = \frac{C^{FE}}{C^{FR}} \quad (38)$$

Onde k é o coeficiente de partição ou distribuição da gordura, C^{FR} é o teor de gordura residual na fase refinado e C^{FE} é o teor de gordura presente na fase extrato, ambos em base livre de gordura.

Os coeficientes de partição variaram em função da razão sólido:solvente, do tipo de solvente e da temperatura empregada, conforme pode ser observado na Tabela 50, que apresenta também a comparação estatística aplicando-se o Teste de Duncan, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 50. Coeficiente de partição nas temperaturas de 75 e 90 °C e diferentes razões mássicas sólido:solvente em extrações empregando etanol em grau absoluto e azeotrópico como solvente.

Solvente	Temperatura (°C)	Coeficiente de partição (k)				
		1:2,5	1:3	1:4	1:5	1:10
Et0	75	0,13 ±	0,135 ±	0,136 ±	0,133 ±	0,13 ±
		0,02 ^{B,a}	0,004 ^{B,a}	0,008 ^{B,a}	0,005 ^{B,a}	0,01 ^{B,a}
	90	0,23 ±	0,25 ± 0,02	0,290 ±	0,258 ±	0,193 ±
		0,02 ^{A,c}	^{A,bc}	0,006 ^{A,b}	0,001 ^{A,bc}	0,006 ^{A,d}
Et6	75	0,028 ±	0,028 ±	0,029 ±	0,029 ±	0,026 ±
		0,004 ^{D,a}	0,001 ^{D,a}	0,002 ^{D,a}	0,001 ^{D,a}	0,004 ^{D,a}
	90	0,049 ±	0,0525 ±	0,055 ±	0,0577 ±	0,069 ±
		0,004 ^{C,b}	0,007 ^{C,ab}	0,006 ^{C,ab}	0,005 ^{C,ab}	0,004 ^{C,a}

Médias seguidas por letra maiúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95% de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: própria autoria.

O coeficiente de partição está relacionado ao nível de dificuldade para extrair o composto de interesse da matriz sólida (BAÜMLER; CARRÍN; CARELLI, 2016). Pode-se observar na Tabela 50 que a temperatura tem forte influência sobre o coeficiente de partição, sendo que quanto maior a temperatura maior o k , isso por que em temperaturas mais elevadas a gordura tende a migrar com mais facilidade para a fase extrato, deixando um refinado mais pobre em lipídeos. Em comparação ao tipo de solvente empregado, nota-se que o etanol em grau absoluto fornece coeficientes de partição maiores, ou seja, tem maior facilidade em extrair a gordura da matriz sólida. Este comportamento era esperado devido a polaridade do etanol absoluto ser menor do que a do etanol azeotrópico, desta forma, este primeiro solvente tem mais afinidade com a gordura presente na casca da amêndoa de cacau o que melhora sua capacidade de extração. Na Tabela 51 também é possível observar que a relação sólido:solvente também é importante, sendo a capacidade de extração maior quanto maior for a proporção de solvente. O mesmo comportamento foi observado por Baümler, Carrín e Carelli (2016) os quais avaliaram os coeficientes de partição do óleo de girassol para extrações empregando etanol e hexano como solventes, a 50 e 60 °C, com razões sólido:solvente de 1:4, 1:11 e 1:18. Os valores dos coeficientes de partição apresentados por estes autores para o solvente etanol ficaram na mesma ordem de grandeza dos apresentados nesta tese de doutorado para o solvente etanol em grau absoluto, porém vale ressaltar que a matriz sólida tem grande influência sobre a forma como o composto de interesse se particionará entre as fases e pode impactar consideravelmente no coeficiente de partição (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016; PEREIRA et al., 2016).

Com isso pode-se inferir que o solvente etanol em grau absoluto, sob temperaturas mais elevadas, fornece coeficientes de partição maiores, e que o solvente etanol em grau azeotrópico se satura mais facilmente com a gordura. Os valores de k maiores obtidos para o solvente etanol em grau absoluto, se comparado com o solvente etanol em grau azeotrópico, indicam que o emprego do solvente sem hidratação em processos de extração exigiria um número menor de estágios de contato para o esgotamento do sólido, tornando-o mais apropriado para o processo de extração em relação aos aspectos técnicos.

5.4 Comparação entre as técnicas de extração de gordura e biocompostos de casca da amêndoa de cacau: extração com líquido pressurizado (PLE) e a pressão atmosférica (ATME)

Neste trabalho foram empregadas duas técnicas distintas de extração, a extração com líquido pressurizado (PLE) e a extração a pressão atmosférica (ATME). A PLE foi realizada utilizando o Lote 1 de matéria-prima, etanol em grau absoluto em diferentes tempos de extração, sendo os resultados utilizados para comparação os obtidos após atingir a condição de equilíbrio (50 e 30 minutos de extração para avaliação de lipídeos e biocompostos, respectivamente) nomeados como PLEEQ. A ATME foi conduzida de acordo com grupos experimentais distintos, sendo que apenas parte dos experimentos serão utilizados nesta seção. Do primeiro grupo experimental, o qual utilizou o Lote 2 de matéria-prima, serão utilizados os experimentos conduzidos por 1 hora (ATME1), com etanol absoluto como solvente e temperaturas de extração de 60, 75 e 90 °C; e do segundo conjunto de experimentos (Lote 3), serão utilizados experimentos conduzidos por 3 horas (ATME3), com etanol absoluto como solvente e temperaturas de 75 e 90 °C. A razão mássica sólido:solvente para ambas as técnicas foi fixada em 1:3. Nesta seção, as técnicas serão comparadas quanto ao seu desempenho da extração de lipídeos, tocoferóis, flavanóis totais, flavanóis e alcaloides e seu impacto sobre a fração proteica da fase refinado. Vale ressaltar que serão reapresentados dados já mostrados em seções anteriores, mas que aparecem novamente aqui com a finalidade de comparação.

Na Tabela 51 pode-se observar os valores de rendimento relativo de extração de gordura da casca da amêndoa de cacau com etanol pressurizado (PLEEQ), e os rendimentos relativos de extração a pressão atmosférica após se atingir a condição de equilíbrio (ATME3) e com uma hora de extração (ATME1) empregando etanol absoluto como solvente.

Tabela 51. Comparação entre os rendimentos de extração de lipídeos através das técnicas PLE e ATME empregando etanol absoluto como solvente.

Temperatura (°C)	Rendimento relativo de extração (%) PLEEQ	Rendimento relativo de extração (%) ATME3	Rendimento relativo de extração (%) ATME1
60 °C	86,2 ± 0,4	não determinado	26 ± 2
75 °C	89,8 ± 0,6	55 ± 4	34 ± 3
90 °C	90,6 ± 0,5	65 ± 2	47 ± 1

Fonte: Própria autoria.

No que diz respeito a extração de lipídeos, pode-se observar na Tabela 51 que a PLE foi mais eficiente do que a ATME, obtendo rendimentos maiores em intervalos de tempo menores. Os rendimentos apresentados pela PLEEQ foram de 191 a 331% superiores a ATME1 e de 138 a 160% superiores ATME3, sendo possível notar que conforme a temperatura de extração aumenta a diferença entre os rendimentos diminui, ou seja, menores diferenças entre as técnicas de extração foram observadas na temperatura de 90 °C. Menores intervalos de tempo para atingir o equilíbrio eram esperados, uma vez que na PLE o emprego de pressão mais elevada provoca redução da tensão superficial do solvente o que o ajuda a penetrar mais rapidamente o poro da matriz e realizar a extração. A pressão mais elevada durante a PLE também controla problemas relacionados às bolhas de ar encontradas no interior do sólido, a existência dessas bolhas impede que o solvente atinja o soluto, sendo que as duas condições apresentadas aumentam a cinética de solubilidade e dessorção do composto de interesse (MUSTAFA; TURNER, 2011; ROSTAGNO et al., 2009).

