

DELICIO SANDI

EXTRAÇÃO DO ÓLEO E DITERPENOS DO CAFÉ
COM CO₂ SUPERCRÍTICO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

A Deus.
Aos meus pais Ari e Gesira.
Aos meus irmãos Gery, Jarbas e Fernanda.
À Patrícia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda a força.

Aos amigos de Viçosa, em especial a Álan, Júnior, Leonardo, Renato, Viviane, Kiu, Frederico, Alexandre, Henrique, Paulo, Luiza, e a todos que de alguma forma estiveram comigo nesta conquista.

Ao professor Júlio, pela orientação e sugestões, e por possibilitar o meu enriquecimento profissional.

Aos professores Marco Túlio e Jane, pelas contribuições, conselhos, apoio e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos pelo constante incentivo, Tarso, Marcondes, Sérgio, Baltazar, Maurício, Everaldo, Márcio, Cláudia, Fabiana, Paula e Vivian.

Aos funcionários do DTA, Adão, Zé Raimundo, Zé Geraldo, José Tomás, Valente, Manoel, Geralda, Tito, Maria Rita, Vânia, Sueli, Valério e Lígia, pela atenção, pelo convívio e ajuda dispensadas.

À Universidade Federal de Viçosa ao DTA e ao CNPq, pela oportunidade e pelo auxílio financeiro.

A Companhia de Café Três Corações, especialmente a Gustavo do Vale pela doação do café utilizado neste trabalho. Igualmente, a Companhia Cacique de Café e ao Sr. Edenir Gualtieri, pelo fornecimento do óleo de café utilizado no desenvolvimento das metodologias de análise.

Aos meus pais, por terem me dado a oportunidade de crescer em todos os sentidos, pelo apoio constante, força, sensatez e preocupação em todos os momentos. Aos meus irmãos, pela ajuda e incentivo constantes.

À Patrícia, namorada, às vezes mãe e irmã, companheira e amor, em todas as horas, pela compreensão, pelo carinho e paciência em todos os momentos desta jornada.

LISTA DE SÍMBOLOS:

CO₂-SC = dióxido de carbono supercrítico

DTP tot = diterpenos totais = cafestol + caveol

FCO₂ = fluxo de CO₂ (mL/min)

G_C = granulometria do café (mm)

P = pressão do CO₂ (bar)

P_c = pressão crítica

P_R = (P/P_c) = pressão reduzida

M_{SE} = massa de café submetida à extração (mg)

T = temperatura de extração (°C)

T_c = temperatura crítica

T_{ED} = tempo de extração dinâmico (min)

T_{EE} = tempo de extração estático (min)

T_R = (T/T_c) = temperatura reduzida

ρ = densidade do CO₂ (g/mL)

ρ_c = densidade do CO₂ no ponto crítico (g/mL)

ρ_R = (ρ/ρ_c) = densidade reduzida

AFB₁ = aflatoxina B₁

AFBO = aflatoxina B₁-8,9-epóxido

BHA = 3-tert-butil-4-hidroxianisole

DMBA = 7,12-dimetilbenz[α]antraceno

GCS = glutamincisteína sintetase

GSH = glutationa

GST = glutationa-S-transferase

PHIP = 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1. Teoria dos fluidos supercríticos | 5 |
| 1.1. Dióxido de carbono como fluido supercrítico (CO ₂ -SC) | 11 |
| 2. Aplicações dos fluidos supercríticos | 12 |
| 2.1. Extração de óleos vegetais com fluidos supercríticos | 15 |
| 3. O café | 16 |
| 4. O óleo de café | 17 |
| 4.1. Teor de óleo | 17 |
| 4.2. Composição do óleo | 18 |
| 5. Aplicações do óleo de café verde na indústria de alimentos e farmacêutica | 20 |
| 6. Aplicações do óleo de café torrado na indústria de alimentos | 25 |
| 7. Aplicações na indústria de cosméticos | 26 |
| 8. Propriedade hipercolesterolêmica e hiperlipidêmica do óleo de café | 28 |
| CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DO ÓLEO EXTRAÍDO COM SOLVENTE | 33 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 33 |
| 1.2. MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 1.2.1. Preparo da matéria-prima | 35 |
| 1.2.2. Teor de umidade da matéria-prima | 35 |
| 1.2.3. Determinação do extrato etéreo | 35 |
| 1.2.4. Perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos do óleo | 36 |
| 1.2.4.1. Preparo das amostras | 36 |
| 1.2.4.2. Determinação do perfil dos ácidos graxos | 36 |
| 1.2.4.3. Determinação do teor de diterpenos | 36 |
| 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 1.3.1. Obtenção do café triturado | 37 |
| 1.3.2. Teores de umidade e de óleo | 38 |
| 1.3.3. Perfil de ácidos graxos do óleo do café | 39 |
| 1.3.4. Determinação do teor de diterpenos do óleo | 40 |
| 1.3.4.1. Determinação do índice de recuperação do método | 40 |
| 1.3.4.2. Teor de diterpenos | 42 |
| 1.4. CONCLUSÕES | 44 |
| CAPÍTULO 2 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CAFÉ VERDE COM CO ₂ SUPERCRÍTICO | 45 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 46 |
| 1.2. MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 1.2.1. Preparo da matéria-prima | 49 |
| 1.2.2. Extração do óleo com solvente | 49 |
| 1.2.3. Extração do óleo com CO ₂ supercrítico | 49 |
| 1.2.4. Determinação da quantidade de óleo extraída | 52 |
| 1.2.5. Perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos do óleo | 52 |

| | |
|---|-----|
| 1.2.5.1. Preparo das amostras | 52 |
| 1.2.5.2. Determinação do perfil dos ácidos graxos | 53 |
| 1.2.5.3. Determinação do teor de diterpenos | 53 |
| 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 1.3.1. Perfil dos ácidos graxos | 54 |
| 1.3.2. Curva de calibração e índice de recuperação do método utilizado na determinação dos diterpenos | 56 |
| 1.3.3. Estudos preliminares para a otimização do rendimento em óleo pelo CO ₂ -SC | 58 |
| 1.3.4. Etapa 1 – Rendimento em óleo em função da temperatura e da densidade de extração | 60 |
| 1.3.4.1. Efeito da pressão - comportamento retrógrado | 63 |
| 1.3.5. Etapa 1 – Teor de diterpenos em função da densidade e temperatura de extração | 65 |
| 1.3.6. Etapa 2 – Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática; fluxo de CO ₂ ; quantidade de café submetida à extração; granulometria do café; e tempo de extração dinâmica | 70 |
| 1.3.6.1. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática (T _{EE}) | 72 |
| 1.3.6.2. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com a quantidade de café submetida à extração (Q _{SE}) | 73 |
| 1.3.6.3. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com o fluxo de CO ₂ (FCO ₂) | 74 |
| 1.3.6.4. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com a granulometria do café (G _c) | 76 |
| 1.3.6.5. Rendimento em óleo de acordo com o tempo de extração dinâmica (T _{ED}) | 80 |
| 1.3.6.6. Teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração dinâmica (T _{ED}) | 85 |
| 1.4. CONCLUSÕES | 88 |
| CAPÍTULO 3 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CAFÉ TORRADO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO | 90 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 91 |
| 1.2. MATERIAL E MÉTODOS | 92 |
| 1.2.1. Preparo da matéria-prima | 93 |
| 1.2.2. Extração do óleo por solvente | 93 |
| 1.2.3. Extração do óleo pelo CO ₂ supercrítico | 93 |
| 1.2.4. Determinação da quantidade de óleo extraída | 96 |
| 1.2.5. Perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos do óleo | 96 |
| 1.2.5.1. Preparo das amostras | 96 |
| 1.2.5.2. Determinação do perfil dos ácidos graxos | 96 |
| 1.2.5.3. Determinação do teor de diterpenos | 97 |
| 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 98 |
| 1.3.1. Perfil dos ácidos graxos | 98 |
| 1.3.2. Curva de calibração e índice de recuperação do método utilizado na determinação dos diterpenos | 99 |
| 1.3.3. Estudos preliminares para a otimização do rendimento em óleo pelo CO ₂ -SC | 101 |

| | |
|---|-----|
| 1.3.4. Etapa 1 – Rendimento em óleo em função da temperatura e da densidade de extração | 103 |
| 1.3.4.1. Efeito da pressão - comportamento retrógrado | 107 |
| 1.3.5. Etapa 1 – Rendimento em óleo em função da temperatura e da densidade de extração | 109 |
| 1.3.6. Etapa 2 – Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática; fluxo de CO ₂ ; quantidade de café submetida à extração; granulometria do café; e tempo de extração dinâmica | 113 |
| 1.3.6.1. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com o tempo de extração estática (T _{EE}) | 114 |
| 1.3.6.2. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com a quantidade de café submetida à extração (Q _{SE}) | 116 |
| 1.3.6.3. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com o fluxo de CO ₂ (FCO ₂) | 117 |
| 1.3.6.4. Rendimento em óleo e respectivo teor de acordo com a granulometria do café (G _c) | 119 |
| 1.3.6.5. Rendimento em óleo de acordo com o tempo de extração dinâmica (T _{ED}) | 122 |
| 1.3.6.6. Teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração dinâmica (T _{ED}) | 126 |
| 1.4. CONCLUSÕES | 128 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 130 |

RESUMO

SANDI, DELCIO. D.S. Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2003.
Extração do óleo e diterpenos do café com CO₂ supercrítico.
Orientador: Júlio Maria de Andrade Araújo. Conselheiros: Marco Túlio Coelho da Silva, Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Foi testada a viabilidade técnica para a extração dos óleos de café verde e café torrado pelo CO₂-SC. Foram avaliados o perfil dos ácidos graxos e os teores de cafestol e caveol, diterpenos presentes exclusivamente no café. Foram determinadas as condições operacionais para obter a maior quantidade de óleo para ambos os tipos de café, entretanto, com o maior teor de diterpenos possível no óleo de café verde, e o menor, no óleo de café torrado. Para isso, foram otimizadas primeiramente a temperatura de operação (60 °C, 70 °C, 80 °C e 90 °C) e a densidade do CO₂ (0,68 g/mL, 0,71 g/mL, 0,74 g/mL, 0,77 g/mL, 0,81 g/mL, 0,84 g/mL e 0,88 g/mL), tanto para o café verde quanto para o torrado, mantendo-se constantes as variáveis tempo de extração estática (5 min); granulometria do café (0,297 mm a 0,35 mm); massa de café submetida a extração (200 mg); fluxo do CO₂ (1,5 mL/min), e tempo de extração dinâmico (20 min). Para cada temperatura e densidade, foram escolhidas as três condições de extração para as quais os objetivos pré estabelecidos foram alcançados. Foram então otimizados, o tempo de extração estática (0 min, 2 min e 5 min); a granulometria do café (0,297 mm a 0,35 mm; 0,35 mm a 0,42 mm, 0,42 mm a 0,50 mm); a massa de café submetida à extração (100 mg, 150 mg e 200 mg); o fluxo do CO₂ (1,5 mL/min, 2,0 mL/min e 2,5 mL/min), e o tempo de extração dinâmico (5 min, até a extração de óleo máxima). Os resultados obtidos para o teor de óleo, o perfil de ácidos graxos e o seu conteúdo de diterpenos, foram comparados com o óleo obtido por extração em equipamento de Soxhlet, utilizando hexano como solvente. O perfil de ácidos graxos foi semelhante para os dois métodos extrativos. As diferentes densidades e temperaturas utilizadas na extração por CO₂-SC não proporcionaram diferenças no perfil dos ácidos graxos. O CO₂-SC proporcionou a extração de todo o óleo presente no café, determinado pela extração com hexano. As características da matéria-prima e as condições utilizadas foram, respectivamente, para o óleo de café verde e torrado: umidade do café de 9,98

% e 2,40 %; granulometria do café de 0,297 mm a 0,35 mm, para ambos os casos; massa de café submetida à extração igual a 200 mg, para ambos os casos; fluxo do CO₂ de 1,5 mL/min e 2,0 mL/min; não utilização de extração estática e emprego de 5 min de extração estática. Para o óleo de café verde, a temperatura da extração e a densidade do CO₂ mais eficientes, em termos de quantidade de óleo obtida e consumo de CO₂ foram de 90°C e 0,77 g/mL, respectivamente. Estas condições promoveram a completa extração do óleo em 20 min, consumindo 28,6 g de CO₂ (7,13 x 10⁻⁴ g de óleo por g CO₂). Em relação ao teor de diterpenos, a temperatura de 70 °C e densidade do CO₂ de 0,74 g/mL, foram as que proporcionaram a maior concentração. Os teores de cafestol e de caveol no óleo foram de 201,7 mg/ 100 g e 251,6 mg/100 g, respectivamente. Estes dados são, respectivamente, 52,5 % e 52,8 %, menores que os teores de cafestol e de caveol no óleo extraído com hexano. Para o óleo de café torrado, o processo extrativo à 70 °C e densidade do CO₂ de 0,84 g/mL, por 20 min, foi suficiente para promover a sua completa extração. Esta condição foi também a mais eficiente na redução do teor de diterpenos presentes no óleo. Os teores de cafestol e de caveol foram, respectivamente, de 94,4 mg/ 100 g e 114,7 mg/ 100g, representando uma redução de 71,3 % e 71,2 %, em relação aos teores destes componentes determinados no óleo extraído com solvente. De uma forma geral, foi observada uma relação inversa entre a quantidade de óleo obtida e o teor de diterpenos. Por isso, diferentes teores de óleo, com diferentes teores de diterpenos podem ser obtidos por esta técnica, tornando-a potencialmente interessante para a obtenção deste produto. Para o óleo de café torrado, por exemplo, a redução do seu teor de diterpenos em até 71 %, aumenta significativamente a sua estabilidade, a sua qualidade sensorial e reduz o seu potencial hipercolesterolêmico.

ABSTRACT

SANDI, DELCIO. D.S. Universidade Federal de Viçosa, January, 2003.
Supercritical fluid extraction of coffee diterpenes and coffee oil.
Adviser: Júlio Maria de Andrade Araújo. Committee members: Marco Túlio Coelho da Silva, Jane Sélia dos Reis Coimbra.

This study was carried out to test the feasibility of supercritical carbon extraction of oil from both green and roasted coffee beans. The oil composition regarding to fatty acid profile (FA) and levels of the diterpenes cafestol and khaweoal (both found exclusively in coffee beans) was evaluated. Operational conditions were initially determined to maximize oil extraction from both green and roasted coffee beans. Also, conditions were study to obtain the highest and the lowest diterpene levels on green and roasted coffee oil, respectively. To accomplish this, operational temperature (60, 70, 80 and 90 °C) and CO₂ density (0.68, 0.71, 0.77, 0.81, 0.84 and 0,88 g mL⁻¹) were optimized for coffee oil extraction. Time static extraction (5 min), granulometry (0.297 to 0.35 mm), extraction sample weight (200 mg), CO₂ flow (1.5 mL min⁻¹), and time of dynamic extraction (20 min) were kept constant. For each temperature and density combination, three extraction conditions were selected to obtain the pre-determined objectives. Therefore, static extraction time (0, 2 and 5 min), granulometry (0.297 to 0.35 mm; 0.35 to 0.42 mm; 0.42 to 0.50 mm), extraction sample weight (100, 150 and 200 mg), CO₂ flow (1.5, 2.0 and 2.5 mL min⁻¹) and dynamic extraction time (5 min until the maximum oil extraction) were optimized. Oil content levels, FA and diterpene concentration of the oil were compared to the results obtained with the extraction with Soxhlet apparatus, in which hexane was utilized as solvent. FA profile was similar in both oil extraction methods. In addition, FA composition was not modified by the different density and temperature combinations used in the SC-CO₂. However, SC-CO₂ was able to completely extract the coffee oil (determined with hexane extraction). Best results were obtained with the following raw material characteristics and extraction conditions for green and roasted coffee beans, respectively: moisture content (9.98 and 2.40 %), granulometry (200 mg for both beans), CO₂ flow (1.5 and 2.0 mL min⁻¹), non-static extraction and 5 min static extraction utilization. For green coffee oil, the most efficient extraction

(mass of oil per unit of CO₂ consumption) was obtained with temperature of 90 °C and CO₂ density of 0.77 g mL⁻¹. These conditions promoted completely oil extraction within 20 min, using 28.6 g of CO₂ (7.13 x 10⁻⁴ g oil/g CO₂). The highest concentration of diterpenes was obtained with 70 °C and 0.74 g mL⁻¹ of CO₂. The extracted oil contained cafestol at 201.7 mg 100 g⁻¹ and kahweol at 251.6 mg 100 g⁻¹. These diterpenes values were 52.5 % and 52.8 % lower when compared to oil obtained with the hexane extraction. Roasted coffee oil was completely extracted in 20 min at 70 °C and CO₂ density of 0.84 g mL⁻¹. This condition was also the most efficient to significantly reduce the oil diterpene concentrations. Cafestol and kahweol levels were 94.4 and 114.7 g 100 g⁻¹, respectively. These values represented a reduction of 71.3 and 71.2 %, compared to levels obtained in oil extraction using hexane. In general, an inverse correlation was observed between the amount of extracted oil and diterpene concentration levels. As a result, different oil contents with different diterpene concentrations could be successfully obtained using this technique. For example, a reduction of 71 % on diterpene levels of roast coffee oil significantly increases its stability and sensorial profile, and decreases hypercholesterolemic effect.

INTRODUÇÃO

O grão de café verde possui em torno de 10 % a 15 % de óleo com elevado teor de compostos insaponificáveis, dos quais fazem parte principalmente os diterpenos cafestol e caveol, presentes exclusivamente no café. Esta composição peculiar do óleo de café verde torna-o valioso para a indústria de cosméticos dadas as suas propriedades amaciantes, emolientes e hidratantes, além da capacidade de bloquear a radiação solar. Outras propriedades, como antiinflamatórias e anticarcinogênicas são também citadas na literatura.

Já o café torrado contém alta quantidade de compostos voláteis que proporcionam o seu sabor e aroma característicos, os quais são encontrados principalmente no seu óleo. Por isso, o óleo de café torrado é utilizado na indústria de alimentos como fonte de aroma, em produtos de confeitaria, balas e chocolates, na produção de café instantâneo, onde pode ou não ser adicionado no final do processo.

A presença do cafestol e do caveol no óleo afeta a sua estabilidade e diminui a sua qualidade sensorial (HAMELL et al., 1979). Adicionalmente, a presença dos diterpenos cafestol e caveol no óleo de café torrado ($\approx 1\%$), tem sido considerada responsável pela elevação do colesterol em consumidores de café que não utilizam filtro de papel na sua obtenção, como o café expresso, turco e grego, os quais apresentam altas quantidades de óleo. Desta forma, este tipo de bebida possui elevada quantidade de diterpenos, podendo aumentar os níveis de colesterol de quem os consome.

Devido a estas questões, os diterpenos como qualquer outra substância, não podem ser classificados unicamente como benéficos ou maléficos. De acordo com CAVIN et al. (1998), a exposição a doses aceitáveis em relação a atividade hipercolesterolêmica pode ser benéfica em relação as propriedades nutracéuticas dadas, principalmente, pelo potencial anticarcinogênico destas substâncias. Esta observação, coloca os diterpenos em uma classe de compostos a qual pode ser considerada futuramente para a inclusão em alimentos como aditivo (HUBER et al., 2002), além de poderem ser utilizados na indústria farmacêutica e de cosméticos.

Outro fator importante a ser ressaltado é que existe certa especificidade destas duas substâncias em relação à atividade hipercolesterolêmica ou anticarcinogênica. Se por um lado o cafestol tem demonstrado ser o composto chave no aumento dos níveis de colesterol (POST et al., 1997), o caveol parece desempenhar a função anticarcinogênica em maior grau (LAM et al., 1982), o que amplia o seu leque de aplicações potenciais.

Tradicionalmente, os óleos vegetais são obtidos por prensagem, cujo rendimento é geralmente baixo, ou por meio de solventes orgânicos, como o hexano, que extraem completamente o óleo, mas que podem deixar resíduos de solvente no óleo, diminuindo a sua qualidade e também causar sérios problemas ambientais com o descarte do solvente.

O rendimento médio em óleo de café verde, na extração por prensagem a frio, não ultrapassa 3,5 % (Zanze Cosméticos, Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, informação pessoal). Em relação à produção do óleo de café torrado, no Brasil, algumas poucas empresas o processam para a indústria de alimentos. Nestas, a extração se dá exclusivamente por prensagem, obtendo-se um rendimento que raramente ultrapassa 5 % (Cia Cacique de Café Solúvel, Londrina, Paraná, informação pessoal).

Como alternativa aos processos tradicionais, a tecnologia de extração com fluidos supercríticos tem sido utilizada há algum tempo. Avanços na aplicação de CO₂ supercrítico tem tornado esta técnica atrativa para a extração de biomaterias sem as desvantagens dos métodos clássicos de extração. Além de não poluir o ambiente, e resultar em produtos de alta qualidade sem resíduos de solventes, este processo pode ser empregado para o seu fracionamento, facilitando a separação de compostos desejáveis e/ou indesejáveis.

O potencial do uso desta tecnologia deve-se a sua habilidade em extrair componentes de matrizes complexas, consubstanciado por leis ambientais cada vez mais severas aos processos industriais, e a demanda pelos consumidores por produtos naturais (TEJA e ECKERT, 2000; PERRUT, 2000).

Em café, a tecnologia de extração supercrítica tem sido quase que exclusivamente empregada para a sua descafeinização, sendo que inúmeros trabalhos e patentes tem sido publicados a esse respeito. Na literatura foram

encontradas duas patentes visando a extração do óleo de café torrado como fonte de aroma, uma nos EUA e outra na Alemanha. Entretanto, nenhum destes trabalhos avaliou o comportamento dos diterpenos presentes no óleo e tão pouco a extração do óleo de café verde.

Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia para a obtenção destes produtos trará avanços para a indústria nacional de alimentos, de cosméticos, e farmacêutica, diminuindo a dependência em tecnologia externa para a sua produção, além de agregar valor ao produto, e aumentar a competitividade do óleo de café brasileiro nos países consumidores.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Teoria dos fluidos supercríticos

A obtenção de produtos de ocorrência natural faz parte do nosso cotidiano e diversas etapas podem estar envolvidas nos processos empregados na sua obtenção. Segundo MOHAMED (1997), estas etapas podem ser simplesmente mecânicas ou envolver operações de transferência de massa, como extração, destilação, absorção, adsorção, entre outras. Neste sentido, os fluidos supercríticos apresentam-se como meios bastante atrativos no processamento de produtos de ocorrência natural devido a certas características inerentes, como a facilidade de recuperação do soluto, reciclagem do solvente e a possibilidade de direcionar a separação pela escolha das condições termodinâmicas de temperatura e/ou pressão.

De acordo com SIHVONEN et al. (1999), o estado supercrítico foi registrado pela primeira vez em 1822 pelo Barão Gagniard de la Tour. Mais de meio século depois, em 1879, Hannay e Hogarth demonstraram o poder solvente dos fluidos supercríticos. Mas somente 100 anos depois, esta tecnologia passou a ser utilizada em laboratórios e posteriormente em escala industrial.

O estado supercrítico é atingido quando a temperatura e a pressão a que uma substância é submetida são elevadas ao seu ponto crítico (Figura 1). A partir deste ponto não existe mais distinção entre a fase gasosa e a líquida, e o fluido não é liquefeito com o aumento da pressão, nem tampouco é transformado em gás pelo aumento da temperatura (SHIVONEN et al., 1999).

A pressão crítica é definida como a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido a um gás pelo aumento da temperatura. Analogamente, a temperatura crítica é considerada a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido a um líquido pelo aumento de pressão. Desta forma, acima do ponto crítico, variações de pressão e de temperatura não modificam a fase do fluido (RIZVI et al., 1986), e ele adquire propriedades intermediárias às aquelas apresentadas na forma de gás e de líquido, como pode ser observado na Tabela 1.

Dado a estas características, propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos como densidade, difusividade, constante dielétrica e viscosidade

podem ser facilmente controladas por variações de pressão e temperatura sem que ocorra mudança de fases (SIHVONEN et al., 1999).

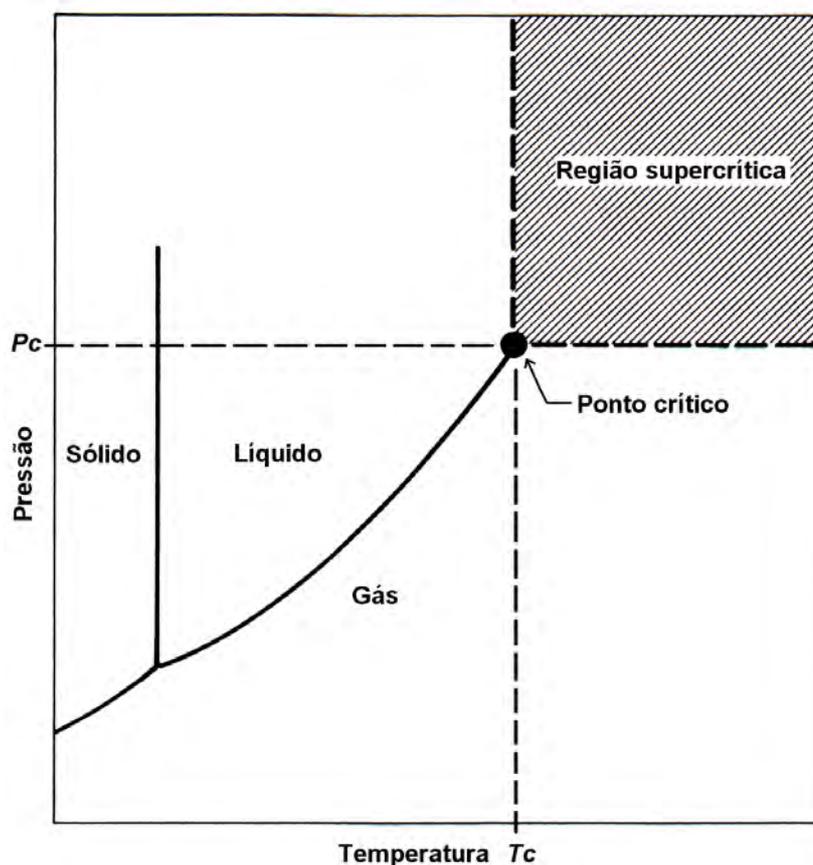


Figura 1 – Diagrama de fases de uma substância pura (P_c = pressão crítica; T_c = temperatura crítica). Fonte: MCHUGH e KRUKONIS (1994).

Tabela 1 – Propriedades físicas típicas dos fluidos supercríticos em diferentes estados.

| Propriedade | Gás | Fluido supercrítico | | Líquido |
|---|--|----------------------|----------------------|--|
| | $P = 0,1 \text{ mPa}$ $T = 15 \text{ a } 30 \text{ }^\circ\text{C}$ | P_c T_c | $4P_c$ T_c | $P = 0,1 \text{ mPa}$ $T = 15 \text{ a } 30 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| Densidade (g/cm^3) | 0,0006 a 0,002 | 0,2 a 0,5 | 0,4 a 0,9 | 0,6 a 1,6 |
| Viscosidade ($\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$) | 10 a 30 | 10 a 30 | 30 a 90 | 200 a 3000 |
| Difusividade (cm^2/s) | 0,1 a 0,4 | $0,7 \times 10^{-3}$ | $0,2 \times 10^{-3}$ | $(0,2 \text{ a } 2) \times 10^{-5}$ |

Fonte: modificado de RIZVI et al. (1986a).

Como pode ser observado, a densidade de um fluido supercrítico é próxima àquela apresentada pelos líquidos, mas a difusividade e a viscosidade são semelhantes àquelas dos gases. Estas propriedades tornam os fluidos

supercríticos interessantes já que a alta densidade proporciona a eles um poder solvente semelhante ao apresentado pelos líquidos, enquanto a alta difusividade e a baixa viscosidade permitem alto poder de penetração em diferentes matrizes, propriedade esta apresentada pelos gases (RIZVI et al., 1986a), o que favorece a transferência de massa no processo de extração.

Diferentemente dos líquidos, entretanto, onde a densidade é difícil de ser modificada, nos fluídos supercríticos ela pode ser facilmente alterada pela variação da temperatura e pressão, notadamente a última. Pequenas variações de pressão próximas ao ponto crítico provocam grandes mudanças na densidade do solvente, o que conseqüentemente modifica a sua capacidade de solvatação (SIHVONEN et al., 1999). Isto acontece porque à medida que as condições de temperatura e de pressão de uma substância aproximam-se de seu ponto crítico, sua compressibilidade isotérmica tende ao infinito, e o seu volume molar ou a sua densidade modificam-se drasticamente (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

A observação de um gráfico de pressão reduzida ($P_R = P/P_c$) versus temperatura reduzida ($T_R = T/T_c$) ilustra melhor este comportamento (Figura 2). Para uma temperatura reduzida entre 0,9 a 1,2 a densidade reduzida ($\rho_R = \rho/\rho_c$) pode aumentar de 0,1 (densidade comum para os gases) a 2,5 (densidade comum para os líquidos), a medida em que a pressão reduzida é aumentada para valores próximos de 1,0. Entretanto, a medida em que a temperatura reduzida (T_R) é aumentada para 1,55 o fluido supercrítico expande, e pressões reduzidas maiores que 10,0 são necessárias para obter densidades semelhantes às de um líquido. Deste modo, as variações de pressão e temperatura nesta região são utilizadas para regular a densidade e o poder de solvatação de um fluido.

McHUGH e KRUKONIS (1994), descreveram o comportamento da solubilidade do naftaleno sólido em etileno supercrítico ($T_c = 9,3$ °C, $P_c = 50,5$ bar) (Figura 3).

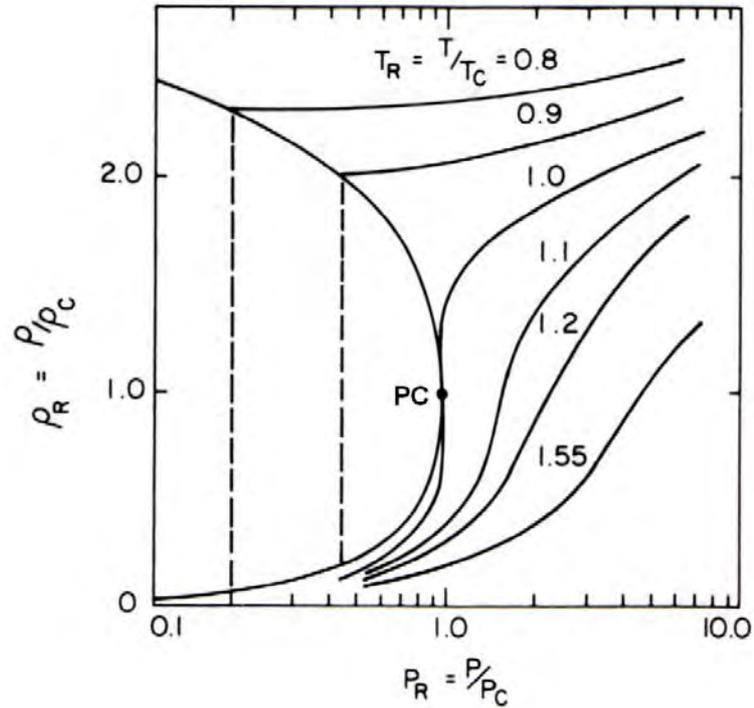


Figura 2 – Variação da densidade reduzida de um composto puro, em condições próximas ao ponto crítico (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

Na isoterma de 12 °C ($T_R = 1,01$) a solubilidade do naftaleno aumenta abruptamente até a pressão de 50 bar, o que corresponde à pressão crítica do etileno. A pressões abaixo de 50 bar a sua solubilidade é muito baixa, uma vez que a pressão crítica não é atingida. É interessante notar que o comportamento desta isoterma é parecido com a isoterma reduzida igual a 1,0 ($T_R = 1,0$) da Figura 1.

A Figura 4 apresenta a região supercrítica, bem como a subcrítica (*nearcritical-liquid*) para o dióxido de carbono. Obviamente, o estado supercrítico está situado acima de $P_R = 1$ e de $T_R = 1$, e a região subcrítica é definida por FILLIPI (1982) como estando entre $T_R = 0,95$ e $T_R = 1$.

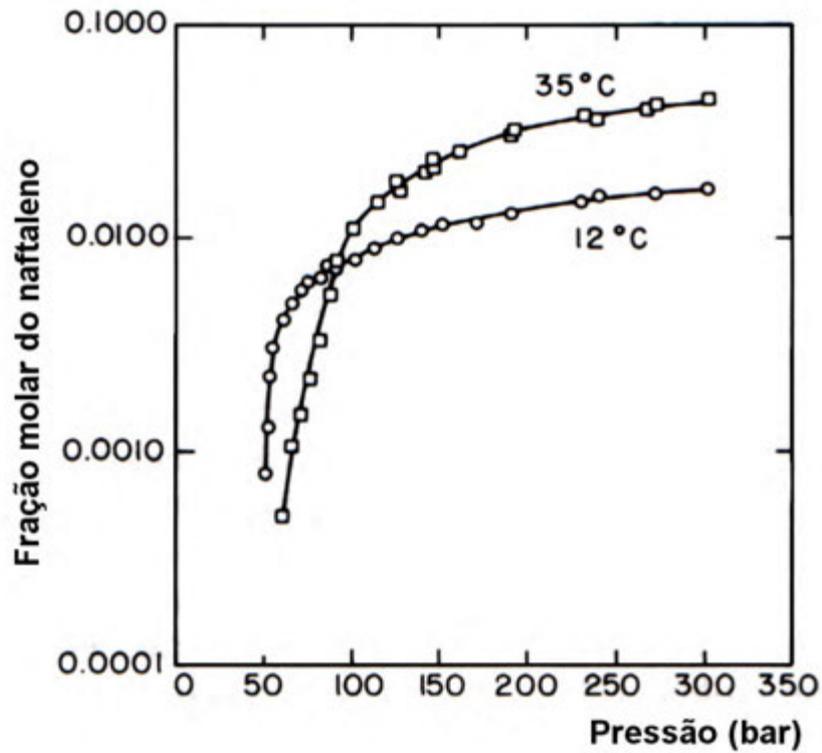


Figura 3 – Solubilidade do naftaleno sólido no etileno supercrítico (PC = ponto crítico) (McHUHG e KRUKONIS, 1994).

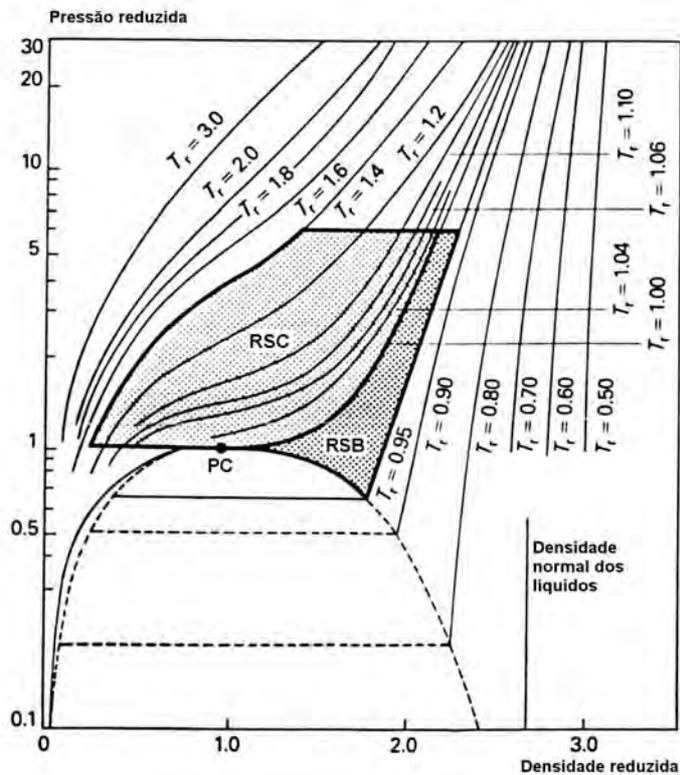


Figura 4 – Densidade reduzida versus pressão reduzida para o dióxido de carbono puro. (RSC = região supercrítica; RSB = região subcrítica) (FILIPPI, 1982).

Observa-se que em valores próximos ao ponto crítico, a medida em que a temperatura aumenta ocorre uma diminuição relativa da densidade, o que se por um lado aumenta a difusividade do solvente e a pressão de vapor do soluto, diminui o seu poder de solvatação. Assim, a concentração do soluto no solvente será função destas duas variáveis. Observa-se também pela extrapolação das isotermas do gráfico, que em pressões muito elevadas a maior influência na solubilidade é dada pela alteração da temperatura, e não mais pela variação de densidade.

Contudo, para condições de pressão usuais de extração, a modificação da densidade, traduzida na capacidade de solvatação do solvente, é a base para todo o processo de extração com fluidos supercríticos. Quanto maior a densidade, maior será o poder de extração de um fluido, entretanto, menor a sua seletividade (REVERCHON et al., 1995).

Desta forma, o aumento da densidade aumenta o poder de solvatação do fluido supercrítico, assim como o aumento da temperatura melhora a sua difusividade, e conseqüentemente a capacidade de extração. Entretanto, altas temperaturas nem sempre são vantajosas, já que elas resultam na redução da densidade do fluido, diminuindo o seu poder solvente (FATTORI et al., 1988). Por esta razão, a definição do binômio pressão/temperatura adequado, determina o sucesso ou não do processo extrativo.

Como demonstra a Tabela 2, o ponto crítico de uma substância para outra varia consideravelmente, o que aumenta a possibilidade do emprego de diferentes fluidos em diferentes aplicações. Fluidos com temperatura crítica próxima à ambiente, como o dióxido de carbono, etano e etileno são interessantes para a extração de aromas, e lipídios termolábeis. Por outro lado, hidrocarbonetos de alta massa molar podem ser empregados na extração de frações de petróleo que apresentam alta massa molar (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

Tabela 2 – Condições de temperatura e pressão críticas para diferentes solventes

| Solvente | Temperatura crítica (°C) | Pressão crítica (bar) |
|----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Dióxido de carbono | 31,1 | 73,8 |
| Etano | 32,2 | 48,8 |
| Etileno | 9,3 | 50,4 |
| Propano | 96,7 | 42,5 |
| Propileno | 91,9 | 46,2 |
| Cicloexano | 280,3 | 40,7 |
| Isopropanol | 235,2 | 47,6 |
| Benzeno | 289,0 | 48,9 |
| Tolueno | 318,6 | 41,1 |
| <i>p</i> -xileno | 343,1 | 35,2 |
| Clorotrifluorometano | 28,9 | 39,2 |
| Triclorofluorometano | 198,1 | 44,1 |
| Amônia | 132,5 | 112,8 |
| Água | 374,2 | 220,5 |

Fonte: McHUGH e KRUKONIS (1994)

1.1. Dióxido de carbono como fluido supercrítico (CO₂-SC)

Mesmo com a disponibilidade de fluidos com diferentes poder solvente, é extremamente dispendioso atingir o ponto crítico de determinadas substâncias, como a água, por exemplo, que apesar de ser um solvente extremamente polar, ao contrário do CO₂, apresenta temperatura e pressão críticas bastante elevadas (Tabela 2). Além disso, alguns fluidos são tóxicos e outros apresentam alta inflamabilidade, tornando a utilização do CO₂, puro ou em misturas com modificadores, como o mais atrativo.