Já o efeito das técnicas sobre o coeficiente de difusão da gordura é pequeno, como pode ser observado na Tabela 52, sendo aproximadamente 4 e 6 vezes menor para a ATME3 para as temperaturas de 75 e 90 °C, respectivamente.

Tabela 52. Comparação dos parâmetros do modelo proposto por Perez, Carelli e Crapiste (2011) ajustados aos dados experimentais de cinética de extração de lipídeos da casca da amêndoa de cacau por PLE e ATME e os coeficientes de difusão.

	T (°C)	Coeficiente A		Coeficiente B ₁ x 10 ³		ARD ^b	De ^c (m ² s ⁻¹) x 10 ¹²
		Valor estimado	CV ^a	Valor estimado	CV ^a		
PLEEQ	60	1,0397	5,08	1,02	8,92	0,50	4,56
	75	1,0493	7,19	1,33	11,88	0,85	5,94
	90	1,0861	4,36	2,72	10,07	0,46	12,15
ATM3	75	1,0206	3,74	0,32	6,96	1,55	1,41
	90	1,0281	4,67	0,48	5,83	0,65	2,14

^a Coeficiente de variação

^b Desvio relativo médio calculado de acordo com a Equação 17.

^c Coeficiente de difusão.

Fonte: própria autoria.

As gorduras obtidas após a extração PLEEQ e ATM1 foram caracterizadas quanto ao seu teor de tocoferóis e os resultados podem ser observados na Tabela 53. Nota-se que as diferenças nos teores alcançados foram pequenas; para os isômeros minoritários (α e δ) a ATME1 resultou em teores maiores, o que pode estar associado a quantidade do composto na matéria-prima, visto que a gordura da CS do Lote 2, utilizada para ATME1 apresentou teores de tocoferóis mais elevados do que a gordura da CS do Lote 1, utilizada para PLEEQ. Já quando analisamos os teores dos isômeros $\beta+\gamma$ e o teor de tocoferóis totais observa-se que a PLEEQ foi mais eficiente, mas a diferença observada é pouco relevante, fato que indica que as técnicas de extração empregadas não influenciaram significativamente o teor de tocoferóis das gorduras obtidas.

Tabela 53. Comparação entre os teores de tocoferóis na gordura da casca da amêndoa de cacau obtida por PLEEQ e ATME1 na temperatura de 90 °C.

Padrões	90 °C	
	Técnica de extração	mg de tocoferol/kg de gordura da CS
α-tocoferol	PLEEQ	372 $\pm$ 17
	ATME1	390 $\pm$ 8
δ-tocoferol	PLEEQ	66.9 $\pm$ 0.6
	ATME1	77 $\pm$ 4
(γ+β)-tocoferol	PLEEQ	1051 $\pm$ 2
	ATME1	969 $\pm$ 50
Total tocoferóis	PLEEQ	1490 $\pm$ 108
	ATME1	1436 $\pm$ 63

Fonte: própria autoria.

A Tabela 54 apresenta os resultados obtidos na extração de flavanóis totais para PLEEQ, ATM1 e ATM3, mostrando o rendimento relativo de extração destes compostos. A comparação na extração destes compostos se fosse realizada por rendimento de extração (mg eq. epicatequina/mg CS) ficaria bastante comprometida, visto a diferença do teor de flavanóis totais apresentada pela matéria-prima do Lote 3, a qual foi aproximadamente 55% inferior ao teor dos Lotes 1 e 2. Dessa forma optou-se por fazer a comparação com base no rendimento relativo de extração de flavanóis totais.

Tabela 54. Comparação entre os rendimentos relativos de extração de flavanóis totais da casca da amêndoa de cacau obtida por PLEEQ, ATME1 e ATM3.

Temperatura (°C)	Rendimento relativo de extração (%) PLEEQ	Rendimento relativo de extração (%) ATME3	Rendimento relativo de extração (%) ATME1
60 °C	25,5 ± 0,4	---	9,6 ± 0,4
75 °C	30,3 ± 0,1	33 ± 1	13 ± 1
90 °C	38,3 ± 0,2	36 ± 2	18 ± 2

Fonte: própria autoria.

Analisando a Tabela 54, é possível observar que os resultados da PLEEQ e ATME3 são bastante semelhantes, indicando que a técnica empregada não influencia a extração de flavanóis totais. No entanto, quando observamos os resultados apresentados para a ATM1 em comparação com os demais, nota-se que este é consideravelmente inferior, mostrando a necessidade de um tempo maior que 1 hora de extração pela técnica ATME para a obtenção de elevados rendimentos destes compostos.

Os flavanóis, catequinas, epicatequinas e procianidinas B2 e os alcaloides, cafeína e teobromina, também tiveram seus rendimentos relativos de extração comparados, estes podem ser observados na Tabela 55. Pode-se observar que a PLEEQ resultou em maior rendimento em comparação a ATME mesmo na menor temperatura avaliada (60 °C) para todos os compostos estudados. Para as extrações por ATME observa-se que os teores obtidos por ATME1 e ATME3, a 90 °C, foram bastante semelhantes, exceto para a epicatequina, a qual apresentou menor rendimento para tempo de extração de 3 horas. Isto pode indicar que uma hora de extração é suficiente para atingir o equilíbrio da extração de catequinas e procianidinas B2. Quanto aos alcaloides, observa-se que para ATME tempos e temperaturas maiores favorecem sua extração, principalmente para a teobromina.

Tabela 55. Comparação do rendimento relativo de extração de flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidina B2) e alcaloides (teobromina e cafeína) das extrações PLEEQ, ATME1 e ATME3.

		Tempo (min)	60 °C	75 °C	90 °C
<i>Flavanóis</i>		Rendimento relativo de extração (%)			
(+) - catequina	PLEEQ		33 ± 2	46,6 ± 0,5	76 ± 1
	ATME1		----	----	27,5 ± 0,3
	ATME3		----	18,93 ± 0,07	27,16 ± 0,04
(-) - epicatequina	PLEEQ		83 ± 6	109 ± 9	93 ± 1
	ATME1		----	----	38,1 ± 0,3
	ATME3		----	26,4 ± 0,1	29,5 ± 0,1
procianidina B2	PLEEQ		53 ± 5	58 ± 7	52,9 ± 0,7
	ATME1		----	----	20,0 ± 0,3
	ATME3		----	16,43 ± 0,06	20,56 ± 0,03
<i>Alcaloides</i>		Rendimento relativo de extração (%)			
teobromina	PLEEQ		53 ± 5	72 ± 3	111 ± 7
	ATME1		----	----	27 ± 2
	ATME3		----	43,3 ± 0,1	52,19 ± 0,07
cafeína	PLEEQ		93 ± 8	136 ± 8	190 ± 12
	ATME1		----	----	53 ± 2
	ATME3		----	55,4 ± 0,2	57,9 ± 0,1

Fonte: própria autoria.

Por fim, comparou-se o efeito da PLEEQ e da ATME3 sobre os sólidos desengordurados avaliando-se o efeito do processo de extração sobre o índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 56.

Tabela 56. Comparação entre os valores de índice de solubilidade de nitrogênio das fases refinado obtidas por PLEEQ e ATME3, determinados no pH 11.

Temperatura (°C)	PLEEQ		ATME3	
	ISN (%)	Decréscimo (%)	ISN (%)	Decréscimo (%)
CS	54 ± 1	-----	47 ± 2	-----
60	54 ± 1	0	----	-----
75	51,6 ± 0,1	4,44	32 ± 1	31,91
90	44 ± 1	18,52	25,3 ± 0,4	46,17

Fonte: própria autoria

Na Tabela 56 observa-se que o ISN da PLEEQ só foi estatisticamente diferente do valor apresentado pela matéria-prima para as extrações conduzidas a 90 °C, enquanto para a ATME3 a 75 °C já pode-se observar redução significativa em relação ao valor apresentado pela CS. Como discutido anteriormente, a redução da solubilidade a 90 °C provavelmente está associada a temperatura de desnaturação da maior parte das proteínas presentes neste material. Entretanto, a redução do ISN ainda na temperatura de 75 °C para a ATME3, deve estar relacionada com o tempo de exposição do material ao solvente alcoólico e a temperatura, considerando que o tempo de extração foi de 3 horas, o material ficou demasiadamente exposto a condições desfavoráveis o que pode ter impactado de forma negativa na solubilidade proteica dos sólidos desengordurados.

Com base nas comparações realizadas, pode-se concluir que a PLE apresenta eficiência superior na extração simultânea de flavanóis e compostos lipídicos da casca da amêndoa de cacau em relação às extrações conduzidas sob pressão atmosférica, o que demonstra sua elevada viabilidade técnica. Quando comparada aos métodos convencionais de extração amplamente difundidos, a PLE possui a grande vantagem de ser um tipo de extração que fornece desempenhos elevados com solventes GRAS (*generally recognized as safe*), o que a torna uma técnica ambientalmente amigável. Apesar de seu excelente desempenho, ainda existe muito a ser investigado, em especial quanto a sua aplicação para extração de compostos da casca da amêndoa de cacau, visto que se trata de uma matéria-prima ainda pouco explorada. Em adição, esforços devem ser despendidos em estudos sobre a sua viabilidade econômica.

6 CONCLUSÕES

Com base na composição da casca da amêndoa de cacau apresentada nesta tese de doutorado, pode-se inferir que a matéria-prima avaliada tem grande potencial para valorização, visto que é rica em compostos associados a benefícios a saúde, tais como fibras dietéticas e flavanóis e possui, também, elevado teor de lipídios e proteínas.

O perfil lipídico mostrado pela gordura CS foi muito parecido com o perfil da manteiga de cacau, com valor nutricional superior devido ao alto teor de ácido linoleico. O teor de tocoferóis encontrado na gordura proveniente da casca da amêndoa de cacau foi bastante elevado, indicando que este material pode ser potencialmente usado para a obtenção destes compostos. As proteínas presentes na casca de cacau demonstraram estar aparentemente disponíveis devido à alta solubilidade proteica observada em pHs básicos.

A casca de cacau mostrou ser uma fonte rica em flavanóis e alcaloides. Em adição, como sugerido na literatura, seu teor de teobromina é bastante elevado e cerca de dez vezes superior ao teor de cafeína. As análises espectrofotométricas para determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais mostraram-se adequadas na avaliação qualitativa destes compostos. Com base na análise UPLC-MS/MS pode-se inferir que a epicatequina demonstrou ser o mais adequado para análise de quantificação de flavanóis totais pelo método DMAC para a matéria-prima casca da amêndoa de cacau empregada neste estudo.

Com relação aos resultados apresentados para as extrações de gordura da casca da amêndoa de cacau por PLE, tem-se que os rendimentos de extração nas condições empregadas são bastante elevados e que a condição de equilíbrio do sistema é atingida rapidamente, indicando a viabilidade técnica do processo empregado. Além disso, pode-se verificar que os parâmetros avaliados não influenciaram significativamente a composição em ácidos graxos da gordura bruta da casca da amêndoa de cacau, sendo que a gordura obtida através do PLE possui perfil de ácidos graxos muito semelhante à da matéria-prima. Destaca-se também o teor de tocoferóis determinados nas gorduras obtidas após PLE, os quais foram superiores aos determinados na gordura da CS obtidos pelo método de extração a frio, indicando que a metodologia empregada foi bastante eficiente na extração destes compostos.

Com relação a modelagem dos dados experimentais de cinética de extração de lipídeos utilizando etanol pressurizado, pode-se observar que o modelo matemático empregado para modelagem dos dados foi adequado para a representação da cinética de extração de lipídeos e permitiu calcular o coeficiente de difusão do material para as diferentes condições avaliadas.

A investigação aprofundada dos extratos da PLE em termos de sua composição em compostos minoritários, possibilitou visualizar o comportamento individual dos diferentes compostos quantificados pela análise em UPLC-MS/MS. Pode-se verificar que o tempo e a temperatura favorecem a extração de flavanóis e alcaloides. No entanto, a procianidina B2 degrada-se quando exposta a alta temperatura e elevados tempos de extração, reduzindo a concentração desses compostos nos extratos e, conseqüentemente, promovendo uma diminuição nos rendimentos de extração.

A modelagem dos dados experimentais de cinética de extração de flavanóis totais com etanol pressurizado utilizando o modelo proposto por Peleg foi eficaz e permitiu prever a concentração máxima do composto na fase extrato para as diferentes condições avaliadas.

Ainda em relação às extrações conduzidas com etanol pressurizado (PLE), a exposição da CS a elevação moderada da pressão não afeta a solubilidade proteica, enquanto que a exposição a temperaturas elevadas prejudica o ISN dos sólidos desengordurados.

Quanto aos experimentos de extração à pressão atmosférica, têm-se que os dois conjuntos de experimentos, com quatro solventes (etanol ou isopropanol, grau absoluto ou azeotrópico) e 1 hora de extração e solventes etanólicos (absoluto e azeotrópico) e condição de equilíbrio permitiram a avaliação do processo de extração.

O primeiro conjunto experimental mostrou que o processo de extração conduzido sob pressão atmosférica (ATME) permitiu a extração simultânea de compostos fenólicos e lipídeos, entretanto, os rendimentos de extração apresentados ficaram aquém do esperado. Neste conjunto experimental pode-se observar que, para a extração de lipídeos, os solventes absolutos e as temperaturas mais elevadas forneceram melhores resultados. Os solventes hidratados forneceram maiores rendimentos de extração de compostos fenólicos totais e flavanóis totais, os quais foram favorecidos também pelo aumento da temperatura de processo.

O segundo conjunto experimental permitiu visualizar a cinética de extração de lipídeos empregando etanol em grau absoluto e azeotrópico como solventes, nas temperaturas de extração de 75 e 90 °C. Os resultados apresentados mostram que temperaturas mais elevadas e o solvente absoluto favorecem a extração de lipídeos. Foi possível observar também que os sistemas compostos por cascas da amêndoa de cacau e solvente etanólico, em geral, atingiram o equilíbrio a partir de 3 horas de extração. Tempos de extração mais longos aumentaram consideravelmente o rendimento de extração de lipídeos, sendo este aumento mais expressivo para o solvente etanol em grau absoluto.

Com relação a modelagem dos dados experimentais de cinética de extração de lipídeos utilizando etanol por ATME, pode-se observar que o modelo matemático empregado foi adequado e permitiu calcular o coeficiente de difusão do material para as diferentes condições avaliadas.

Com isso, pode-se concluir que, de maneira geral, o processo de extração sob pressão atmosférica (ATME) apresenta resultados satisfatórios na obtenção simultânea de gordura e compostos fenólicos, considerando-se a operação em 1 estágio de contato.

Em relação ao terceiro conjunto experimental de extrações ATME, verificou-se que o solvente etanol em grau absoluto e que temperaturas mais elevadas de extração fornecem coeficientes de partição maiores, e que o solvente etanol em grau azeotrópico se satura mais facilmente com gordura. Os valores de coeficientes de partição maiores obtidos para o solvente etanol em grau absoluto, se comparado com o solvente etanol em grau azeotrópico, indicam que seu emprego em processos de extração exigiria um número menor de estágios de contato para o esgotamento do sólido, tornando-o mais apropriado para o processo de extração em relação aos aspectos técnicos.