Fluidos inertes, não-tóxicos, não-inflamáveis, não-agressivos ao meio ambiente e com temperaturas críticas baixas, como o dióxido de carbono, apresentam a possibilidade de realização da extração e do fracionamento sem os riscos de deixar resíduos indesejáveis e/ou provocar a degradação térmica dos produtos obtidos (MOHAMED, 1997).

De acordo com RAMSAY (1991), o uso do CO₂ como fluido supercrítico apresenta vantagens como a baixa pressão crítica (73 bar) e a temperatura

crítica (31 °C) próxima a ambiente, o que facilita a sua utilização. Possui baixa toxidez, não é explosivo, não poluente, e disponível em grandes quantidades, sendo facilmente removido do produto extraído, podendo então ser reciclado. Além de ser ambientalmente inócuo, o CO₂ é considerado seguro à exposição humana em níveis aceitáveis, podendo ser liberado no ambiente.

Apesar de apresentar inúmeras vantagens, a utilização do CO₂-SC é limitada por ser um solvente essencialmente apolar, dificultando assim a extração de muitos compostos polares e iônicos. O baixo poder solvente do CO₂ se deve a baixa constante dielétrica, situada entre 1,4 e 1,5 enquanto a grande maioria dos solventes orgânicos possui constante dielétrica variando de 2,5 a 4,0. Para comparação, a constante dielétrica da água é aproximadamente 78.

Para diminuir esta limitação, a capacidade solvente essencialmente apolar do CO₂-SC pode ser alterada com a adição de modificadores, surfactantes e quelantes (BRENNECKE, 1997), com os quais forma misturas facilmente, e aumenta a sua força solvente. A adição de co-solventes ou modificadores aumenta a solubilidade do soluto. O efeito co-solvente é definido como a razão entre a solubilidade obtida com a utilização do co-solvente e àquela obtida sem a sua utilização (WANG et al., 2001). Normalmente, modificadores como o etanol, são utilizados na extração de óleos vegetais quando se deseja melhorar a extração de compostos polares lipossolúveis, como fosfolípidios, pigmentos e ácidos graxos livres (MISHRA et al. 1994; STHAL et al., 1980).

2. Aplicações dos fluidos supercríticos

A primeira aplicação em escala industrial dos fluidos supercríticos foi realizada na década de 70 para a descafeinização do café (GOPALAKRISHNAN, 1990). De lá para cá, vários trabalhos tem aumentado o leque de aplicação, como pode ser observado nas Tabela 3 e 4.

Tabela 3 – Possíveis aplicações do CO₂-SC

| Indústria | Finalidade |
|----------------------------------|---|
| Indústria de alimentos e bebidas | Obtenção de aromas e essências; pigmentos naturais; gorduras animais, fosfatídios (p. e., lecitina); condimentos (p. e., baunilha, pimenta, cravo, noz moscada); gorduras e óleos vegetais a baixas temperaturas; aromas de frutas; lúpulo; café e chá sem cafeína. |
| Indústria farmacéutica | Obtenção de extratos de plantas (p.e., valeriana, camomila, pimenta); e princípios ativos para drogas (p. e., penicilinas, esteróides). |
| Indústria de cosméticos | Obtenção de óleos essenciais; substâncias ativas de origem vegetal; óleos e gorduras de alto valor agregado (p. e., ácidos graxos e substâncias presentes em óleos). |

Fonte: modificado de UHDE (n.d.).

Além da sua utilização como solvente de extração, os fluidos supercríticos, especialmente o CO₂-SC, têm sido empregados como meio para reações enzimáticas e químicas (McHUGH e KRUKONIS, 1994), e como técnica cromatográfica alternativa à cromatografia de fase líquida e gasosa (FLAMENT et al., 1994).

Atualmente, uma das aplicações mais promissoras está relacionada a extração de ingredientes para alimentos, compostos nutracéuticos e fármacos (PERRUT, 2000). De acordo com TEJA e ECKERT (2000), unidades de extração de compostos nutracéuticos e fitoquímicos obtidos de produtos naturais tem sido construídas no extremo oriente, objetivando, por exemplo, a extração de ginseng.

Tabela 4 – Plantas industriais

| Empresa | Atividade | Capacidade |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ General Foods (Houston, EUA) ▪ Kaffee HAG AG (Bremen, Alemanha) ▪ Hermsen (Bremen, Alemanha) ▪ SKW Trostberg (Pozzilo, Itália) | Decafeinização de café | 50.000 ton/ano 22.000 ton/ano 22.000 ton/ano Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ SKW Trostberg AG (Alemanha) | Decafeinização de chá | 6.000 ton/ano |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pfizer Hops Extraction (Sidney, Austrália) ▪ Hopfenextraktion HVG, Barth, Raiser & Co. (Wolznach, Alemanha) ▪ Hops extraction Corp. of America (Yakima, EUA) ▪ J. I. Haas, Inc. (Yakima, EUA) ▪ Carlton & United Breweries Ltd. (Melbourne, Austrália) | Extração de lúpulo | Desconhecida 22.000 ton/ano 1.000 a 2.000 ton/ano Desconhecida Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ SKW Trostberg AG/HEG (Munchmuenster, Alemanha) ▪ Pauls & White, Inglaterra | Extração de lúpulo e especiarias | 10.000 ton/ano Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Philip Morris (Hopewell, EUA) | Extração de nicotina | Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Kerr (McGee, EUA) | Rose (óleos residuais) | Variável |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cammilli Albert & Louie (Grasse, França) | Extração de fragrâncias | 4 ext. de 100L |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Flavex GmbH (Rehlingen, Alemanha) | Extração de fragrâncias e aromas | 1 ton/dia |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mori Oil Mills (Ise, Japão) | Extração de óleo de milho | Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mori Oil (Masuzaka, Japão) ▪ Fuji Flavor (Japão) ▪ Sumitomo Seiko (Japão) ▪ Yasuma (Japão) ▪ Hasegawa Koryo (Japão) ▪ Takasago Foods (Japão) | Extração de corantes de pimenta | Extr. de 500L Desconhecida Desconhecida Desconhecida Desconhecida Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Takada Pharmaceuticals (Japão) | Purificação de resíduos farmacêuticos | Extr. de 1200 L |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Marbet GmbH (Dusseldorf, Alemanha) | Ácidos graxos de cevada | Desconhecida |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Agrofarm (Inglaterra) | Refino de óleo de piretro com CO ₂ | Desconhecida |

Fonte: SUTTER et al. (1994).

2.1. Extração de óleos vegetais com fluidos supercríticos

A aplicação comercial mais importante da tecnologia dos fluidos supercríticos na indústria alimentícia é a extração da cafeína do café, com unidades de extração na Alemanha, Japão, EUA e Áustria (SALDAÑA et al., 1997; GOPALAKRISHNAN, 1990; TEMELLI et al., 1988).

Contudo, com a expansão da aplicação desta tecnologia, passou-se a ser utilizada também para a extração e fracionamento de óleos e gorduras de diferentes fontes (MODEY et al., 1996). Alguns exemplos podem ser citados, como óleo de milho (UHDE, n. d.), óleo de soja (FRIEDRICH et al., 1982), canola (FATTORI et al., 1988), óleo de manteiga (CHEN et al., 1992), de sementes de uva, (GÓMEZ et al., 1996), de buriti (FRANÇA et al., 1999), de palma (MARKOM et al., 2001), de girassol (BRAVI et al., 2002) bem como para a purificação de óleo de frituras (YOON et al., 2000) e o refino de azeite de oliva lampante (BONDIOLI et al., 1992).

Para a extração de óleos vegetais utilizam-se normalmente pressões e temperaturas relativamente baixas, variando de 200 bar a 300 bar, e de 40 °C a 60 °C, respectivamente (MAHESHWARI et al., 1992; FRANÇA e MEIRELLES, 1997), embora pressões de até 700 bar tenham sido utilizadas por FRIEDRICH et al. (1982) para a extração de óleo de soja.

A manipulação das variáveis pressão e temperatura permite a otimização do rendimento em óleo bem como a seletividade dos diferentes componentes presentes. GÓMEZ et al. (1996), extraíndo óleo de sementes de uva por CO₂-SC, obtiveram rendimento similar à extração com hexano por 20 horas em aparelho de Soxhlet. Este resultado foi obtido com a extração a 40 °C por 3 horas e pressão de 350 bar, e a qualidade do óleo foi considerada superior a do óleo extraído com solvente, o que também foi observado por STAHL et al. (1980) com a qualidade dos óleos de soja, algodão e colza.

STAHL et al. (1982), observaram em óleo de mamona, que a solubilidade dos lipídios no dióxido de carbono supercrítico aumenta, com o aumento da pressão. Entretanto, este aumento além de proporcionar maior rendimento em óleo, altera o teor dos diferentes constituintes presentes, já que a seletividade diminui com o aumento da densidade.

Além da pressão e temperatura de extração, outras variáveis como o tamanho das partículas e umidade dos grãos devem também ser considerados na otimização do rendimento em óleo, e foram estudados por GÓMEZ et al. (1996), na extração de óleo de semente de uva. Os resultados obtidos demonstraram que teores de umidade da matéria-prima entre 0,35 % e 6,3 % proporcionaram rendimentos semelhantes, diferentemente do tamanho das partículas, que apresentou diferenças significativas de rendimento, na faixa entre 0,35 mm a 2,83 mm. FOLSTAR (1989), também demonstrou que o diâmetro das partículas do café influencia no rendimento em óleo, sendo que quanto maior o diâmetro, menor é o rendimento.

A extração de óleo de café torrado com CO₂ supercrítico foi conduzida por duas empresas alemãs e patenteada nos EUA e na Alemanha (ROSELIUS et al., 1982; BRIMMER, 1996).

ROSELIUS et al. (1982), demonstraram que a temperatura de extração do óleo influencia na sua cor bem como no aroma. Neste trabalho são dados exemplos de rendimento, com temperaturas de extração variando de 50 °C a 150 °C e pressões de aproximadamente 294 bar a 1763 bar. Os rendimentos variaram de 8,7 % (80 °C e 294 bar) a 13 % (150 °C e 304 bar). Neste último, o óleo apresentou uma cor bastante escura e um aroma forte de queimado, provavelmente devido à alta temperatura, necessária para aumentar o rendimento.

Já BRIMMER (1996), concluiu que as variáveis temperatura e pressão ideais para garantir o maior rendimento em óleo de café e a maior quantidade de compostos voláteis extraída, são de 75 °C e 280 bar, respectivamente. O autor trabalhou com pressões variando de 74 bar a 350 bar, e temperaturas entre 31 °C e 90 °C.

3. O café

Apesar de ser originário da Etiópia, o café passou a ser cultivado para a obtenção de bebida na Arábia, para onde foi levado no século XV. Mais tarde, por volta de 1600, os turcos levaram o café para a Europa, de onde foi disseminado rapidamente para o resto do mundo. Em 1650 foi aberta a primeira casa de café em Oxford, na Inglaterra, e 25 anos depois elas já eram

quase 300. O Rei da França Luiz XIV foi presenteado com esta planta em 1714, e a disseminou na América Central e do Sul, por meio de suas colônias (SMITH, 1989).

No Brasil, o café foi introduzido no século XVIII pela Guiana Francesa e foi disseminado em toda a costa, chegando ao Rio de Janeiro, São Paulo e ao Paraná, tornando o Brasil o maior produtor e exportador mundial de café (AGRIANUAL, 2002).

Duas espécies são comercialmente cultivadas, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, respectivamente conhecidas como café arábica e café robusta, e apresentam diferenças em relação a sua composição química, incluindo os teores de óleo e a sua composição em diterpenos.

4. O óleo de café

4.1. Teor de óleo

Em relação ao teor de óleo, fatores como espécie, condições de cultivo, além do método de extração e determinação utilizados são importantes. Segundo FOLSTAR (1989), o café arábica contém maiores quantidades de óleo que o café robusta. Os resultados encontrados por vários autores apresentaram teores variando de 10,5 % a 17,7 % e 8 % a 10 %, respectivamente (PINTO e CARVALHO, 1961; TANGO, 1963; LERCKER et al., 1996a; MAZZAFERA et al., 1998). De acordo com FOLSTAR (1989), a torração praticamente não afeta a quantidade absoluta de óleo, entretanto, a perda de umidade aumenta o seu teor relativo. A quantidade de óleo de café extraída industrialmente é sempre menor que aquela determinada analiticamente. Segundo CALLE VELEZ (1960), a extração do óleo de café por solvente, quando utilizada nas indústrias, raramente ultrapassa 10 %.

Este comportamento também é observado na extração por prensagem. LÓPEZ-FONTAL e CASTAÑO-CASTRILLÓN (1999), determinaram a quantidade de óleo em uma variedade colombiana de café arábica, e obtiveram valores em torno de 17 %. Entretanto, o rendimento em óleo quando obtido por prensagem foi de 6,8 % a 8,7 %.

4.2. Composição do óleo

O óleo de café distingue-se da maioria dos óleos vegetais dada a maior quantidade de compostos insaponificáveis. Enquanto os óleos vegetais possuem em torno de 95 % de triglicerídios, o óleo de café apresenta em torno de 80 % (AL KANHAL, 1997). São compostos principalmente pelos ácidos palmítico e linoléico, com teores de aproximadamente 35 % e 42 %, respectivamente (MURATORE et al., 1998).

Os lipídios do grão de café verde estão presentes principalmente no endosperma, e contém uma fração considerável de compostos insaponificáveis (LÓPEZ-FONTAL e CASTAÑO-CASTRILLÓN, 1999) (Tabela 5), os quais conferem características importantes, sendo os álcoois diterpênicos cafestol e caveol e seus ésteres, os mais importantes (FOLSTAR, 1989; AL KANHAL, 1997).

Tabela 5 – Composição lipídica de grãos de café verde (porcentagem média do total de lipídios)

| Componente | % |
|---|-------------|
| Ácido graxos: | |
| C14:0 | 0,09 |
| C15:0 | 0,04 |
| C16:0 | 34,77 |
| C16:1 | 0,03 |
| C18:0 | 7,68 |
| C18:1 ω 9 | 8,33 |
| C18:1 ω 11 | 0,49 |
| C19:0 | 0,02 |
| C18:2 | 42,30 |
| C20:0 | 2,75 |
| C20:1 ω 9 | 0,27 |
| C18:3 | 1,34 |
| C21:0 | 0,07 |
| C22:0 | 0,75 |
| C23:0 | 0,08 |
| C24:0 | 0,23 |
| Triglicerídios ¹ | 75,2 |
| Ésteres de álcoois diterpênicos e ácidos graxos | 18,5 |
| Álcoois diterpênicos | 0,4 |
| Ésteres de esteróis e ácidos graxos | 3,2 |
| Esteróis | 2,2 |
| Tocoferóis | 0,04 - 0,06 |
| Fosfatídios | 0,1 - 0,5 |
| Derivados de “triptamina” | 0,6 - 1,0 |

FONTE: Maier (1981) citado por FOLSTAR (1989); ¹MURATORE et al. (1998).

Os diterpenos (Figura 5) e seus ésteres foram isolados da fração insaponificável do café verde em 1932 e 1938, respectivamente (LAM et al., 1982).

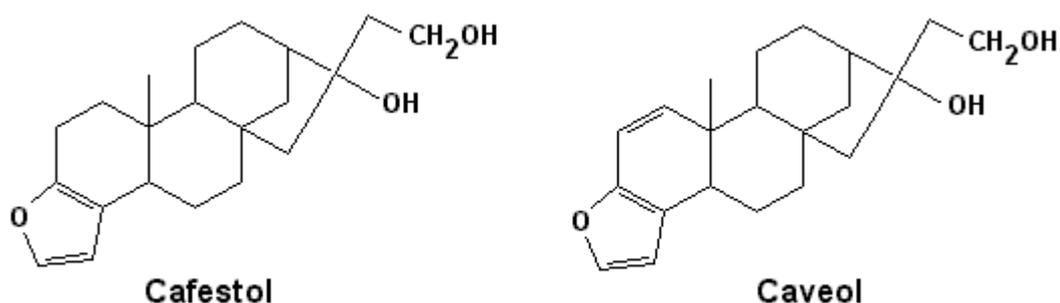


Figura 5 – Estruturas químicas do cafestol e do caveol.

O café arábica possui maiores quantidades de diterpenos que o café robusta. As quantidades no grão de café verde, variam de 1,3 % a 1,9 % (m/m) e 0,2 % a 1,5 %, respectivamente (VIANI, 1989; RATNAYAKE et al., 1993). Em relação ao óleo, LERCKER et al. (1996b) quantificaram os diterpenos em café verde e torrado obtido de várias regiões produtoras. Para o café arábica verde obtido do Brasil, a quantidade de cafestol e de caveol foi de 533,7 mg/100g de óleo, e 619,2 mg/100g de óleo; enquanto o café torrado, apresentou valores de 432,1 mg/100g e 572,3 mg/100g, respectivamente.

Os diterpenos cafestol e caveol existem no óleo na forma livre em menor quantidade, e esterificados aos ácidos palmítico, linoléico e esteárico (VAN ROOIJ et al., 1995). Segundo os autores, o óleo de café arábica contém maiores quantidades de ácidos graxos esterificados ao cafestol e caveol, que o óleo de café robusta. O último, além de possuir menores quantidades de ésteres de cafestol, apresenta somente traços de ésteres de caveol (Tabela 6).

Tabela 6 – Diterpenos livres e esterificados em óleo de café verde

| Composto | <i>C. arabica</i> (g/kg) | <i>C. canephora</i> (g/kg) |
|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Caveol esterificado à ácidos graxos | 85 | 1 |
| Cafestol esterificado à ácidos graxos | 68 | 29 |
| Caveol livre | 2 | nd |
| Cafestol livre | 2 | 1 |
| 16-O-metilcafestol | nd | 9 |

FONTE: VAN ROOIJ et al. (1995).

5. Aplicações do óleo de café verde na indústria de alimentos e farmacêutica

Evidências têm sugerido a presença de compostos no café que estimulam a formação de agentes desintoxicantes in vivo. O consumo de café reduz, por exemplo, os níveis séricos de γ -glutamilttransferase, considerada um marcador de doenças relacionadas ao fígado (NILSSEN e FORDE, 1994; TANAKA et al., 1998), o que de acordo com URGERT et al. (1995) e URGERT e KATAN (1997), deve-se à presença dos diterpenos cafestol e caveol. Adicionalmente, estudos comprovaram cientificamente que o café não possui

potencial carcinogênico (HASEGAWA et al., 1995). De acordo com PEZZUTO et al. (1986), os diterpenos presentes no café não apresentam atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium*, ao contrário do steviosídeo, um glicosídeo diterpênico presente no adoçante obtido da stévia.

Vários trabalhos têm demonstrado que os diterpenos do café apresentam propriedades anticancerígenas, pela indução da atividade de glutathione-S-transferases – GST (CAVIN et al., 1998; SCHILTER et al., 1996; LAM et al., 1982). Este sistema de enzimas (GST) catalisa a ligação de compostos eletrofílicos carcinogênicos como a aflatoxina B₁ (AFB₁) (CAVIN et al., 1998), o DMBA (7,12-dimetilbenz[α]antraceno) (WATTENBERG, 1983) e o 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-*b*] piridina (PhIP) (HUBER et al., 1997), à glutathione (GSH), reduzindo o seu efeito deletério.

Metabólitos secundários como a aflatoxina B₁ (AFB₁), por exemplo, produzida por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, são potentes indutores da formação de câncer do fígado em diversas espécies de mamíferos (homem, ratos, entre outros), em contraste com os camundongos, os quais são pouco sensíveis (CAVIN et al., 1998). Na verdade, os compostos derivados da AFB₁, após ser metabolizada pelo citocromo P450, é que apresentam atividade cancerígena, particularmente a aflatoxina B₁-8,9-epóxido (AFBO) (NIGAM e GHOSH, 1997), um metabólito instável que prontamente forma ligações com sítios nucleofílicos do DNA, causando mutações em células saudáveis (GALLAGHER et al., 1994). Felizmente, este epóxido pode ser inativado antes da sua reação com o DNA, pela conjugação com a glutathione, mediada pela glutathione-S-transferase (DEGEN e NEWMAN, 1978).

Várias substâncias possuem o poder de aumentar a atividade da GSH, e uma das mais potentes é o 3-*tert*-butil-4-hidroxianisole (BHA). Para comparação, LAM et al. (1982), testaram sob as mesmas condições experimentais a indução da atividade de GSH pelo BHA e pelo palmitato de caveol, no intestino delgado de camundongos, e concluíram que o último foi três vezes mais potente.

WATTENBERG (1983), observou a inibição de neoplasia em ratos, um tumor mamário específico, induzida antes e após a administração de DMBA, utilizando uma dieta contendo café verde. Após a alimentação com 10 % e 20

% de café verde, e administração posterior de DMBA, 75 % e 44 % dos ratos apresentaram tumores, respectivamente. No grupo controle, a incidência foi de 91 %. Quando os ratos foram alimentados com 10 % de café verde após a administração de DMBA, 50 % deles apresentaram tumores enquanto 94 % foram afetados no grupo controle. Resultados no mesmo sentido foram obtidos por WATTENBERG e LAM (1983) após a intubação oral com palmitato de cafestol ou palmitato de caveol.

Em trabalho semelhante, MILLER et al. (1988) observaram somente o aparecimento de tumores ocasionais na cavidade bucal de hamsters, tratada 3 vezes por semana com uma solução 0,5 % de DMBA em óleo mineral, e alimentados com uma dieta contendo 20 % de café verde. Todos os animais que não receberam a dieta contendo o café verde apresentaram tumores múltiplos.

Em outro trabalho com hamsters, MILLER et al. (1991) alimentaram os animais com uma dieta contendo 0,2 g/kg e 2,0 g/kg de uma mistura equivalente de cafestol e caveol, obtendo 30 % e 40 % de redução da incidência de tumores, respectivamente. CAVIN et al. (1998), observaram uma redução de 50% na formação de compostos de ligação com o DNA, após a administração de 6200 ppm de uma mistura de cafestol e caveol (52,5 % : 47,5 %) em ratos.

Contudo, o primeiro estudo com células humanas foi publicado por CAVIN et al. (2001) utilizando células epiteliais do fígado. Neste trabalho foi demonstrado que o mecanismo envolvido na diminuição da atividade cancerígena em humanos pelos diterpenos, é semelhante aquele observado em ratos, sugerindo que os resultados obtidos com esses animais podem ser extrapolados para os humanos. Foi observado um aumento da atividade de GST concomitante à redução de até 45 % na expressão de subunidades de citocromo P450, e por consequência, dos níveis de compostos de ligação.

De acordo com LAM et al. (1982), os diterpenos cafestol e caveol são dois potentes agentes anticancerígenos, já que promovem um aumento da atividade da GSH, o que também é sugerido por SCHARF et al. (2001). O Dr. Lam e seus colaboradores (LAM et al., 1982) constataram que esta atividade é dose dependente, e atribuíram o maior efeito ao palmitato de caveol

enquanto o cafestol apresentou menor atividade (5,6 e 3,9 vezes maior que o controle, respectivamente).

Em trabalho subsequente com cafestol e caveol modificados quimicamente, os mesmos pesquisadores concluíram que a atividade anticancerígena é induzida pelo anel furânico dos diterpenos e não pela função glicol (LAM et al., 1987). MILLER et al. (1994) especularam sobre a maior atividade do caveol, também comprovada no trabalho anterior, ser devido à presença da ligação dupla entre os carbonos 1 e 2 no caveol.

Segundo CAVIN et al. (2001), existem dois mecanismos pelos quais acredita-se ocorrer esta atividade em ratos e humanos. O primeiro se dá devido à redução da expressão de subunidades do citocromo P450, associado a bioativação da AFB₁ à AFBO; o segundo, ocorre devido a indução da atividade da GSH, pela qual ocorre a desintoxicação provocada pela AFBO.

Por meio dos trabalhos de HUBER et al. (1997) e HUBER et al. (2002), é possível avaliar estes mecanismos de forma mais aprofundada, embora de acordo com CAVIN et al. (2002), eles ainda não estejam totalmente elucidados. No primeiro, os autores verificaram a redução da formação de câncer de cólon em ratos, provocada por uma amina heterocíclica aromática, a 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-*b*] piridina (PhIP), com a administração dos diterpenos. A PhIP é uma amina formada por pirólise durante a cocção de alimentos, freqüentemente encontrada na urina de humanos após a ingestão de carne cozida (LYNCH et al., 1992), e é responsável pelo aparecimento de câncer de mama, da próstata, do sistema linfático e do cólon (CAVIN et al., 2002), sendo o último, uma das mais freqüentes formas de câncer do mundo ocidental (ADAMSON et al., 1996).

Junto a uma mistura de palmitato de cafestol e palmitato de caveol (1:1) foram testadas outras 16 substâncias com possível atividade anticancerígena, dentre elas o chá preto e o benzilisotiocianato. A atividade anticancerígena foi medida pela redução dos níveis de compostos de ligação formados por ligações covalentes entre o DNA e derivados do PhIP. Esta redução foi de 67 %, 66 % e 54 %, para o chá preto, o benzilisotiocianato e a mistura de diterpenos. Entretanto, somente a mistura de diterpenos esteve associada a indução de GST.

Para que ocorra a ligação covalente entre o PhIP e o DNA é necessário que a amina seja primeiramente oxidada a *N*-hidroxi-PhIP, reação catalisada pelo citocromo P450. Em seguida, este intermediário é transformado em diferentes ésteres eletrofílicos reativos, na presença de acetiltransferases, sulfotransferases e quinases, que prontamente reagem covalentemente com moléculas de DNA, formando os compostos de ligação (HUBER et al., 1997). Desta forma, a redução dos níveis de citocromo pelos diterpenos reduz o potencial cancerígeno de certas substâncias, incluindo a PhIP e a própria AFB₁ (HUBER et al., 2002).

Adicionalmente, a reação de redução das formas oxidadas de PhIP é outro mecanismo importante para a diminuição de sua capacidade cancerígena, envolvendo a GSH, a qual é catalisada pela GST (HUBER et al., 1997).

Os estudos de HUBER et al. (2002), verificaram a ativação da GSH em diferentes órgãos de ratos utilizando uma mistura de cafestol e caveol (1:1) e cafestol puro, mostrando com maior clareza a indução da atividade desta enzima. De acordo com estes autores, além de induzir a atividade da GST, ocorre uma indução da atividade da glutamilsteína sintetase (GCS), uma enzima limitante na síntese de GSH, pelo aumento dos níveis de mRNAs da GCS, o que conseqüentemente eleva a atividade da GSH. O aumento da atividade foi dose dependente, e mais pronunciada em células do fígado, que do pâncreas, cólon e rins.

Resumidamente, os complexos mecanismos pelos quais os diterpenos atuam podem ser explicados pela indução da atividade da enzima glutaiona-S-transferase (GST), pelo aumento da expressão da glutamilsteína (GCS), e conseqüente aumento da atividade da glutationa (GSH), e pela inibição da expressão e/ou atividade do citocromo P450. Isto significa que os diterpenos podem ser considerados agentes bloqueadores de metabólitos com potencial para se ligar ao DNA, modificando-os permanentemente, o que diminui a formação de tumores (CAVIN et al., 2002).

6. Aplicações do óleo de café torrado na indústria de alimentos

O óleo de café torrado é um produto que possui valor elevado como aromatizante, para as indústrias de doces, biscoitos, café instantâneo, café gelado, sorvetes, sobremesas, café capuccino, pudins, e produtos a base de leite (CIA IGUAÇÚ DE CAFÉ SOLÚVEL, 2000), dado ao seu aroma pronunciado.

Uma das utilizações do óleo de café torrado na indústria pode se dar na sua adição aos grãos de café antes da sua moagem. Estes óleos são previamente aromatizados com diversos aromas como os de chocolates, rum, baunilha, entre outros (NATURE'S FLAVORS, 2002) conferindo ao café aromas diferenciados.

Na indústria de café solúvel, uma das formas de melhorar o seu sabor é reincorporar o óleo de café torrado, durante a sua obtenção (VARGAS-VARGAS-ZAPATA et al., 1996). Por isso, várias técnicas para reincorporação do óleo no café solúvel têm sido patenteadas (KOCH et al., 1994; STOECKLI e BERRY, 1989; JASOVSKY et al., 1985; KATZ et al., 1985).

Contudo, como já comentado, a elevada fração insaponificável presente no óleo, e conseqüente concentração dos diterpenos não é desejável dada a sua capacidade hipercolesterolêmica. Além disso, de acordo com HAMELL et al. (1979), o óleo livre de diterpenos é considerado de melhor qualidade sensorial que o óleo bruto.

A considerável fração insaponificável apresentada pelo óleo levou pesquisadores a desenvolver técnicas para a sua remoção. Neste sentido foram realizados alguns trabalhos com o intuito de diminuir a concentração de diterpenos no óleo ou no próprio café torrado, quer seja por saponificação (HISBRUNNER et al., 1981), por aquecimento e extração com solução aquosa de isopropanol (ROYCHOUDHURY e RATHINDRA, 1985), ou por tratamento com ácidos, separação cromatográfica e destilação (HAMELL et al., 1979). BAECHLER e HISBRUNNER (1999) utilizaram ácido fosfórico para a remoção dos compostos diterpênicos de café para a utilização em alimentação animal.

A própria possibilidade da reutilização do café verde após a extração do seu óleo, para o processamento como café torrado, abre perspectivas no que

diz respeito à produção de um café com baixos índices de diterpenos, e que poderia ser utilizado sem restrições, em relação a sua propriedade hipercolesterolêmica, além de apresentar melhor estabilidade à oxidação.

7. Aplicações na indústria de cosméticos

Óleos vegetais, inclusive o de café, têm sido utilizados há anos na indústria de cosméticos (ALVAREZ e RODRIGUEZ, 2000). ANDERSEN (2000), compilou no *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook* as informações acerca do uso do café arábica na indústria de cosméticos. Segundo ele, além do óleo de café, os extratos de sementes e folhas também são utilizados como fonte de aroma e como agente condicionador para a pele.

O óleo de café torrado tem sido empregado na indústria de cosméticos, para a formulação de batons e produtos onde se deseja proporcionar o seu aroma (CAMPO RESEARCH, 2000; BRANNA, 2000). Entretanto, a característica mais interessante conferida pelo óleo de café verde, é a capacidade de bloquear a radiação solar UVB (280 a 320 nm), a qual mesmo possuindo capacidade bronzeadora, causa eritema na pele humana, sem contudo impedir a passagem de raios UVA (320 a 400 nm), responsáveis pelo bronzeamento saudável (CONNOCK, 1999; GROLLIER e PLESSIS, 1988). Esta função, acredita-se ser causada pelos diterpenos cafestol e caveol e seus ésteres (BERTHOLET, 1987; BERTHOLET, 1988; PELLE, 1999; SNOI INTERNATIONAL, 2000).

Outra fração importante do óleo de café para a indústria de cosméticos são os ácidos graxos presentes. O produto final das glândulas sebáceas da pele humana, chamado de sebo cutâneo, é constituído por compostos lipídicos como ácidos graxos, triglicerídios, colesterol, esqualeno, ceras, etc. Assim, o sebo cutâneo é importante por formar uma capa protetora na pele, e funcionar como um agente hidratante natural (TISNES, 1992). Entretanto, dadas às sucessivas agressões sofridas pela pele, esta capa protetora é freqüentemente removida (CONNOCK, 1999). O óleo de café por sua vez, restaura a capa protetora da pele, melhorando a aparência e a sua textura (CONNOCK, 1999, MONTCILLIAC, 2002).

De acordo com CONNOCK (1999), o ácido linoléico, presente em altas concentrações no óleo de café, faz parte dos ácidos graxos essenciais, juntamente com o ácido linolênico e araquidônico. Estes ácidos são muito interessantes quando utilizados em cosméticos, e estudos têm demonstrado que a sua carência leva a diferentes tipos de distúrbios na pele, inclusive a deficiência no processo de queratinização, levando a sua descamação.

O óleo de café além de possuir a habilidade de absorver a radiação solar indesejável em testes *in vivo* (GROLLIER e PLESSIS, 1988), promove a lubrificação da pele e regeneração da barreira hidrolipídica (CONNOCK, 1999).

Os estudos de GROLLIER e PLESSIS (1988) foram patenteados pela empresa L'Oreal (Paris), no Departamento de Patentes Americano. O óleo extraído da borra de café por solventes orgânicos, bem como frações ricas em diterpenos obtidas por destilação molecular, foram testadas em humanos como componentes de uma série de produtos para a pele, dentre eles, diferentes emulsões, géis e em misturas com outros óleos vegetais. Os resultados demonstraram que o óleo, além de possuir características desejáveis como facilidade para aplicação e distribuição uniforme nos veículos disponíveis para utilização em cosméticos, possui a propriedade de permitir a passagem dos raios UV benéficos à pele e de bloquear aqueles causadores de eritema. Esta característica importante não é observada em outros óleos vegetais utilizados em cosméticos, os quais absorvem em outros comprimentos de onda que não na faixa nociva à pele.

Os estudos concluíram também que a maior proteção à radiação foi apresentada pelas frações ricas em diterpenos, demonstrando a sua importância na proteção aos raios UV. Os autores apresentam também alguns exemplos de formulados para utilização como filtro solar.

PELLE (1999), registrou uma patente na qual outra propriedade dos diterpenos, mais especificamente do cafestol e de seus ésteres foi comprovada. Neste trabalho, estes compostos demonstraram a capacidade de aumentar a barreira lipídica do *stratus corneun*, a camada mais externa da pele. Esta camada é constituída por células queratinizadas e por espaços intercelulares preenchidos por diferentes lipídios, e funciona como uma barreira natural, impedindo a entrada de substâncias indesejáveis nas camadas

internas, além de evitar a perda de água. Os testes demonstraram que o cafestol promove um aumento da camada de *stratus corneun* pelo aumento da diferenciação celular, além de aumentar a síntese de lipídios.

O autor enfatizou também que a utilização de outros óleos vegetais, ceras e manteigas como recuperadores da barreira lipídica natural, proporciona um aspecto gorduroso à pele, o que é indesejado. Além disso, estes produtos somente promovem o aumento da barreira lipídica enquanto estão em contato com a pele, desaparecendo tão logo sejam removidos, quer seja naturalmente ou pela ação de detergentes, sabões e da própria água. Isto diferencia o cafestol e seus ésteres, já que estes induzem a formação da barreira lipídica natural, permanecendo assim o efeito após a sua remoção.

No Brasil, a Zanze Cosméticos, sediada em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, desenvolveu uma linha de cosméticos totalmente baseada na utilização do óleo de café verde. Esta empresa possui convênios com fornecedores, que após a extração do óleo, retornam o café à indústria que processam normalmente para a produção do café torrado (FOLHA DE SÃO PAULO, 1998). Recentemente, a Davene lançou um protetor solar para peles negras o qual contém óleo de café na sua composição (DAVENE, 2002).

8. Propriedade hipercolesterolêmica e hiperlipidêmica do óleo de café

Como citado, os diterpenos cafestol e caveol estão associados a algumas atividades fisiológicas em seres vivos (BAECHLER e HISBRUNNER, 1999), principalmente ao aumento da atividade de enzimas no fígado (URGERT et al., 1995; URGERT & KATAN, 1997). Algumas destas atividades são consideradas benéficas, como a propriedade anticancerígena. Não se sabe ao certo quais são exatamente as atividades indesejáveis associadas a estes compostos, entretanto, uma delas refere-se ao aumento do risco de doenças cardiovasculares pelo aumento da concentração de homocisteína (GRUBBEN et al., 2001), e principalmente pelo incremento nos níveis de LDL no sangue (VAN DE WOUW et al., 1994; HECKERS et al., 1994 e VAN ROIJ et al., 1995).

O aumento dos níveis de homocisteína plasmática é considerado um indício do risco de aparecimento de doenças cardiovasculares, e tem sido correlacionado a ingestão de café não filtrado, o qual contém altas

concentrações de diterpenos (GRUBBEN et al., 2001). Entretanto, URGERT et al. (2000) observaram rápido aumento na concentração deste marcador após a ingestão de café filtrado, o qual contém quantidades bem menores de diterpenos. Em artigo de revisão, THELLE et al. (1987) observaram que dois terços dos estudos conduzidos até então com o intuito de verificar a relação entre o consumo de café e o aumento dos níveis de colesterol no sangue, obtiveram resultados positivos.

Outra observação foi a de que esta relação era mais evidente nos estudos conduzidos em países escandinavos (FORDE et al., 1985; ARO et al., 1985; ARO et al., 1987; BAK e GROBEE, 1989) que naqueles desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos (ROSEMARIN et al., 1990; VAN DUSSELDORP et al., 1990; SUPERKO et al., 1991; SEDOR et al., 1991). Isto levou os pesquisadores a abandonar a prática de atribuir à cafeína qualquer distúrbio fisiológico que o consumo de café pudesse provocar, já que tanto na Escandinávia quanto na Europa e nos Estados Unidos, o café continha cafeína, naturalmente. A não associação da cafeína com os níveis de colesterol foi demonstrada em alguns trabalhos, como os desenvolvidos por ZOCK et al. (1990), VAN DUSSELDORP et al. (1990) e WEI et al. (1995).

Nos países escandinavos, a população ainda possui o antigo hábito de obter a bebida adicionando o pó de café a água fervida, ingerindo-a após a decantação da borra (café fervido). Todavia, a redução dos níveis de colesterol na população escandinava foi registrada a partir de 1985 (STENSVOLD et al., 1996). De acordo com STAVRIC (1992) a partir de 1960, boa parte da população passou a utilizar filtros de papel no preparo da bebida, e em 1987, somente um quarto da população finlandesa ainda consumia o café fervido.

BAK e GROBEE (1989), especularam sobre o possível mecanismo pelo qual o café fervido aumenta a concentração de colesterol plasmático. Duas hipóteses surgiram, a primeira postulava que a elevada temperatura de preparo da água do café fervido, a qual ficava em contato direto com o pó de café por um tempo relativamente longo, poderia extrair uma maior quantidade dos compostos responsáveis pela atividade hipercolesterolêmica. A segunda, que veio a ser confirmada posteriormente, acreditava que estes compostos eram retidos pelo filtro de papel, e, portanto, estariam presentes no café fervido.

De fato, os estudos conduzidos por ARO et al. (1987) e ZOCK et al. (1990) esclareceram esta dúvida, concluindo que o efeito hipercolesterolêmico do café é causado pelos lipídios, presentes em quantidades elevadas nas bebidas de café que não utilizam filtros de papel para o seu preparo, e concluíram ainda, que a fração insaponificável do óleo é que era responsável por esta atividade fisiológica.

Estes estudos foram corroborados posteriormente pelos trabalhos de VAN DE WOUW et al. (1994), HECKERS et al. (1994) e VAN ROIJ et al. (1995), os quais elucidaram a questão, concluindo que os compostos responsáveis pelo aumento do colesterol são os diterpenos cafestol e caveol, presentes em grande quantidade na fração insaponificável do óleo.

RATNAYAKE et al. (1993), observaram que o conteúdo de lipídios encontrado em café expresso obtido do café arábica, foi de 2260 mg/L (12,5 % de álcoois diterpênicos), enquanto que a bebida de café, obtida em cafeteiras que utilizam filtros de papel, apresentou valores médios de 23,4 mg/L (10,4 % de diterpenos). Considerando-se a porcentagem de diterpenos encontrada no óleo, tem-se que o café expresso continha 282,5 mg/L de diterpenos, enquanto a bebida obtida em cafeteiras utilizando filtros de papel, 2,43 mg/L.