Dessa forma, pode-se inferir que a PLE foi mais eficiente tecnicamente do que a ATME, fornecendo, em geral, rendimentos mais elevados de gordura e biocompostos em curto intervalo de tempo. A PLE possui a grande vantagem de ser um tipo de extração que fornece desempenhos elevados com solventes GRAS (*generally recognized as safe*), o que a torna uma técnica ambientalmente amigável.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, são sugeridas as seguintes atividades:

Caracterização mais aprofundada da matéria-prima casca da amêndoa de cacau quanto ao seu conteúdo proteico e de aminoácidos.

Caracterização química e do comportamento térmico da gordura proveniente da casca da amêndoa de cacau.

Estudo dos parâmetros que afetam o teor de ácidos graxos livres da gordura da CS.

Estudo de métodos de pré-preparo da matéria-prima casca da amêndoa de cacau para torna-la adequada para submissão aos processos de extração, objetivando assim a obtenção de maiores rendimentos de extração em tempos mais curtos.

Estudo da cinética de extração de lipídeos e biocompostos da CS por PLE e ATME empregando diferentes solventes alcoólicos, bem como possíveis misturas.

Estudo de processos de extração sequenciais empregando técnicas e solventes com características distintas para extração seletiva de compostos polares e apolares.

Estudo da viabilidade técnica da substituição parcial ou total da manteiga de cacau por gordura da casca da amêndoa de cacau em produtos alimentícios.

Estudo da viabilidade econômica dos processos de extração da gordura da CS.

Simulação dos processos de extração em múltiplos estágios utilizando-se os dados de equilíbrio sólido-líquido de sistemas compostos por CS e solventes alcoólicos.

8 MEMÓRIA DA PÓS-GRADUAÇÃO

DOUTORADO

Artigos publicados em periódicos internacionais

OKIYAMA, DAYANE C.G.; SOARES, INGRID D.; CUEVAS, MAITÊ S.; CREVELIN, EDUARDO J.; MORAES, LUIZ A.B.; MELO, MARIZA P.; OLIVEIRA, ALESSANDRA L.; RODRIGUES, CHRISTIANNE E.C. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, v.114, p.20-29, 2018.

OKIYAMA, DAYANE C.G.; NAVARRO, SANDRA L.B.; RODRIGUES, CHRISTIANNE E.C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY*, v. 63, p. 103-112, 2017.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

OKIYAMA, D. C. G.; SOUZA, V. B. ; TRINDADE, C. S. F. ; OLIVEIRA, A.L. ; RODRIGUES, C. E. C. . Extração de Lipídeos e Proantocianidinas de Cascas de Amêndoas de Cacau Utilizando Fluido Pressurizado. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016, Fortaleza/CE. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

OKIYAMA, D. C. G.; SOARES, I. D.; CUEVAS, M. S., CREVELIN, E. J., MORAES, L. A. B.; OLIVEIRA, A. L.; RODRIGUES, C. E. C. Atmospheric Pressure Extraction of Fat and Flavanols from Cocoa Bean Shell. XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Valparaíso, Chile, 2017.

SOARES, I. D.; OKIYAMA, D. C. G.; RODRIGUES, C. E. C. Extração Alcoólica de Gordura e Biocompostos de Cascas de Amêndoas de Cacau. In: 12 Simpósio Latino Americano de

Ciência dos Alimentos, 2017, Campinas. 11 Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2017.

OKIYAMA, D. C. G.; SOARES, I. D.; CUEVAS, M. S., CREVELIN, E. J., MORAES, L. A. B.; OLIVEIRA, A. L.; RODRIGUES, C. E. C. Extração com líquido pressurizado de flavanóis e alcaloides de cascas de amêndoas de cacau. In: II Encontro da Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2017, Pirassununga-SP.

SOARES, I. D.; OKIYAMA, D. C. G.; RODRIGUES, C. E. C. Cinética de Extração de Lipídeos de Cascas de Amêndoas de Cacau Utilizando Etanol como Solvente. **25º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – 25º SIICUSP**, Pirassununga/SP, 2017.

OKIYAMA, D. C. G.; ARACAVA, K. K. ; RODRIGUES, C. E. C. . Caracterização de Cascas de Amêndoas de Cacau Submetidas aos Processos de Secagem e Torrefação. In: 11 Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2015, Campinas. 11 Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2015.

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto às seguintes disciplinas:

ZEA 0865 – Operações Unitárias III, sob supervisão da Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues (2º semestre de 2014, participação como bolsista).

MESTRADO

Artigos publicados em periódicos internacionais

OKIYAMA, DAYANE; RABI, JOSÉ; KAMIMURA, ELIANA. Biospecific Affinity Chromatography: Computational Modelling via Lattice Boltzmann Method and Influence of Lattice-Based Dimensionless Parameters. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY FOR WELLNESS INDUSTRIES, v. 4, p. 40-50, 2015.

Capítulos de livros publicados

OKIYAMA, D. C. G.; RABI, J. A.; RIBEIRO, R.; FERRAZ, A. D. N.; ZAIAT, M. CFD Simulations of Fluid Dynamics Inside a Fixed-Bed Bioreactor for Sugarcane Vinasse Treatment. Lecture Notes in Civil Engineering. 1ed.: Springer International Publishing, 2017, p. 684-690.

OKIYAMA, D. C. G.; RABI, J. A. Lattice-Boltzmann Simulation of Transport Phenomena in Agroindustrial Biosystems. In: Anna Belya Kora. (Org.). Advances in Computational Modeling Research. 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2013, v. 1, p. 79-103

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

OKIYAMA, DAYANE; RABI, J. A.; RIBEIRO, R.; Ferraz, A. D. N.; ZAIAT, M.. CFD Simulations of Fluid Dynamics Inside a Fixed-Bed Bioreactor for Sugarcane Vinasse Treatment. In: Frontiers International Conference on Wastewater Treatment, 2017, Palermo. Frontiers International Conference on Wastewater Treatment, 2017.

OKIYAMA, D. C. G.; RABI, J. A. Dirichlet versus Danckwerts inlet condition for bioaffinity chromatography - Part 2: comparing results from Lattice-Boltzmann simulations. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2013, Foz do Iguaçu. XIX SINAFERM - X SHEB, 2013.

OKIYAMA, D. C. G.; RABI, J. A. Lattice-Boltzmann Simulation of Biospecific Affinity Chromatography: Influence of Process Parameters on Breakthrough Curves. In: WSEAS, 2013, Baltimore. Mathematics and Computers in Biology and Biomedical Informatics, 2013.

Resumos publicados em anais de congressos

OKIYAMA, D. C. G.; RABI, J. A. Simulação de Transferência de Massa via Método de Boltzmann em Rede. In: I Simpósio de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia

de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2012, Pirassununga. I Simpósio de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2012.