Existem controvérsias em relação ao efeito do café instantâneo na elevação dos níveis de colesterol. Isto porque, teoricamente, este produto apresenta teores muito baixos de óleo, devido à sua forma de obtenção. Entretanto, algumas indústrias adicionam o óleo nas etapas finais de produção, como fonte de aroma, enquanto outras não o fazem. Neste sentido, a variação na quantidade de óleo no café instantâneo pode ser bastante grande (URGERT et al., 1995) e o seu efeito hipercolesterolêmico pode variar proporcionalmente. Bak (1990) citado por MIYAKE et al. (1999) observou que a ingestão de uma xícara de café instantâneo por dia estava associada ao aumento de 0,85 mg/dL nos níveis de colesterol total no sangue de mulheres. Enquanto o trabalho de BURR et al. (1995) demonstrou que a quantidade de colesterol total aumentou em 0,45 mg/dL (0,12 mmol/L) com a ingestão de 5 xícaras de café instantâneo por dia. De acordo com os autores, a ingestão desta quantidade de café por seis semanas tem um efeito marginal no aumento do colesterol, e, em pessoas normais, não é necessário restringir o seu consumo.

MIYAKE et al. (1999), trabalhando com 4587 homens entre 48 e 56 anos, observou que a ingestão de uma xícara de café instantâneo diariamente, aumentou o nível de LDL colesterol sanguíneo em 0,82 mg/dL, concluindo que a ingestão desta bebida está associada ao seu aumento. O mecanismo associado à atividade hipercolesterolêmica ainda não está bem definido, mas envolve o aumento dos níveis de LDL e a diminuição dos níveis de HDL (ESPARZA, 1998).

Segundo POST et al. (1997), o cafestol é que confere a maior elevação da concentração de colesterol no sangue de mamíferos, sendo o caveol menos importante, conclusão também obtida por URGERT et al. (1997). De acordo com o primeiro trabalho, a conversão do colesterol em ácidos biliares no fígado, é a rota mais importante para a sua eliminação, e o aumento dos níveis de LDL está associado à diminuição da síntese de ácidos biliares.

A reação da biossíntese dos ácidos biliares a partir do colesterol, envolve a hidroxilação do colesterol pela enzima 7 α -hidroxilase, no retículo endoplasmático, ou alternativamente pela ação da enzima esterol 27-hidroxilase. Como os diterpenos cafestol e caveol são estruturalmente semelhantes aos esteróis, e estes, como os oxisteróis, podem inibir a ação da 7 α -hidroxilase e a formação dos ácidos biliares, a partir do colesterol, pode ser inibida por estes compostos. Desta forma, o cafestol inibiria a síntese dos ácidos biliares pela diminuição da atividade de 7 α -hidroxilase e esterol 27-hidroxilase, e também pela diminuição da transcrição dos genes que codificam essas duas enzimas (POST et al., 1987).

Trabalhos de revisão efetuados por ROOS e KATAN (1999), indicaram que o cafestol é a substância conhecida que apresenta o maior poder hipercolesterolêmico, e que o caveol é responsável por somente 20 % do efeito provocado pela ingestão de óleo.

Os autores descrevem três mecanismos que podem estar envolvidos na elevação dos níveis de colesterol pelo cafestol, sendo que um deles é o mais plausível. Este mecanismo envolve o efeito do cafestol na supressão da transcrição de genes ligados a formação de importantes reguladores do metabolismo de lipídios em humanos, como a lipase lipoprotéica, os receptores

de LDL e a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), levando a sua diminuição, e conseqüente aumento dos níveis de colesterol.

Além da atividade hipercolesterolêmica, vários estudos têm demonstrado a capacidade dos diterpenos de elevar os níveis de triglicerídios em indivíduos normais. De acordo com ROOS et al. (2001), o aumento nos níveis de triglicerídios plasmáticos e do colesterol parece ser regulado independentemente no fígado. Enquanto o aumento dos níveis de colesterol pode ser explicado, por exemplo, pela supressão da síntese de ácidos biliares, o mecanismo pelo qual ocorre à atividade hiperlipidêmica, se dá pelo aumento da quantidade de VLDL₁ apo B no plasma sanguíneo, induzida pelos diterpenos, no fígado.

**CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DO ÓLEO
EXTRAÍDO COM SOLVENTE**

1.1. INTRODUÇÃO

Originário da Etiópia, o café passou a ser cultivado para a obtenção de bebida na Arábia, para onde foi levado no século XV. Mais tarde, por volta de 1600, os turcos levaram o café para a Europa, de onde foi disseminado rapidamente para o resto do mundo. Em 1650 foi aberta a primeira casa de café em Oxford, na Inglaterra e 25 anos depois, já eram quase 300. O Rei da França Luiz XIV foi presenteado com esta planta em 1714, e a disseminou na América Central e do Sul, por meio de suas colônias (SMITH, 1989).

No Brasil, o café foi introduzido no século XVIII vindo da Guiana Francesa e foi disseminado em toda a costa, chegando a São Paulo e o Paraná, tornando o Brasil o maior produtor e exportador mundial de café.

Dois espécies são comercialmente cultivadas, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, respectivamente conhecidas como café arábica e café robusta. Estas duas espécies apresentam diferenças em relação a sua composição química, também observadas entre o café verde e o torrado.

Em relação ao teor de óleo, fatores como espécie, condições de cultivo, além do método de extração e determinação utilizado são importantes. Segundo FOLSTAR (1989), o café arábica contém maiores quantidades de óleo que o robusta. Os resultados encontrados por vários autores apresentaram teores variando de 10,5 % a 17,7 % e 8 % a 10 %, respectivamente (PINTO e CARVALHO, 1961; TANGO e CARVALHO, 1963; LERCKER et al., 1996a; MAZZAFERA et al., 1998). De acordo com FOLSTAR (1989), a torração praticamente não afeta a quantidade absoluta de óleo, entretanto, a perda de umidade aumenta o seu teor relativo.

Em relação à composição, o óleo de café possui menor quantidade de compostos saponificáveis que os óleos comestíveis, e geralmente não ultrapassa 80% de triglicerídios, os quais são compostos principalmente pelos ácidos palmítico e linoléico, com teores de aproximadamente 35 % e 42 %, respectivamente (MURATORE et al., 1998). Em contrapartida, a quantidade de compostos insaponificáveis é bastante elevada, podendo chegar a 12 % ou mais (AL KANHAL, 1997).

Por sua vez, a fração insaponificável do óleo de café é rica nos diterpenos caveol e cafestol, e seus ésteres (VIANI, 1988; URGERT et al., 1995), os quais foram isolados da fração insaponificável do café verde em 1932 e 1938, respectivamente (LAM et al., 1982).

O café arábica possui maiores quantidades de diterpenos que o café robusta. As quantidades no grão de café verde, variam de 1,3 % a 1,9 % (m/m) a 0,2 % a 1,5 %, respectivamente (VIANI, 1988; RATNAYAKE et al., 1993). Em relação ao óleo, LERCKER et al. (1996b) quantificaram os diterpenos em café verde e torrado obtido de várias regiões produtoras. Para o café arábica verde obtido do Brasil, a quantidade de cafestol e de caveol foi de 533,7 mg/100g de óleo, e 619,2 mg/100g de óleo; enquanto o café torrado, apresentou valores de 432,1 mg/100g e 572,3 mg/100g, respectivamente.

Os compostos diterpênicos cafestol e caveol existem no óleo na forma livre, e principalmente esterificados com ácidos graxos, principalmente palmítico, linoléico e esteárico (VAN ROOIJ et al., 1995).

O objetivo desta etapa do trabalho foi caracterizar a matéria-prima e o óleo obtido convencionalmente com hexano, em relação a umidade, teor de óleo, perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos, sendo importante para o desenvolvimento das etapas seguintes, servindo de base para a comparação e o entendimento dos resultados obtidos na extração com CO₂ supercrítico.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta etapa foi conduzida no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Amostras de café arábica verde e torrado (*Coffea arabica*) foram gentilmente fornecidas pela Companhia de Café 3 Corações S.A. (Santa Luzia, MG). O café verde foi torrado à temperatura de 237 °C por 13,17 min em torrefador de cilindro rotativo Lilla Oppus 40.

Para evitar a oxidação do óleo e de seus componentes, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietilenotereftalato laminado, sob vácuo, e armazenadas em congelador à temperatura de -15 °C.

1.2.1. Preparo da matéria-prima

Tanto o café verde quanto o café torrado, foram triturados para redução do seu tamanho, utilizando um moedor de café de bancada (Arbel, Brasil), visando aumentar a área interfacial para transferência de massa e conseqüentemente aumentar a extração do óleo. Os grãos triturados foram classificados em peneiras de forma a obter 3 frações de diferentes diâmetros (0,297 mm a 0,35 mm; 0,35 mm a 0,42 mm e 0,42 mm a 0,50 mm).

As frações obtidas foram acondicionadas sob atmosfera de nitrogênio em frascos de vidro de 250 mL com tampas de metal à temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.2. Teor de umidade da matéria-prima

O teor de umidade foi determinado por gravimetria pelo método de secagem em estufa, a temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (SALDAÑA et al., 1997).

1.2.3. Determinação do extrato etéreo

A determinação do extrato etéreo nos grãos de café verde e torrado foi realizada em aparelho Soxhlet, segundo o método oficial da AOAC ref. 8 nº 15.033 (AOAC, 1997). Para tal, as amostras de café verde e de café torrado foram extraídas em aparelho de Soxhlet, utilizando hexano p.a. como solvente, por um período de 16 horas. O solvente foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo (Fisatom, modelo 802, Brasil), fazendo-se em seguida o resfriamento e a pesagem do balão de extração, com o que foi obtido o teor de óleo, sendo acondicionado em frascos de 5 mL sob atmosfera de nitrogênio a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

1.2.4. Perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos do óleo

1.2.4.1. Preparo das amostras

Para a determinação do perfil de ácidos graxos e do teor de diterpenos, o óleo armazenado foi descongelado, e 50 mg de óleo foram saponificadas com 3 mL de uma solução de KOH 0,5 mol/L em metanol (HARTMAN & LAGO, 1973). A fração insaponificável foi extraída da fração saponificada com 3 x 2 mL de hexano. A fase metanólica foi utilizada para a determinação da composição em ácidos graxos. O extrato em hexano foi usado para a determinação do teor de diterpenos.

1.2.4.2. Determinação do perfil dos ácidos graxos

Os ácidos graxos da fração metanólica foram esterificados de acordo com HARTMAN & LAGO (1973). Ao extrato metanólico contendo os ácidos graxos foram adicionados 3 mL do reagente de esterificação. No seu preparo, 10 g de NH_4Cl foram adicionados a 300 mL de MeOH, seguido por 15 mL de NH_2SO_4 , utilizando-se um balão de fundo chato. A mistura foi aquecida sob refluxo em um condensador até a dissolução total do NH_4Cl (em torno de 20 min). Os ésteres metílicos foram extraídos adicionando-se 5 mL de hexano após a adição de 10 mL de solução saturada de NaCl.

O perfil dos ácidos graxos foi determinado por cromatografia de fase gasosa, usando cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II, equipado com detector de ionização de chama a 260 °C e coluna capilar J & W Scientific, CP-Wax (25 m x 0,32 mm x 0,20 μm) mantida a 215 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão de 15 psi e velocidade de 95,6 cm/s. A temperatura do injetor foi mantida em 230 °C.

1.2.4.3. Determinação do teor de diterpenos

Os diterpenos cafestol e caveol foram determinados por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), em cromatógrafo HP 1050A equipado com

duas colunas HP-C₁₈ (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) conectadas em série e detector de UV-VIS a 220 nm, utilizando-se como fase móvel metanol/água (85:15 %, v/v) e fluxo de 0,7 mL/min.

O extrato em hexano foi lavado com 1 mL de água (3 vezes) para a remoção de resíduos de sabão. A fração orgânica contendo os diterpenos foi então transferida para frascos âmbar de 5 mL, evaporada sob fluxo de nitrogênio com aquecimento a aproximadamente 45 °C, e ressuspensa em 1 mL de fase móvel. As amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada RC 55 de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha) e analisadas (CLAD).

As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL em um *loop* de 50 µL e os diterpenos quantificados utilizando-se curvas de calibração construídas com padrões de cafestol (LKT Labs, Inc. Saint Paul, Minnesota) e caveol (Sigma, Saint Louis, Missouri).

Para a construção das curvas de calibração, foi preparada uma solução estoque de cada padrão na concentração de 1 mg/mL, diluídos na fase móvel. As soluções estoques foram diluídas de forma a se obter as seguintes concentrações para cada padrão: cafestol: 0,019 mg/mL, 0,038 mg/mL, 0,076 mg/mL, 0,114 mg/mL e 0,152 mg/mL; e caveol: 0,016 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,064 mg/mL, 0,096 mg/mL e 0,128 mg/mL.

O índice de recuperação do método foi realizado adicionando-se quantidades crescentes de uma mistura de cafestol e caveol (1 mg/mL) a amostras de óleos de café verde e torrado.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Obtenção do café triturado

Os processos de extração de componentes de interesse requerem a redução do tamanho das partículas da matéria-prima visando aumentar a superfície de contato entre o solvente e a matéria-prima. Dependendo do material, existe um diâmetro de partícula ótimo para o processo extrativo. No

caso do café, valores entre 0,15 mm e 0,85 mm são utilizados para a extração de óleo por solvente (FOLSTAR, 1989).

A trituração forneceu diferentes quantidades de café verde e torrado, em cada peneira (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem relativa de cada fração obtida após o peneiramento.

| Fração | Abertura da peneira (mm) | Café verde (%) | Café torrado (%) |
|---------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | 0,297 a 0,35 | 27,5 | 33,9 |
| 2 | 0,35 a 0,42 | 39,1 | 45,8 |
| 3 | 0,42 a 0,50 | 33,4 | 20,3 |

Observa-se que a maior quantidade foi obtida na fração 2 para ambas as amostras, ou seja, entre 0,35 mm e 0,42 mm. Entretanto, o café torrado foi triturado mais facilmente, devido provavelmente à baixa umidade e por isso, comparativamente, apresentou maior quantidade na fração 1 (com menor diâmetro de partícula) que o café verde na mesma fração.

1.3.2. Teores de umidade e de óleo

Os teores de umidade e de óleo determinados para o café verde e o torrado, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Teores de umidade e de óleo do café verde e torrado.

| | Umidade (%) | Óleo (g/100g) | |
|--------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| | | Base úmida (%) | Base seca (%) |
| Café verde | 9,98 | 10,23 | 11,37 |
| Café torrado | 2,40 | 15,42 | 15,49 |

Os teores de umidade encontrados por MURATORE et al. (1998) em variedades de café procedentes de três diferentes locais, variaram de 9,68 % a 10,48 % para o café verde e de 1,81 % a 1,85 % para o café torrado. Isto demonstra que as amostras de café verde estão dentro da faixa comum para o café comercializado mundialmente, entretanto os resultados obtidos para o

café torrado situam-se um pouco acima da faixa relatada, o que é aceitável, já que o teor de umidade depende do tipo de torração a que o grão é submetido. LERCKER et al. (1996a), por exemplo, obtiveram para o café arábica torrado valores de umidade de 0,6 %.

Os teores de óleo encontrados estão dentro da faixa de valores observados por outros autores, os quais variaram em base seca, de 10,5 % a 17,7 % para o café arábica (PINTO e CARVALHO, 1961; TANGO e CARVALHO, 1963; LERCKER et al., 1996a; MAZZAFERA et al., 1998), e são iguais aos obtidos por LERCKER et al. (1996a), que foram de 11,4 % e 15,4 %, para o café arábica verde e torrado, respectivamente. Como verificado por FOLSTAR (1989), a torração não afeta significativamente a quantidade absoluta de óleo, entretanto, a perda de umidade e de matéria seca aumentam seu teor relativo. A perda de umidade não justificaria por si só o aumento no teor de óleo, já que a diferença mesmo em base úmida é considerável, o que demonstra que a perda de matéria seca causada principalmente pela pirólise de carboidratos contribui significativamente para este aumento.

1.3.3. Perfil de ácidos graxos do óleo do café

A Tabela 3 apresenta o perfil de ácidos graxos nos óleos de café verde e torrado por cromatografia de fase gasosa em comparação àquele obtido por LERCKER et al. (1996a).

Observa-se a predominância dos ácidos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2), seguidos pelo ácido oléico (C18:1) em menor concentração, os quais somam aproximadamente 88 %. Ocorreu uma pequena variação na composição dos ácidos graxos, com a torração. Entretanto, esta variação não segue nenhuma tendência em relação à massa molar dos ácidos graxos, a qual poderia supostamente ocorrer em maior amplitude naqueles de cadeia curta, dado a temperatura de torração e a existência de ácidos graxos livres no óleo (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 1998).

Tabela 3 - Perfil dos ácidos graxos no café arábica verde e torrado obtidos neste estudo, comparados com outros trabalhos.

| Ácido graxo | LERCKER et al. (1996a) | | Café verde* | Café torrado* |
|-------------------|------------------------|--------------|--------------|---------------|
| | Café verde | Café torrado | | |
| C14:0 | 0,1 | 0,1 | 0,12 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 |
| C16:0 | 30,9 | 33,9 | 32,44 ± 0,30 | 33,04 ± 0,50 |
| C16:1 | traços | traços | < 0,1 | < 0,1 |
| C18:0 | 9,5 | 9,0 | 9,06 ± 0,07 | 7,14 ± 0,50 |
| C18:1 ω 9 | 9,4 | 9,1 | 9,18 ± 0,05 | 8,78 ± 0,21 |
| C18:1 ω 11 | - | - | 0,37 ± 0,03 | 0,41 ± 0,01 |
| C18:2 | 43,4 | 42,5 | 43,50 ± 0,31 | 45,98 ± 0,96 |
| C18:3 | 3,3 | 2,7 | 1,40 ± 0,15 | 1,76 ± 0,30 |
| C20:0 | 1,2 | 1,2 | 2,65 ± 0,05 | 2,00 ± 0,05 |
| C20:1 | 0,3 | 0,3 | 0,33 ± 0,03 | 0,21 ± 0,03 |
| C22:0 | 0,9 | 0,6 | 0,82 ± 0,02 | 0,43 ± 0,08 |
| C24:0 | 0,20 | 0,3 | 0,13 ± 0,01 | 0,15 ± 0,02 |

* Porcentagem de área relativa.

1.3.4. Determinação do teor de diterpenos do óleo

No Brasil, nenhum estudo foi encontrado em relação a composição em diterpenos de óleo de café, devido possivelmente à dificuldade na obtenção de padrões para identificação e quantificação de diterpenos, os quais somente agora estão disponíveis no mercado.

1.3.4.1. Determinação do índice de recuperação do método

O índice de recuperação do método foi testado adicionando-se 20 μ L, 40 μ L e 60 μ L de uma mistura de caveol e cafestol (1 mg/mL) a amostras de óleo de café verde e de café torrado, com teor de diterpenos conhecido, como demonstrado na Tabela 4.

Como observado, o índice de recuperação do método utilizado variou de 89,8 % a 109,1 % para o cafestol e de 88,2 % a 106,4 % para o caveol, sendo os menores índices determinados nas amostras com as maiores concentrações.

Resultados prévios indicaram baixo índice de recuperação (dados não apresentados) o que foi atribuído à alta temperatura (em torno de 70 °C)

utilizada para auxiliar a remoção do hexano, com nitrogênio, tanto na etapa de secagem da amostra para a determinação do teor de óleo, quanto na sua remoção para a ressuspensão da fase móvel. Por esta razão, a temperatura da amostra nestas etapas foi mantida em aproximadamente 45 °C.

Tabela 4 – Índice de recuperação do método para determinação dos diterpenos.

| | Valor original (mg/100g) | Quantidade adicionada (mg/100g) | Valor encontrado* (mg/100g) | Índice de recuperação (%) |
|---------------------|-------------------------------------|--|--|--------------------------------------|
| Café verde | | | | |
| Cafestol | | | | |
| Amostra 1 | 383,9 ± 2,3 | 100 | 495,4 ± 8,6 | 102,4 ± 1,8 |
| Amostra 2 | 383,9 ± 2,3 | 200 | 546,1 ± 4,7 | 90,1 ± 3,9 |
| Amostra 3 | 383,9 ± 2,3 | 300 | 614,1 ± 5,8 | 89,8 ± 7,2 |
| Caveol | | | | |
| Amostra 1 | 476,2 ± 6,4 | 100 | 599,5 ± 5,1 | 104,0 ± 10,2 |
| Amostra 2 | 476,2 ± 6,4 | 200 | 632,9 ± 9,6 | 93,5 ± 7,2 |
| Amostra 3 | 476,2 ± 6,4 | 300 | 621,5 ± 4,0 | 91,9 ± 5,7 |
| Café torrado | | | | |
| | Valor original (mg/100g) | Quantidade adicionada (mg/100g) | Valor encontrado* (mg/100g) | Índice de recuperação (%) |
| Cafestol | | | | |
| Amostra 1 | 328,5 ± 3,9 | 100 | 467,4 ± 3,6 | 109,1 ± 2,9 |
| Amostra 2 | 328,5 ± 3,9 | 200 | 546,1 ± 8,0 | 103,3 ± 6,0 |
| Amostra 3 | 328,5 ± 3,9 | 300 | 604,1 ± 5,9 | 96,1 ± 1,9 |
| Caveol | | | | |
| Amostra 1 | 397,8 ± 6,6 | 100 | 529,5 ± 5,8 | 106,4 ± 5,2 |
| Amostra 2 | 397,8 ± 6,6 | 200 | 552,9 ± 7,7 | 92,5 ± 9,3 |
| Amostra 3 | 397,8 ± 6,6 | 300 | 615,5 ± 10,1 | 88,2 ± 8,4 |

*Valores médios de triplicatas.

1.3.4.2. Teor de diterpenos

Observa-se na Figura 1 que os teores de cafestol e de caveol nos óleos de café estão abaixo daqueles encontrados por LERCKER et al. (1996b) tanto para o café verde (533,7 mg de cafestol e 619,2 mg de caveol por 100 g de óleo) quanto para o torrado (432,1 mg de cafestol e 572,3 mg de caveol por 100 g de óleo), mas como naquele trabalho, o caveol apresentou a maior concentração, e com a torração, ocorreu uma diminuição no teor dos dois diterpenos, que neste trabalho foi de 14,4 % e 16,5 % para o cafestol e caveol, respectivamente. Esta redução da concentração foi também reportada por NACKUNSTZ e MAIER (1987) e é dependente do grau de torração a que o grão é submetido.

De forma contrária, quando os teores de diterpenos são considerados em relação à massa de café, ocorre um pequeno aumento com a torração, reflexo direto da perda de matéria seca (Figura 2).

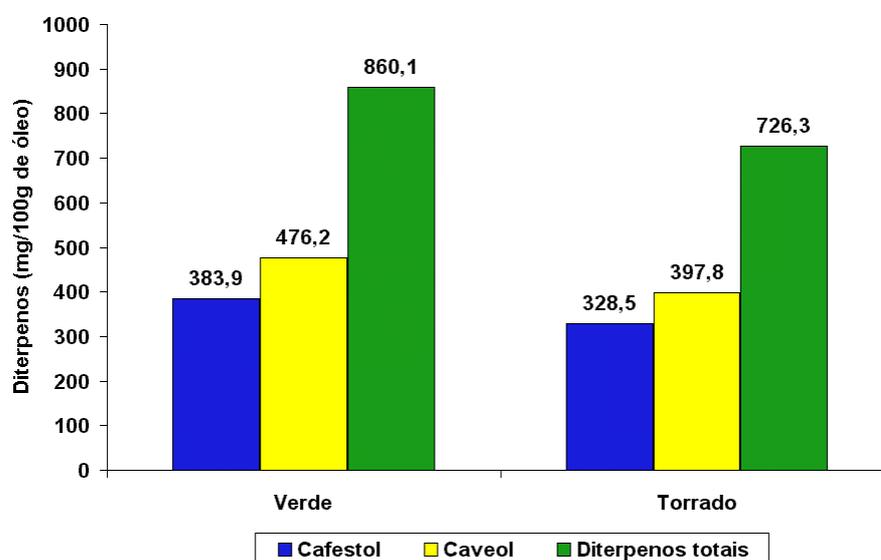


Figura 1 – Teores cafestol e de caveol nos óleos de café verde e torrado.

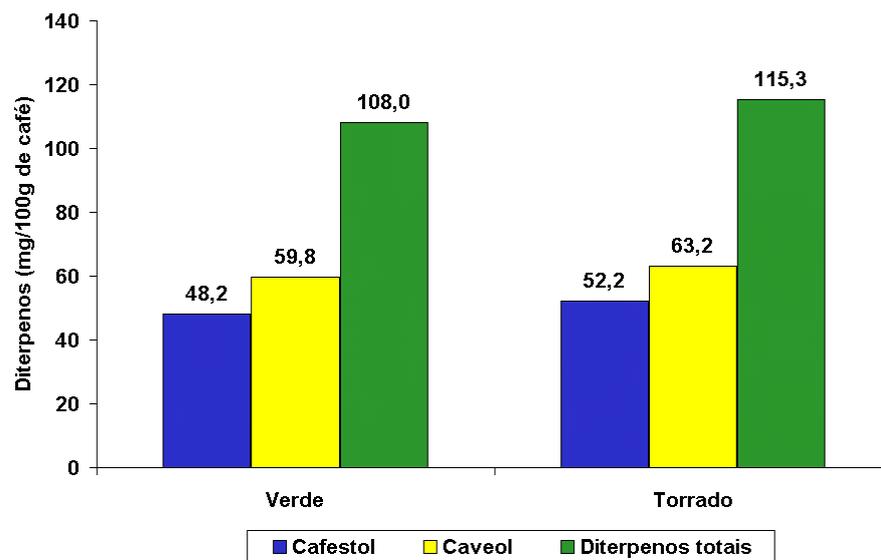


Figura 2 – Teores de cafestol e de caveol no café verde e no torrado.

1.4. CONCLUSÕES

Os teores de umidade, óleo e o perfil de ácidos graxos apresentados pelo café verde e torrado estão dentro da faixa descrita na literatura.

Em relação aos diterpenos foram observados menores teores de cafestol e de caveol que aqueles determinados por outros autores, provavelmente originários de características intrínsecas da variedade utilizada. Para o óleo de café verde, teores de cafestol e de caveol de 533,7 mg/100g de óleo e 619,2 mg/100g de óleo foram observados por LERCKER et al. (1996b), enquanto os valores determinados neste trabalho foram de 383,9 mg/100g de óleo e 476,2 mg/100g de óleo, respectivamente.

Os teores de caveol foram maiores que os de cafestol tanto no café verde quanto no café torrado e a torração promoveu a redução dos dois diterpenos, comportamento também esperado. O teor de cafestol neste trabalho foi reduzido para 328,5 mg/100g de óleo, enquanto o de caveol para 397,8 mg/100g de óleo.

**CAPÍTULO 2 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO E DE DITERPENOS DO CAFÉ
VERDE COM CO₂ SUPERCRÍTICO**

1.1. INTRODUÇÃO

Processos de extração com fluídos supercríticos têm sido desenvolvidos para a obtenção de produtos com alto valor agregado, como suplementos alimentícios e nutracéuticos, para os quais a característica “natural” do processo apresenta alto poder de marketing (SIHVONEN et al., 1999; PERRUT, 2000).

A tecnologia dos fluídos supercríticos começou a ser desenvolvida na Alemanha, e propiciou a instalação da primeira unidade comercial, dedicada a descafeinação do café, na cidade de Bremen. A partir desta unidade, outras surgiram para o mesmo fim, e, posteriormente, para a extração de lúpulo. Com o surgimento de concorrentes como os EUA a partir da década de 1980, os alemães investiram em novas áreas, incluindo a descafeinação de chá, e a extração de aromas e aditivos para alimentos, compostos nutracéuticos e princípio ativos para a indústria farmacêutica e de cosméticos (PERRUT, 2000).

Esta tecnologia, aplicada à extração de produtos de alto valor agregado, foi também levada para a França e Inglaterra, estendeu-se depois para o Canadá e mais recentemente atingiu países da Ásia, como a China, Coréia do Sul e Índia (SIHVONEN et al., 1999; PERRUT, 2000).

Embora uma enorme quantidade de patentes que utilizam a tecnologia dos fluídos supercríticos tenha sido requerida no mundo todo, poucas delas realmente foram aplicadas industrialmente. Como exemplo, tem-se a descafeinação do café e do chá e a extração de lúpulo, onde esta tecnologia substituiu a extração por solventes tradicional. Contudo, de acordo com SIHVONEN et al. (1999), a extração de nicotina, extratos de especiarias, e de óleos e gorduras, são aplicações industriais que tem ganhado bastante espaço.

De acordo com MERMELSTEIN (1999) e TEJA e ECKERT (2000), a extração e purificação de compostos com propriedades nutracéuticas, bem como a extração de princípios ativos para produtos farmacêuticos continuarão sendo áreas de importância na pesquisa e aplicação de fluídos supercríticos. Como resultado, o conhecimento da solubilidade, capacidade de extração, pureza, e qualidade dos materiais obtidos, continuará a ser expandido, a

medida em que mais produtos forem comercializados. A obtenção de ácidos graxos polinsaturados a partir de óleo de peixes, é um exemplo (NILSSON, 1996; ESQUÍVEL et al., 1997).

No café, vários trabalhos têm demonstrado que os diterpenos cafestol e caveol presentes na fração insaponificável do óleo, apresentam atividades nutracéuticas, dentre elas a propriedade anticarcinogênica (WILDMAN, 2001). Isto se deve principalmente, à indução da atividade de glutathione-S-transferases – GST (SCHARF, 2001; CAVIN et al., 1998; SCHILTER et al., 1996; MILLER et al., 1991; MILLER et al., 1988; LAM et al., 1982). Este sistema de enzimas catalisa a ligação de compostos eletrofílicos carcinogênicos como a aflatoxina B₁ (AFB₁) (CAVIN et al., 1998), o DMBA (7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno) (WATTENBERG, 1983) e o 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-*b*] piridina (PhIP) (HUBER et al., 1997), a glutathione (GSH), reduzindo o seu efeito deletério.

Outro mecanismo ligado à atividade anticarcinogênica se deve à redução da expressão de subunidades do citocromo P450, associado a bioativação aos compostos eletrofílicos (CAVIN et al., 2001).

Além disto, de acordo com BERTHOLET (1987, 1988), o cafestol possui propriedades antiinflamatórias, o que torna a sua aplicação potencial na indústria farmacêutica.

Entretanto, uma das características mais interessante do óleo de café verde, é a capacidade de bloquear a radiação solar UVB (280 a 320 nm), indesejável à pele humana (CONNOCK, 1999), sem contudo impedir a passagem de raios UVA (320 a 400 nm), responsáveis pelo bronzeamento saudável (GROLLIER e PLESSIS, 1988). Esta característica é também proporcionada pelos diterpenos e seus ésteres, naturalmente presentes na fração insaponificável do óleo de café (BERTHOLET, 1987; SNOI INTERNATIONAL, 2000; PELLE, 1999).

Contudo, a ingestão de bebidas de café preparadas sem o uso de filtros de papel, tem sido altamente correlacionada com a elevação dos níveis de colesterol sanguíneo em animais e humanos. Esta atividade fisiológica é também conferida pelos diterpenos, os quais são quase que totalmente removidos da bebida quando filtros de papel são utilizados para a sua obtenção

(ZOCK et al., 1990; VAN DE WOUW et al., 1994; HECKERS et al., 1994; VAN ROIJ et al., 1995).

Entretanto, de acordo com CAVIN et al. (1998), a exposição a doses seguras em relação à atividade hipercolesterolêmica pode ser benéfica em relação às propriedades nutracéuticas dadas pelo potencial anticarcinogênico destas substâncias.

Esta característica coloca os diterpenos em uma classe de compostos a qual pode ser considerada futuramente para a inclusão em alimentos como um aditivo (HUBER et al., 2002), além de poder ser utilizada na indústria farmacêutica e de cosméticos.

Segundo PALMER e TING (1995), os processos que obtiveram sucesso comercial utilizando fluídos supercríticos, como a extração da cafeína, apresentam algumas características em comum. Dentre elas estão a obtenção de produtos de alto valor agregado os quais podem ser empregados não somente em alimentos, mas também em cosméticos. Na descafeinação do café por exemplo, são obtidos dois produtos com alto valor agregado, o café descafeinado, e a própria cafeína, a qual encontra uma série de aplicações industriais.

Neste sentido, a extração do óleo de café verde por CO₂-SC além de fornecer o óleo para ser empregado tanto na indústria de cosméticos quanto de alimentos e farmacêutica, forneceria um café verde livre de óleo e de diterpenos. Este café poderia futuramente vir a ser processado por meio de técnicas modernas de torração, fornecendo um produto de alto valor agregado para ser exportado para países consumidores de café não filtrado, por exemplo.

A extração do óleo de café verde utilizando dióxido de carbono supercrítico ainda não foi encontrada, tampouco as condições nas quais os diterpenos cafestol e caveol podem ser extraídos. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar as condições de extração do óleo de café verde e dos diterpenos utilizando-se o CO₂-SC.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Extração Supercrítica do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Amostras de café arábica (*Coffea arabica*) verde, com 9,98 % de umidade e 11,37 % de óleo foram gentilmente fornecidas pela Companhia de Café 3 Corações S.A. (Santa Luzia, MG). Para evitar a oxidação do óleo e de seus componentes, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de poliolefina multicamada metalizada, sob vácuo, e armazenadas em congelador à temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.1. Preparo da matéria-prima

Os grãos de café foram triturados para redução do seu tamanho, utilizando um moedor de café de bancada (Arbel, Brasil), visando aumentar a área interfacial para transferência de massa e conseqüentemente aumentar a extração do óleo. Os grãos triturados foram classificados em peneiras Tyler de forma a obter 3 frações de diferentes diâmetros (0,297 mm a 0,35 mm; 0,35 mm a 0,42 mm e 0,42 mm a 0,50 mm).

As frações obtidas foram acondicionadas sob atmosfera de nitrogênio em frascos de vidro de 250 mL com tampas de metal à temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.2. Extração do óleo com solvente

A extração do óleo com solvente foi realizada em aparelho Soxhlet, utilizando hexano, por um período de 16 horas (AOAC, 1997). O solvente foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo (Fisatom, modelo 802, Brasil), fazendo-se em seguida o resfriamento e pesagem do balão de extração, com o que foi obtida a massa de óleo extraída, sendo então acondicionado em frascos de 5 mL a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de nitrogênio, para posterior análise.

1.2.3. Extração do óleo pelo CO₂ supercrítico

O óleo de café foi extraído em um equipamento de extração supercrítica, modelo 7680A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA), utilizando dióxido de carbono com pureza mínima de 99,99 % (White Martins, Osasco, SP). A configuração do equipamento empregada está esquematizada na Figura 1.

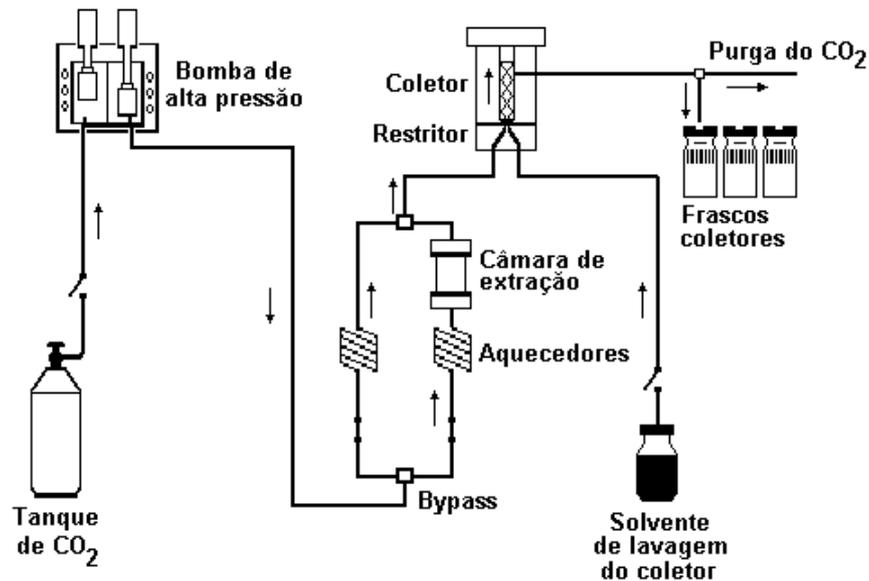


Figura 1 – Figura 1 – Representação da configuração do extrator supercrítico HP 7680A, utilizado no experimento.

Neste processo extrativo, o dióxido de carbono após atingir a temperatura e pressão desejada, entra em contato com a amostra (acondicionada em filtro de papel) colocada na câmara extratora de aço inoxidável com volume de 4,64 mL. Este procedimento é realizado sob duas formas: a estática, em que o fluido permanece em contato com a amostra na pressão e temperaturas pré-definidas por um tempo fixo, sem deslocamento; e a dinâmica, em que o gás entra em contato com amostra, e é continuamente removido sob um fluxo e tempo pré-definidos.

Após sair da câmara extratora, o fluido é conduzido pressurizado para o restritor, onde ocorre uma redução drástica na pressão, e conseqüente uma expansão do fluido. Com isso, o óleo extraído decanta e é retido em um coletor

de ODS (octadecilsilica), sendo posteriormente removido por hexano e coletado em frascos de vidro de 2 mL.

Em todas as etapas de extração, a temperatura do restritor foi mantida a 70 °C e a do coletor a 35 °C, para impedir a decantação do óleo na linha de transferência e ao mesmo tempo a sua completa retenção no coletor. Durante a lavagem do coletor, as temperaturas do restritor e do coletor foram mantidas a 58 °C. Esta temperatura foi escolhida de acordo com a recomendação do fabricante do equipamento, segundo a qual a temperatura do coletor deve ser mantida em, no mínimo, 10 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente utilizado para a sua lavagem (KNIPE et al., 1993).

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) buscando verificar o efeito dos fatores granulometria do café, massa de café submetida a extração, pressão do CO₂, temperatura de extração, fluxo do CO₂, e tempo de extração estática e dinâmica, sobre as variáveis rendimento em óleo, teor de diterpenos (cafestol e caveol) e perfil de ácidos graxos.

Anteriormente à execução do experimento propriamente dito, foi conduzido um estudo preliminar com o objetivo de selecionar 4 temperaturas de extração e respectivas pressões do CO₂ que proporcionassem a maior extração de óleo possível. Além disto com este estudo foi possível verificar possíveis obstruções do sistema de extração, devido ao excesso de óleo no restritor (KNIPE et al., 1993; VEJROSTA et al., 1999). Para este estudo foram estabelecidas 10 temperaturas as quais variaram de 50 °C a 95 °C (em intervalos de 5 °C) nas máximas pressões de extração que o equipamento pudesse comportar em cada temperatura (Tabela 3).

Selecionadas 4 temperaturas de extração e 4 pressões do CO₂ em cada temperatura (Tabela 4), o experimento foi então dividido em duas etapas. Na primeira, foram otimizadas as variáveis, temperatura de extração e pressão (densidade) do CO₂, em um esquema fatorial (4 x 4) com três repetições, mantendo-se constantes a granulometria do café (0,297 mm a 0,35 mm), a quantidade de café submetida à extração (200 mg), o fluxo do CO₂ (1,5 mL/min), e o tempo de extração estática (5 min) e dinâmica (20 min).