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto às seguintes disciplinas:

ZEA 0765 – Instalações e Instrumentação Industrial, sob supervisão do Prof. Dr. Rogers Ribeiro (2º semestre de 2012, participação como bolsista);

ZEA 0563 – Fenômenos de Transporte I, sob supervisão do Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes (1º semestre de 2013, participação como voluntária);

ZEB 0562 – Cálculo Numérico, sob supervisão da Prof. Dr. José Antônio Rabi (2º semestre de 2013, participação como bolsista).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA-SORIA, L.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; AMAYA-FARFAN, J. Soluble Albumin and Biological Value of Protein in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans as a Function of Roasting Time. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. S294–S298, 31 maio 2006.
- ABRAHAM, G. et al. Water accumulation in the alcohol extraction of cottonseed. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 2, p. 207–208, 1993.
- ADAMAFIO, N. A. Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: An overview. **Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 7, p. 570–576, 2013.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
- AIDER, M.; BARBANA, C. Canola proteins : composition , extraction , functional properties , applications as a food ingredient and allergenicity e A practical and critical review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 21–39, 2011.
- ALADEDUNYE, F. A. Natural antioxidants as stabilizers of frying oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 6, p. 688–706, 2014.
- AMÉZQUETA, S. et al. A simple chemical method reduces ochratoxin A in contaminated cocoa shells. **Journal of food protection**, v. 71, n. 7, p. 1422–1426, 2008.
- AMIM, I.; YEE, C. L. Antioxidative Effects of Extracts of Cocoa Shell, Roselle Seeds and a Combination of Both Extracts on the Susceptibility of Cooked Beef to Lipid Oxidation. **Journal of Food Technology**, v. 4, n. 1, p. 10–15, 2006.
- ANDERSON, D. A. Primer on Oils Processing Technology. In: SHAHIDI, F. (Ed.). . **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6. ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. p. 1–56.
- ANDRADE, I. V. O. et al. Perdas da características fermentativas e valor nutritivo da silagem de capim - elefante contendo subprodutos agrícolas - Losses, fermentation characteristics and nutritional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 12, p. 2578–2588, 2010.
- ANDRES-LACUEVA, C. et al. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: Influence of the manufacturing process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3111–3117, 2008.
- AOAC. **Official methods of analysi**. 18. ed. Washington, D.C.: A.O.A.C., 2007.
- AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 3. ed. Champaign: AOCS Press, 1998.
- ARLORIO, M. et al. Characterization of Pectins and Some Secondary Compounds from

- Theobroma cacao Hulls. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 653–656, jun. 2001.
- ARLORIO, M. et al. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO₂. **Food Research International**, v. 38, n. 8–9, p. 1009–1014, 2005.
- ASAE. Methods for determining and expressing fineness of feed materials by sieving. v. 2008, p. S319.2, 1995.
- ASP, N. G. et al. Rapid enzymic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 476–482, maio 1983.
- AZAM, S. et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 9, n. 9, p. 325–330, set. 2003.
- AZIZAH, A. H.; NIK RUSLAWATI, N. M.; SWEE TEE, T. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 199–202, 1999.
- BAKER, E. C.; SULLIVAN, D. A. Development of a pilot-plant process for the extraction of soy flakes with aqueous isopropyl alcohol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 7, p. 1271–1277, jul. 1983.
- BAÜMLER, E. R.; CARRÍN, M. E.; CARELLI, A. A. Extraction of sun fl ower oil using ethanol as solvent. v. 178, p. 190–197, 2016.
- BAÜMLER, E. R.; CRAPISTE, G. H.; CARELLI, A. A. Solvent Extraction: Kinetic Study of Major and Minor Compounds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 12, p. 1489–1495, 2010.
- BECKETT, S. T. **The Science of Chocolate**. Second ed. Cambridge: RSCPublishing, 2008.
- BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 4^a ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2009.
- BERA, M. B.; MUKHERJEE, R. K. Solubility, Emulsifying, and Foaming Properties of Rice Bran Protein Concentrates. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 142–145, jan. 1989.
- BERNAET, H.; RUYSSCHER, I. **Methods for extractin cocoa**Germany, 2013.
- BERTAZZO, A. et al. The protein profile of Theobroma cacao L . seeds as obtained by matrix - assisted laser desorption / ionization mass spectrometry. n. May, p. 2035–2042, 2011.
- BESSA, L. C. B. A. et al. Simulation and process design of continuous countercurrent ethanolic extraction of rice bran oil. **Journal of Food Engineering**, v. 202, p. 99–113, 2017.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

- BONVEHÔÂ, J. S.; COLL, F. V. Protein quality assessment in cocoa husk. **Food Research International**, v. 32, p. 201–208, 1999.
- BORCHERS, A. T. et al. Cocoa and chocolate: composition, bioavailability, and health implications. **Journal of Medicinal Food**, v. 3, n. 2, p. 77–105, jun. 2000.
- BRADBURY, A.; KOPP, G. **Polyphenol enriched composition from cocoa shell extraction** Germany, 2006.
- BRUNA, C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins. **Journal of applied Botany and Food Quality**, v. 83, n. 1, p. 9–13, 2009.
- BUCHELI, P. et al. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 5046–5051, 2001.
- BUCIC-KOJIC, A. et al. Study of solid – liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 236–242, 2007.
- BUSTAMANTE-RANGEL, M. et al. Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by pressurized liquid extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 587, n. 2, p. 216–221, 2007.
- CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379–389, 2003.
- CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices - Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126, p. 1182–1193, 2001.
- CAPELLINI, M. C. **Extração de óleo de farelo de arroz utilizando solventes alcoólicos: avaliação de alterações na fração proteica e na composição do óleo**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.
- CAPELLINI, M. C. et al. Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. **Industrial Crops and Products**, v. 104, n. March, p. 133–143, 2017.
- CARVALHO JUNIOR, J. N. et al. Digestibilidade aparente da dieta com capim-elefante ensilado com diferentes aditivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 889–897, ago. 2010.
- CHEN, M. H.; BERGMAN, C. J. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2–

3, p. 139–151, 2005.

CHIRINOS, R. et al. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 2, p. 217–225, 2007.

CHRONOPOULOS, D. et al. **Food comprising alkalized cocoa shells and method therefor**Northfield, 2011.

COLIVET, J.; OLIVEIRA, A. L.; CARVALHO, R. A. Influence of the bed height on the kinetics of watermelon seed oil extraction with pressurized ethanol. **Separation and Purification Technology**, v. 169, p. 187–195, 2016.

COLLAR, C. et al. Breadmaking performance and keeping behavior of cocoa-soluble fiber-enriched wheat breads. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 1, p. 79–87, 1 fev. 2009.

CONTI, A. et al. Chocolate and Health: A Brief Review of the Evidence. In: CONTI, A. et al. (Eds.). . **Chocolate and Health**. Milano: Springer Milan, 2012.

COPETTI, M. V. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1–2, p. 67–70, 2010.

COPETTI, M. V. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 141–144, ago. 2011.

COPETTI, M. V. et al. **Determination of aflatoxins in by-products of industrial processing of cocoa beans****Food Additives & Contaminants: Part A**, 2012.

COPETTI, M. V. et al. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 100–104, 2013.

COPETTI, M. V. et al. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 13–20, 2014.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649–657, 2006.

COUNET, C.; COLLIN, S. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6816–6822, nov. 2003.

CREWS, C. Autentication of cocoa butter. In: JEE, M. (Ed.). . **Oils and Fats autentication**. 1. ed. Boca Raton,FL, USA: CRC Press, 2002.

CROSS, E. Cocoa flavor development and effects of post-harvest processing. **The Manufacturing Confectioner**, p. 70–77, 1999.

- CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do Sabor de Amêndoa de Cacau Através de Tratamento Térmico em Forno Convencional e de Microondas**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- DANLAMI, J. M. et al. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605–626, 2014a.
- DANLAMI, J. M. et al. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605–626, 1 jan. 2014b.
- DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I.; MARÍN-ARROYO, M. R. Kinetics of Thermal Modifications in a Grape Seed Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7211–7217, 13 jul. 2011.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. PLE in the analysis of plant compounds: Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 1155–1159, 2005.
- DIBERT, K.; CROS, E. Solvent Extraction of Oil and Chlorogenic Acid from Green Coffee . Part II : Kinetic Data Particle porosity. p. 199–214, 1989.
- DIMICK, P. S. Compositional effect on crystallization of cocoa butter. In: **Physical Properties of Fats, Oils, and Emulsifiers**. Champaign, IL: AOCS Press, 1999. p. 140–163.
- DOS SANTOS FREITAS, L. et al. Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1200, n. 1, p. 80–83, 2008.
- DU, Y. et al. TG-pyrolysis and FTIR analysis of chocolate and biomass waste. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 117, n. 1, p. 343–353, 2014.
- DUNCAN, D. B. Multiple F and multiple “F” test. **Biometrics**, v. 11, n. 4, p. 1955, 1955.
- EFRAIM, P. **Estudo para Minimizar as Perdas de Flavonóides Durante a Fermentação de Sementes de Cacau para Produção de Chocolate**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- EFRAIM, P. et al. **Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2010.
- EIKANI, M. H. et al. An Experimental Design Approach for Pressurized Liquid Extraction from Cardamom Seeds. **Separation Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 1194–1200, 2013.
- EL-SAIED, H. M.; MORSI, M. K.; AMER, M. M. A. Composition of cocoa shell fat as related to cocoa butter. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 20, n. 2, p. 145–151, 1981.
- FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, V. et al. Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polycyclic

- aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1196–1197, p. 65–72, jul. 2008.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. et al. Storage stability of a high dietary fibre powder from orange by-products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 4, p. 748–756, 2009.
- FERNÁNDEZ-PONCE, M. T. et al. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study. **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 420–430, 2016.
- FERNÁNDEZ, M. B. et al. Kinetic study of canola oil and tocopherol extraction: Parameter comparison of nonlinear models. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 4, p. 682–689, ago. 2012.
- FIRESTONE, D. **Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes**. 2. ed. Washington, D.C.: AOCS Press, 2006.
- FIRESTONE, D. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes**. 3rd. ed. Champaign, IL, USA: AOCS Press, 2013.
- FONTAN, R. DA C. I.; BONOMO, R. C. F.; COIMBRA, J. S. DOS R. Adsorção e Troca Iônica. In: TADINI, C. C. (Ed.). **Operações unitárias na indústria de alimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016. p. 399–420.
- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C.; ROBERTS, J. B. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 9, n. 3, p. 181–184, mar. 1958.
- FOWLER, M. S. COCOA BEANS: FROM TREE TO FACTORY. In: BECKETT, S. T. (Ed.). **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 4th. ed. [s.l.] Blackwell Publishing, 2009. p. 10–47.
- FRANCO, D. et al. Ethanolic extraction of Rosa rubiginosa soluble substances: Oil solubility equilibria and kinetic studies. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 150–157, 2007.
- FREDHOLM, B. B. **Methylxanthines**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 200
- FREITAS, L. DOS S. et al. Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of brazilian grape seed oil. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 313–318, set. 2013.
- GARCIA-MENDOZA, P. et al. The Journal of Supercritical Fluids Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juc (Euterpe edulis Mart .) residues using pressurized

- liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9–16, 2017.
- GENTILI, A.; CARETTI, F. Analysis of Vitamins by Liquid Chromatography. In: FANALI, S. et al. (Eds.). . **Liquid Chromatography Applications**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 799.
- GILABERT-ESCRIVÁ, M. V. et al. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian Theobroma species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 13, p. 1425–1431, out. 2002.
- GILMOUR, M.; LINDBLOM, M. Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. In: **Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade**. Wallingford: CABI, 2008. p. 231–243.
- GIMENO, E. et al. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1–2, p. 251–254, jun. 2000.
- GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, n. 2, p. 195–198, 2004.
- GOFFMAN, F. D.; BÖHME, T. Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4990–4, out. 2001.
- GREENWOOD-BARTON, L. H. Utilisation of cocoa by-products 40(5):52-56. **Food Manufacture**, v. 40, n. 5, p. 52–56, 1965.
- GU, L. et al. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4057–4061, maio 2006.
- GUJAR, J. G. et al. Experimental and modeling studies on extraction of catechin hydrate and epicatechin from indian green tea leaves. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 88, n. 2, p. 232–240, 2010.
- GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M.; BERKTAS, I.; ÖZÇELİK, B. Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 559–565, 2016.
- HAMMOND, E. G. et al. Soybean oil. In: SHAHIDI, F. (Ed.). . **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 1. ed. New Jersey, USA: John Wiley and Sons, 2005. p. 577–653.
- HANNUM, S. M.; ERDMAN, J. W. Emerging health benefits from cocoa and chocolate.

Journal of medicinal food, v. 3, n. 2, p. 73–75, 2000.

HASLAM, E. **Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action**. New York: Cambridge University Press, 2005.

HOWLETT, J. F. et al. The definition of dietary fiber – discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement. **Food & Nutrition Research**, v. 54, n. 3, p. 112–129, 1 nov. 2010.

HU, W. et al. Comparison of Isopropanol and Hexane for Extraction of Vitamin E and Oryzanol from Stabilized Rice Bran. n. 20, p. 1653–1656, 1996.

HUANG, Y.; BARRINGER, S. A. Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. C121–C127, jan. 2010.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics - Production of cocoa beans**. [s.l.: s.n.].

IUPAC. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. In: PAQUOT, C. (Ed.). **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6. ed. [s.l.] Pergamon Press, 1979.

JACQUES, R. A. et al. Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 1, p. 70–76, 2008.

JAHURUL, M. H. A. et al. Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 467–476, ago. 2013.

JERKOVIC, V. et al. Stilbenic Profile of Cocoa Liquors from Different Origins Determined by RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS. Detection of a New Resveratrol Hexoside. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 7067–7074, 9 jun. 2010.

JESUS, A. A. et al. Extraction of palm oil using propane, ethanol and its mixtures as compressed solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 245–253, 2013.

JOHNSON, L. A.; LUSAS, E. W. Comparison of alternative solvents for oils extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 2, p. 229–242, fev. 1983.

JOKIC, S. et al. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 3, p. 206–212, 2010.

JONFIA-ESSIEN, W. A. et al. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1155–1159, jun. 2008.

KAMIMURA, J. A. A. M. et al. Experimental data and modeling of rice bran oil extraction

- kinetics using ethanol as solvent. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 1921–1928, 2017.
- KANTH RAO, R.; ARNOLD, L. K. Alcoholic extraction of vegetable oils. Part IV. Solubilities of vegetable oils in aqueous 2-propanol. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 34, n. 8, p. 401–404, 1957.
- KARACABEY, E. et al. Modeling solid-liquid extraction kinetics of trans-resveratrol and trans- ϵ -viniferin from grape cane. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 1, p. 103–112, 2013.
- KATZ, D. L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779–2811, 15 nov. 2011.
- KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 105–113, mar. 2002.
- KEMPER, T. Extraction principles and extractor design. In: WAN, P. J.; WAKELYN, P. J. (Eds.). . **Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils**. [s.l.] AOCS Press, 1997. p. 137–141.
- KEMPER, T. G. Oil Extraction. In: SHAHID, F. (Ed.). . **Bailey's industrial oil and fat production**. 6. ed. New-Jersey: John Wiley & Sons, 2005. p. 57–98.
- KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 4, p. 1090–1092, jul. 1984.
- KIRK, R. S.; SAWYER, R. **Person's Composition e Analysis of Foods**. 9. ed. New York: Addison-Wesley Longman Ltd, 1991.
- KNAPP, ARTHUR WILLIAM. **Cocoa and Chocolate: Their History from Plantation to Consumer**. Londres: library of alexandria, 1920.
- KNOWLES, D.; RICHTER, B. **Extraction of Oils from Oilseeds by Accelerated Solvent Extraction** Salt Lake City Thermo Fisher Scientific, , 2010.
- KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-Primas Alimentícias - Composição e Controle de Qualidade**. 1. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2011.
- KOTHE, L.; ZIMMERMANN, B. F.; GALENSA, R. Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3656–3663, 2013.
- KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.

- LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. et al. Review: Health effects of cocoa flavonoids. **Food Science and Technology International**, n. 11, p. 159–176, 2005.
- LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; GOLC WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214–222, nov. 2005.
- LATIF, R. Chocolate/cocoa and human health: a review. **The Netherlands journal of medicine**, v. 71, n. 2, p. 63–68, 2013.
- LECUMBERRI, E. et al. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 948–954, 2007.
- LEE, K. W. et al. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7292–7295, 2003.
- LIU, J. et al. Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: Extraction of polyphenols in red onions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 2, p. 441–445, 2014.
- LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 47–56, 2005.
- LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- LOPES, A. S.; GARCIA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das Condições de Torração Após a Fermentação de Amêndoas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e Cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal Food technology**, v. 6, n. 2, p. 309–316, 2003.
- LOZANO-SÁNCHEZ, J. et al. Recovering Bioactive Compounds from Olive Oil Filter Cake by Advanced Extraction Techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16270–16283, 2014.
- LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. [s.l.] Universidade Estadual de campinas, 2001.
- MALACHOVÁ, A. et al. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all

regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 145–156, out. 2014.

MANDA, P. et al. Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 26, n. 7, p. 1081–1088, 2009.

MARCILLA, A.; RUIZ, F.; GARCÍA, A. N. Liquid-liquid-solid equilibria of the quaternary system water-ethanol-acetone-sodium chloride at 25 °C. **Fluid Phase Equilibria**, v. 112, n. 2, p. 273–289, dez. 1995.

MARCONI, M. F.; KAKUDA, Y.; YADA, R. Y. Salt soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 265–274, 1998.

MARTÍN-CABREJAS, M. A. et al. Cocoa Hull : A Potential Source of Dietary Fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 66, n. 1991, p. 307–311, 1994.

MARTÍNEZ, R. et al. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 39–45, nov. 2012.

MCGAULEY, ARA E.; MARANGONI, A. G. Static Crystallization Behavior of Cocoa Butter and Its Relationship to Network Microstructure. In: MARANGONI, A. G.; NARINE, S. S. (Eds.). **Physical Properties of Lipids**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. p. 592.

MELO, G. R. P.; CHITARRA, A. B. CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DE IMPORTÂNCIA NA GORDURA DA AMÊNDOA EM NOVE HÍBRIDOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L .) 1 QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF IMPORTANCE IN FAT OF ALMOND OF NINE HYBRIDS OF THE CACAO TREE NUT (*Theobroma cacao* L .). **Ciencia E Agrotecnologia**, v. 23, p. 161–169, 1999.

MENDES, F. A. T.; LIMA, E. L. **Perfil Agroindustrial do Processamento de Amêndoas de Cacau em Pequena Escala no Estado do Pará**. Belém: [s.n.].

MENDONÇA, C. R. B. et al. Characterization of hydroxyaromatic compounds in vegetable oils by capillary electrophoresis with direct injection in an oil-miscible KOH/propanol/methanol medium. **Electrophoresis**, v. 26, n. 17, p. 3307–14, set. 2005.

MEZIANE, S.; KADI, H. Kinetics and thermodynamics of oil extraction from olive cake. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 4, p. 391–396, 2008.

MILLER, K. B. et al. Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyandin Contents of Selected Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United

- States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4062–4068, maio 2006.
- MINIFIE, B. W. **Chocolate, Cocoa and Confectionery: Science and Technology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989.
- MOLLEA, C.; CHIAMPO, F.; CONTI, R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1353–1356, 2008.
- MOREAU, R. A.; HICKS, K. B. The composition of corn oil obtained by the alcohol extraction of ground corn. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 11, p. 809–815, 2005.
- MOREAU, R. A.; POWELL, M. J.; SINGH, V. Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 11, p. 1063–1067, nov. 2003.
- MORR, C. V. et al. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, nov. 1985.
- MOURE, A. et al. Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, v. 39, p. 945–963, 2006.
- MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 897–903, 2012.
- MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.
- NAGENDRA PRASAD, M. N. et al. Health Benefits of Rice Bran - A Review. n. September 2015, 2011.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273–300, 1990.
- NAVARRO, S. L. B. et al. Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 185–194, 2016.
- NAVARRO, S. L. B. **Extração alcoólica de óleos de gérmen de milho e de torta de macadâmia e aproveitamento do material desengordurado na produção de concentrado proteico**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Macadamia Oil Extraction With Alcoholic Solvents: Yield and Composition of Macadamia Oil and Production of Protein Concentrates From Defatted Meal. v. 1800092, p. 1–9, 2018.

- NIEMENAK, N. et al. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 612–619, 2006.
- NIETO, A. et al. Pressurized liquid extraction : A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. v. 29, n. 7, 2010.
- NSOR-ATINDANA, J.; ZHONG, F.; MOTHIBE, K. J. **In vitro hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells***Food & Function*, 2012.
- OKIYAMA, D. C. G.; NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 103–112, maio 2017.
- OLALEKAN, S. et al. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L .) nut. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 852–858, 2009.
- OLIVEIRA, R. et al. Effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol—A response surface approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 22–31, jan. 2012.
- ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ŻYŻELEWICZ, D. Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by roasting conditions. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 5, p. 663–681, 4 nov. 2015.
- ORTEGA, N. et al. Obtention and Characterization of Phenolic Extracts from Different Cocoa Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9621–9627, 22 out. 2008.
- ORTEGA, N. et al. Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 3, p. 298–305, 2010.
- OSUNDAHUNSI, O. F.; BOLADE, M. K.; AKINBINU, A. A. Effect of cocoa shell ash as an alkalizing agent on cocoa products. **Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 12, p. 1674–1678, 2007.
- OWUSU, M.; PETERSEN, M. A.; HEIMDAL, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 5, p. 446–456, 2012.
- PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine

- from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing**, v. 42, n. 2, p. 129–133, 2003.
- PAWLISZYN, J. Sample Preparation : Quo Vadis ? **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 11, p. 2543–2558, 2003.
- PAYNE, M. J. et al. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 1, p. 89–96, 2010.
- PELEG, M. An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1216–1217, jul. 1988.
- PEREIRA, C. G. et al. Extração sólido-líquido. In: TADINI, C. C. (Ed.). . **Operações unitárias na indústria de alimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016. p. 167–194.
- PÉRES, V. F. et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 115–118, 2006.
- PÉREZ, E. et al. Proximal composition and the nutritional and functional properties of cocoa by-products (pods and husks) for their use in the food industry. In: SIRA, E. P. (Ed.). . **Chocolate: Cocoa Byproducts Technology, Rheology, Styling, and Nutrition**. 1. ed. Caracas: Nova Publisher, 2015. p. 219–234.
- PEREZ, E. E.; CARELLI, A. A.; CRAPISTE, G. H. Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 180–185, 2011a.
- PEREZ, E. E.; CARELLI, A. A.; CRAPISTE, G. H. Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 180–185, 2011b.
- PLANINIĆ, M. et al. Modelling of drying and rehydration of carrots using Peleg's model. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 3–4, p. 446–451, 26 ago. 2005.
- PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 223–230, dez. 1985.
- PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (Theobroma grandiflorum) : Composição e possíveis benefícios (Theobroma grandiflorum) e do cupulate : [s.l.]** Universidade de São Paulo, 2010.
- RAMIRO, E. et al. Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8506–8511, 2005.