Na segunda etapa, verificadas a temperatura de extração e pressão (densidade) do CO₂, foram selecionados três tratamentos considerando-se o rendimento em óleo e a sua concentração em diterpenos, e otimizados independentemente nesta seqüência as variáveis, tempo de extração estática (0 min, 2 min e 5 min); granulometria do café (0,42 mm a 0,50 mm, 0,35 mm a 0,42 mm, e 0,297 mm a 0,35 mm); massa de café submetida a extração (100 mg, 150 mg e 200 mg); fluxo do CO₂ (1,5 mL/min, 2,0 mL/min e 2,5 mL/min), e tempo dinâmico (5 min, até a extração de óleo máxima). Uma vez otimizada a variável, ela era mantida fixa para a verificação da variável seguinte.

O estudo do tempo de extração dinâmica foi baseado no trabalho de MARKOM et al. (2001), de acordo com o qual coletas sucessivas da substância a ser extraída são conduzidas na medida em que ocorre a sua extração. Em nosso estudo, as coletas do óleo para a sua quantificação, bem como a determinação dos diterpenos, foram realizadas a cada 5 min, mantendo o sistema de extração pressurizado. A vantagem deste sistema reside na economia de CO₂ e na redução do tempo para condução do experimento.

1.2.4. Determinação da quantidade de óleo extraída

A massa de óleo extraída, necessária para a determinação do rendimento em óleo, foi determinada gravimetricamente em balança analítica, após a evaporação do hexano (verificada visualmente) com nitrogênio por aproximadamente 5 minutos e aquecimento do extrato a aproximadamente 45 °C, em chapa aquecedora.

1.2.5. Perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos do óleo

1.2.5.1. Preparo das amostras

Para a determinação do perfil de ácidos graxos e do teor de diterpenos, o óleo armazenado foi descongelado, e saponificado com uma solução de KOH 0,5 mol/L em metanol (HARTMAN & LAGO, 1973). A fração

insaponificável foi então extraída da solução metanólica com 3 x 2 mL de hexano, para a determinação do teor de diterpenos.

1.2.5.2. Determinação do perfil dos ácidos graxos

Os ácidos graxos da fração metanólica foram esterificados (HARTMAN & LAGO, 1973), sendo o seu perfil determinado por cromatografia de fase gasosa, usando cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II, equipado com detector de ionização de chama a 260 °C e coluna capilar J & W Scientific, CP-Wax (25 m x 0,32 mm x 0,20 µm) mantida a 215 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão de 15 psi e velocidade de 95,6 cm/s. A temperatura do injetor foi mantida em 230 °C.

1.2.5.3. Determinação do teor de diterpenos

Os diterpenos cafestol e caveol foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), em cromatógrafo HP 1050A equipado com duas colunas HP-C₁₈ (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) conectadas em série e detector de UV-VIS a 220 nm, utilizando-se como fase móvel metanol/água (85:15 %, v/v) e fluxo de 0,7 mL/min.

O extrato de hexano contendo a fração insaponificável foi lavado com 1 mL de água (3 vezes) para a remoção de resíduos de sabão. A fração orgânica contendo os diterpenos foi então transferida para frascos âmbar de 5 mL, evaporada sob fluxo de nitrogênio com aquecimento de aproximadamente 45 °C, e ressuspendida em 1 mL de fase móvel. As amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada RC 55 de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha) e analisadas.

As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL e *loop* de 50 µL e os diterpenos quantificados utilizando-se curvas de calibração construídas com padrões de cafestol (LKT Labs, Inc. Saint Paul, Minnessota) e caveol (Sigma, Saint Louis, Missouri).

Para a construção das curvas de calibração, foi preparada uma solução estoque de cada padrão na concentração de 1 mg/mL, diluídos na fase móvel.

As soluções estoques foram diluídas de forma a se obter as seguintes concentrações para cada padrão: cafestol: 0,019 mg/mL, 0,038 mg/mL, 0,076 mg/mL, 0,114 mg/mL e 0,152 mg/mL; e caveol: 0,016 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,064 mg/mL, 0,096 mg/mL e 0,128 mg/mL.

O índice de recuperação do método foi obtido adicionando-se 20 µL, 40 µL e 60 µL de uma mistura de cafestol e caveol (1 mg/mL) a uma amostra de óleo obtida por extração com hexano.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Perfil dos ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado no óleo obtido em todos os tratamentos da primeira etapa do experimento. Isto foi realizado devido a possibilidade de ocorrer extração seletiva dos triglicerídios (KIM et al., 1999, PALMER e TING, 1995), o que alteraria o perfil de ácidos graxos do óleo, e conseqüentemente a sua estabilidade.

A Tabela 1 apresenta os valores em porcentagem de área relativa, de cada ácido graxo, em comparação com o óleo extraído por hexano. Nos dois casos observa-se claramente a predominância dos ácidos linoléico (C18:2) e palmítico (C16:0).

O baixo desvio padrão apresentado para cada ácido graxo é relativo às repetições de todos os tratamentos conduzidos na primeira etapa. Isto significa que a variação dos resultados foi muito pequena quando foi alterada a temperatura de extração e a densidade do CO₂, o que também foi verificado por ROZZI et al. (2002), na caracterização da fração lipídica de sementes de tomate.

Por esta razão, não foi determinado o perfil dos ácidos graxos na segunda etapa do experimento, uma vez que as variações no poder solvente do fluido e na sua seletividade, dadas pelas diferentes densidades do CO₂ e temperaturas de extração, não apresentaram qualquer efeito no perfil de ácidos graxos. Então estas condições não foram modificadas na segunda etapa.

Tabela 1 - Perfil dos ácidos graxos do óleo de café obtido na primeira etapa do experimento com CO₂, em comparação com o óleo obtido por extração com hexano (porcentagem de área relativa).

| Ácido graxo | Hexano ¹ | CO ₂ -SC ² |
|-----------------------|---------------------|----------------------------------|
| C14:0 | 0,12 ± 0,01 | 0,21 ± 0,03 |
| C16:0 | 32,44 ± 0,30 | 34,43 ± 0,97 |
| C16:1 | < 0,1 | 0,15 ± 0,02 |
| C18:0 | 9,06 ± 0,07 | 8,73 ± 0,22 |
| C18:1 _ω 9 | 9,18 ± 0,05 | 8,67 ± 0,19 |
| C18:1 _ω 11 | 0,37 ± 0,03 | 0,49 ± 0,07 |
| C18:2 | 43,50 ± 0,31 | 43,27 ± 0,41 |
| C18:3 | 1,40 ± 0,15 | 1,22 ± 0,13 |
| C20:0 | 2,65 ± 0,05 | 2,94 ± 0,60 |
| C20:1 | 0,33 ± 0,03 | 0,24 ± 0,01 |
| C22:0 | 0,82 ± 0,02 | 0,30 ± 0,05 |
| C24:0 | 0,13 ± 0,01 | < 0,1 |

¹ Média de 3 repetições; ² Média de 48 repetições.

Mesmo nas menores densidades do CO₂ utilizadas, onde a seletividade do fluido supercrítico tende a ser maior (McHUGH e KRUKONIS, 1994), não foi observado nenhum comportamento que denotasse a extração seletiva dos ácidos graxos e/ou dos triglicerídios, como observado por BHASKAR et al. (1993), no fracionamento da gordura de leite. Provavelmente, as temperaturas e densidades de extração utilizadas foram maiores que a faixa onde ocorreria esta seletividade. Na extração do óleo de noqueira-pecã, ALEXANDER et al. (1997), concluíram que se algum efeito significativo em relação à extração seletiva de ácidos graxos pudesse ser atribuído à temperatura de extração e à densidade do CO₂, este efeito seria observado na menor temperatura e densidade utilizada no experimento.

Em relação ao óleo obtido por extração com hexano, pequenas variações são observadas, resultado semelhante ao obtido por ZHAO et al. (1987) e MOLERO GÓMEZ et al. (1996), nas extrações de óleo de farelo de arroz e óleo de sementes de uva, respectivamente. Relativamente, o óleo obtido por CO₂-SC apresentou menores teores de todos os ácidos graxos com número igual ou maior a 18 carbonos, em detrimento aos maiores teores de ácido palmítico (C16:0) e palmitoléico (C16:1), este em menor grau.

Estes resultados são importantes uma vez que o menor teor de ácidos graxos insaturados apresentado pelo óleo obtido por CO₂-SC, indicariam maior tendência a estabilidade à oxidação, o que é extremamente desejável para qualquer óleo vegetal, pois a oxidação do óleo leva a uma série de reações indesejáveis (MORALES et al., 1998). Além disso, os óleos obtidos por extração supercrítica tendem a ser menos estáveis à oxidação devido ao menor teor de antioxidantes naturais que possuem (DEL VALLE e AGUILERA, 1999).

Por outro lado, de acordo com MORALES et al. (1998), as altas temperaturas e densidades utilizadas na extração com CO₂-SC podem contribuir para o processo de oxidação dos ácidos graxos insaturados, o que explicaria a redução relativa no seu teor. Entretanto, como já observado, nenhuma relação direta entre o aumento da temperatura e da densidade e a diminuição da concentração de qualquer ácido graxo foi notada.

1.3.2. Curva de calibração e índice de recuperação do método utilizado na determinação dos diterpenos

A Figura 2 apresenta um cromatograma típico da fração insaponificável do óleo de café obtido por extração supercrítica.

A quantificação dos diterpenos foi realizada utilizando-se a técnica do padrão externo, relacionando a área de cada diterpeno com as respectivas curvas de calibração de cada padrão.

Como a determinação dos diterpenos foi realizada ao longo do experimento, o equipamento foi calibrado pelo menos uma vez a cada análise, para diminuir erros de quantificação. Por isso, os coeficientes de determinação e os valores das constantes das curvas de calibração para o cafestol e o caveol foram diferentes ao longo do experimento.

Todavia, todas as equações de regressão utilizadas para a quantificação dos diterpenos apresentaram coeficientes de determinação com valores acima de 0,999.

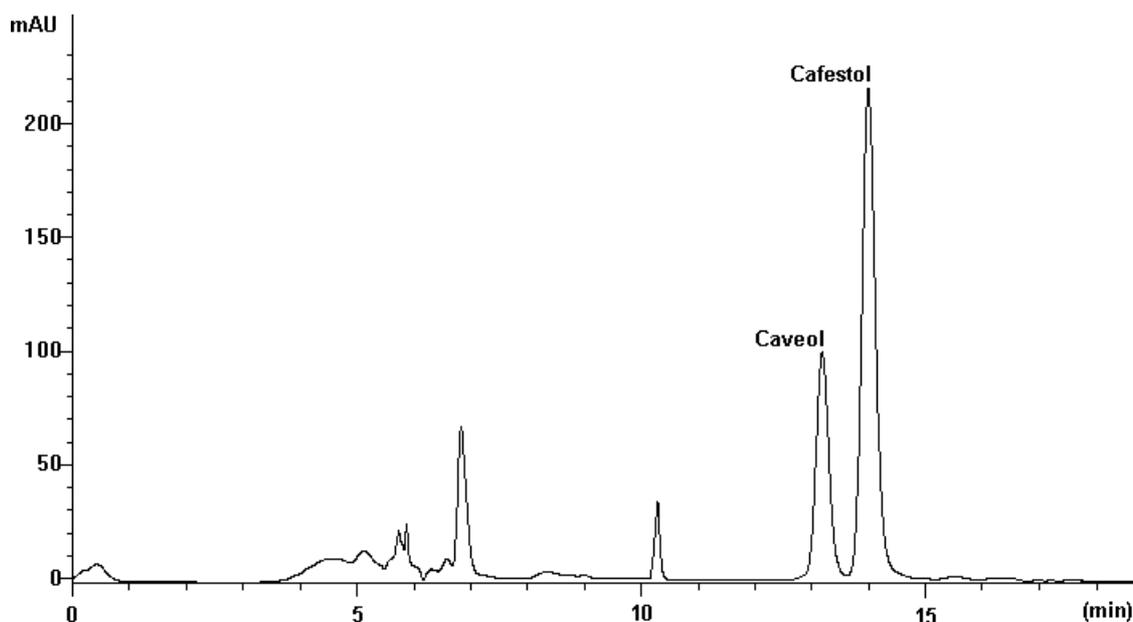


Figura 2 – Cromatograma típico da fração insaponificável do óleo extraído pelo CO₂-SC.

O índice de recuperação de cada diterpeno foi determinado na fração insaponificável do óleo obtido por solvente, após a sua quantificação e adição de quantidades conhecidas dos padrões de cada diterpeno (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de recuperação do método utilizado na determinação dos diterpenos.

| | Valor original (mg/100g) | Quantidade adicionada (mg/100g) | Valor encontrado* (mg/100g) | Índice de recuperação (%) |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Cafestol | | | | |
| Amostra 1 | 383,9 ± 2,3 | 100 | 495,4 ± 8,6 | 102,4 ± 1,8 |
| Amostra 2 | 383,9 ± 2,3 | 200 | 546,1 ± 4,7 | 90,1 ± 3,9 |
| Amostra 3 | 383,9 ± 2,3 | 300 | 614,1 ± 5,8 | 89,8 ± 7,2 |
| Caveol | | | | |
| Amostra 1 | 476,2 ± 6,4 | 100 | 599,5 ± 5,1 | 104,0 ± 10,2 |
| Amostra 2 | 476,2 ± 6,4 | 200 | 632,9 ± 9,6 | 93,5 ± 7,2 |
| Amostra 3 | 476,2 ± 6,4 | 300 | 621,5 ± 4,0 | 91,9 ± 5,7 |

*Valores médios de triplicatas.

O índice de recuperação médio foi de 94,1 % para o cafestol e de 96,5 % para o caveol, respectivamente, valores considerados excelentes em análise química.

1.3.3. Estudos preliminares para a otimização do rendimento em óleo pelo CO₂-SC.

Antes da execução do experimento propriamente dito, foi conduzido um estudo preliminar com os objetivos de verificar possíveis obstruções do sistema de extração, devido ao excesso de óleo no restritor (KNIPE et al., 1993; VEJROSTA et al., 1999), e determinar a faixa de temperatura e densidade de extração que seriam utilizadas posteriormente (Tabela 3).

Foram primeiramente verificados a massa de café submetida à extração e o fluxo de CO₂, para um máximo rendimento em óleo. Verificou-se que quantidades menores que 500 mg de amostra deveriam ser utilizadas, para que houvesse a possibilidade de todo o óleo ser extraído sem que ocorresse a sua decantação na linha de extração. Foi verificado também que fluxos elevados, como 3 mL/min causavam esse problema, razão pela qual optou-se por utilizar o fluxo de 2,0 mL/min e 300 mg de amostra. Nesta fase foram mantidos constantes, o tempo de extração estática (5 min); o tempo de extração dinâmica (20 min); a temperatura do restritor (70 °C) e do coletor (15 °C) e a granulometria do café (0,297 mm a 0,350 mm).

Quando comparado à extração com hexano, o rendimento foi relativamente baixo, exceto para a temperatura de 90 °C. Por isso, optou-se por reduzir a quantidade de amostra e o fluxo nas etapas seguintes, uma vez que o aumento do fluxo, poderia causar problemas de entupimento da linha. Estipulou-se em 200 mg, a quantidade de amostra a ser extraída, e um fluxo de 1,5 mL/min. A diminuição do fluxo objetivou também aumentar a eficiência do processo de extração, o que será discutido adiante (Tabela 6).

Tabela 3 – Rendimento em óleo e concentração de óleo no CO₂, em diferentes temperaturas de extração e pressões do CO₂.

| T (°C) | P (bar) | Densidade do CO ₂ (g/mL)* | Rendimento em óleo** (%) | Concentração do óleo no CO ₂ *** (mg/g) |
|--------|---------|--------------------------------------|--------------------------|--|
| 50 | 370 | 0,91 | 24,4 | 0,206 |
| 55 | 365 | 0,89 | 60,8 | 0,501 |
| 60 | 380 | 0,88 | 74,3 | 0,606 |
| 65 | 375 | 0,86 | 66,0 | 0,527 |
| 70 | 371 | 0,84 | 70,0 | 0,545 |
| 75 | 368 | 0,82 | 69,6 | 0,529 |
| 80 | 379 | 0,81 | 83,6 | 0,628 |
| 85 | 376 | 0,79 | 63,9 | 0,468 |
| 90 | 373 | 0,77 | 91,6 | 0,654 |
| 95 | 382 | 0,76 | 63,3 | 0,446 |

* os valores de densidade foram calculados pelo programa SFE versão 2.0, 1991, o qual acompanha o equipamento de extração; ** em relação à extração com hexano; *** Massa de CO₂ consumida (g) = 0,92 g/mL (densidade do CO₂ na entrada da bomba) x T_{ED} x FCO₂.

Objetivando reduzir o consumo de CO₂ no sistema de refrigeração, a temperatura do coletor foi aumentada para 35 °C, verificando-se possíveis perdas no rendimento. Para tal, a extração a 90 °C e 373 bar, foi escolhida por proporcionar o melhor rendimento. Os resultados não demonstraram diferença na quantidade de óleo coletada com a temperatura do coletor a 35 °C. Esta foi então a temperatura do coletor usada na execução do experimento.

Após estas considerações, optou-se por utilizar no experimento, as 4 temperaturas de extração com maior rendimento em óleo, ou seja, 60 °C, 70 °C, 80 °C e 90 °C (Tabela 3). Para cada temperatura foram estipuladas quatro densidades do CO₂ com diferença de 0,03 g/mL entre elas, partindo-se da maior pressão permitida pelo equipamento em cada temperatura (Tabela 4).

Tabela 4 – Temperaturas, pressões e respectivas densidades selecionadas para a Etapa 1 do experimento

| T (°C) | P (bar) - ρ (g/mL) | | | |
|--------|--------------------|------------|------------|------------|
| 60 | 235 - 0,77 | 275 - 0,81 | 314 - 0,84 | 380 - 0,88 |
| 70 | 253 - 0,74 | 280 - 0,77 | 327 - 0,81 | 371 - 0,84 |
| 80 | 268 - 0,71 | 294 - 0,74 | 327 - 0,77 | 379 - 0,81 |
| 90 | 280 - 0,68 | 306 - 0,71 | 337 - 0,74 | 373 - 0,77 |

1.3.4. Etapa 1 – Rendimento em óleo em função da temperatura e da densidade de extração

De acordo com PALMER et al. (1995) e VALCAREL e TENA (1997), a pressão, a qual está relacionada à densidade, e a temperatura de extração, são parâmetros importantes para a otimização do processo de extração com fluídos supercríticos.

Assim, nesta etapa foi otimizado o rendimento em óleo para cada temperatura e densidade selecionada, mantendo-se constantes o fluxo de CO₂ (1,5 mL/min); a quantidade de amostra (200 mg); o tempo de extração estática (5 min); o tempo de extração dinâmica (20 min); a temperatura do restritor (70 °C) e do coletor (35 °C) e a granulometria do café (0,297 mm a 0,350 mm).

A Figura 3 apresenta o rendimento em óleo obtido para cada tratamento, em relação à extração com hexano, a qual apresentou um teor de 11,37 %.

Os rendimentos mínimos e máximos foram observados nos tratamentos com menor e maior densidade, respectivamente, em cada temperatura, e foram de 33,4 % para a extração a 90 °C e densidade de 0,68 g/mL, e de 89,3 % para a extração a 90 °C e densidade de 0,77 g/mL. De acordo com FAVATI et al. (1991), a solubilidade dos triglicerídios no CO₂-SC aumenta significativamente com o aumento da pressão, e conseqüentemente, da densidade.

Para uma mesma densidade, a elevação da temperatura aumentou o rendimento, como pode ser observado na Figura 3(a), notadamente para a densidade de 0,77 g/mL. Por outro lado, para uma mesma isoterma, o aumento da densidade contribuiu para aumentar o rendimento em óleo.

Este comportamento é reflexo direto da solubilidade, a qual segundo LANG e WAI (2001), é o fator determinante na eficiência da extração de uma substância pelo CO₂-SC. De acordo com MODEY et al. (1996), a solubilidade é controlada por dois fatores: a volatilidade da substância, que é função da temperatura de extração, e o poder solvente do fluído, conferido pela densidade.

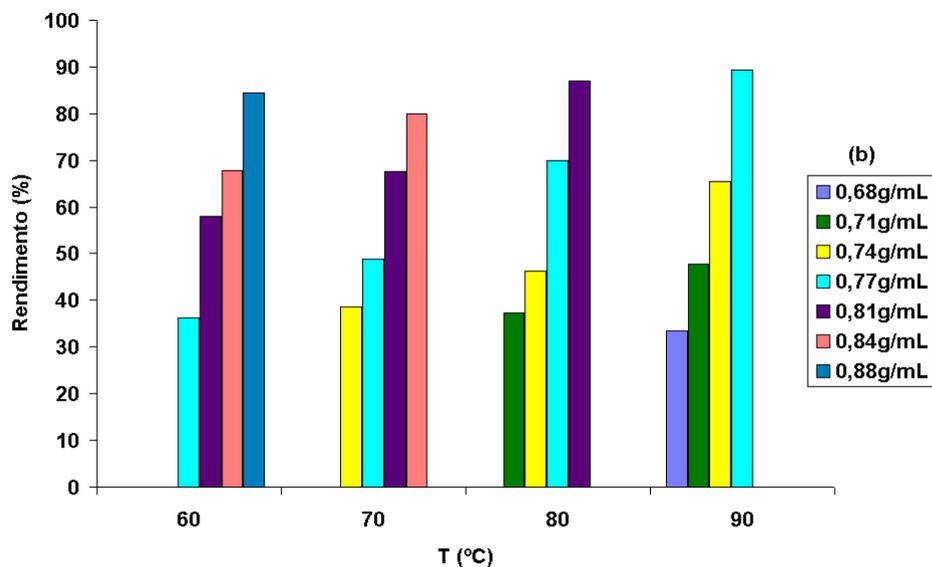
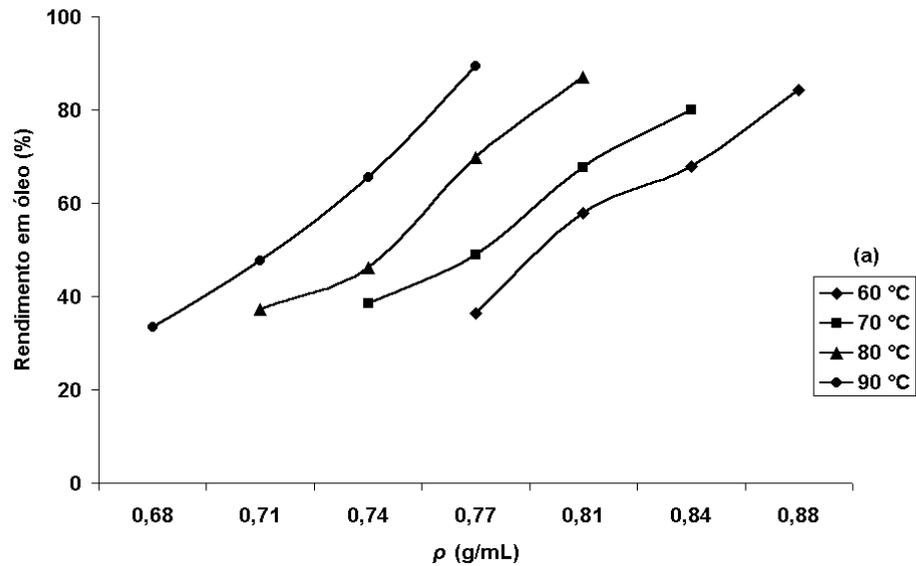


Figura 3 – Rendimento em óleo em relação à massa de café submetida à extração em função da densidade do CO₂ (a) e da temperatura de extração (b) (FCO₂ = 1,5 mL/min; T_{EE} = 5 min; T_{ED} = 20 min).

Pela observação da Figura 3, conclui-se que os dois fatores condicionaram a extração do óleo. Observa-se na Figura 3(b) que para uma mesma temperatura o aumento de densidade eleva gradualmente o rendimento em óleo, atingindo valores próximos a 90 %. Adicionalmente, o aumento do rendimento em óleo é substancial com o incremento da temperatura para uma mesma densidade.

Não obstante, os três maiores rendimentos foram obtidos na maior densidade em cada temperatura de extração, e variaram de 79,9 % a 89,4% para a extração a 70 °C e 0,84 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL, respectivamente.

Além do rendimento em óleo, outra forma de avaliar o processo é relacionar a quantidade de óleo extraída, com o consumo de CO₂. Esta relação, traduzida como eficiência do processo, pode ser verificada na Tabela 5. Observa-se que a solubilidade do óleo no CO₂ aumenta, a medida em que a densidade é elevada dentro de cada temperatura de extração.

Tabela 5 – Concentração de óleo no CO₂ em diferentes condições de extração.

| T (°C) | P (bar) | Densidade do CO₂ (g/mL) | Solubilidade do óleo no CO₂ (mg/g)* |
|-------------------|--------------------|---|---|
| 60 | 235 | 0,77 | 0,269 |
| 60 | 275 | 0,81 | 0,430 |
| 60 | 314 | 0,84 | 0,504 |
| 60 | 380 | 0,88 | 0,626 |
| 70 | 253 | 0,74 | 0,286 |
| 70 | 280 | 0,77 | 0,362 |
| 70 | 327 | 0,81 | 0,501 |
| 70 | 371 | 0,84 | 0,593 |
| 80 | 268 | 0,71 | 0,277 |
| 80 | 294 | 0,74 | 0,343 |
| 80 | 327 | 0,77 | 0,518 |
| 80 | 379 | 0,81 | 0,645 |
| 90 | 280 | 0,68 | 0,248 |
| 90 | 306 | 0,71 | 0,354 |
| 90 | 337 | 0,74 | 0,486 |
| 90 | 373 | 0,77 | 0,663 |

Massa de CO₂ consumida = 0,92 g/mL (densidade do CO₂ na entrada da bomba) x T_{ED} x FCO₂.

A menor e a maior eficiência foram observadas à 90 °C, à densidade de 0,68 g/mL e 0,77 g/mL, respectivamente, como observado para o rendimento em óleo. Como o tempo de extração e o fluxo de CO₂ foram mantidos constantes, a massa de CO₂ consumida em cada extração também não foi modificada. Por esta razão, a extração com maior rendimento é também a mais eficiente em relação ao consumo de CO₂.

A relação entre a quantidade de óleo extraída e o consumo de CO₂ foi utilizada também para verificar a otimização do processo, no que diz respeito à redução do tamanho da amostra submetida à extração e o fluxo de CO₂, comparada ao estudo preliminar (Item 1.3.3.). Para isso, foram compilados na Tabela 6, os resultados, obtidos em iguais condições de temperatura e densidade de extração, no estudo preliminar (Tabela 3) e no experimento (Tabela 5).

Tabela 6 – Otimização do processo de extração em relação à massa de café submetida à extração e ao fluxo do CO₂.

| T (°C) | P (bar) | ρ (g/mL) | Solubilidade do óleo no CO ₂ (mg/g) | |
|--------|---------|----------|--|---------------|
| | | | Estudo preliminar* | Experimento** |
| 60 | 380 | 0,88 | 0,606 | 0,626 |
| 70 | 371 | 0,84 | 0,545 | 0,593 |
| 80 | 379 | 0,81 | 0,628 | 0,645 |
| 90 | 373 | 0,77 | 0,654 | 0,663 |

* Fluxo = 2,0 mL/min; massa de café submetida à extração = 300 mg.

** Fluxo = 1,5 mL/min; massa de café submetida à extração = 200 mg.

Observa-se que a diminuição do fluxo do CO₂ de 2,0 mL/min para 1,5 mL/min, e do tamanho da amostra de 300 mg para 200 mg, tornou o processo mais eficiente, mesmo com a elevação da temperatura do coletor, a qual poderia supostamente permitir perdas do óleo extraído.

1.3.4.1. Efeito da pressão - comportamento retrógrado

A solubilidade do óleo no CO₂ varia com a pressão e a temperatura de extração. Devido à variação diferenciada da densidade observada em torno do ponto crítico e em altas pressões reduzidas (FRIEDRICH et al., 1982; RIZVI et al., 1986), as isotermas representadas em um gráfico de pressão x solubilidade, podem cruzar em determinado ponto, como demonstra a Figura 4. Este fenômeno é conhecido como comportamento retrógrado (MOHAMED, 1997), ou condensação retrógrada (DEL VALLE e AGUILERA, 1999).

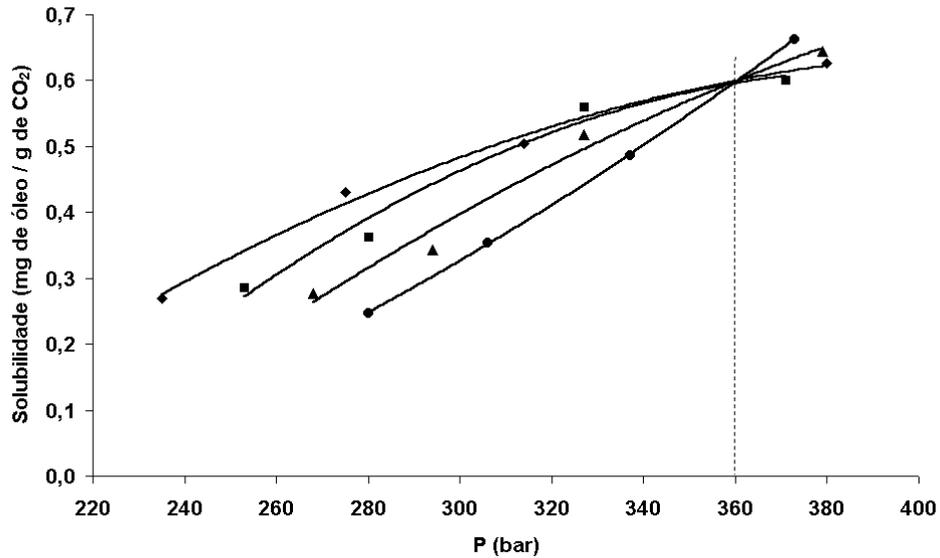


Figura 4 – Solubilidade do óleo de café no CO₂-SC, em função da pressão (♦ = 60 °C; ■ = 70 °C; ▲ = 80 °C; ● = 90 °C).

Observa-se que independentemente da isoterma, a solubilidade do óleo no CO₂ tende a aumentar a medida em que a pressão aumenta. Entretanto, a aproximadamente 360 bar, ocorre uma intersecção de todas as isotermas. Esta pressão é chamada de pressão de transformação, e a intersecção, conhecida como ponto de transformação (GE et al., 2002).

Abaixo da pressão de 360 bar, a solubilidade do óleo diminuiu a medida em que a temperatura aumentou. Ao contrário, nas pressões maiores que 360 bar, o aumento da temperatura contribuiu para o aumento da solubilidade do óleo no CO₂.

Isto acontece porque a solubilidade do óleo no CO₂ é dependente da pressão de vapor dos triglicerídios que o compõem, e da densidade do CO₂ (MODEY et al., 1996; GE et al., 2002). A pressões abaixo de 360 bar, a compressibilidade do CO₂ é alta, e, por isso, à medida em que a temperatura aumenta, a densidade do CO₂ diminui consideravelmente, reduzindo rapidamente o seu poder solvente. Se por um lado ocorre um incremento na volatilidade e no coeficiente de difusão dos triglicerídios, com o aumento da temperatura, o efeito da redução da densidade é mais pronunciado, e o resultado é a diminuição da solubilidade do óleo.

Por outro lado, a pressões acima de 360 bar, o aumento da temperatura eleva a solubilidade do óleo no CO₂. Neste caso, a densidade do fluido é alta, mas a sua compressibilidade é pequena (DEL VALE e AGUILERA, 1997). Mesmo que o aumento da temperatura diminua o poder solvente do CO₂ pela redução da densidade, o seu efeito na pressão de vapor, no coeficiente de difusão e conseqüentemente na transferência de massa, é muito maior (GE et al., 2002), razão pela qual, acima do ponto de transformação, incrementos na temperatura de extração aumentam a solubilidade do óleo.

Estes resultados estão de acordo com EGGERS (1996), o qual observou que extrações de óleos vegetais a pressões maiores que 350 bar são favorecidas com o aumento da temperatura. KING et al. (2001), observou este comportamento na extração do óleo de sementes de *Vernonia galamensis*, à temperatura de 100°C e pressões entre 345 bar e 690 bar.

Na prática, especialmente em aplicações industriais, extrações próximas à pressão de transformação são preferíveis uma vez que nesta condição, a eficiência do processo é pouco influenciada pela variação da temperatura, o que é desejável em relação ao consumo de energia (GE et al., 2002). Adicionalmente, neste ponto, a extração de compostos termossensíveis pode ser conduzida na menor temperatura possível.

1.3.5. Etapa 1 – Teor de diterpenos em função da densidade e temperatura de extração

O procedimento para a otimização do teor de cafestol e de caveol em função da temperatura de extração e da densidade do CO₂ foi idêntico ao do item 1.3.4, uma vez que os diterpenos foram determinados no óleo, extraído segundo as condições já descritas naquele item, ou seja, para cada temperatura e densidade selecionadas, foram mantidos constantes, o fluxo de CO₂ (1,5 mL/min); a quantidade de amostra (200 mg); o tempo de extração estática (5 min); o tempo de extração dinâmica (20 min); a temperatura do restritor (70 °C) e do coletor (35 °C) e a granulometria do café (0,297 mm a 0,350 mm).

A Figura 5 apresenta o teor de cafestol e de caveol em separado, obtido para cada tratamento bem como o rendimento em diterpenos totais, em relação à extração com hexano.

A variação do teor de diterpenos foi semelhante para as diferentes condições de extração. Os três maiores rendimentos tanto para o cafestol quanto para o caveol foram observados na temperatura de extração de 70 °C e nas densidades de 0,74 g/mL, 0,77 g/mL e 0,81 g/mL (Tabela 7). O rendimento médio dos diterpenos nestas condições foi de 93,4 %, 89,6 % e 89,4 %, para estas densidades, respectivamente (Figura 5).

Em média, o rendimento do cafestol nas três condições citadas foi maior que o de caveol (Tabela 7) mesmo que a solubilidade do caveol no CO₂ tenha sido maior para condições iguais de extração (Tabela 8).

Tabela 7 – Rendimento do cafestol e do caveol no óleo extraído à temperatura de extração de 70 °C.

| ρ (g/mL) | Rendimento (%) | |
|------------------|----------------|--------|
| | Cafestol | Caveol |
| 0,74 | 98,9 | 89,0 |
| 0,77 | 97,2 | 81,6 |
| 0,81 | 93,9 | 85,8 |

Independentemente do rendimento, o teor dos diterpenos no óleo diminuiu similarmente com o aumento da densidade, em todas as isotermas (Figuras 5a e 5b).

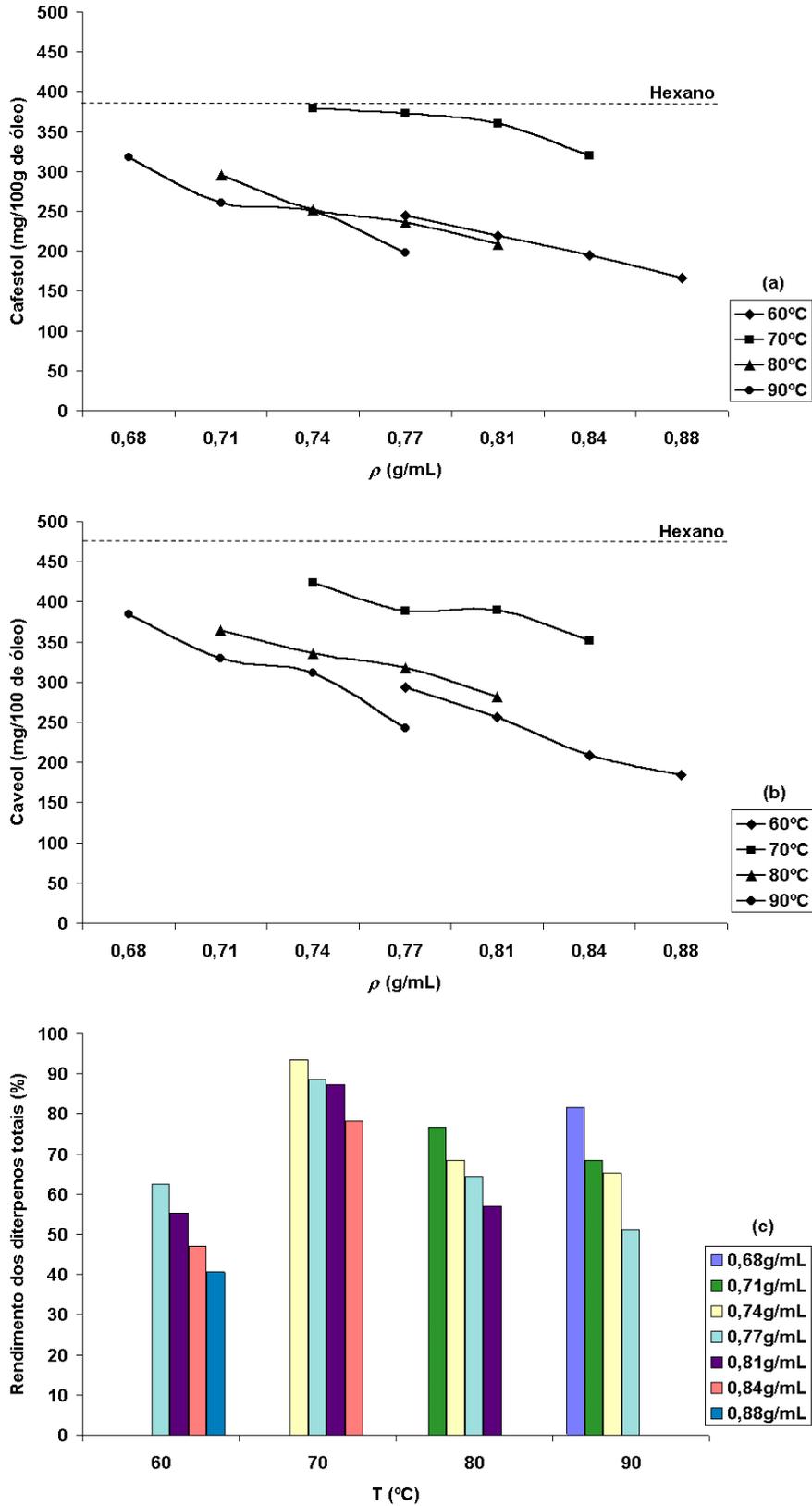


Figura 5 – Massa de cafestol (a) e de caveol (b) extraídas e rendimento em diterpenos totais (c) em função da densidade do CO₂ e da temperatura de extração.

De acordo com CHRASTIL (1982), a solubilidade do cafestol diminui com o aumento da temperatura, quando a pressão é mantida constante. Neste trabalho é difícil fazer esta comparação uma vez que as pressões não são constantes em cada temperatura de extração e tão pouco o equilíbrio termodinâmico é atingido. Para comparação, a solubilidade determinada para o cafestol no trabalho citado foi de $4,6 \times 10^{-1}$ g/L a 80 °C e 250 bar, enquanto a concentração calculada neste trabalho foi de $2,9 \times 10^{-5}$ g/L para a mesma temperatura, e pressão de 268 bar. Isto também demonstra que na prática, o equilíbrio termodinâmico raramente é atingido quando se deseja otimizar o processo de extração.

Entretanto, tomando-se pressões similares em cada temperatura (Tabela 8), observa-se uma tendência semelhante àquela observada por CHRASTIL (1982), tanto para o cafestol quanto para o caveol. Exceto para a temperatura de 60 °C, a solubilidade dos diterpenos no CO₂ diminuiu com o aumento da temperatura, quando a pressão foi mantida mais ou menos constante. Isto se deve, possivelmente, a diminuição da densidade do CO₂ a medida em que a temperatura aumenta. Os resultados também demonstraram que a solubilidade de ambos os diterpenos é maior à temperatura de 70 °C.

Tabela 8 – Solubilidade dos diterpenos no CO₂ em função da temperatura de extração para valores próximos de pressão.

| T (°C) | P (bar) | ρ (g/mL) | Solubilidade dos diterpenos no CO ₂ (mg/g) | |
|-----------|------------|------------------|---|--------|
| | | | Cafestol | Caveol |
| 60 | 275 | 0,81 | 0,95 | 1,11 |
| 70 | 280 | 0,77 | 1,35 | 1,41 |
| 80 | 268 | 0,71 | 0,82 | 1,01 |
| 90 | 280 | 0,68 | 0,79 | 0,95 |
| 60 | 314 | 0,84 | 0,98 | 1,05 |
| 70 | 327 | 0,81 | 1,80 | 1,95 |
| 80 | 327 | 0,77 | 1,22 | 1,64 |
| 90 | 337 | 0,74 | 1,21 | 1,51 |
| 60 | 380 | 0,88 | 1,04 | 1,16 |
| 70 | 371 | 0,84 | 1,89 | 2,07 |
| 80 | 379 | 0,81 | 1,34 | 1,81 |
| 90 | 373 | 0,77 | 1,31 | 1,61 |

Independentemente deste comportamento, quando o rendimento em óleo (Figura 3a) e o teor de diterpenos (Figura 5a e 5b), obtidos em cada

condição de temperatura de extração e densidade do CO₂ foram comparados, ficou claro que a medida em que aumentou o rendimento em óleo, o teor de diterpenos diminuiu.

Este comportamento supõe que a solubilidade dos diterpenos no CO₂ é maior que a dos triglicerídios, o que faria com que os diterpenos fossem extraídos mais facilmente, e a medida em que os triglicerídios fossem extraídos, ocorreria uma diluição dos diterpenos, diminuindo o seu teor. Entretanto, CHRASTIL (1982), observou que a solubilidade dos triglicerídios no CO₂-SC é bem maior que a do cafestol, e se esta constatação puder ser extrapolada para o caveol, significa que a suposição anterior é incorreta.

Esta conclusão é confirmada quando o teor dos diterpenos é expresso em relação à quantidade de amostra submetida à extração (Figura 6) e não em relação ao óleo. Observou-se que na verdade, o teor de diterpenos no óleo aumentou com o aumento da densidade, o mesmo comportamento observado para o rendimento em óleo (Figura 3), o que é inerente a substâncias pouco voláteis (LANG e WAI, 2001), como as em questão.

No entanto, a inclinação das isotermas da Figura 3a e das Figuras 6a e 6b, demonstra que, com o aumento da densidade, o incremento do rendimento em óleo é maior que aquele observado para os diterpenos, razão pela qual o teor relativo dos diterpenos no óleo diminui.

Estes resultados ajudam a elucidar a observação de FOLSTAR (1989), de que o teor de material insaponificável, no qual os diterpenos são os maiores constituintes, é extremamente influenciado pelo rendimento em óleo.

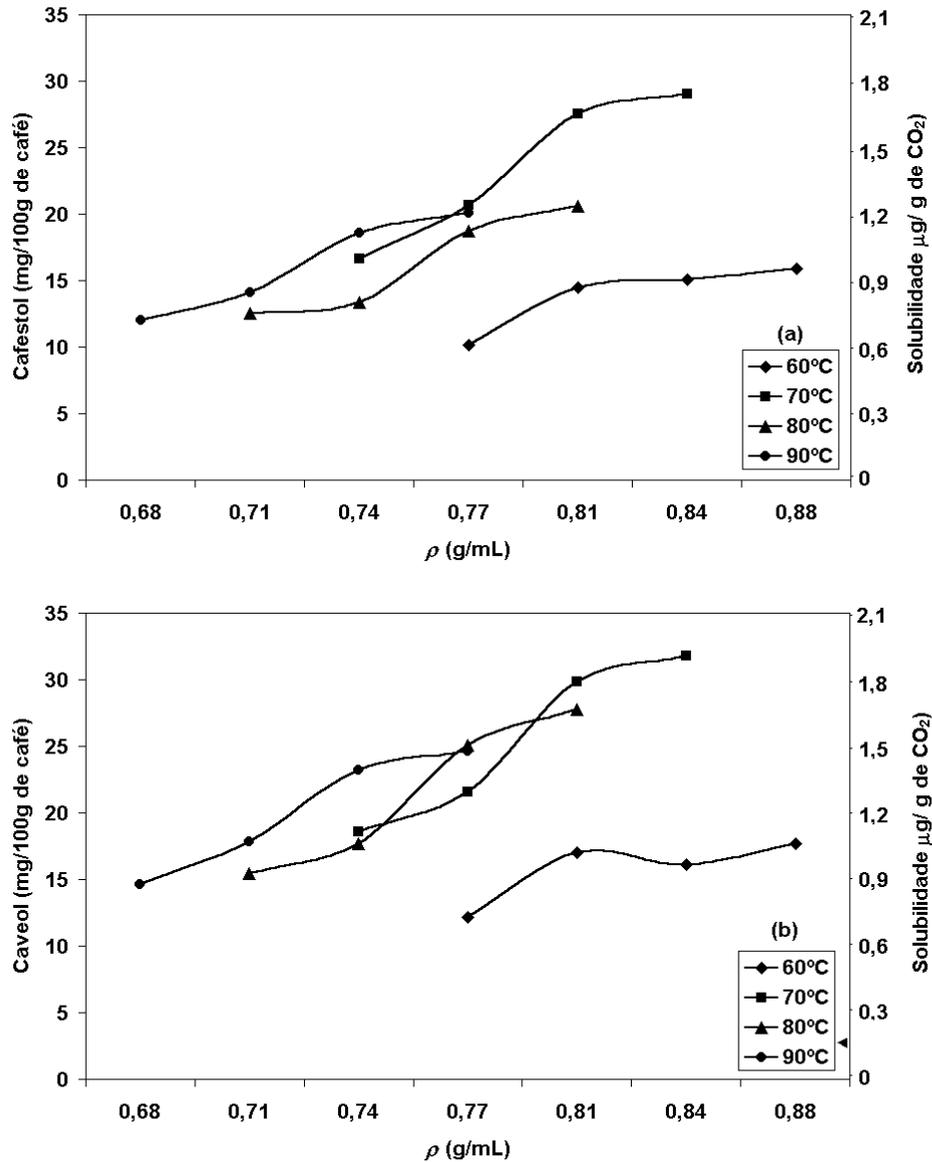


Figura 6 – Massa de cafestol (a) e de cineol (b) extraídas, em relação à massa de café submetida à extração e sua solubilidade no CO₂, em função da densidade do CO₂ e da temperatura de extração.

1.3.6. Etapa 2 – Rendimento em óleo e teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática; fluxo de CO₂; massa de café submetida à extração; granulometria do café; e tempo de extração dinâmica.

Nesta etapa foram escolhidas três condições de densidade e temperatura de extração, as quais satisfizessem os objetivos do trabalho, ou seja, extrair a maior quantidade de óleo com o maior teor de diterpenos possível. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que as condições

ótimas em relação à quantidade de óleo extraída foram diferentes daquelas obtidas para o teor de diterpenos (Tabela 9).

Tabela 9 – Tratamentos que proporcionaram os maiores rendimentos em óleo e respectivos teores de diterpenos.

| Temp (°C) | ρ (g/mL) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g de óleo) | Caveol (mg/100g de óleo) | Rendimento médio* (%) |
|-----------|---------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 90 | 0,77 | 89,4 | 197,7 | 242,3 | 51,1 |
| 80 | 0,81 | 86,9 | 209,0 | 282,0 | 57,1 |
| 70 | 0,84 | 79,9 | 320,4 | 351,5 | 78,1 |
| 60 | 0,88 | 84,3 | 166,0 | 184,7 | 40,8 |

* em relação aos dos dois diterpenos.

Se por um lado estes tratamentos apresentaram os maiores rendimentos em óleo, por outro lado, os teores de diterpenos foram relativamente baixos. Por esta razão, foram escolhidas três condições diferentes para continuar a otimização do processo: uma com o maior rendimento em óleo; outra com o maior teor de diterpenos; e outra que apresentasse quantidades medianas de óleo e de diterpenos (Tabela 10).

Tabela 10 – Condições de temperatura e densidade escolhidas para a otimização das variáveis da Etapa 2.

| T (°C) | ρ (g/mL) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g de óleo) | Caveol (mg/100g de óleo) | Rendimento médio* (%) |
|--------|---------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 70 | 0,74 | 42,0↓ | 379,3 | 424,0 | 93,4↑ |
| 70 | 0,81 | 67,6± | 360,3 | 388,8 | 87,3± |
| 90 | 0,77 | 89,4↑ | 197,7 | 242,3 | 51,1↓ |

* em relação aos dos dois diterpenos. ↑ e ↓ = valores máximos e mínimos; ± = valores intermediários.

Assim, as três condições selecionadas permitiriam avaliar as variáveis da Etapa 2 em condições de extração que apresentaram comportamento distinto para o rendimento em óleo, e para o teor de diterpenos.

1.3.6.1. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática (T_{EE})

A utilização do tempo de extração estática é importante quando se deseja aumentar a difusão do fluido na matriz, ou nos casos em que se utilizam modificadores (KNIPE et al., 1993). Neste trabalho as extrações foram efetuadas com o T_{EE} iguais a zero, 2 min e 5 min.

Os resultados expressos na Tabela 11 demonstram que a quantidade de óleo extraída aumentou com o aumento do tempo de extração estática, entretanto, o teor de diterpenos diminuiu com o aumento do rendimento em óleo, comportamento já esperado.

Tabela 11 – Rendimento do óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com o tempo de extração estática para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | T_{EE} (min) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|-------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| 70 °C e 0,74 g/mL | 0 | 30,3 | 409,3 | 447,4 |
| | 2 | 33,7 | 394,8 | 439,3 |
| | 5 | 42,0 | 379,3 | 424,0 |
| 70 °C e 0,81 g/mL | 0 | 61,1 | 378,4 | 407,3 |
| | 2 | 63,5 | 362,7 | 402,7 |
| | 5 | 67,4 | 360,3 | 388,8 |
| 90 °C e 0,77 g/mL | 0 | 79,6 | 299,2 | 308,4 |
| | 2 | 86,5 | 277,5 | 303,2 |
| | 5 | 89,9 | 197,7 | 242,3 |

* $FCO_2 = 1,5$ mL/min; $G_C = 0,297$ mm a 0,35 mm; $T_{ED} = 20$ min; $M_{SE} = 200$ mg.

Com estes resultados, não seria possível escolher uma única condição que satisfizesse a maior extração de óleo e o maior teor de diterpenos. Contudo, segundo BJÖRKLUND et al. (1998), nos casos onde o T_{EE} tem pouco efeito no rendimento, é preferível desprender este tempo com a extração dinâmica.

Aliado a esse fato, e como a não utilização do T_{EE} proporcionou o maior teor de diterpenos e uma diminuição muito pequena em relação ao rendimento em óleo, decidiu-se não utilizar o tempo de extração estática, preferindo

compensar a redução do rendimento em óleo com o aumento do tempo de extração dinâmica.

1.3.6.2. Rendimento do óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com a massa de café submetida à extração (M_{SE})

Após decidir pela não utilização do tempo de extração estática, foi otimizada a massa de café submetida à extração.

Como a quantidade de CO_2 utilizada poderia estar sendo insuficiente para a completa extração do óleo e dos diterpenos, e o aumento do fluxo já havia causado a obstrução do sistema de extração, decidiu-se diminuir a quantidade de café no extrator para 100 mg e 150 mg, com o que a quantidade de óleo e de diterpenos disponíveis para extração seriam menores e o rendimento aumentaria, conseqüentemente.

Os resultados demonstraram que realmente, este procedimento aumentou o rendimento em óleo em todas as condições de extração, entretanto, o comportamento do teor de diterpenos foi inverso (Tabela 12).

Tabela 12 – Rendimento do óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com a massa de café submetida à extração, para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | M_{SE} (g) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| 70 °C e 0,74 g/mL | 100 | 60,6 | 322,8 | 352,0 |
| | 150 | 35,2 | 392,2 | 413,1 |
| | 200 | 30,3 | 409,3 | 447,4 |
| 70 °C e 0,81 g/mL | 100 | 78,2 | 270,3 | 325,4 |
| | 150 | 69,7 | 300,4 | 354,8 |
| | 200 | 61,1 | 378,4 | 407,3 |
| 90 °C e 0,77 g/mL | 100 | 89,9 | 249,0 | 287,1 |
| | 150 | 87,9 | 267,7 | 302,2 |
| | 200 | 79,6 | 299,2 | 308,4 |

* T_{EE} = 0 min; FCO_2 = 1,5 mL/min; G_C = 0,297 mm a 0,35 mm; T_{ED} = 20 min.

Exceto para a extração a 70 °C e 0,74 g/mL, onde a redução da quantidade de café de 200 mg para 100 mg duplicou o rendimento em óleo, este procedimento demonstrou ter efeito pouco pronunciado. As extrações a

70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL apresentaram incrementos de 17,1 % e 20,3 % no rendimento em óleo. Em contrapartida, a redução média no teor de diterpenos foi de 21,2 %, 24,2 % e 13,3 %, respectivamente.

Estas observações levaram à manutenção da massa de café em 200 mg uma vez que o aumento do rendimento em óleo não compensaria a redução na concentração de diterpenos. Outra constatação é que a redução da quantidade de café pela metade somente seria quantitativamente compensada, se duplicasse o rendimento em óleo e, pelo menos, mantivesse a quantidade de diterpenos. Evidentemente não seria possível duplicar este rendimento uma vez que o teor de óleo máximo, determinado por solvente, foi de 11,37 %.

Entretanto, esta avaliação foi importante uma vez que em valores absolutos, concluiu-se que a quantidade de óleo e de diterpenos obtida a cada extração não compensaria a massa de CO₂ consumida e o tempo de extração despendido. Adicionalmente, a avaliação da quantidade de café no extrator demonstrou realmente que a quantidade de CO₂ utilizada poderia estar sendo insuficiente para a extração máxima do óleo, necessitando de um aumento no fluxo ou no tempo de extração dinâmica.

1.3.6.3. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o fluxo de CO₂ (FCO₂)

Determinada a quantidade de café a ser extraída, e tendo em vista a necessidade de aumentar a quantidade de CO₂, o fluxo de CO₂ foi elevado para 2,0 mL/min e 2,5 mL/min. Este procedimento poderia levar à sobrecarga do sistema de extração, como verificado no estudo preliminar (Item 1.3.3.). Contudo, naquele caso, a quantidade de café utilizada era de 300 mg, ou seja, 100 mg a mais que a utilizada nesta etapa, e na realidade, este problema não voltou a ocorrer.

Os resultados da Tabela 13 indicam um comportamento diferenciado em relação ao rendimento em óleo para cada condição de extração, o qual pode ser melhor observado na Figura 7.

Tabela 13 – Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com o fluxo de CO₂, para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | FCO ₂ (mL/min) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|-------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| 70 °C e 0,74 g/mL | 1,5 | 30,3 | 409,3 | 447,4 |
| | 2,0 | 49,3 | 181,9 | 331,2 |
| | 2,5 | 41,0 | 230,7 | 355,2 |
| 70 °C e 0,81 g/mL | 1,5 | 61,1 | 378,4 | 407,3 |
| | 2,0 | 71,3 | 223,1 | 262,1 |
| | 2,5 | 69,4 | 232,2 | 274,7 |
| 90 °C e 0,77 g/mL | 1,5 | 79,6 | 299,2 | 308,4 |
| | 2,0 | 89,9 | 180,6 | 216,4 |
| | 2,5 | 91,4 | 172,5 | 215,9 |

*T_{EE} = 0 min; M_{SE} = 200 mg; G_C = 0,297 mm a 0,35 mm; T_{ED} = 20 min.

As curvas da Figura 7 demonstram a tendência do fluxo de 2,0 mL/min proporcionar maiores rendimentos em óleo. Mesmo na extração a 90 °C e 0,77 g/mL, o fluxo de 2,5 mL/min apresentou um aumento de somente 1,5 % em relação ao fluxo de 2,0 mL/min, um incremento que pode ser considerado desprezível.

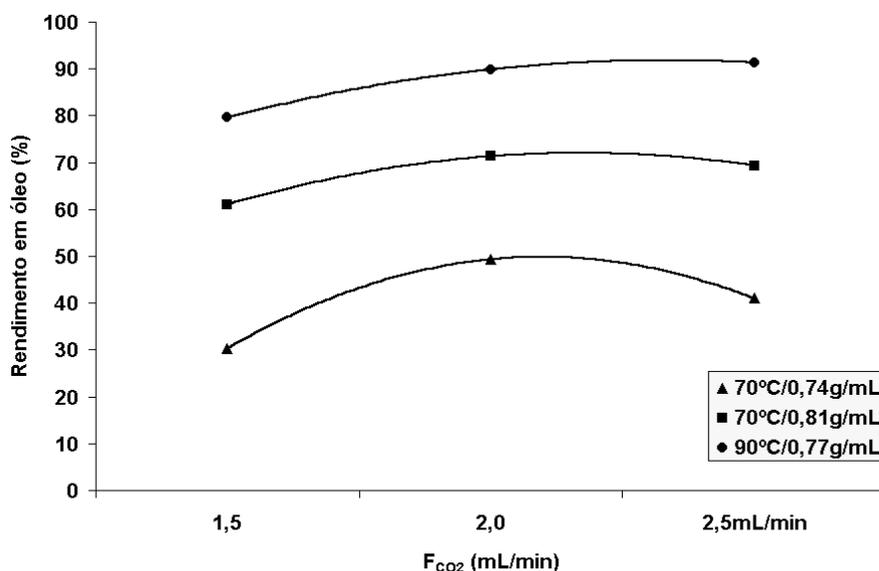


Figura 7 – Rendimento em óleo em função do fluxo de CO₂ (T_{EE} = 0 min; M_{SE} = 200 mg; G_C = 0,297 mm a 0,35 mm; T_{ED} = 20 min).

As diferenças foram tanto maiores quanto menor o rendimento em óleo apresentado por cada condição de extração. Isto significa que o aumento da

densidade do fluido, observado entre as extrações à temperatura de 70 °C, e o incremento da temperatura em relação à extração a 90 °C, tendeu a compensar ou diminuir o efeito da elevação do fluxo, razão pela qual nas extrações a 70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL, a influência do fluxo foi praticamente nula, se comparada à extração a 70 °C e 0,74 g/mL.

Se considerado o rendimento em óleo, o fluxo de 2,0 mL/min foi ideal, e com 2,5 mL/min, ocorreu uma redução nas extrações a 70 °C, e um pequeno incremento na extração a 90 °C. Estes resultados indicam, entretanto, que a transferência do óleo para o CO₂ foi praticamente independente do seu fluxo, e para aumentar a taxa de extração, a solubilidade do óleo deveria ser aumentada. De acordo com BJÖRKLUND et al. (1998), nestes casos, a alta interação entre o material a ser extraído e a matriz, não responde à elevação do fluxo, e o uso da extração estática pode ser viável, o que foi anteriormente discutido (Tabela 11).

Por outro lado, o aumento do fluxo para 2,0 mL/min e 2,5 mL/min reduziu drasticamente os teores de diterpenos em todas as condições de extração (Tabela 13).

Provavelmente, devido à solubilidade dos diterpenos no CO₂-SC ser bem menor que a dos triglicerídios (CHRASIL, 1982), fluxos mais elevados tenderiam a extrair, relativamente, maiores quantidades de óleo (uma vez que os triglicerídios compõem a maior parte do óleo), o que reduziria a concentração dos diterpenos.

Se por um lado o incremento do fluxo de 1,5 mL/min para 2,0 mL/min foi favorável ao rendimento em óleo, por outro, provocou a redução média no teor dos diterpenos em 34,8 %, 36,6 % e 33,0 %, para as extrações a 70 °C e 0,74 g/mL, 70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL, respectivamente. Desta forma, o pequeno aumento do rendimento em óleo, não justifica esta redução, razão pela qual o fluxo de 1,5 mL/min foi mantido.

1.3.6.4. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com a granulometria do café (G_c)

Uma vez otimizado o fluxo de extração, foi verificada a influência da granulometria do café no rendimento em óleo e na concentração dos diterpenos. É importante observar que mesmo com a mudança da granulometria, a massa de café submetida à extração foi mantida constante.

Em qualquer sistema de extração de matrizes sólidas, o tamanho de suas partículas influencia no rendimento dos extratos (FOLSTAR, 1989). Este fator é importante nos processos de extração com fluídos supercríticos, uma vez que matrizes com partículas muito grandes tendem a aumentar o tempo de extração devido ao processo tornar-se dependente da difusão da substância dentro da matriz (IBÁÑEZ et al., 1997). Quando matrizes com partículas de menor tamanho são utilizadas, no entanto, a extração geralmente é mais rápida, uma vez que o óleo presente na sua superfície é prontamente removido pelo fluído (GOODRUM et al., 1996).

A redução no tamanho das partículas aumenta a área superficial, e promove o maior rompimento das células e a maior exposição do material a ser extraído. Por outro lado, aumenta a resistência à penetração do fluído na matriz dado ao aumento da sua própria densidade (GE et al., 2002) o que dificulta inclusive, a própria manutenção do fluxo do fluído (LANG e WAI, 2001). Obviamente, o aumento do tamanho das partículas provoca um efeito contrário, levando a necessidade da utilização de tempos de extração prolongados (ROY et al., 1994; LANG e WAI, 2001).

FOLSTAR (1989), apresentou os resultados da extração de óleo de café verde por éter de petróleo em aparelho de Soxhlet por 6 horas. Utilizando café com diâmetro de partículas entre 0,15 mm a 0,42 mm, 0,42 mm a 0,60 mm e 0,60 mm a 0,85 mm, o rendimento foi de 15,51 mg/100 g, 13,10 mg/100 g e 9,36 mg/ 100 g, respectivamente, demonstrando que o aumento do tamanho das partículas reduziu o rendimento.

No presente trabalho, os maiores rendimentos em óleo foram obtidos com a granulometria intermediária (0,35 mm a 0,42 mm), para as três condições de extração (Figura 8). Estes resultados, embora sejam semelhantes aos obtidos por FATTORI et al. (1988) na extração de óleo de canola,

discordam da afirmação de MODEY et al. (1996), segundo a qual, para amostras sólidas, quanto menor o tamanho das partículas, maior a taxa de extração.

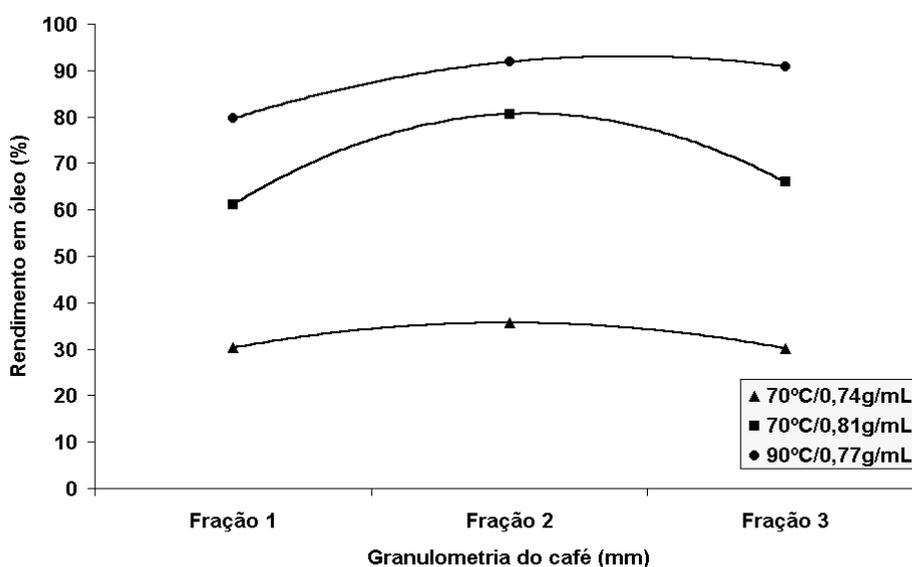


Figura 8 – Rendimento em óleo em função da granulometria do café (Fração 1 = 0,297 a 0,35 mm; Fração 2 = 0,35 a 0,42 mm; Fração 3 = 0,42 a 0,50 mm).

Contudo, o seu efeito no rendimento em óleo e no seu teor de diterpenos foi diferenciado para cada condição. A extração a 70 °C e 0,74 g/mL apresentou um ligeiro aumento na quantidade de óleo, quando a granulometria passou de 0,297 mm a 0,35 mm para 0,35 mm a 0,42 mm, retornando ao rendimento inicial com o novo aumento da granulometria. Respectivamente, a extração a 90 °C e 0,77 g/mL, apresentou primeiramente um pequeno aumento, diminuindo ligeiramente em seguida. Já a extração a 70 °C e 0,81 g/mL apresentou primeiramente o aumento mais pronunciado, retornando em seguida a um valor intermediário.

Este comportamento diferenciado pode ser explicado pelas diferentes temperaturas e densidades de extração do CO₂ empregadas, as quais condicionam de forma diferenciada a difusividade e o poder solvente do CO₂, respectivamente (SIHVONEN et al., 1999; LANG e WAI, 2001). À temperatura e densidade de 70 °C e 0,74 g/mL, a variação no rendimento em óleo com o

aumento da granulometria foi muito pequena. Neste caso, a baixa densidade não foi suficiente para promover a completa solvatação de todo o óleo disponibilizado para a extração em cada fração, ou seja, a densidade foi o fator limitante no processo e não a granulometria.

De forma semelhante, a extração a 90 °C e 0,77 g/mL apresentou uma variação sensivelmente maior, mas ainda pouco pronunciada. Neste caso, a temperatura pareceu ser o fator limitante em um primeiro momento. Provavelmente, a 90 °C, a difusividade do fluido foi suficientemente elevada para permitir a sua maior penetração na matriz, independentemente da sua granulometria. Ao que parece, a variação positiva no rendimento em óleo, com o aumento da granulometria de 0,297 mm a 0,35 mm para 0,35 mm a 0,42 mm, se deva ao aumento do espaço intersticial da matriz, o que permite a maior penetração do CO₂. Entretanto, quando a granulometria foi aumentada novamente, ocorreu uma ligeira queda no rendimento em óleo, o que provavelmente seja devido à capacidade limitada de solvatação à densidade de 0,77 g/mL, uma vez que com o aumento da granulometria, ocorre menor disponibilização de óleo prontamente extraível, na matriz.

Certamente, a maior variação devido a granulometria foi observada na extração a 70 °C e 0,81 g/mL e provavelmente se deva ao efeito conjunto da temperatura e da densidade. Como a temperatura é relativamente baixa, e confere baixa difusividade ao fluido, quando a granulometria foi aumentada no primeiro momento, ocorreu um incremento no rendimento em óleo, dado ao aumento da sua penetrabilidade. Diferentemente da extração a mesma temperatura e a 0,74 g/mL, a maior densidade relativa compensou a redução do óleo disponível para a extração, dada a diminuição da área superficial da matriz, e aumentou o rendimento. Entretanto, quando a granulometria aumentou novamente, a redução da área superficial da matriz não foi mais compensada pela densidade, ocorrendo novamente a redução.

Adicionalmente, de acordo com GE et al. (2002), partículas muito finas promovem freqüentemente uma compactação da amostra quando altas pressões são aplicadas, o que faz com que o fluido passe pela câmara de extração sem efetivamente penetrar na matriz, fenômeno conhecido como CO₂ *short circuit*. Talvez também por esta razão, o menor rendimento foi observado

nas três temperaturas de extração, na granulometria de 0,297 mm a 0,35 mm, exceto para a extração a 70 °C e 0,74 g/mL.

Quanto aos diterpenos, o comportamento foi semelhante àquele observado nas variáveis já estudadas, ou seja, a medida em que o rendimento em óleo aumentou, o seu teor de diterpenos diminuiu. Neste sentido, se por um lado o aumento na granulometria num primeiro momento, contribuiu positivamente para o rendimento em óleo, a sua concentração em diterpenos diminuiu consideravelmente. Assim, a granulometria mais fina (0,297 mm a 0,35 mm) foi a que apresentou os maiores teores, tanto de cafestol quanto de caveol (Tabela 14).

Tabela 14 – Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com a granulometria do café, para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | G_c (mm) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 70 °C e 0,74 g/mL | 0,297 a 0,35 | 30,3 | 409,3 | 447,4 |
| | 0,35 a 0,42 | 35,7 | 239,3 | 330,8 |
| | 0,42 a 0,50 | 30,2 | 253,9 | 350,0 |
| 70 °C e 0,81 g/mL | 0,297 a 0,35 | 61,1 | 378,4 | 407,3 |
| | 0,35 a 0,42 | 80,6 | 141,1 | 223,0 |
| | 0,42 a 0,50 | 65,9 | 177,4 | 250,6 |
| 90 °C e 0,77 g/mL | 0,297 a 0,35 | 79,6 | 299,2 | 308,4 |
| | 0,35 a 0,42 | 91,8 | 132,8 | 171,9 |
| | 0,42 a 0,50 | 90,9 | 173,4 | 255,3 |

*T_{EE} = 0 min; M_{SE} = 200 mg; FCO₂ = 1,5 mL/min; T_{ED} = 20 min.

As variações foram bastante pronunciadas, principalmente para o cafestol, o qual apresentou uma redução média entre a maior e a menor concentração, de 53,3 %. Já a redução apresentada pelo caveol foi de 38,5 %.

O aumento apresentado no rendimento em óleo não compensou a drástica redução no teor de diterpenos, razão pela qual a menor granulometria foi mantida.

1.3.6.5. Rendimento em óleo de acordo com o tempo de extração dinâmica (T_{ED})

Provavelmente, a variável mais importante desta etapa do experimento tenha sido o tempo de extração dinâmica, sendo por isso estudada após a otimização das outras variáveis. O tempo de extração dinâmica é importante uma vez que a sua variação permite não somente modificar o tempo de contato entre o fluido e a amostra, mas também verificar a relação entre a quantidade de extrato obtida e a quantidade de fluido utilizada (FAVATTI et al., 1991; DUNFORD et al., 1998; ROZZI et al., 2002), ou seja, a eficiência do processo de extração.

Com a variação do tempo de extração, as três condições de temperatura e densidade selecionadas, proporcionaram rendimentos em óleo semelhantes ao obtido na extração convencional com hexano (Figura 9a). Este resultado está de acordo com o de CORRÊA et al. (1994), para a extração de óleo de semente de maracujá, e o de autores para os óleos de milho, girassol e amendoim (MCHUGH, 1990).

A primeira diferença, no entanto, é que a extração com solvente consumiu um tempo de 16 horas, enquanto os tempos necessários para se obter o máximo rendimento em óleo pelo CO_2 foram de 60 min, 40 min e 20 min, para as extrações a 70 °C e 0,74 g/mL, 70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL, respectivamente, o que representa uma redução de 94 % a 98 % no tempo necessário para a extração do óleo. É claro que dependendo da temperatura do solvente, extrações por aproximadamente 9 horas em aparelho de Soxhlet seriam suficientes para promover praticamente a extração de quantidades semelhantes de óleo, todavia, a diferença no tempo de extração ainda seria em torno de 90 %.

Estes resultados estão de acordo com a observação de DEL VALLE e AGUILERA (1999), segundo a qual, a extração por fluidos supercríticos é geralmente mais rápida que a extração convencional por solventes, devido à sua alta difusividade e baixa viscosidade. MOLERO GÓMEZ et al. (1996), obtiveram uma redução de 85 % no tempo necessário para a extração de óleo de sementes de uva (20 h para a extração com Soxhlet e 3 h para a extração com CO_2 -SC).

Na extração por CO₂-SC, as curvas apresentadas para cada condição em função do tempo (Figura 9a), denotam um efeito diferenciado da temperatura e da densidade. As três condições de extração seguem um comportamento padrão, ou seja, um aumento linear na fase inicial, e um decréscimo no final, com a redução da taxa de extração (CHAO et al., 1993; CORRÊA et al. 1994; GE et al., 2002).

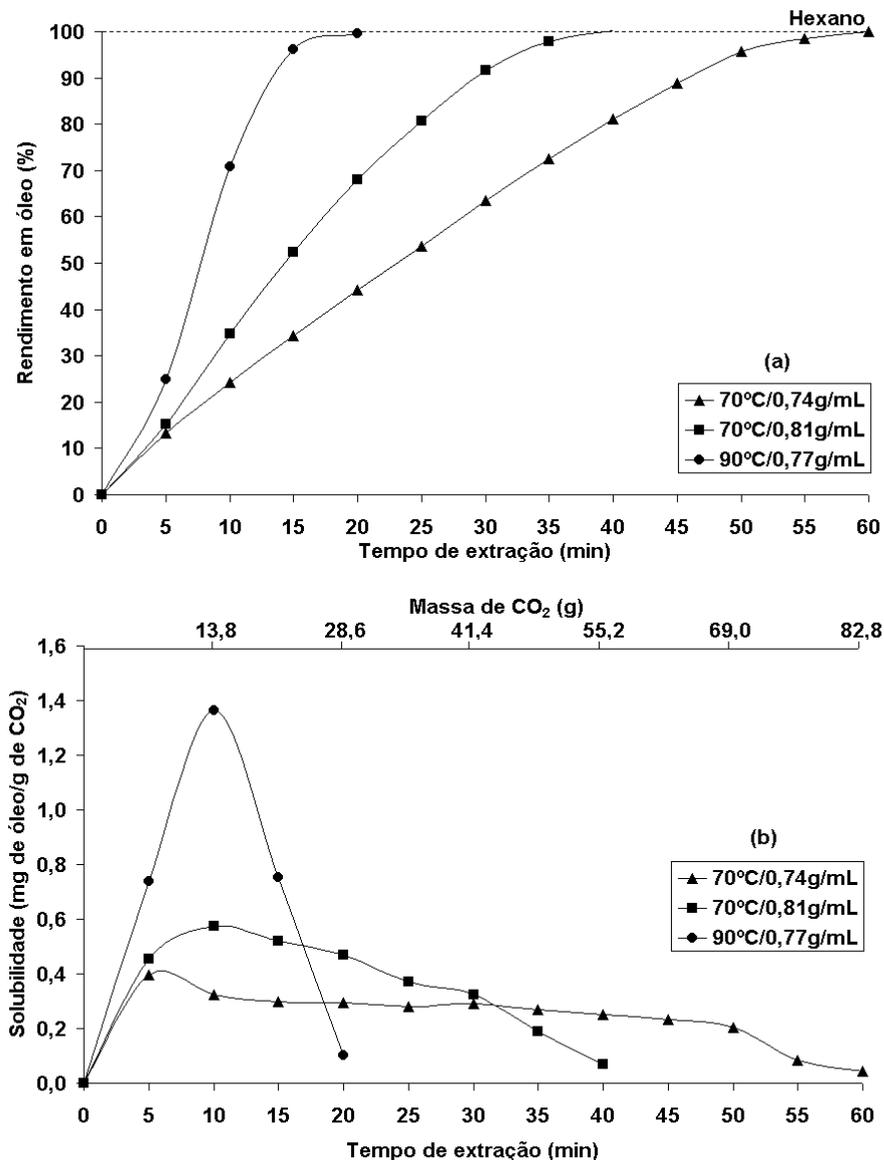


Figura 9 – Rendimento em óleo em função do tempo de extração dinâmica (a); Solubilidade do óleo no CO₂ em função do tempo de extração e massa de CO₂ consumida (b).

Este comportamento é inerente aos processos de extração por CO₂ supercrítico (LANG e WAI, 2001) e se deve a rápida remoção do soluto da superfície das partículas primeiramente, e a remoção mais lenta do soluto no interior da matriz em seguida, quando então a taxa de extração torna-se mais ou menos constante. Um paralelo com a desidratação de alimentos pode ser feito, uma vez que a remoção da água torna-se cada vez mais difícil, a medida em que diminui a sua disponibilidade na superfície do alimento.

A extração a 70 °C e 0,74 g/mL apresentou incrementos praticamente constantes até os 50 min, atingindo o máximo rendimento aos 60 min. Já a extração a 70 °C e 0,81 g/mL apresentou incrementos mais pronunciados que a condição anterior, mais ou menos constantes até aproximadamente 25 min, decrescendo a taxa de extração até os 40 min, quando foi verificado o rendimento máximo em óleo. Neste caso, o incremento da taxa de extração e a conseqüente redução do tempo, foram devidos ao efeito do aumento da densidade e conseqüentemente do poder de solvatação do CO₂ (CORRÊA et al., 1994; MARKOM et al., 2001), uma vez que as extrações foram realizadas à mesma temperatura.

De acordo com MODEY et al. (1996) e BJÖRKLUND et al. (1998), o aumento da temperatura de extração geralmente contribui para a dessorção do material a ser extraído da matriz, o que foi observado neste trabalho. A 90 °C a taxa de extração foi mais pronunciada, sendo necessários somente 20 min para atingir o rendimento máximo. Isto significa que o aumento de 20 °C na temperatura, verificado entre as extrações a 70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL promoveu o mesmo efeito que a elevação da densidade em 0,07 g/mL observada entre as extrações a 70 °C, uma vez que nos dois casos, o tempo de extração foi reduzido pela metade (60 min para 40 min e 40 min para 20 min, respectivamente).

Entretanto, mesmo que o menor tempo de extração tenha sido verificado à temperatura de extração de 90 °C, as observações anteriores por si só não expressam a intensidade do efeito da elevação da temperatura e da densidade. Ainda, se for desconsiderado o tempo necessário para se obter o rendimento máximo em óleo em cada condição, a variação da densidade ou da

temperatura não influenciou a extração, uma vez que todo o óleo disponível foi extraído.

A Figura 9b apresenta a solubilidade de óleo no CO₂ em função do tempo de extração e da massa de CO₂ consumido. Observa-se que as condições de extração apresentaram comportamentos diferenciados em relação ao rendimento em óleo e ao consumo de CO₂. Diferentemente da extração a 70 °C e 0,74 g/mL, as extrações a 70 °C e 0,81 g/mL e a 90 °C e 0,77 g/mL, apresentaram inicialmente uma solubilidade menor de óleo no CO₂ (entre 5 min e 10 min). Provavelmente, este comportamento deva-se ao elevado fluxo de CO₂ utilizado nestas condições de extração, não permitindo uma maior saturação do fluido, inicialmente.

Contudo, é evidente que a extração a 90 °C foi a mais eficiente. Por este motivo, concluiu-se que a pressão de vapor do óleo e a difusividade do CO₂ foram determinantes para a eficiência do processo de extração, o que é comum para substâncias com alto ponto de ebulição (LANG e WAI, 2001) como é o caso dos triglicerídios.

Uma alternativa para aumentar a eficiência do processo seria reduzir o fluxo de extração, (PAPAMICHAIL et al., 2000) o que aumentaria a saturação para valores o mais próximo possíveis do equilíbrio (EGGERS, 1996). Por isso, o maior aproveitamento do CO₂ contribuiria para a redução de custos.