- RAO, R. K.; ARNOLD, L. K. Alcoholic extraction of vegetable oils. II. Solubilities of corn, linseed, and tung oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 33, n. 2, p. 82–84, 1956.
- REDGWELL, R. et al. Dietary fibre in cocoa shell: Characterisation of component polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 103–112, 2003.
- RISNER, C. H. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)-epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter. **Journal of chromatographic science**, v. 46, n. 10, p. 892–899, 2008.
- RODRIGUES, C. E. C.; ARACAVA, K. K.; ABREU, F. N. Thermodynamic and statistical analysis of soybean oil extraction process using renewable solvent. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 11, p. 2407–2414, 2010.
- RODRIGUES, C. E. C.; OLIVEIRA, R. Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 813–820, 2010.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Optimization of microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves by multiresponse surface methodology. **Electrophoresis**, p. 1938–1946, 2016.
- ROSTAGNO, M. A. et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2–29, 2009.
- SÁNCHEZ, D. et al. Effect of a soluble cocoa fiber-enriched diet in Zucker fatty rats. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 3, p. 621–8, 2010.
- SATHE, S. K. Solubilization and electrophoretic characterization of cashew nut (*Anacardium occidentale*) protein. p. 319–324, 1994.
- SATHE, S. K. et al. Solubilization and Electrophoretic Characterization of Select Edible Nut Seed Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7846–7856, 2009.
- SAURA-CALIXTO, F.; CAFIELLAS, J.; GARCIA-RASO, J. Contents of detergent-extracted dietary fibers and composition of hulls, shells, and teguments of almonds (*Prunus amygdalus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1255–1259, 1983.
- SAWADA, M. M. **Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e índices de qualidade**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.
- SAWADA, M. M. et al. Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. **Food Research International**,

v. 62, p. 662–670, ago. 2014.

SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, 2005.

SCHARLACK, N. K. **Estudo do efeito do tipo e grau de hidratação de solventes alcoólicos na extração simultânea de óleo e de ácidos clorogênicos de torta de sementes de girassol**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

SCHARLACK, N. K.; ARACAVA, K. K.; RODRIGUES, C. E. C. Effect of the type and level of hydration of alcoholic solvents on the simultaneous extraction of oil and chlorogenic acids from sunflower seed press cake. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4612–4620, 2017.

SESSA, D. J.; NELSEN, T. C.; SNYDER, J. M. Effect of Salts on Soy Storage Proteins Defatted with Supercritical CO₂ and Alcohols. **JAOCS**, v. 75, n. 8, p. 911–916, 1998.

SIGMA-ALDRICH. **Catalog Sigma-Aldrich**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>.

SILVA, A. R. DE A. **Caracterização de amêndoas e chocolate de diferentes variedades de cacau visando a melhoria da qualidade tecnológica**. [s.l.] Universidade estadual de Campinas, 2013.

SILVA, H. G. . et al. Farelo de Cacau (Theobroma cacao L .) e Torta de Dendê (Elaeis guineensis , Jacq) na Alimentação de Cabras em Lactação : Consumo e Produção de Leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1786–1794, 2005.

SINDIRAÇÕES. Método nº40 - Espectrometria de absorção atômica. In: SINDIRAÇÕES (Ed.). **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal 2013**. São Paulo: Sindirações, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent**. [s.l: s.n.]. v. 299

SMIT, H. J. Theobromine and the Pharmacology of Cocoa. In: **Handbook of Experimental Pharmacology - Methylxanthines**. Oxford: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 201–234.

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

TAEYE, C. et al. Degradation of (-)-epicatechin and procyanidin b2 in aqueous and lipidic model systems. First evidence of “chemical” flavan-3-ol oligomers in processed cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 36, p. 9002–9016, 2014.

- TAFURI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 487–494, dez. 2004.
- TAKEUCHI, T. et al. Pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants.No Title. In: MEIRELES, M. A. (Ed.). . **Extracting bioactive compounds for foods product: theory and applications**. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009. p. 140–142.
- THEIVARASU, C.; MYLSAMY, S.; SIVAKUMAR, N. Kinetics, Isotherm and Thermodynamic studies of Adsorption of Congo red from aqueous solution onto COCOA Shell Activated Carbon. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 15, p. 34–38, 2011a.
- THEIVARASU, C.; MYLSAMY, S.; SIVAKUMAR, N. Cocoa Shell as Adsorbent for the Removal of Methylene Blue from Aqueous Solution: Kinetic and Equilibrium Study. **Universal Journal of Environmental Research and Technology**, v. 1, p. 70–78, 2011b.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Dionex ASE 150 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual - Doc. 065207-03**Thermo Fisher Scientific Inc., , 2011.
- THOBANI, M.; DIOSADY, L. L. Two-Phase Solvent Extraction of Canola. p. 207–214, 1997.
- TIMBIE, D. J.; SECHRIST, L.; KEENEY, P. G. APPLICATION OF HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY TO THE STUDY OF VARIABLES AFFECTING THEOBROMINE AND CAFFEINE CONCENTRATIONS IN COCOA BEANS. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 2, p. 560–565, mar. 1978.
- TIR, R.; DUTTA, P. C.; BADJAH-HADJ-AHMED, A. Y. Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 12, p. 1427–1438, dez. 2012.
- TODA, TATIANE A. **Minimização de resíduos do processamento do café solúvel através do reaproveitamento da borra para extração de óleo utilizando solvente renovável**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- TODA, T. A.; SAWADA, M. M.; RODRIGUES, C. E. C. Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 1–10, abr. 2016.
- TOMAS-BARBERAN, F. A. et al. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3926–35, 16 maio 2007.
- TOSCHI, T. G. et al. Pressurized solvent extraction of total lipids in poultry meat. v. 83, p. 551–555, 2003.

- TRENTINI, C. P. et al. Pressurized liquid extraction of macauba pulp oil. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 95, n. 8, p. 1579–1584, ago. 2017.
- TREYBAL, R. **Mass Transfer Operations**. [s.l.] McGraw Hill, 1986.
- TURGUT, N.; ZHANG, M. Pressurized solvent extraction of wheat germ oil §. v. 36, p. 905–909, 2003.
- VIGANÓ, J. et al. Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 382–390, 2016.
- VIUDA-MARTOS, M. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, n. 25, p. 13–19, 2010.
- VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. . (Ed.). . **Methods of Testing Protein Functionality**. 1. ed. London: Chapman&Hall, 1996. p. 11–61.
- WESOŁOWSKI, M.; SZYNKARUK, P. Thermal decomposition of methylxanthines: Interpretation of the results by PCA. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n. 3, p. 739–746, 2008.
- WILLIAMS, M. A. Recovery of Oils and Fats from Oilseeds and Fatty Materials. In: SHAHIDI, F. (Ed.). . **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. p. 99–189.
- WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423–447, jul. 2000.
- XI, J.; YAN, L.; HE, L. Pressure-dependent kinetic modeling of solid–liquid extraction of the major green tea constituents. **Separation and Purification Technology**, v. 133, p. 155–159, set. 2014.
- YAO, L.; GERDE, J. A.; WANG, T. Oil extraction from microalga *Nannochloropsis* sp. with isopropyl alcohol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 12, p. 2279–2287, 8 dez. 2012.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 1, p. 41–48, 2006.
- ZAYAS, J. F. **Functionality of Proteins in Food**. 1. ed. Berlin: Springer, 1997.
- ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGELA, P. **Métodos físicoquímicos para análise de alimentos** (Instituto Adolfo Lutz, Ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHENG, X.-Q. et al. Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. **Journal of plant physiology**, v. 161, n. 4, p. 363–9, 2004.

ZHUANG, H.; BARTH, M. M.; HILDEBRAND, D. Fatty acid oxidation in plant lipids. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. (Eds.). . **Food lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 413–464.

ZUGAIB, A. C. C. et al. **Análise do Mercado Processador de Cacau no Brasil vista sob o modelo Estrutura-Condução-Desempenho**. Ilhéus: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.ceplac.gov.br/radar/Análise do Mercado Processador.pdf](http://www.ceplac.gov.br/radar/Análise%20do%20Mercado%20Processador.pdf)>.