Por outro lado, o aumento do tempo de extração proporcionaria um efeito oposto e obviamente não seria desejável (EGGERS, 1996). Desta forma, para alcançar o máximo rendimento na extração de um determinado soluto, grandes volumes de fluido são utilizados, como pode ser observado no trabalho de MOHAMED (1997), na extração de óleo de manteiga. Nestes casos, a saturação do CO₂, utilizada em estudos de solubilidade, raramente é atingida, uma vez que seria inviável economicamente. ZHAO et al. (1987), observaram que a concentração do óleo de farelo de arroz no CO₂ foi de até um terço do valor de solubilidade determinado para óleos vegetais.

É importante lembrar que a condução do estudo do tempo dinâmico, neste trabalho, foi diferente daquela realizada normalmente. A cada 5 minutos, quando a coleta do óleo era efetuada, ocorria um efeito da extração estática, uma vez que a câmara de extração era mantida pressurizada neste intervalo.

Este sistema de extração é semelhante ao definido por BJÖRKLUND et al. (1998), como *stepwise extraction*, e permite o aumento da eficiência do processo de extração pela modificação da matriz ou da interação entre a matriz e o material a ser extraído.

Por esta razão, o rendimento em óleo, observado com 20 min de extração dinâmica na Etapa 1 é menor que o observado no mesmo tempo de extração nesta etapa, para todas as condições de extração. A condição de 90 °C e 0,77 g/mL, por exemplo, promoveu a extração de 89,9 % (10,2 g/100g) na etapa 1 e 99,7 % (11,3 g/100g) na segunda etapa.

1.3.6.6. Teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração dinâmica (T_{ED})

O teor de diterpenos foi avaliado no óleo em função do tempo de extração dinâmica. Observaram-se a taxa de extração dos diterpenos nas diferentes temperaturas de extração e densidades do CO₂ e a relação entre o teor de diterpenos e o consumo de CO₂ ao longo do tempo.

As Figuras 10a e 10b apresentam o comportamento das curvas de extração do cafestol e do caveol, respectivamente. Os maiores teores de cafestol e de caveol foram observados nas extrações a 70 °C e 0,74 g/mL, 70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL, respectivamente, comportamento inverso aquele apresentado pelo óleo (Figura 9a). Estes resultados estão de acordo com as observações feitas anteriormente, onde as condições de extração que proporcionaram os maiores rendimentos em óleo, continham os maiores teores de diterpenos, e vice versa.

Outra característica apresentada pelas curvas é que a taxa de extração dos diterpenos seguiu aproximadamente a mesma tendência da extração do óleo, ou seja, uma maior inclinação na extração a 90 °C e 0,77 g/mL e inclinações semelhantes nas extrações a 70 °C.

Isto demonstra, como já discutido, que o teor de diterpenos está relacionado à quantidade de óleo extraída, mesmo que não totalmente, uma vez que valores mais elevados de diterpenos foram observados em condições de extração que apresentaram quantidades de óleo também maiores. Caso a concentração dos diterpenos no óleo dependesse exclusivamente da

quantidade de óleo extraída, as concentrações dos diterpenos seriam muito próximas, para quantidades de óleo semelhantes. Como pode ser observado pelas Figuras 10a e 10b, esta afirmativa não é verdadeira.

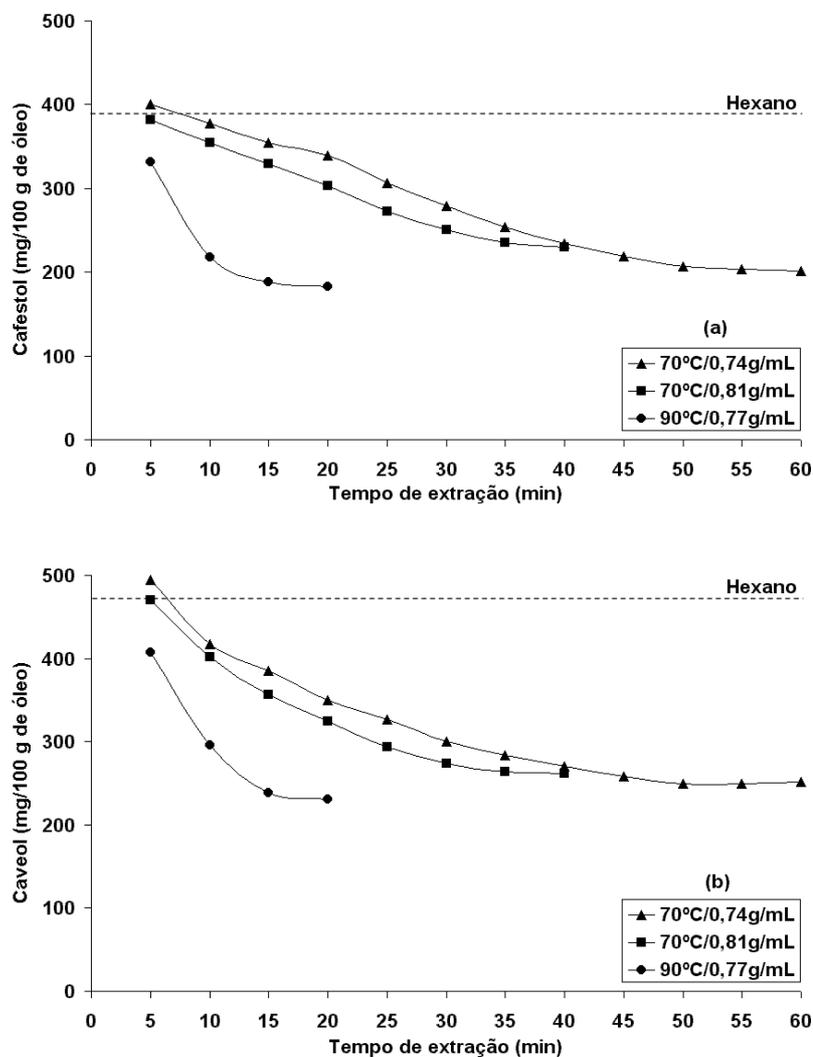


Figura 10 – Teores de cafestol (a) e de caveol (b) no óleo, em função do tempo de extração dinâmica.

A concentração de cafestol no óleo, no tempo final de extração foi de 201,7 mg/100 g, 230,0 mg/100 g e 182,8 mg/100 g, para as extrações a 70 °C e 0,74 g/mL, 70 °C e 0,81 g/mL e 90 °C e 0,77 g/mL, respectivamente. Para o caveol, as concentrações finais foram de 251,6 mg/100 g, 261,1 mg/100 g e 230,9 mg/100 g, respectivamente. Estes valores, se comparados àqueles

encontrados no óleo extraído por solvente, representam uma redução média de 47 % para o cafestol e 48 % para o caveol.

Concentrações de cafestol e de caveol intermediárias ou até um pouco maiores que aquelas observadas no óleo extraído por hexano foram obtidas na extração por CO₂ supercrítico. Estes resultados indicam que a extração do óleo de café verde por CO₂-SC é viável do ponto de vista técnico. Neste trabalho foi possível obter diferentes rendimentos em óleo com concentrações de diterpenos variadas. De uma forma geral, a medida em que o rendimento em óleo aumentou, o teor de diterpenos diminuiu, demonstrando a sua interdependência.

1.4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram estudadas algumas variáveis importantes para a otimização do processo de extração do óleo de café verde com dióxido de carbono supercrítico. Os resultados obtidos para o rendimento em óleo, o perfil de ácidos graxos e o seu teor de diterpenos, foram comparados com o óleo obtido por extração em equipamento de Soxhlet, utilizando hexano como solvente.

O perfil de ácidos graxos foi semelhante para os dois métodos de extração, embora a extração com CO₂-SC tenha apresentado teores ligeiramente menores de ácidos graxos com número igual ou superior a 18 carbonos. As diferentes pressões e temperaturas utilizadas na extração por CO₂-SC não denotaram qualquer diferença que pudesse ser atribuída à variação na seletividade do fluido supercrítico.

O teor de óleo no café, determinado por extração com hexano, foi de 11,37%, e este rendimento foi atingido pela extração com CO₂-SC. As características da matéria-prima e as condições utilizadas foram: umidade do café: 9,98 %; granulometria do café: 0,297 mm a 0,35 mm; massa de café submetida à extração: 200 mg; fluxo do CO₂: 1,5 mL/min; e não utilização de extração estática. A temperatura e a pressão (densidade) de extração mais eficientes, em termos de quantidade de óleo obtida e consumo de CO₂ foram de 90°C e 373 bar (0,77 g/mL), respectivamente, e promoveram o rendimento máximo em óleo em 20 min de extração dinâmica, consumindo 28,6 g de CO₂ (7,13 x 10⁻⁴ g/g CO₂).

Em relação ao teor de diterpenos, observado nas condições que promoveram a extração total do óleo, a temperatura de 70 °C e pressão de 253 bar (densidade igual a 0,74 g/mL), foram as que proporcionaram a maior concentração. Os teores de cafestol e de cafeol no óleo foram de 201,7 mg/ 100 g e 251,6 mg/100 g, respectivamente. Comparados aos teores observados no óleo obtido pela extração com hexano, estes valores representaram uma redução de 52,5 % e 52,8 %, dos teores originais, respectivamente.

Entretanto, teores de diterpenos maiores que àqueles obtidos pela extração com hexano, e de óleo intermediários àquele, foram observados nas diferentes condições de extração. Conclui-se assim, que a extração do óleo de café verde por dióxido de carbono supercrítico, é viável tecnicamente, e que diferentes quantidades de óleo, com diferentes teores de diterpenos podem ser obtidos por esta técnica, tornando-a potencialmente utilizável na obtenção deste produto.

**CAPÍTULO 3 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO E DE DITERPENOS DO CAFÉ
TORRADO COM CO₂ SUPERCRÍTICO**

1.1. INTRODUÇÃO

Fluídos supercríticos tem sido utilizados pela indústria de alimentos desde a década de 70. Até o começo dos anos 80, as aplicações comerciais eram confinadas a descafeinização do café e a extração de lúpulo. No final dos anos 80, as aplicações foram expandidas com o aparecimento de plantas em pequena escala para a extração de aromas e aditivos, principalmente na Alemanha. Ao mesmo tempo, a extração comercial de lúpulo e a descafeinização do café em larga escala chegou aos Estados Unidos. Aplicações em menor escala para a extração de produtos naturais foram verificadas em vários países, como no Japão, Coréia e Índia. A ênfase nesta técnica foi dada, em todos os casos, pela habilidade inerente aos fluídos supercríticos em extrair componentes de substratos complexos, e as exigências governamentais e dos consumidores, por produtos obtidos sem o uso de solventes orgânicos (TEJA e ECKERT, 2000).

Com a expansão desta tecnologia, ela passou também a ser utilizada para a extração e fracionamento de óleos e gorduras de diferentes fontes, o que de acordo com MODEY et al. (1996), parecem ser promissores em escala industrial. Ao mesmo tempo, a extração de extratos aromáticos passou a ser estudada exaustivamente (KERROLA, 1996). Entretanto, as aplicações industriais neste sentido ainda tem sido reduzidas, uma vez que o valor agregado dos produtos obtidos por esta técnica, deve ser elevado para compensar o seu investimento (CYGNAROWICZ-PROVOST, 1996).

O óleo de café torrado tem sido utilizado há bastante tempo como aromatizante em vários alimentos e bebidas industrializadas, e possui alto valor agregado. Ele pode ser obtido por extração com solventes como o hexano ou por prensagem dos grãos, o que é mais comum (ROYCHOUDHURY e RATHINDRA, 1985). Se a extração por solvente é indesejável, tanto em relação a qualidade do produto final quanto ao próprio processo, o rendimento na extração por prensagem é geralmente muito baixo (LÓPEZ-FONTAL e CASTAÑO-CASTRILLÓN, 1999a), e o seu aroma pode ser bastante prejudicado devido às altas temperaturas do processo (KOCH e PARCHET, 1994).

Um das aplicações do óleo de café torrado se dá na fabricação de café instantâneo, onde é adicionado no final do processo para compensar as perdas dos compostos voláteis ocorridas na sua obtenção (SCHLECHT et al., 1993).

Uma característica indesejável no óleo, no entanto, são os diterpenos cafestol e caveol presentes na fração insaponificável, razão pela qual vários métodos já foram patenteados para a sua remoção (HAMELL et al., 1979). Além de comprometerem a estabilidade do óleo (ROYCHOUDHURY e RATHINDRA, 1985), vários trabalhos os têm associado ao aumento das taxas de colesterol em animais e humanos (VAN DE WOUW et al., 1994; HECKERS et al., 1994 e VAN ROIJ et al., 1995), e a qualidade sensorial do óleo livre de diterpenos é considerada melhor que àquela do óleo bruto (HAMELL et al., 1979).

Desta forma, a obtenção do óleo de café torrado pelo CO₂ supercrítico poderia ser uma alternativa para aumentar o rendimento da extração, e obter um produto de melhor qualidade sensorial. Além disso, a redução do teor de diterpenos no óleo reduziria o risco do aumento de doenças cardíacas, pela elevação das taxas de colesterol.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração do óleo de café torrado pelo CO₂ supercrítico, contendo o menor teor possível dos diterpenos cafestol e caveol.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de café arábica (*Coffea arabica*) torrado, com 2,4 % de umidade e 15,49 % de óleo foram gentilmente fornecidas pela Companhia de Café 3 Corações S.A. (Santa Luzia, MG). O café foi torrado à temperatura de 237 °C por 13,17 min em torrefador de cilindro rotativo Lilla Oppus 40.

Para evitar a oxidação do óleo, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de poliolefina multicamada metalizada, sob vácuo, e armazenadas em congelador à temperatura de -15 °C.

1.2.1. Preparo da matéria-prima

Os grãos de café foram triturados para redução do seu tamanho, utilizando um moedor de café de bancada (Arbel, Brasil), visando aumentar a área interfacial para transferência de massa e conseqüentemente aumentar a extração do óleo. Os grãos triturados foram classificados em peneiras Tyler de forma a obter 3 frações de diferentes diâmetros (0,297 mm a 0,35 mm; 0,35 mm a 0,42 mm e 0,42 mm a 0,50 mm).

As frações obtidas foram acondicionadas sob atmosfera de nitrogênio em frascos de vidro de 250 mL com tampas de metal à temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.2. Extração do óleo com solvente

A extração do óleo com solvente foi realizada em aparelho Soxhlet, utilizando hexano, por um período de 16 horas (AOAC, 1997). O solvente foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo (Fisatom, modelo 802, Brasil), fazendo-se em seguida o resfriamento e pesagem do balão de extração, com o que foi obtido o teor de óleo, sendo então acondicionado em frascos de 5 mL a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior análise.

1.2.3. Extração do óleo pelo CO₂ supercrítico

O óleo de café foi extraído em um equipamento de extração supercrítica, modelo 7680A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA), utilizando dióxido de carbono com pureza mínima de 99,99 % (White Martins, Osasco, SP). A configuração do equipamento empregada está esquematizada na Figura 1.

Neste processo extrativo, o dióxido de carbono após atingir a temperatura e pressão desejada, entra em contato com a amostra (acondicionada em filtro de papel) colocada na câmara extratora de aço inoxidável com volume de 4,64 mL. Este procedimento é realizado sob duas formas: a estática, em que o fluido permanece em contato com a amostra na pressão e temperaturas pré-definidas por um tempo fixo, sem deslocamento; e

a dinâmica, em que o gás entra em contato com amostra, e é continuamente removido sob um fluxo e tempo pré-definidos.

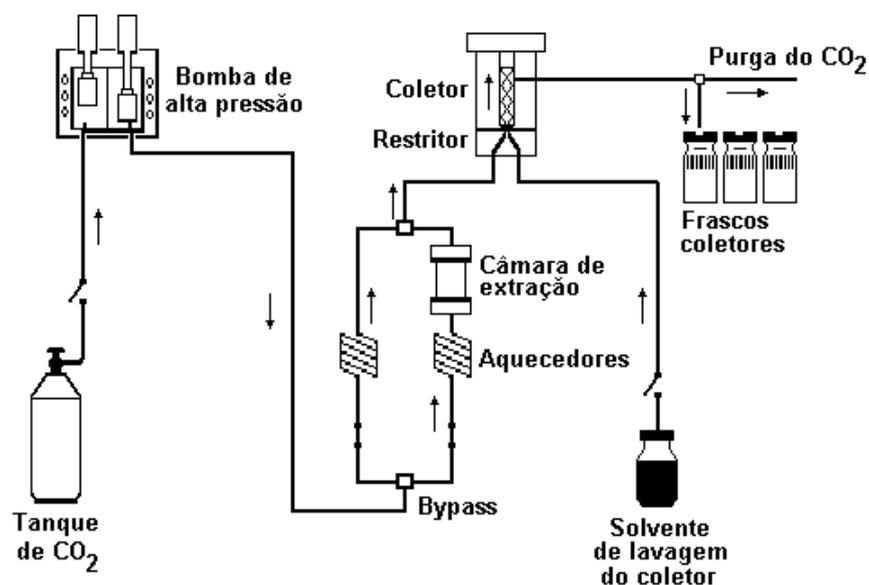


Figura 1 – Figura 1 – Representação da configuração do extrator supercrítico HP 7680A, utilizado no experimento.

Após sair da câmara extratora, o fluido é conduzido pressurizado para o restritor, onde ocorre uma redução drástica na pressão, e conseqüente uma expansão do fluido. Com isso, o óleo extraído decanta e é retido em um coletor de ODS (octadecilsilica), sendo posteriormente removido por hexano e coletado em frascos de vidro de 2 mL.

Em todas as etapas de extração, a temperatura do restritor foi mantida a 70 °C e a do coletor a 35 °C, para impedir a decantação do óleo na linha de transferência e ao mesmo tempo a sua completa retenção no coletor. Durante a lavagem do coletor, as temperaturas do restritor e do coletor foram mantidas a 58 °C. Esta temperatura foi escolhida de acordo com a recomendação do fabricante do equipamento, segundo a qual a temperatura do coletor deve ser mantida em, no mínimo, 10 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente utilizado para a sua lavagem (KNIPE et al., 1993).

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) buscando verificar o efeito dos fatores granulometria do café, massa de café submetida a extração, pressão do CO₂, temperatura de

extração, fluxo do CO₂, e tempo de extração estática e dinâmica, sobre as variáveis rendimento em óleo, teor de diterpenos (cafestol e caveol) e perfil de ácidos graxos.

Anteriormente à execução do experimento propriamente dito, foi conduzido um estudo preliminar com o objetivo de selecionar 4 temperaturas de extração e respectivas pressões do CO₂ que proporcionassem a maior extração de óleo possível. Além disto com este estudo foi possível verificar possíveis obstruções do sistema de extração, devido ao excesso de óleo no restritor (KNIPE et al., 1993; VEJROSTA et al., 1999). Para isso, foram estabelecidas 10 temperaturas as quais variaram de 50 °C a 95 °C (intervalos de 5 °C) nas máximas pressões de extração que o equipamento pudesse comportar em cada temperatura (os resultados estão expressos na Tabela 3).

Selecionadas 4 temperaturas de extração e 4 pressões do CO₂ em cada temperatura (Tabela 4), o experimento foi então dividido em duas etapas. Na primeira, foram otimizadas as variáveis, temperatura de extração e pressão (densidade) do CO₂, em um esquema fatorial (4 x 4) com três repetições, mantendo-se constantes a granulometria do café (0,297 mm a 0,35 mm), a quantidade de café submetida à extração (200 mg), o fluxo do CO₂ (1,5 mL/min), e o tempo de extração estática (5 min) e dinâmica (20 min).

Na segunda etapa, verificadas a temperatura de extração e pressão (densidade) do CO₂, foram selecionados três tratamentos considerando-se o rendimento em óleo e a sua concentração em diterpenos, e otimizados independentemente nesta seqüência as variáveis, tempo de extração estática (0 min, 2 min e 5 min); granulometria do café (0,42 mm a 0,50 mm, 0,35 mm a 0,42 mm, e 0,297 mm a 0,35 mm); massa de café submetida a extração (100 mg, 150 mg e 200 mg); fluxo do CO₂ (1,5 mL/min, 2,0 mL/min e 2,5 mL/min), e tempo dinâmico (5 min, até a extração de óleo máxima). Uma vez otimizada a variável, ela era mantida fixa para a verificação da variável seguinte.

O estudo do tempo de extração dinâmica foi baseado no trabalho de MARKOM et al. (2001), de acordo com o qual coletas sucessivas da substância a ser extraída são conduzidas na medida em que ocorre a sua extração. Em nosso estudo, as coletas do óleo para a sua quantificação, bem como a determinação dos diterpenos, foram realizadas a cada 5 min, mantendo o

sistema de extração pressurizado. A vantagem deste sistema reside na economia de CO₂ e na redução do tempo para condução do experimento.

1.2.4. Determinação da quantidade de óleo extraída

A massa de óleo extraída, necessária para a determinação do rendimento em óleo, foi determinada gravimetricamente em balança analítica, após a evaporação do hexano (verificada visualmente) com nitrogênio por aproximadamente 5 minutos e aquecimento do extrato a aproximadamente 45 °C, em chapa aquecedora.

1.2.5. Perfil de ácidos graxos e teor de diterpenos do óleo

1.2.5.1. Preparo das amostras

Para a determinação do perfil de ácidos graxos e do teor de diterpenos, o óleo armazenado foi descongelado, e saponificado com uma solução de KOH 0,5 mol/L em metanol (HARTMAN & LAGO, 1973). A fração insaponificável foi então extraída da solução metanólica com 3 x 2 mL de hexano, para a determinação do teor de diterpenos.

1.2.5.2. Determinação do perfil dos ácidos graxos

Os ácidos graxos da fração metanólica foram esterificados (HARTMAN & LAGO, 1973), sendo o seu perfil determinado por cromatografia de fase gasosa, usando cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II, equipado com detector de ionização de chama a 260 °C e coluna capilar J & W Scientific, CP-Wax (25 m x 0,32 mm x 0,20 µm) mantida a 215 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão de 15 psi e velocidade de 95,6 cm/s. A temperatura do injetor foi mantida em 230 °C.

1.2.5.3. Determinação do teor de diterpenos

Os diterpenos cafestol e caveol foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), em cromatógrafo HP 1050A equipado com duas colunas HP-C₁₈ (200 mm x 4,6 mm x 5 µm) conectadas em série e detector de UV-VIS a 220 nm, utilizando-se como fase móvel metanol/água (85:15 %, v/v) e fluxo de 0,7 mL/min.

O extrato de hexano contendo a fração insaponificável foi lavado com 1 mL de água (3 vezes) para a remoção de resíduos de sabão. A fração orgânica contendo os diterpenos foi então transferida para frascos âmbar de 5 mL, evaporada sob fluxo de nitrogênio com aquecimento de aproximadamente 45 °C, e ressuspensa em 1 mL de fase móvel. As amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada RC 55 de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha) e analisadas.

As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL e *loop* de 50 µL e os diterpenos quantificados utilizando-se curvas de calibração construídas com padrões de cafestol (LKT Labs, Inc. Saint Paul, Minnesota) e caveol (Sigma, Saint Louis, Missouri).

Para a construção das curvas de calibração, foi preparada uma solução estoque de cada padrão na concentração de 1 mg/mL, diluídos na fase móvel. As soluções estoques foram diluídas de forma a se obter as seguintes concentrações para cada padrão: cafestol: 0,019 mg/mL, 0,038 mg/mL, 0,076 mg/mL, 0,114 mg/mL e 0,152 mg/mL; e caveol: 0,016 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,064 mg/mL, 0,096 mg/mL e 0,128 mg/mL.

O índice de recuperação do método foi obtido adicionando-se 20 µL, 40 µL e 60 µL de uma mistura de cafestol e caveol (1 mg/mL) a uma amostra de óleo obtida por extração com hexano.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Perfil dos ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado no óleo obtido em todos os tratamentos estudados na primeira etapa do experimento. Isto foi realizado devido a possibilidade de ocorrer extração seletiva dos triglicerídios, o que alteraria o perfil de ácidos graxos do óleo (MARKOM et al., 2001, KIM et al. 1999, PALMER e TING, 1995), e conseqüentemente a sua estabilidade a oxidação.

A Tabela 1 apresenta os valores em porcentagem de área relativa de cada ácido graxo, em comparação com o óleo extraído por hexano. Tanto na extração por solvente quanto com CO₂-SC, observou-se uma predominância dos ácidos graxos linoléico (C18:2) e palmítico (C16:0).

Tabela 1 - Perfil dos ácidos graxos do óleo de café obtido na primeira etapa do experimento com CO₂, em comparação com o óleo obtido por extração com hexano (porcentagem de área relativa).

| Ácido graxo | Hexano ¹ | SC-CO ₂ ² |
|-------------------|---------------------|---------------------------------|
| C14:0 | 0,10 ± 0,01 | 0,13 ± 0,06 |
| C16:0 | 33,04 ± 0,50 | 34,41 ± 0,75 |
| C16:1 | < 0,1 | 0,14 ± 0,07 |
| C18:0 | 7,14 ± 0,50 | 7,68 ± 0,66 |
| C18:1 ω 9 | 8,78 ± 0,21 | 9,01 ± 0,13 |
| C18:1 ω 11 | 0,41 ± 0,01 | 0,50 ± 0,05 |
| C18:2 | 45,98 ± 0,96 | 43,81 ± 0,39 |
| C18:3 | 1,76 ± 0,30 | 1,41 ± 0,06 |
| C20:0 | 2,00 ± 0,05 | 2,38 ± 0,19 |
| C20:1 | 0,21 ± 0,03 | 0,20 ± 0,02 |
| C22:0 | 0,43 ± 0,08 | 0,33 ± 0,05 |
| C24:0 | 0,15 ± 0,02 | < 0,1 |

¹ Média de 3 repetições; ² Média de 48 repetições.

Como o desvio padrão apresentado para cada ácido graxo é relativo às repetições de todos os tratamentos conduzidos na primeira etapa, isto significa que praticamente não houve alteração do seu perfil, com a variação da temperatura e da densidade do fluido.

Por esta razão, não foi determinado o perfil dos ácidos graxos na segunda etapa do experimento, uma vez que as variações no poder solvente do fluido e na sua seletividade, dadas pelas diferentes densidades e temperaturas, não apresentaram qualquer efeito.

Mesmo nas menores densidades utilizadas, onde a seletividade na extração dos compostos tende a ser maior (RIZVI et al., 1986a), nenhum comportamento que denotasse a extração seletiva dos ácidos graxos foi observado.

Em relação ao óleo obtido com hexano, pequenas alterações foram observadas. Resultados similares foram obtidos por MANESS et al. (1995), na extração de óleo de noz-pecã. Relativamente, o óleo obtido por SC-CO₂ apresentou menores teores de ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1), ácido araquídico (C20:0) e ácido behênico (C22:0), em detrimento aos maiores teores de ácido palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1) e linoléico (C18:2).

De acordo com MORALES et al., (1998), as altas temperaturas e densidades utilizadas na extração por CO₂-SC podem contribuir para o processo de oxidação dos ácidos graxos insaturados, levando a formação de compostos indesejáveis. Entretanto, assim como as diferentes condições do processo não alteraram o perfil de ácidos graxos, não foi observada nenhuma relação entre o aumento da temperatura de extração e da densidade do CO₂ e a diminuição da concentração de ácidos graxos.

1.3.2. Curva de calibração e índice de recuperação do método utilizado na determinação dos diterpenos

A Figura 2 apresenta um cromatograma típico da fração insaponificável do óleo extraído por CO₂ supercrítico.

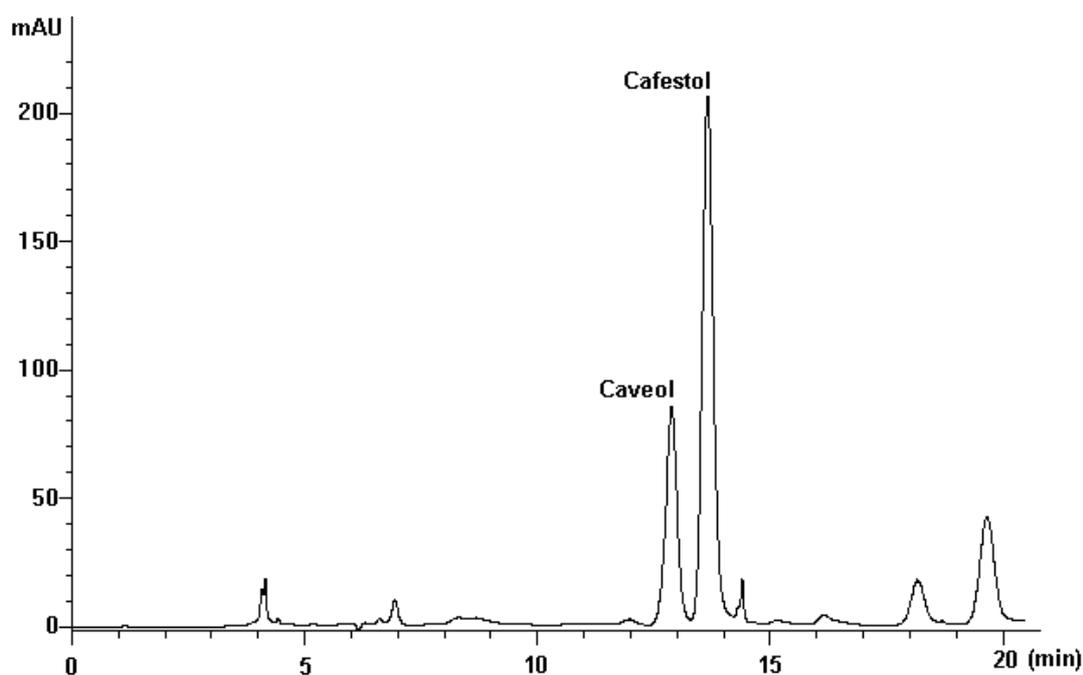


Figura 2 – Cromatograma típico da fração insaponificável do óleo extraído pelo CO₂-SC.

A quantificação dos diterpenos foi realizada utilizando-se a técnica do padrão externo, correlacionando a área de cada diterpeno com as curvas de calibração obtidas para cada padrão.

Como a sua determinação foi realizada ao longo do experimento, o equipamento foi calibrado pelo menos uma vez a cada determinação, para diminuir erros de quantificação. Por isso, os coeficientes de determinação e os valores das constantes das curvas de calibração para o cafestol e o caveol foram diferentes ao longo do experimento.

Todavia, todas as equações de regressão utilizadas para a quantificação dos diterpenos, apresentaram coeficientes de determinação com valores acima de 0,999.

O índice de recuperação de cada diterpeno foi determinado na fração insaponificável do óleo obtido por solvente, após a sua quantificação e adição de quantidades conhecidas dos padrões cada diterpeno (Tabela 2).

O índice de recuperação médio foi de 102,83 % para o cafestol e de 95,69 % para o caveol, respectivamente, valores considerados excelentes em análise química.

Tabela 2 – Índice de recuperação do método utilizado na determinação dos diterpenos.

| | Valor original (mg/100g) | Quantidade adicionada (mg/100g) | Valor encontrado* (mg/100g) | Índice de recuperação (%) |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Cafestol | | | | |
| Amostra 1 | 328,5 ± 3,9 | 100 | 467,4 ± 3,6 | 109,1 ± 2,9 |
| Amostra 2 | 328,5 ± 3,9 | 200 | 546,1 ± 8,0 | 103,3 ± 6,0 |
| Amostra 3 | 328,5 ± 3,9 | 300 | 604,1 ± 5,9 | 96,1 ± 1,9 |
| Caveol | | | | |
| Amostra 1 | 397,8 ± 6,6 | 100 | 529,5 ± 5,8 | 106,4 ± 5,2 |
| Amostra 2 | 397,8 ± 6,6 | 200 | 552,9 ± 7,7 | 92,5 ± 9,3 |
| Amostra 3 | 397,8 ± 6,6 | 300 | 615,5 ± 10,1 | 88,2 ± 8,4 |

*Valores médios de triplicatas.

1.3.3. Estudos preliminares para a otimização do rendimento em óleo pelo CO₂-SC.

Antes da execução do experimento propriamente dito, foi conduzido um estudo preliminar com os objetivos de, verificar possíveis obstruções do sistema de extração, devido ao excesso de óleo no restritor (KNIPE et al., 1993; VEJROSTA et al., 1999), e determinar a faixa de temperatura e densidade de extração que seriam utilizadas posteriormente (Tabela 3).

Foram primeiramente verificados a massa de café submetida à extração e o fluxo de CO₂, para um máximo rendimento em óleo. Verificou-se que quantidades menores que 500 mg de amostra, deveriam ser utilizadas para que houvesse a possibilidade de todo o óleo ser extraído, sem que ocorresse a sua decantação na linha de extração. Foi verificado também que fluxos elevados, como 3 mL/min causavam esse problema, razão pela qual optou-se por utilizar o fluxo de 2,0 mL/min e 300 mg de amostra. Nesta fase foram mantidos constantes, o tempo de extração estática (5 min); o tempo de extração dinâmica (20 min); a temperatura do restritor (70 °C) e do coletor (15 °C) e a granulometria do café (0,297 mm a 0,350 mm).

Os rendimentos observados foram relativamente baixos se comparados à extração com hexano. Por isso, optou-se por reduzir a massa de café na

câmara extratora para 200 mg. Como a massa de café submetida a extração foi reduzida, decidiu-se reduzir o fluxo de CO₂ para 1,5 mL/min, com o objetivo de aumentar a eficiência do processo de extração, o qual será discutido na Tabela 5.

Tabela 3 – Rendimento em óleo e solubilidade do óleo no CO₂, em diferentes temperaturas de extração e pressões do CO₂.

| T (°C) | P (bar) | Densidade do CO₂ (g/mL)* | Rendimento em óleo** (%) | Solubilidade do óleo no CO₂*** (mg/g) |
|-------------------|--------------------|--|---|---|
| 50 | 370 | 0,91 | 51,2 | 0,589 |
| 55 | 365 | 0,89 | 59,9 | 0,689 |
| 60 | 380 | 0,88 | 66,1 | 0,761 |
| 65 | 375 | 0,86 | 65,3 | 0,752 |
| 70 | 371 | 0,84 | 66,8 | 0,768 |
| 75 | 368 | 0,82 | 65,5 | 0,753 |
| 80 | 379 | 0,81 | 69,7 | 0,802 |
| 85 | 376 | 0,79 | 60,3 | 0,694 |
| 90 | 373 | 0,77 | 69,1 | 0,794 |
| 95 | 382 | 0,76 | 65,9 | 0,758 |

* os valores de densidade foram calculados pelo programa SFE versão 2.0, 1991, o qual acompanha o equipamento de extração; ** em relação à extração com hexano; *** Massa de CO₂ consumida (g) = 0,92 g/mL (densidade do CO₂ na entrada da bomba) x T_{ED} x FCO₂.

Também com o intuito de reduzir o consumo de CO₂ no sistema de refrigeração, a temperatura do coletor foi aumentada de 15 °C para 35 °C, verificando-se possíveis perdas no rendimento em óleo. Para tal, a extração a 80 °C e 379 bar, foi escolhida por proporcionar o melhor rendimento. Os resultados não demonstraram diferenças na quantidade de óleo coletada com o que a temperatura do coletor foi mantida em 35 °C. Esta temperatura foi então utilizada no experimento.

Optou-se então por utilizar no experimento, as 4 temperaturas de extração com maior rendimento em óleo, ou seja, 60 °C, 70 °C, 80 °C e 90 °C. Para cada temperatura foram estipuladas 4 densidades do CO₂ com diferença de 0,03 g/mL, partindo-se da maior pressão possível do equipamento em cada temperatura (Tabela 4).

Tabela 4 – Temperaturas, pressões e respectivas densidades selecionadas para a Etapa 1 do experimento

| T (°C) | P (bar) - ρ (g/mL) | | | |
|--------|-------------------------|------------|------------|------------|
| 60 | 235 - 0,77 | 275 - 0,81 | 314 - 0,84 | 380 - 0,88 |
| 70 | 253 - 0,74 | 280 - 0,77 | 327 - 0,81 | 371 - 0,84 |
| 80 | 268 - 0,71 | 294 - 0,74 | 327 - 0,77 | 379 - 0,81 |
| 90 | 280 - 0,68 | 306 - 0,71 | 337 - 0,74 | 373 - 0,77 |

1.3.4. Etapa 1 – Rendimento em óleo em função da temperatura e da densidade de extração

Nesta etapa foi otimizado o rendimento em óleo para cada temperatura e densidade pré-determinadas, mantendo-se constantes o fluxo de CO₂ (1,5 mL/min); a massa de café submetida a extração (200 mg); o tempo de extração estática (5min); o tempo de extração dinâmica (20 min); a temperatura do restritor (70 °C) e do coletor (35 °C) e a granulometria do café (0,297 mm a 0,350 mm).

A Figura 3 apresenta o rendimento em óleo obtido para cada tratamento, em relação à extração com hexano (15,49 %).

Os rendimentos mínimos e máximos foram observados nos tratamentos com menor e maior densidade, respectivamente, em cada temperatura, e foram de 29,2 % para a extração a 60 °C e 0,77 g/mL (235 bar), e de 86,4 % para a extração a 80 °C e 0,81 g/mL (379 bar). Para comparação, ROSELIUS et al. (1982), obtiveram um rendimento máximo de 13 % na extração de óleo de café torrado, porém, à temperatura de 150 °C e pressão de 300 atm (303,97 bar). O rendimento obtido por BRIMMER (1996), à temperatura de 75 °C e pressão de 280 bar foi de 15 %. Entretanto, como estes trabalhos foram publicados na forma de patentes, parâmetros como fluxo de CO₂ e tempo de extração, não estão disponíveis para comparação.

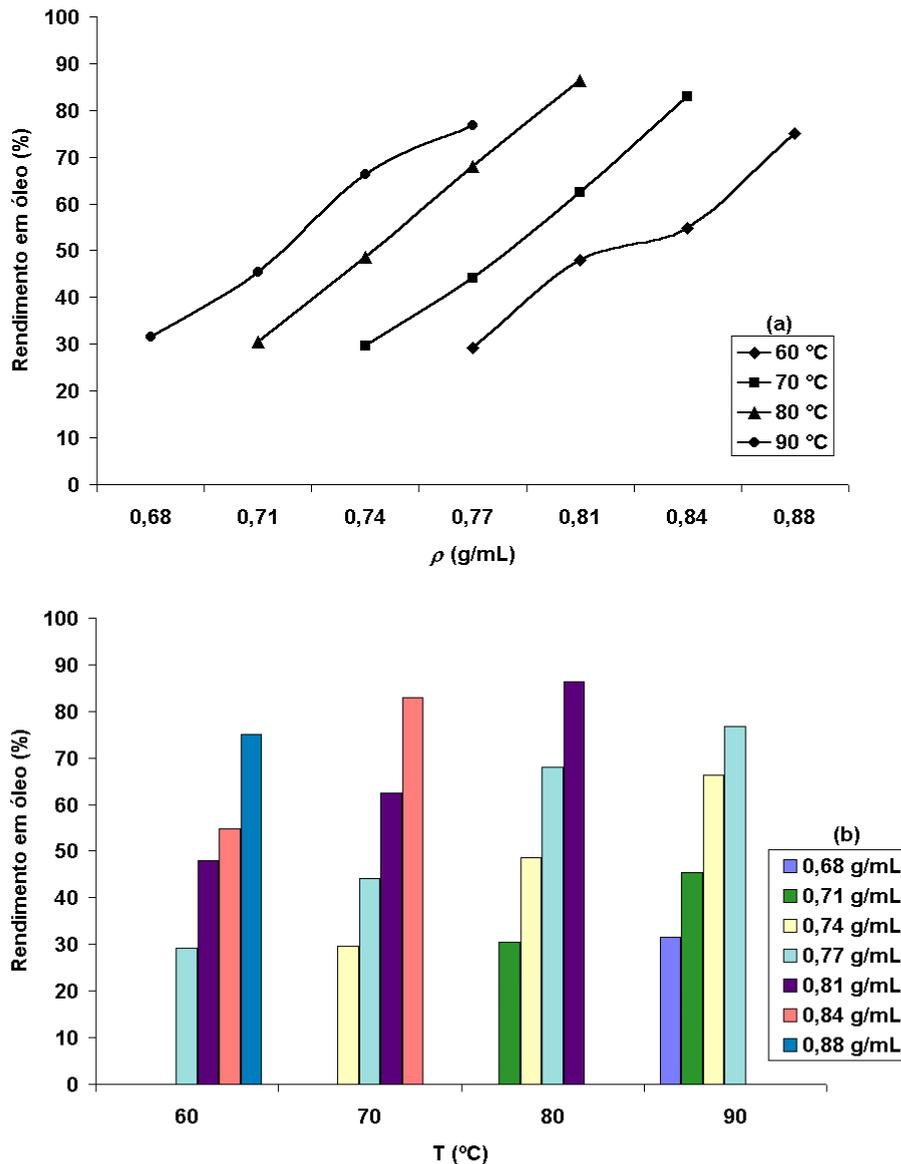


Figura 3 – Rendimento em óleo em relação à massa de café submetida à extração em função da densidade do CO₂ (a) e da temperatura de extração (b) (FCO₂ = 1,5 mL/min; T_{EE} = 5 min; T_{ED} = 20 min).

Segundo GE et al. (2002), a variação da temperatura de extração pode influenciar tanto o comportamento do extrato quanto do fluido supercrítico. O aumento da temperatura melhora o coeficiente de difusão das moléculas do extrato, mas reduz sua solubilidade no fluido supercrítico, pela redução da sua densidade. Observou-se neste trabalho, que para uma mesma temperatura, o aumento da densidade elevou gradualmente o rendimento em óleo, para valores entre 70 % e 90 %. Similarmente, para uma mesma densidade, a

elevação da temperatura de extração aumentou o rendimento em óleo substancialmente, mesmo que de forma diferenciada.

De acordo com BOWARDT e HAWTHORNE (1995), geralmente, a solubilidade máxima de um soluto é observada na maior densidade do fluido. Por esta razão, os maiores rendimentos em óleo foram obtidos na maior densidade em cada temperatura de extração.

A relação entre a quantidade de óleo extraída e o consumo de CO₂ é uma forma de avaliar a eficiência do processo de extração. Observa-se pela Tabela 5, que a solubilidade do óleo no CO₂ aumentou, a medida em que a densidade foi elevada dentro de cada temperatura de extração.

Tabela 5 – Relação entre a quantidade de óleo extraída e o consumo de CO₂

| T (°C) | P (bar) | Densidade do CO₂ (g/mL) | Solubilidade do óleo no CO₂* (mg/g) |
|-------------------|--------------------|---|---|
| 60 | 235 | 0,77 | 0,320 |
| 60 | 275 | 0,81 | 0,527 |
| 60 | 314 | 0,84 | 0,600 |
| 60 | 380 | 0,88 | 0,822 |
| 70 | 253 | 0,74 | 0,325 |
| 70 | 280 | 0,77 | 0,484 |
| 70 | 327 | 0,81 | 0,684 |
| 70 | 371 | 0,84 | 0,908 |
| 80 | 268 | 0,71 | 0,335 |
| 80 | 294 | 0,74 | 0,533 |
| 80 | 327 | 0,77 | 0,745 |
| 80 | 379 | 0,81 | 0,947 |
| 90 | 280 | 0,68 | 0,347 |
| 90 | 306 | 0,71 | 0,498 |
| 90 | 337 | 0,74 | 0,726 |
| 90 | 373 | 0,77 | 0,842 |

A menor eficiência foi observada na extração à 60 °C e 0,77 g/mL, e a maior, a 80 °C e 0,81 g/mL, condições que apresentaram, respectivamente, o menor e o maior rendimento em óleo. Como o tempo de extração e o fluxo de CO₂ não foram alterados durante o processo, a massa de CO₂ consumida em

cada extração, também foi mantida constante. Por esta razão, a extração com maior rendimento é também a mais eficiente em termos de consumo de CO₂.

Se considerada a densidade de 0,77 g/mL, única que se repete em todas as temperaturas de extração, observa-se que para cada incremento de 1 °C na temperatura de extração, a solubilidade do óleo no CO₂ aumentou 0,017 mg/g CO₂. Se for considerado o aumento da densidade em todas as temperaturas, em média, a solubilidade do óleo no CO₂ aumentou 5,5 mg/g CO₂ para cada incremento de 1 g/mL na densidade, ou 0,055 mg/g CO₂ para cada 0,01 g/mL. É óbvio que em números absolutos, o aumento da densidade parece ser mais importante para o aumento do rendimento, do que a temperatura. Entretanto, estes valores somente podem ser úteis se for realizada a análise de custos do processo de extração.

A relação entre a quantidade de óleo extraída e a massa de CO₂ consumida foi também utilizada para verificar a influência da redução da massa de café submetida a extração e do fluxo de CO₂, em relação ao estudo preliminar (Item 1.3.3). Foram compilados na Tabela 6, os resultados obtidos em iguais condições de temperatura de extração e densidade do CO₂ do estudo preliminar (Tabela 3) e do atual (Tabela 5). Observa-se que com a diminuição do fluxo do CO₂ e do tamanho da amostra, o processo tornou-se mais eficiente, mesmo com a elevação da temperatura do coletor.

Tabela 6 – Otimização do processo de extração em relação ao tamanho da amostra e ao fluxo de extração.

| T (°C) | P (bar) | ρ (g/mL) | Solubilidade do óleo no CO ₂ (mg/g) | |
|--------|---------|----------|--|---------------|
| | | | Estudo preliminar* | Experimento** |
| 60 | 380 | 0,88 | 0,761 | 0,822 |
| 70 | 371 | 0,84 | 0,768 | 0,908 |
| 80 | 379 | 0,81 | 0,802 | 0,947 |
| 90 | 373 | 0,77 | 0,794 | 0,842 |

* Fluxo = 2,0 mL/min; massa de café submetida à extração = 300 mg.

** Fluxo = 1,5 mL/min; massa de café submetida à extração = 200 mg.

1.3.4.1. Efeito da pressão - comportamento retrógrado

A variação da pressão e da temperatura de extração afetam a solubilidade de qualquer substância no CO₂. Devido à variação diferenciada da densidade, observada em torno do ponto crítico e em altas pressões reduzidas (FRIEDRICH et al., 1982; RIZVI et al., 1986a), as isotermas representadas em um gráfico de pressão x solubilidade, podem cruzar em determinado ponto, como demonstra a Figura 4.

Este fenômeno é conhecido como comportamento retrógrado (MOHAMED, 1997), ou condensação retrógrada (DEL VALLE e AGUILERA, 1999), e demonstra o efeito diferenciado da temperatura e da pressão de extração na solubilidade de diferentes substâncias nos fluidos supercríticos.

A solubilidade do óleo no CO₂ tendeu a aumentar com o aumento da pressão em todas as isotermas e entre aproximadamente 310 bar e 320 bar, ocorre a sua intersecção. Esta pressão é chamada de pressão de transformação, e a intersecção, conhecida como ponto de transformação (GE et al., 2002).

Abaixo do ponto de transformação, a solubilidade do óleo diminuiu a medida em que a temperatura aumentou. Ao contrário, a pressões acima do ponto de transformação, o aumento da temperatura contribuiu para o aumento da solubilidade do óleo no CO₂.

De acordo com LANG e WAI (2001), a solubilidade é o fator determinante na eficiência da extração de uma substância, a qual segundo MODEY et al. (1996), é controlada por dois fatores, a volatilidade da substância, que é função da temperatura de extração, e o poder solvente do fluido, dado pela densidade.

Desta forma, a solubilidade do óleo é dependente principalmente, da pressão de vapor dos triglicerídios que o compõem e da densidade do CO₂ (GE et al., 2002). A pressões abaixo do ponto de transformação, a compressibilidade do CO₂ é alta, e, por isso, a medida em que a temperatura aumenta, a densidade do CO₂ diminui consideravelmente, reduzindo rapidamente o seu poder solvente. Se por um lado ocorre um incremento na

volatilidade dos triglicerídios e no coeficiente de difusão, com o aumento da temperatura, o efeito da redução da densidade é mais pronunciado, e o resultado é a diminuição da solubilidade do óleo.

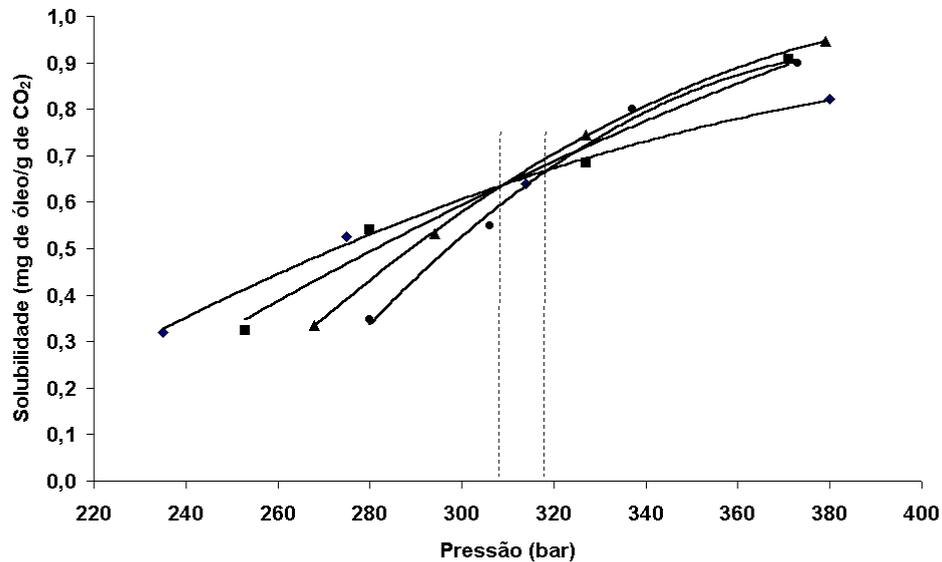


Figura 4 – Solubilidade do óleo de café no CO₂-SC, em função da pressão (◆ = 60 °C; ■ = 70 °C; ▲ = 80 °C; ● = 90 °C).

Por outro lado, nas pressões acima do ponto de transformação, o aumento da temperatura eleva a solubilidade do óleo no CO₂. Nesta faixa de pressão, a densidade do CO₂ é alta, mas a sua compressibilidade é pequena (DEL VALE e AGUILERA, 1997). Mesmo que o aumento da temperatura diminua o poder solvente do CO₂, o seu efeito na pressão de vapor, no coeficiente de difusão e conseqüentemente na transferência de massa, é muito maior (GE et al., 2002), razão pela qual, acima do ponto de transformação, incrementos de temperatura de extração aumentam a solubilidade do óleo, e conseqüentemente, a sua concentração.

Na prática, especialmente em aplicações industriais, extrações próximas à pressão de transformação são preferíveis uma vez que nesta condição, a eficiência do processo é pouco influenciada pela variação da temperatura, o que é desejável em relação ao consumo de energia (GE et al., 2002). Adicionalmente, neste ponto, a extração de materiais que contenham

substâncias termossensíveis, como o óleo de café torrado, por exemplo (BERTHOLET, 1987), é favorecida, sem comprometimento do rendimento.

1.3.5. Etapa 1 – Teor de diterpenos em função da densidade e da temperatura de extração

Como os diterpenos foram determinados no óleo, o procedimento para a otimização do seu teor em função da temperatura de extração e da densidade do CO₂ foi idêntico ao do item 1.3.4, ou seja, para cada temperatura e densidade selecionadas, foram mantidos constantes, o fluxo de CO₂ (1,5 mL/min); a quantidade de amostra (200 mg); o tempo de extração estática (5 min); o tempo de extração dinâmica (20 min); a temperatura do restritor (70 °C) e do coletor (35 °C) e a granulometria do café (0,297 mm a 0,350mm).

Cabe lembrar que ao contrário da extração do óleo de café verde (Capítulo 2), na qual o objetivo foi extrair a maior quantidade de diterpenos possível, no café torrado objetivou-se reduzir o teor de diterpenos no óleo, dadas as razões já citadas.

Os rendimentos em cafestol e de caveol obtidos para cada condição de extração em relação ao óleo extraído com hexano, estão representados na Figura 5.

A tendência na extração dos diterpenos foi inversa àquela apresentada para o óleo, ou seja, incrementos de temperatura e de densidade diminuíram gradativamente a quantidade de diterpenos extraída, comportamento oposto àquele apresentado pelo óleo. Por esta razão, os três menores rendimentos tanto para o cafestol quanto para o caveol foram observados nas extrações a 70 °C e 0,84 g/mL; 80 °C e 0,81 g/mL; e 90 °C e 0,77 g/mL (Tabela 7), exatamente as mesmas condições que proporcionaram os maiores rendimentos em óleo (Figura 3).

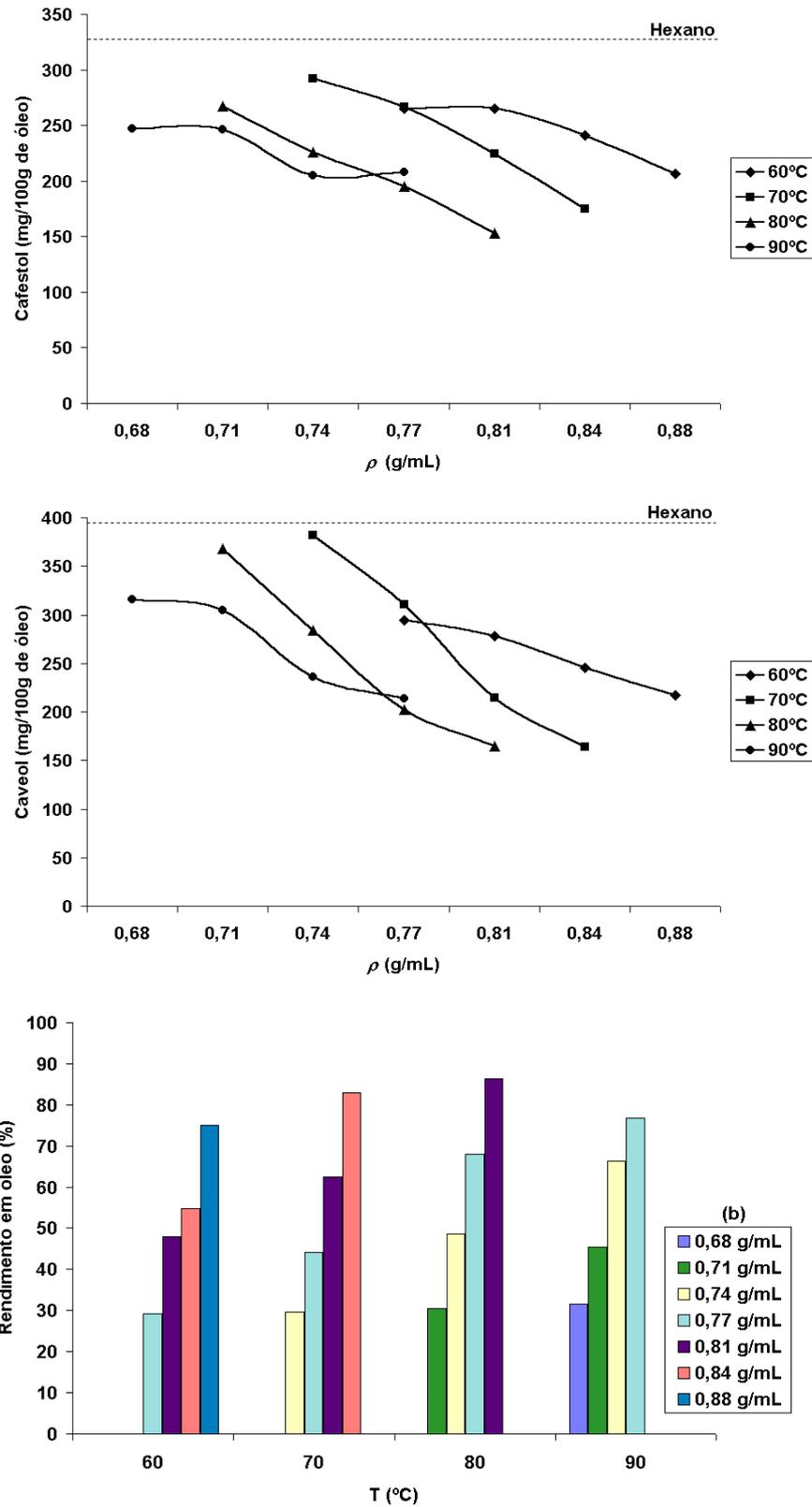


Figura 5 – Massa de cafestol (a) e de cineol (b) extraídas e rendimento em diterpenos totais (c) em função da densidade do CO₂ e da temperatura de extração.

Tabela 7 – Rendimento em cafestol e caveol no óleo de café para as três condições de extração que apresentaram os menores teores de diterpenos totais.

| Condição de extração | Rendimento (%) | | |
|----------------------|----------------|--------|-------------------|
| | Cafestol | Caveol | Diterpenos totais |
| 70 °C e 0,84 g/mL | 53,2 | 41,1 | 46,6 |
| 80 °C e 0,81 g/mL | 46,7 | 41,5 | 43,8 |
| 90 °C e 0,77 g/mL | 63,3 | 53,8 | 58,1 |

O comportamento inverso demonstrado pelo teor de diterpenos e o rendimento em óleo pode ser mais bem compreendido quando é avaliada a quantidade de diterpenos extraída em relação a massa de café submetida à extração (Figura 6). Observou-se uma tendência no aumento do teor de diterpenos em todas as temperaturas de extração, a medida em que a densidade do CO₂ foi aumentada.

Contudo, este comportamento não é linear. A medida em que a densidade do CO₂ aumenta, ocorre uma queda considerável na taxa de extração dos dois diterpenos em todas as isotermas, exceto para o cafestol na extração a 90 °C, na qual a queda é bastante sutil.

Comparando-se as isotermas da Figura 6 com aquelas obtidas para o rendimento em óleo, na Figura 3, observa-se claramente que o aumento do rendimento, não foi acompanhado pelo aumento do teor de diterpenos, razão pela qual, a medida em que o rendimento em óleo aumentou, o seu teor de diterpenos diminuiu consideravelmente.

CHRASTIL (1982), observou que a solubilidade dos triglicerídios no CO₂-SC é consideravelmente maior que a do cafestol para condições iguais de temperatura e pressão. Esta solubilidade pode ser comparada aos valores de concentração do óleo e de diterpenos no CO₂ obtidas em nosso trabalho (Figuras 3 e 6, respectivamente), os quais apresentam valores na faixa de mg/g de CO₂ e µg/g de CO₂, respectivamente.

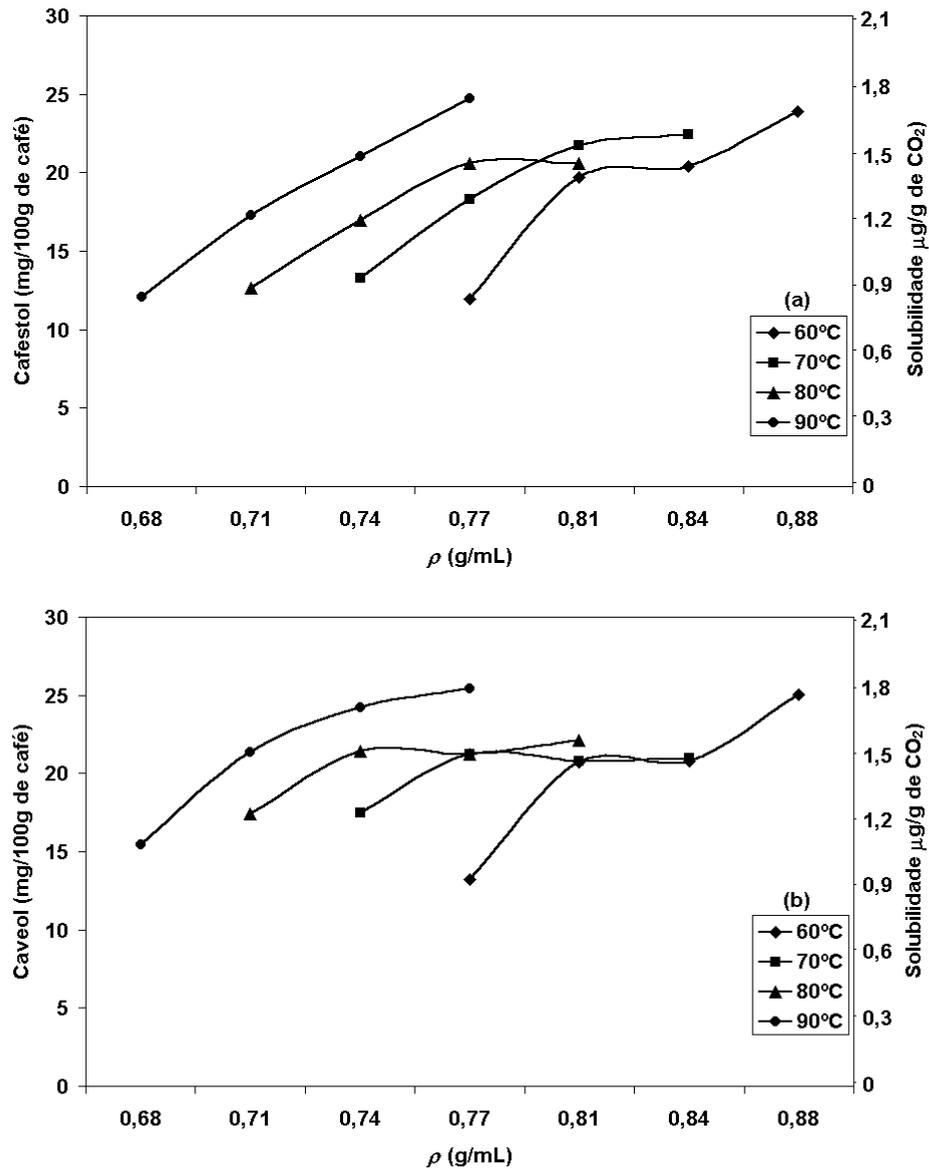


Figura 6 – Massa de cafestol (a) e de caveol (b) extraídas, em relação à massa de café submetida à extração e sua solubilidade no CO₂, em função da densidade do CO₂ e da temperatura de extração.

Quando são plotados os resultados encontrados por Chrastil para o cafestol e para os triglicerídios em um gráfico de pressão versus solubilidade, a inclinação das isotermas apresentadas pelo cafestol é consideravelmente menor que aquelas apresentadas pelos triglicerídios (Figura 7). Isto significa que para uma mesma temperatura, a medida em que a densidade aumenta, a solubilidade dos triglicerídios tem um incremento proporcionalmente maior que o do cafestol.

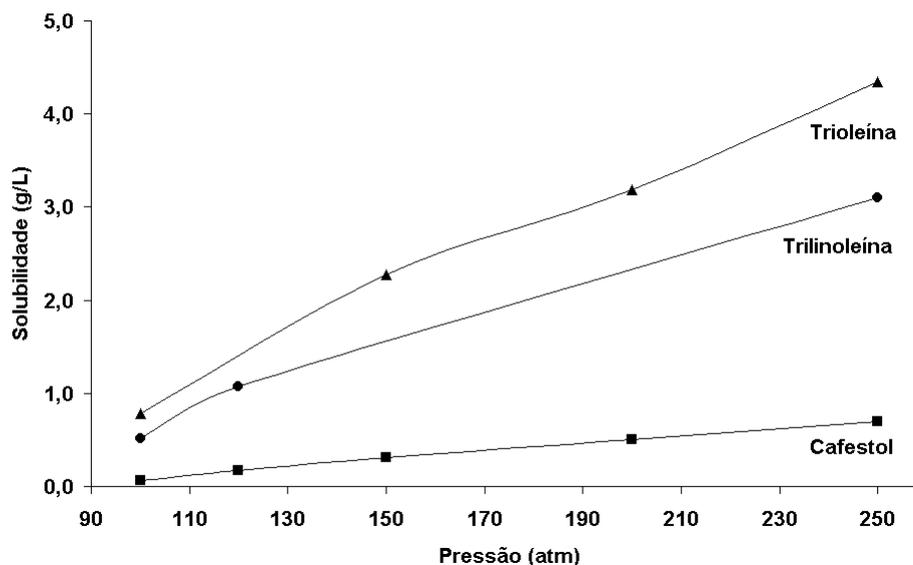


Figura 7 – Solubilidade do cafestol e dos triglicerídios trioleína e trilinoleína à 40 °C em função da pressão (adaptado de CHRASTIL, 1982).

Extrapolando-se estes resultados também para o caveol, pode-se concluir que a relação entre o teor de material insaponificável e o rendimento em óleo, observada por FOLSTAR (1989), e em nosso trabalho, se deve principalmente, à variação diferenciada na solubilidade dos diterpenos e dos triglicerídios à medida em que as condições de extração são modificadas.

1.3.6. Etapa 2 – Rendimento em óleo e teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática; fluxo de CO₂; massa de café submetida à extração; granulometria do café; e tempo de extração dinâmica.

Para prosseguir com a otimização do processo, três condições de extração que satisfizeram os objetivos do trabalho, ou seja, extrair a maior quantidade de óleo com o menor teor de diterpenos possível, foram escolhidas.

Os valores apresentados na Tabela 8 correspondem a reduções no teor de diterpenos em relação ao óleo obtido por solvente, de 53,4 %, 56,2 % e 41,9 % para as extrações a 70 °C, 80 °C e 90 °C, respectivamente. Apesar de a literatura atribuir a cada diterpeno, diferente potencial hipercolesterolêmico (POST et al., 1997), pode-se inferir que provavelmente, o óleo obtido nessas condições tem aproximadamente metade do potencial hipercolesterolêmico apresentado pelo óleo extraído por hexano.

Tabela 9 – Tratamentos que proporcionaram os maiores rendimentos em óleo e respectivos teores de diterpenos.

| Temp (°C) | ρ (g/mL) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g de óleo) | Caveol | Rendimento médio* (%) |
|-----------|---------------|------------------------|----------------------------|--------|-----------------------|
| 90 | 0,77 | 76,8 | 208,1 | 213,8 | 58,1 |
| 80 | 0,81 | 86,4 | 153,4 | 165,0 | 43,8 |
| 70 | 0,84 | 82,9 | 174,8 | 163,5 | 46,6 |

* em relação aos dos dois diterpenos.

1.3.6.1. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração estática (T_{EE})

Vários métodos de extração com fluídos supercríticos empregam a combinação do modo de extração estática e do modo de extração dinâmica (PORTER, 1997). De acordo com KNIPE et al. (1993), a utilização do tempo de extração estática deve ser considerada quando se deseja melhorar a penetrabilidade do fluído na matriz, ou nos casos em que se utilizam modificadores. Neste trabalho as extrações foram efetuadas sem tempo de extração estática e com 2 min e 5 min de extração estática.

As Figuras 8a e 8b, demonstram que a quantidade de óleo extraída foi diretamente proporcional ao aumento do tempo de extração estática, comportamento contrário àquele observado para o teor de diterpenos.

Estes resultados indicam claramente que tanto em relação ao rendimento em óleo quanto ao seu teor de diterpenos, a utilização da extração estática foi importante. De acordo com GE et al. (2002), matrizes com diâmetros de partícula muito finas, podem promover uma compactação do material submetido à extração, dificultando a extração dos compostos de interesse. Por esta razão provavelmente, a granulometria do café utilizada tenha dificultado a penetração do fluído na matriz, e por isso, o uso da extração estática tenha surtido efeito. É claro que esta constatação somente poderia ser confirmada se fossem testadas outras granulometrias, entretanto, os resultados obtidos sugerem este efeito.

A diferença média entre a não utilização da extração estática e a sua utilização por 5 min, para as três condições de extração, foi de 23,9 % no rendimento em óleo e de 31,5 % e 49,7 % no teor de cafestol e de caveol,

respectivamente. A diferença foi mais evidente quando o tempo de extração estática foi elevado de 2 min para 5 min (Figura 8b).

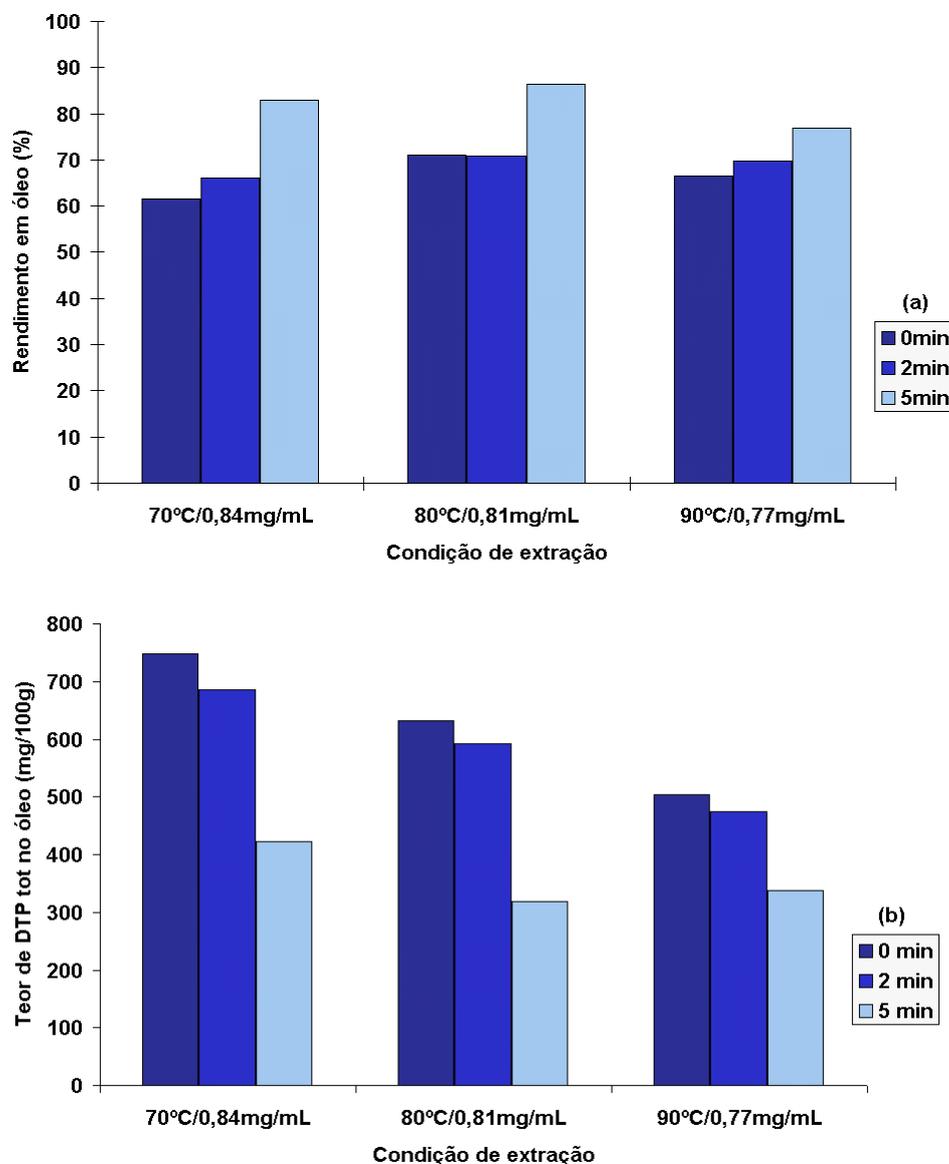


Figura 8 – Rendimento em óleo e teor de diterpenos totais no óleo de café em função do tempo de extração estático.

Por estas razões, o tempo estático de 5 min foi mantido e utilizado nas etapas subsequentes.

1.3.6.2. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com a massa de café submetida à extração (M_{SE})

Verificado o comportamento do tempo de extração estática foi testada a massa de café submetida à extração (Tabela 10). Isto foi importante pois permitiu observar a sua relação com a massa de CO_2 utilizada.

Como a massa de CO_2 poderia estar sendo insuficiente para a completa extração do óleo e dos diterpenos decidiu-se diminuir a quantidade de café no extrator para 100 mg e 150 mg, com o que a quantidade de óleo e de diterpenos disponíveis para extração seriam menores e o rendimento poderia aumentar, conseqüentemente.

Tabela 10 – Rendimento do óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com a massa de café submetida à extração, para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | M_{SE} (g) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| 70 °C e 0,84g/mL | 100 | 99,88 | 133,4 | 174,3 |
| | 150 | 88,63 | 149,1 | 179,1 |
| | 200 | 82,89 | 208,1 | 213,8 |
| 80 °C e 0,81g/mL | 100 | 98,56 | 115,0 | 129,8 |
| | 150 | 90,84 | 121,0 | 140,7 |
| | 200 | 86,44 | 153,4 | 165,0 |
| 90 °C e 0,77g/mL | 100 | 89,96 | 146,6 | 150,5 |
| | 150 | 84,22 | 149,2 | 162,2 |
| | 200 | 76,82 | 174,8 | 163,5 |

* T_{EE} = 5 min; FCO_2 = 1,5 mL/min; G_C = 0,297 mm a 0,35 mm; T_{ED} = 20 min.

Os resultados observados demonstraram claramente que a redução na quantidade de café aumentou o rendimento em óleo em todas as condições de extração, com conseqüente redução no teor de diterpenos. O aumento médio no rendimento em óleo foi de 2,18 %, enquanto a redução no teor de diterpenos foi de aproximadamente 20 %.

Mesmo tendo sido verificado um incremento no rendimento em óleo e uma redução considerável do teor de diterpenos, em valores absolutos, a quantidade de óleo obtida a cada extração (batelada) não compensaria a massa de CO_2 consumida e o tempo necessário para a extração. Ou seja, a redução da quantidade de café para 100 mg somente seria quantitativamente

compensada, se duplicasse o rendimento em óleo, o que evidentemente não aconteceria, uma vez que o teor máximo, determinado por extração com hexano, foi de 15,49 %.

Entretanto, a avaliação da quantidade de café no extrator foi útil para demonstrar que a quantidade de CO₂ utilizada era insuficiente para a completa extração do óleo, necessitando então, um aumento no fluxo do CO₂ ou no tempo de extração dinâmica.

Estas observações levaram à manutenção da quantidade de café em 200 mg nas etapas seguintes.

1.3.6.3. Rendimento do óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com o fluxo de CO₂ (FCO₂)

Devido à necessidade de aumentar a quantidade de CO₂, o seu fluxo foi elevado para 2,0 mL/min e 2,5 mL/min, procedimento que poderia levar à sobrecarga da linha de extração, como verificado no estudo preliminar (Item 1.3.3.). Todavia, a quantidade de café utilizada anteriormente era de 300 mg, ou seja, 100 mg a mais que a utilizada nesta etapa. Felizmente, este problema não voltou a ser observado com o aumento do fluxo de CO₂.

Os resultados obtidos com este procedimento estão apresentados na Tabela 11 e na Figura 9 e indicam que a quantidade de óleo extraída variou de forma diferente em cada condição de extração.

Tabela 11 – Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com o fluxo de CO₂, para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | FCO ₂ (mL/min) | Rendimento em óleo (%) (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|-------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 70 °C e 0,84 g/mL | 1,5 | 82,9 | 208,1 | 213,8 |
| | 2,0 | 87,6 | 105,3 | 136,8 |
| | 2,5 | 88,6 | 99,8 | 120,6 |
| 80 °C e 0,81 g/mL | 1,5 | 86,4 | 153,4 | 165,0 |
| | 2,0 | 90,3 | 83,5 | 107,6 |
| | 2,5 | 90,9 | 80,7 | 102,3 |
| 90 °C e 0,77 g/mL | 1,5 | 76,8 | 174,8 | 163,5 |
| | 2,0 | 80,7 | 102,3 | 116,7 |
| | 2,5 | 81,0 | 89,5 | 113,0 |

*T_{EE} = 5 min; M_{SE} = 200 mg; G_C = 0,297 mm a 0,35 mm; T_{ED} = 20 min.

O aumento do fluxo de CO₂ de 1,5 mL/min para 2,5 mL/min proporcionou um incremento médio de 4,77 % no rendimento em óleo e uma redução média de 43,4 % no seu teor de diterpenos (aproximadamente 50 % no teor de cafestol). Desta forma, a variação no fluxo de CO₂ pouco afetou o rendimento em óleo em todas as condições de extração, mas contribuiu significativamente para a redução no teor de diterpenos.

Estes resultados indicam que a transferência do óleo para o CO₂ foi praticamente independente do seu fluxo. De acordo com BJÖRKLUND et al. (1998), nestes casos, dada a alta interação entre o material a ser extraído e a matriz, o rendimento em óleo não responde à elevação do fluxo, e o uso da extração estática pode ser viável, como já confirmado.

Provavelmente, devido a menor solubilidade dos diterpenos comparada aos triglicerídios (CHRASIL, 1982), o aumento do fluxo favoreceu, relativamente, a extração de maiores quantidades de óleo que de diterpenos, o que reduziu a sua concentração. Mesmo assim, a elevada redução no teor de diterpenos não pode ser explicada somente pelo aumento do rendimento em óleo.

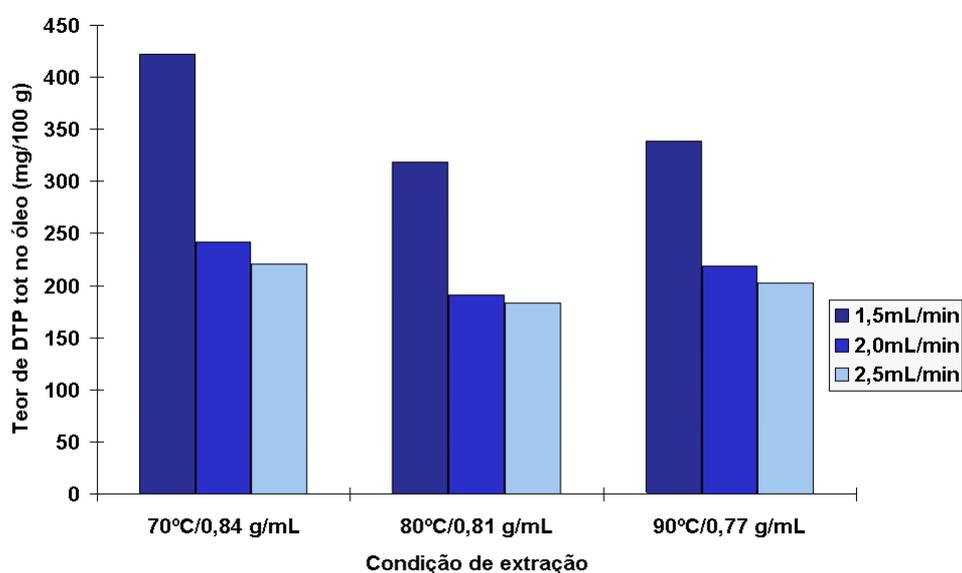


Figura 9 – Teor de diterpenos totais no óleo de acordo com o fluxo de CO₂.

Quando o teor de diterpenos é observado na Figura 9, fica claro que a sua redução foi devida quase que totalmente ao aumento do fluxo para 2,0 mL/min, e não para 2,5 mL/min.

Se considerado o rendimento em óleo, o fluxo de CO₂ deveria ser mantido em 1,5 mL/min, uma vez que o seu aumento com a elevação do fluxo, foi desprezível. Entretanto, considerada a necessidade de reduzir o teor de diterpenos, o fluxo de 2,0 mL/min foi considerada mais apropriada.

1.3.6.4. Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos de acordo com a granulometria do café (G_c)

Observado o fluxo de CO₂, foi estudada a influência da granulometria do café na quantidade de óleo extraída e na concentração dos diterpenos. É importante observar que mesmo com a mudança da granulometria, a massa de café submetida à extração foi mantida constante.

De acordo com FOLSTAR (1989), em qualquer sistema de extração de matrizes sólidas, o tamanho de suas partículas influencia no rendimento dos extratos. Particularmente, este fator é importante nos processos de extração com fluidos supercríticos, uma vez que matrizes com partículas muito grandes tendem a aumentar o tempo de extração devido ao processo tornar-se dependente da difusão da substância dentro da matriz (IBÁÑEZ et al., 1997). Ao contrário, partículas de menor tamanho favorecem a extração, uma vez que o óleo presente na sua superfície é prontamente removido pelo fluido (GOODRUM et al., 1996).

A redução no tamanho das partículas aumenta a sua área superficial, promovendo o maior rompimento das suas células e a maior exposição do material a ser extraído. Por outro lado, aumenta a resistência à penetração do fluido na matriz dado ao aumento da sua própria densidade (GE et al., 2002) o que dificulta inclusive a manutenção do fluxo do fluido (LANG e WAI, 2001). Obviamente, o aumento do tamanho das partículas provoca um efeito contrário, levando a necessidade da utilização de tempos de extração prolongados (ROY et al., 1994; LANG e WAI, 2001).

Os resultados constantes na Figura 10 indicam que os maiores rendimentos em óleo foram obtidos utilizando-se a granulometria mais fina

(0,297 mm a 0,35 mm) o que foi também observado por ROY et al. (1994) e MOLERO GÓMEZ et al (1996), na extração de óleo de sementes de tomate e de sementes de uva, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com MODEY et al. (1996), segundo os quais, para amostras sólidas, quanto menor o tamanho das partículas, melhor a taxa de extração.

Entretanto, as três condições de extração apresentaram pouca diferença em relação a quantidade de óleo extraída, que, em média, foi 3,68 % maior na fração mais fina quando comparada à fração intermediária, a qual apresentou os menores teores. Provavelmente, o comprometimento da integridade física da matriz provocado pela torração, tenha contribuído para a exposição mais ou menos uniforme do óleo, o que promoveu este comportamento.

Mesmo que a maior diferença no rendimento em óleo para as diferentes frações, tenha sido observada na extração à maior densidade (70 °C e 0,84 g/mL) é muito difícil atribuir qualquer efeito à temperatura ou à densidade de extração, uma vez que as três condições forneceram resultados muito próximos.

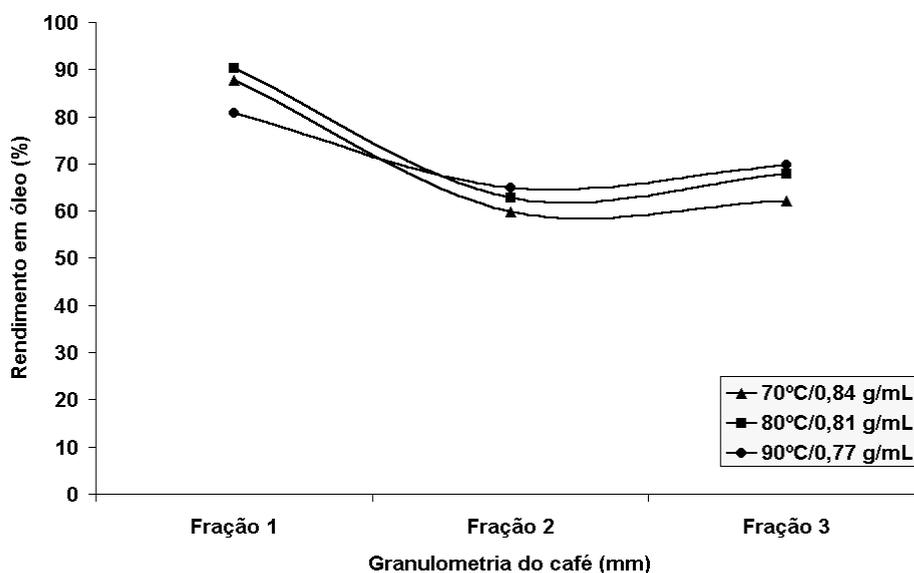


Figura 10 – Rendimento em óleo em função da granulometria do café (Fração 1 = 0,297 a 0,35 mm; Fração 2 = 0,35 a 0,42 mm; Fração 3 = 0,42 a 0,50 mm).

Quanto aos diterpenos, o comportamento é semelhante àquele observado anteriormente, ou seja, a medida em que o rendimento em óleo aumentou, o seu teor de diterpenos diminuiu (Tabela 12).

Tabela 12 – Rendimento em óleo e respectivo teor de diterpenos, de acordo com a granulometria do café, para as condições de extração selecionadas.

| Extração* | G_c (mm) | Rendimento em óleo (%) | Cafestol (mg/100g) | Caveol (mg/100g) |
|------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 70 °C e 0,84g/mL | 0,297 a 0,35 | 87,6 | 105,3 | 136,8 |
| | 0,35 a 0,42 | 59,9 | 125,7 | 167,2 |
| | 0,42 a 0,50 | 62,2 | 122,8 | 159,6 |
| 80 °C e 0,81g/mL | 0,297 a 0,35 | 90,3 | 83,5 | 107,6 |
| | 0,35 a 0,42 | 62,8 | 120,3 | 140,6 |
| | 0,42 a 0,50 | 67,8 | 108,8 | 124,2 |
| 90 °C e 0,77g/mL | 0,297 a 0,35 | 80,7 | 102,3 | 116,7 |
| | 0,35 a 0,42 | 64,8 | 117,8 | 138,7 |
| | 0,42 a 0,50 | 69,8 | 109,7 | 130,3 |

*T_{EE} = 5 min; M_{SE} = 200 mg; FCO₂ = 2,0 mL/min; T_{ED} = 20 min.

As variações no teor de diterpenos foram mais pronunciadas na extração a 80 °C, a qual apresentou uma diferença média entre a maior e a menor concentração, de 44,1 % e 30,7 %, para o cafestol e o caveol, respectivamente. As reduções observadas a 70 °C e 90 °C foram semelhantes para os dois diterpenos e da ordem de 20 %.

A menor variação na quantidade de óleo na extração a 90 °C (2,46 %) comparada à extração a 80 °C (4,26 %), poderia indicar que a diferença na redução do teor de diterpenos entre estas duas condições fosse devido somente às diferenças no rendimento em óleo. Entretanto, a extração a 70 °C apresentou uma diferença semelhante aquela a 80 °C, e quase duas vezes maior no teor de diterpenos, o que significa que outros fatores estão envolvidos na extração dos diterpenos que não somente a relação direta com o rendimento em óleo.

De qualquer forma, a granulometria mais fina (0,297 mm a 0,35 mm) apresentou os maiores rendimentos em óleo e as menores concentrações de

diterpenos, com o que ela foi mantida para o estudo do tempo de extração dinâmica.

1.3.6.5. Rendimento em óleo de acordo com o tempo de extração dinâmica (T_{ED})

Observada a taxa de extração do óleo e o teor de diterpenos, em função do tempo de extração estática, da massa de café submetida à extração, do fluxo de CO_2 , e da granulometria do café, e selecionada a melhor condição em cada uma destas variáveis, foi estudado o tempo de extração dinâmica.

Esta variável é importante porque permite não somente modificar o tempo de contato entre o fluido e a amostra, mas também verificar a relação entre a quantidade de extrato obtida e a massa de fluido utilizada na extração (FAVATTI et al., 1991; DUNFORD et al., 1998; ROZZI et al., 2002), ou seja, a eficiência do processo.

A Figura 11a apresenta o rendimento em óleo a cada 5 min de extração. Independentemente do comportamento de cada condição de extração, a variação do tempo de extração, permitiu que as três condições de temperatura e densidades selecionadas proporcionassem rendimentos em óleo semelhantes ao obtido na extração convencional com hexano. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por, CORRÊA et al. (1994), na extração de óleo de semente de maracujá, TAYLOR et al. (1993), na extração de óleo de soja, de canola e de germe de milho e FRIEDRICH et al. (1984), na extração de óleo de soja.

Primeiramente, observou-se que a extração por solvente consumiu um tempo de 16 horas, enquanto os tempos necessários para atingir o máximo rendimento com o CO_2 foram de 30 min, 25 min e 20 min, para as extrações a 90 °C e 0,77 g/mL, 80 °C e 0,81 g/mL e 70 °C e 0,84 g/mL, respectivamente, o que representa uma redução de aproximadamente 98 % no tempo necessário para a extração do óleo. Obviamente, o aumento da temperatura do solvente poderia reduzir a extração para 9 horas em aparelho de Soxhlet, tempo suficiente para promover praticamente a mesma extração em óleo, todavia, a diferença ainda seria maior que 90 %.

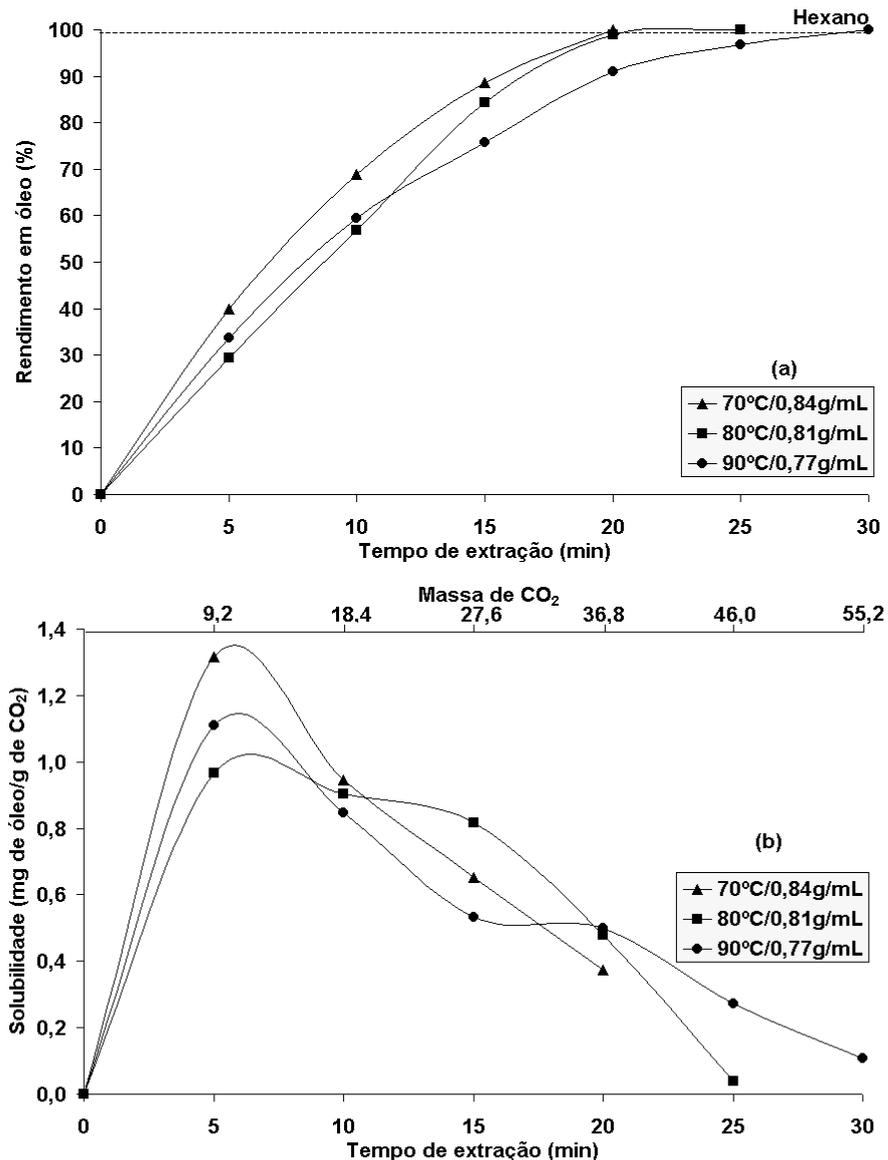


Figura 11 – Rendimento em óleo em função do tempo de extração dinâmica (a); Solubilidade do óleo no CO₂ em função do tempo de extração e massa de CO₂ consumida (b).

Estes resultados estão de acordo com a observação de DEL VALLE e AGUILERA (1999), em que a extração por fluidos supercríticos é geralmente mais rápida que a extração convencional por solventes devido à sua alta difusividade e baixa viscosidade. MOLERO GÓMEZ et al. (1996), obtiveram uma redução de 85 % no tempo gasto para a extração de óleo de sementes de uva (20 h para a extração com Soxhlet e 3 h para a extração com CO₂- SC).

Na extração do óleo de café pelo CO₂-SC, as curvas obtidas em cada condição em função do tempo de extração dinâmica (Figura 11a), demonstraram que as diferentes temperaturas e densidades de extração proporcionaram efeitos muito próximos. Provavelmente, este comportamento seja devido ao comprometimento da integridade física da matriz, provocado pela torração, o que contribuiu para a exposição mais ou menos uniforme do óleo à extração pelo CO₂-SC.

As três condições de extração seguem um comportamento padrão, ou seja, um aumento linear na fase inicial, e um decréscimo no final com a redução da taxa de extração (CHAO et al., 1993; CORRÊA et al. 1994; GE et al., 2002). De acordo com ROY et al. (1994), a rápida extração inicial do óleo ocorre devido ao rompimento das paredes das células que o contém, o que o torna mais acessível. Entretanto, a medida em que ocorre a sua remoção, a maior retenção do óleo presente dentro da estrutura da matriz, diminui a taxa de extração (LANG e WAI, 2001).

De uma forma geral, verificou-se que quanto menor a temperatura de extração e maior a densidade do CO₂, maior a taxa de extração do óleo. Com isso, a extração a 70 °C e 0,84 g/mL, consumiu um tempo menor que as outras condições para atingir o mesmo rendimento. Portanto, o incremento da taxa de extração e a conseqüente redução do tempo podem ser atribuídos ao efeito do aumento da densidade e conseqüentemente do poder de solvatação do CO₂ (CORRÊA et al., 1994; MARKOM et al., 2001).

Entretanto, a observação das curvas denota que a redução da taxa de extração não foi muito acentuada, indicando que a maior parte do óleo presente na matriz estava prontamente disponível para a extração. De acordo com LANG e WAI (2001), a difusão de um soluto para fora da matriz pode ser afetada por três fatores: (1) a ocupação dos sítios da matriz pelas moléculas do fluido de extração, a qual poder reduzir a afinidade da matriz pelo soluto; (2) a dissolução do soluto no fluido, que está diretamente relacionada à densidade do fluido; (3) aos efeitos da temperatura, os quais podem influenciar a volatilidade do soluto, particularmente àqueles com alto ponto de ebulição.

Neste trabalho, é possível concluir que a remoção do óleo foi governada pela sua dissolução no CO₂, e que por isso, a maior taxa de extração se deu na maior densidade do fluido e não na extração à maior temperatura.

A avaliação do comportamento das curvas de extração é importante uma vez que em determinados casos, a extração completa de determinada substância requer um tempo muito elevado, não sendo viável economicamente (LANG e WAI, 2001).

Contudo, mesmo que o menor tempo de extração tenha sido verificado na maior densidade, as observações anteriores não expressam o efeito da temperatura e da densidade na extração do óleo, por si só. Mesmo porque, se for desconsiderado o tempo necessário para obter o rendimento máximo, em cada condição, a variação da densidade e da temperatura não apresentou qualquer efeito, uma vez que todo o óleo foi extraído.

Quando é observada a quantidade de CO₂ consumida, no entanto, e principalmente, a relação entre a quantidade de óleo extraída e de CO₂ consumido (Figura 11b), nota-se que a extração à maior densidade foi a mais eficiente, pelo menos nos primeiros 10 min, onde dois terços do óleo já haviam sido extraídos. A partir daí, a relação entre a quantidade de CO₂ e o rendimento em óleo tende a se igualar nas diferentes condições de extração.

Independente disso, e ignorando fatores não considerados neste trabalho, como o consumo de energia para se atingir determinada densidade, a extração a 70 °C e 0,84 g/mL foi mais adequada por necessitar de menor tempo para a completa extração do óleo.

Uma alternativa para aumentar a eficiência do processo seria reduzir o fluxo de extração (PAPAMICHAIL et al., 2000) o que aumentaria a saturação do CO₂ a valores mais próximos do equilíbrio (EGGERS, 1996). Desta forma, o maior aproveitamento do CO₂ contribuiria para a redução de custos.

Por outro lado, o aumento do tempo de extração proporcionaria um efeito oposto e obviamente não seria desejável (EGGERS, 1996). Por este motivo, quando se deseja estudar o rendimento da extração de um determinado soluto, grandes volumes de fluido acabam sendo utilizados, como pode ser observado no trabalho de MOHAMED (1997), com a extração de óleo de manteiga. Nestes casos, a saturação do CO₂, obtida em estudos de

solubilidade raramente é utilizada, como observado por ZHAO et al. (1987), na extração de óleo de farelo de arroz.

1.3.6.6. Teor de diterpenos de acordo com o tempo de extração dinâmica (T_{ED})

O teor de diterpenos no óleo foi também avaliado em função do tempo de extração dinâmica. Da mesma forma que na avaliação do comportamento do óleo, foi possível observar a taxa de extração dos diterpenos nas diferentes temperaturas de extração e densidades do CO_2 .

As Figuras 12a e 12b apresentam o comportamento das curvas de extração do cafestol e do caveol, respectivamente. É importante lembrar, que os tempos de extração finais são exatamente os mesmos determinados para o óleo, já que os diterpenos foram determinados em relação a ele.

Os teores de cafestol e de caveol variaram com o tempo em todas as condições de extração. Até os 10 min, os maiores teores de diterpenos foram observados na extração a 80 °C e 0,81 g/mL. A partir daí a extração a 90 °C e 0,77 g/mL proporcionou os maiores teores, comportamento inverso aquele apresentado pelo rendimento em óleo (Figura 11a). Estes resultados estão de acordo com as observações feitas anteriormente, uma vez que os teores de diterpenos dependem da quantidade de óleo extraída.

Por esta razão, a inclinação das curvas também foi muito semelhante, analogamente as curvas de extração do óleo (Figura 11a), o que significa que a taxa de extração dos diterpenos seguiu, aproximadamente, a mesma tendência da extração do óleo.

A concentração de cafestol no óleo no tempo final de extração em cada condição foi de 122,2 mg/100 g, 111,3 mg/100 g e 94,4 mg/100 g, para as extrações a 80 °C e 0,81 g/mL, 90 °C e 0,77 g/mL e 70 °C e 0,84 g/mL, respectivamente. Para o caveol, as concentrações finais foram de 165,7 mg/100 g, 139,8 mg/100 g e 114,7 mg/100 g, respectivamente. Estes valores, correspondem a uma redução média de 67 % para o cafestol e 65 % para o caveol, em relação ao óleo extraído por hexano.

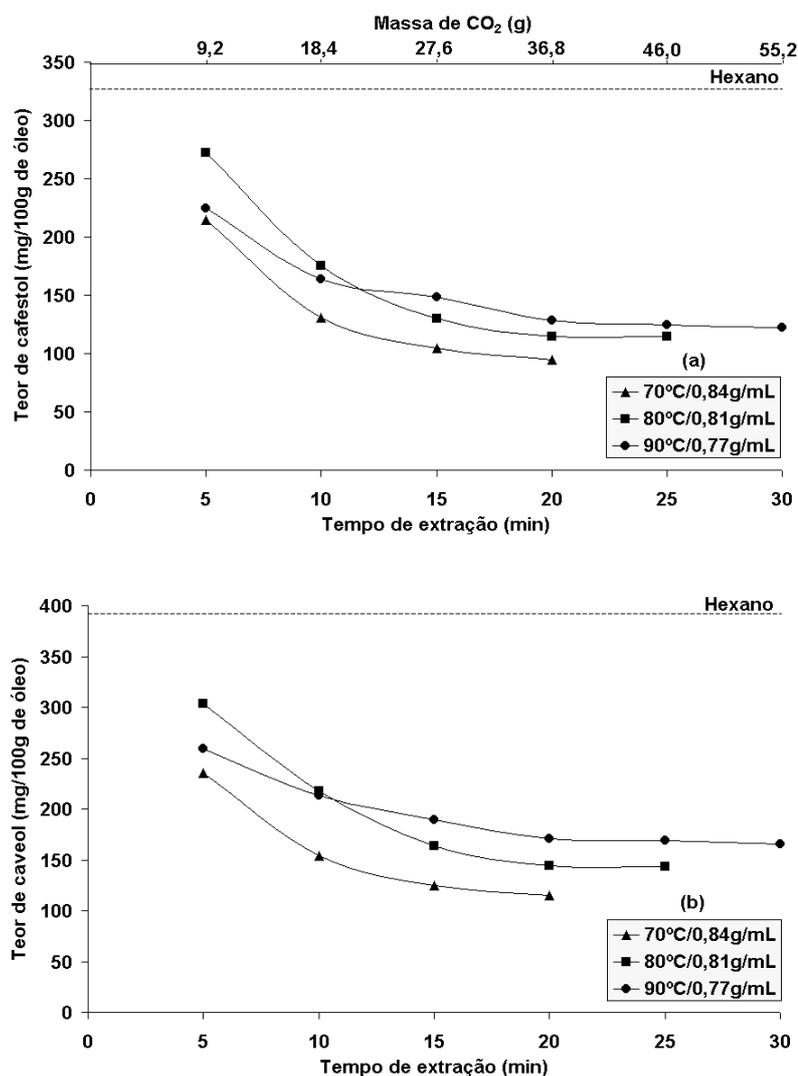


Figura 12 – Teores de cafestol (a) e de caftaric acid (b) no óleo, em função do tempo de extração dinâmica.

Estes resultados indicam que a extração a 70 °C e 0,84 g/mL foi a mais adequada para a extração da maior quantidade de óleo com o menor teor de diterpenos.

Isto significa que a extração do óleo de café torrado por CO₂ supercrítico, além de proporcionar teores bem maiores que aqueles comumente observados na extração por prensagem, proporciona os mesmos teores que a extração convencional por hexano. Entretanto, à redução do teor de diterpenos em aproximadamente 66 % em relação ao óleo extraído por hexano, aumenta a sua estabilidade e a sua qualidade sensorial e reduz substancialmente o seu poder hipercolesterolêmico.

1.4. CONCLUSÕES

Algumas variáveis importantes para a otimização do processo de extração do óleo de café torrado pelo dióxido de carbono supercrítico foram avaliadas no presente trabalho. O rendimento em óleo, o perfil de ácidos graxos e o seu teor de diterpenos, foram comparados com o óleo obtido com hexano, em equipamento de Soxhlet.

Quanto ao perfil de ácidos graxos, resultados semelhantes foram observados entre os dois métodos, sendo o ácido palmítico e o linoléico predominantes. Da mesma forma, a extração por CO₂-SC não apresentou qualquer diferença no perfil de ácidos graxos do óleo extraído em diferentes temperaturas e pressões (densidades), não demonstrando qualquer relação entre as condições de extração e a proporção relativa dos ácidos graxos.

A extração pelo CO₂-SC foi eficiente na extração do óleo e na redução do seu teor de diterpenos. A extração à temperatura de 70 °C e pressão de 371 bar (densidade de 0,84 g/mL), durante 20 min, foi suficiente para obter cem por cento de rendimento em óleo, determinado pela extração com hexano como sendo 15,49 %. As seguintes características da matéria-prima e condições de extração foram utilizadas, umidade do café: 2,40 %; granulometria do café: 0,297 mm a 0,35 mm; massa de café submetida à extração: 200 mg; fluxo do CO₂: 2,0 mL/min; tempo de extração estática: 5 min. O consumo de CO₂ foi de 36,8 g, o que representa uma relação de $8,22 \times 10^{-4}$ g de óleo por grama de CO₂.

Quanto aos diterpenos, foi observada uma relação inversa com a quantidade de óleo obtida, ou seja, quanto maior o rendimento em óleo, menor a sua concentração.

Desta forma, a extração à 70 °C e 371 bar (0,84 g/mL) foi também a mais eficiente, na redução do teor de diterpenos presentes no óleo. Os teores de cafestol e de caveol foram de 94,4 mg/100 g e 114,7 mg/100 g, respectivamente. Estes valores, representam uma redução de 71,3 % e 71,2 %, dos teores determinados no óleo obtido por solvente, respectivamente.

Isto significa que a extração do óleo de café torrado pelo CO₂ supercrítico é viável tecnicamente, pois além de propiciar rendimentos

semelhantes àqueles proporcionados pela extração com hexano, promoveu a redução do seu teor de diterpenos em aproximadamente 71 %, aumentando significativamente a sua estabilidade, e reduzindo o seu poder hipercolesterolêmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, R. H., THORGEIRSSON, U. P., SUGIMURA, T. Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. *Arch. Toxicol. Suppl.*, v. 18, p. 303-318. 1996.
- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. INP Consultoria & Comércio. Ed. Argos Comunicação. São Paulo. 2002.
- AL KANHALL, M. A. Lipid analysis of *Coffea arabica* (Linn) beans and their possible hypercholesterolemic effects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 48, p. 135-139, 1997.
- ALEXANDER, W. S., BRUSEWITZ, G. H., MANESS, N. O. Pecan oil recovery and composition as affected by temperature, pressure, and supercritical CO₂ flow rate. *Journal of Food Science*, v. 62, p. 762-766. 1997.
- ALVAREZ, A. M. R., RODRIGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y aceites*, v. 51, p. 74-96. 2000.
- ANDERSEN, A. Director of Cosmetic Ingredient Review. E-mail: andersena@cir-safety.org, 2000.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Maryland: Ed. Patricia Cunnif. 1997.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Ref. 8 n° 15.033. Maryland: Ed. Patricia Cunnif. 1997.
- ARO, A., KOSTIAINEN, E., HUTTUNEN, J. K., SEPPALA, E., VAPAATALO, H. Effects of coffee and tea on lipoproteins and prostanoids. *Atherosclerosis*, v. 57, p. 123-128. 1985.
- ARO, A., TUOMILEHTO, J., UUSITALO, U., PIETINEN, P. Boiled coffee increases serum low density lipoprotein concentrations. *Metabolism*, v. 36, p. 1027-1030. 1987.
- BAECHLER, R., HIRSBRUNNER, P. Process for degrading diterpenes of coffee grounds for animal. United States Patent n°. 5,897,907, US Patent & Trademark Office, 1999.
- BAK, A. A. A., GROBEE, D. E. The effect on serum cholesterol levels of coffee brewed by filtering or boiling. *New England Journal of Medicine*, v. 321, p. 1432-1437, 1989.
- BERTHOLET, R. Preparation of a mixture of cafestol and kahweol. United States Patent n°. 4,748,258. US Patent & Trademark Office, 1988.

BERTHOLET, R. Preparation of cafestol. United States Patent nº. 4,692,534, US Patent & Trademark Office, 1987.

BHASKAR, A. R., RIZVI, S. S. H., SHERBON, J. W. Anhydrous milk fat fractionation with continuous countercurrent supercritical carbon dioxide. *J. Food Science*, v. 58, p. 748-752. 1993

BJÖRKLUND, E., JÄREMO, M., MATHIASSEN, L., JÖNSSON, J. A., KARLSSON, L. Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction. *Analytica Chimica Acta*, v.368, p. 117-128. 1998.

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

BOWARDT, S., HAWTORNE, S. B. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 703, p. 549-571. 1995.

BRANNA, T. Diretor da Revista Happi. E-mail: tomb@rodpub.com. (Informação pessoal), 2000.

BRAVI, M., BUBBICO, R., MANNA, F., VERDONE, N. Process optimization in sunflower oil extraction by supercritical CO₂. *Chemical Engineering Science*, v. 57, p. 2753-2764. 2002.

BRENNECKE, J. F. Molecular trees for green chemistry. *Nature*, v. 389, p. 333-334. 1997.

BRIMMER, J. Verfahren zum extrahieren von aromabestandteile enthaltendem kaffeeöl. *Deutsches Patentamt*, DE 43 35 321 C2, 1996.

BURR, M. L., LIMB, E. S., SWEETNAM, P. M., FEHILY, A. M., AMARAH, L., HUTCHINGS, A. Instant coffee and cholesterol: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 49, p. 779-784. 1995.

CALLE VELEZ, H. Aceites del café. *Cenicafé*, v. 11, p. 251-258, 1960.

CAMPO RESEARCH. Coffee oil, novel function ingredients for cosmetic formulations. Disponível em <<http://www.campo-research.com/campo/products/coffee2.html>>. Acesso em: 15 de maio de 2000.

CAVIN, C., HOLZÄUSER, D., CONSTABLE, A., HUGGETT, A. C., SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 1369-1375. 1998.

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

CHAO, R. R., MULVANEY, S. J., HUANG, H. Effects of extraction and fractionation pressures on supercritical extraction of cholesterol from beef tallow. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 70, p. 139-143. 1993.

CHEN, H., SCHWARTZ, S. J., SPANOS, G. Fractionation of butter oil by supercritical carbon dioxide. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 2659-2669. 1992.

CHRASTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *J. Phys. Chem.*, v. 86, p. 3016-3021. 1982.

CIA. IGUAÇÚ DE CAFÉ SOLÚVEL. High quality products: Coffee oil. Disponível em: <<http://www.iguacu.com.br/prod/inoleo.htm>>. Acesso em: 22 de julho de 2000.

CONNOCK, A & E. Coffee oil. Documento interno. Hampshire, England. 1999. 9 p.

CORRÊA, N. C. F., MEIRELES, M. A. A., FRANÇA, L. F., ARAÚJO, M. E. Extração de óleo da semente de maracujá (*Passiflora edulis*) com CO₂ supercrítico. *Ciênc. e Tecnol. Aliment.* V. 14 (supl), p. 29- 37. 1994.

CYGNAROWICZ-PROVOST, M. Design and economic analysis of supercritical fluid extraction processes. In.: KING, J. W., LIST, G. R. *Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry*. AOCS Press. Champaign. 1996.

DAVENE. Disponível em: <<http://www.davene.com.br>>. Acesso em: 14 de outubro de 2002.

DEGEN, .G, NEWMAN, H. The major metabolite of aflatoxina B₁ in the rat is a glutathione conjugate. *Chemical and Biological interaction*, v. 22, 239-255. 1978.

DEL VALLE, J. M., AGUILERA, J. M. Revisión: Extracción con CO₂ a alta presión. *Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos*. *Food Sci. Tech. Int.*, v. 5, p. 1-24. 1999.

DUNFORD, N. T., GOTO, M., TEMELLI, F. Modeling of oil extraction with supercritical CO₂ from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) as different moisture contents. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 13, p. 303-309. 1998.

EGGERS, R. Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products. In.: KING, J. W., LIST, G. R. *Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry*. AOCS Press. Champaign. 1996.

ESPARZA, A. M. G. Café y colesterol. *Alimentaria*, n. 295, p. 111-115, 1998.

ESQUÍVEL, M. M., BANDARRA, N. M., FONTAN, I., BERNARDO-GIL, M. G., BATISTA, I., NUNES, M. L., EMPIS, J. A. Supercritical carbon dioxide extraction of sardine *Sardina pilchardus* oil. *Lebensm.-Wiss. U-Technol.*, v. 30, p. 715-720. 1997.

FATTORI, M., BULLEY, N. R., MEISEN, A. Carbon dioxide extraction of canola seed: oil solubility and effect of seed treatment. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 65, p. 968-974, 1988.

FAVATI, F., KING, J. W., MAZZANTI, M. Supercritical carbon dioxide extraction of evening primrose oil. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 68, p. 422-427. 1991.

FILIPPI, R. P. de. CO₂ as a solvent: application to fats, oils and other materials. *Chemistry and Industry*, junho, p. 390-394. 1982.

FLAMENT, I., KELLER, U., WÜNSCHE, L. Use of semi-preparative supercritical chromatography for the separation and isolation of flavor and food constituents. In.: RIZVI, S. S. H. *Supercritical fluid processing of food and biomaterials*. Blackie Academic & Professional. Glasgow. 1994.

FOLHA DE SÃO PAULO. Indústria usa óleo de café verde para a fabricação de cosméticos. *Seção Agrofolha*. Edição 25.318. 28 de julho de 1998.

FOLSTAR, P. Lipids. In.: CLARKE, R. J., MACRAE, R. *Coffee*, volume I: *Chemistry*. Elsevier Applied Science: London, 1989.

FORDE, O. H., KUNSTEN, S. F., ARNESEN, E., THELLE, D. S. The Tromso heart study: coffee consumption and serum lipid concentration in men with hypercholesterolemia, a randomized intervention study. *British Medical Journal*, v. 290, p. 893-895. 1985.

FRANÇA, L. F., REBER, G., MEIRELES, M. A. A., MACHADO, N. T., BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 14, p. 247-256, 1999.

FRANÇA, L. F.; MEIRELLES, A. A. Extraction of oil from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, p. 384-388, 1997.

FRIEDRICH, J. P., LIST, G. R., HEAKIN, A. J. Petroleum-free extraction of oil from soybeans. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 59, p. 288-292. 1982.

GALLAGHER, E., WIENKERS, L., STAPLETON, P., KUNZE, K., EATON, D. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed

cytochromes P450IA2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxina B1. *Cancer research*, v. 54, p. 445-600. 1994.

GE, Y., YAN, H., HUI, B., NI, Y., WANG, S., CAI, T. Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 685-689. 2002.

GÓMEZ, A. M., LÓPEZ, C. P., DE LA OSSA, E. M. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal*, v. 61, p. 227-231. 1996.

GOODRUM, J. W., KILGO, M. K., SANTERRE, C. R. Oilseed solubility and extraction modeling. In.: KING, J. W., LIST, G. R. *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*. AOCS Press. Champaign. 1996.

GOPALAKRISHNAN, N. Carbon dioxide extraction of coffee beans. *Indian coffee*, v. 54, p. 7-9, 1990.

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

GRUBBEN, J. M., BOERS, G. H., BLOM, H. J., BROEKHUIZEN, R., JONG, R., VAN RIJL, L., RUIJTER, E., SWINKELS, D. W., NUGENGAST, F. M., KATAN, M. B. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 71, p. 480-484. 2000.

HAMELL, M., SIMS, R. J., FELDMAN, J. R. Stabilization of purified coffee oil. United States Patent n°. 4,156,031, US Patent & Trademark Office, 1979.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory practice*, v. 22, p. 475-476. 1973.

HASEGAWA, R., OGISO, T., IMAIDA, K., SHIRAI, T., ITO, N. Analysis of the potential carcinogenicity of coffee and its related compounds in a medium-term liver bioassay of rats. *Food Chemical and Toxicology*, v. 33, p. 15-20. 1995.

HECKERS, H., GOBEL, U., KLEPPEL, U. End of the coffee mystery: diterpene alcohols raises serum cholesterol low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels. *Journal of Internal Medicine*, v. 235, p. 192-193. 1994.

HISBRUNNER, P., BERTHOLET, R. Saponification treatment of spent coffee grounds. United States Patent n°. 4,293,581, US Patent & Trademark Office, 1981.

HUBER, W. W., McDaniel, L. P., KADERLIK, K. R., TEITEL, C. H., LANG, N. P., KADLUBAR, F. F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-

phenylimidazol[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutation Research*, v. 376, p. 115-122. 1997.

HUBER, W. W., SCHARF, G., ROSSMANITH, W., PRUSTOMERSKY, S., GRASL-KRAUPP, B., PETER, B., TURESKY, R. J., SCHULTE-HERMANN, R. S. The coffee components kahweol and cafestol induce γ -glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs in rat. *Arch. Toxicol.*, v. 75, p. 685-694. 2002.

IBÁÑEZ, E., LÓPEZ-SEBASTIÁN, S., RAMOS, E., TABERA, J., REGLERO, G. Analysis of highly volatile components of foods by off-line SFE/GC. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 3940-3943. 1997.

JASOVSKY, G. A., JACQUETT, H. W., DE CEGLIE, G. J. United States Patent n°. 4,551,344, US Patent & Trademark Office, 1985.

KATZ, S. N. e KEARNEY, D. T. United States Patent n°. 4,556,575, US Patent & Trademark Office, 1985.

KERROLA, K. Literature review: isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. *Food Rev. Int.*, v. 11, p. 547-573. 1995.

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

KING, J. W., MOHAMED, A., TAYLOR, S. L., MEBRAHTU, T., PAUL, P. Supercritical fluid extraction of *Vernonia galamensis* seeds. *Industrial Crops and Products*, v. 14, p. 241-249. 2001.

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

KOCH, P., PARCHET, J. M. Treatment of coffee oil. United States Patent n°. 5,372,831, US Patent & Trademark Office, 1994.

LAM, L. K. T., SPARNINS, V. L., WATTENBERG, L. W. Effects of derivatives of kahweol and cafestol on the activity of glutathione-S-transferase in mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 30, p. 1399-1403. 1987.

LAM, L. K. T., SPARNINS, V. L., WATTENBERG, L. W. Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferases activity in the mouse. *Cancer Research*, v. 42, p. 1193-1198. 1982.

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

LERCKER, G., CABONI, M. F., BERTACCO, G., TURCHETTO, E., LUCCI, A., BORTOLOMEAZZI, R., FREGA, N., BOCCI, F. La frazione lipídica del café. Nota 1: Influenze della torrefazione e della decaffeinizzazione. *Industrie Alimentari*, v. 35, p. 1057-1062, 1996a.

LERCKER, G., CABONI, M. F., BERTACCO, G., TURCHETTO, E., LUCCI, A., BORTOLOMEAZZI, R., PAGANI, E., FREGA, N., BOCCI, F. La frazione lipídica del café. Nota 2: Su alcuni parametri di qualificazione. *Industrie Alimentari*, v. 35, p. 1186-1193, 1996b.

LÓPEZ-FONTAL, E. M., CASTAÑO-CASTRILÓN, J. J. Extracción de aceite a partir de subproductos de la trilla de café pergamino. *Cenicafé*, v. 50, p. 66-77, 1999.

LYNCH, A. M., KNIZE, M. G., BOOBIS, A. R., GOODERHAM, N. J., DAVIES, D. S., MURRAY, S. Intra and interindividual variability in systemic exposure in humans to 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, carcinogens present in cooked beef. *Cancer Research*, v. 52, p. 6216-6223. 1992.

MAHESHWARI, P., NIKOLAV, Z. L., WHITE, T. M., HARTEL, R. Solubility of fatty acids in supercritical carbon dioxide. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 69, p. 1069-1076, 1992.

MANESS, N.O., CHRZ, D., PIERCE, T., BRUSEWITZ, G. H. Quantitative Extraction of pecan oil from small samples with supercritical carbon dioxide. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 72, p. 665-669. 1995.

MARKOM, M., SINGH, H., HASAN, M. Supercritical CO₂ fractionation of crude palm oil. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 20, p. 45-53. 2001.

MAZZAFERA, P., SOAVE, D., ZULLO, M. A. T., GUERREIRO FILHO, O. Oil content of green beans from some coffee species. *Bragantia*, v. 57, p. 45-48, 1998.

McHUGH, M. A. Supercritical Fluid Extraction. In.: HENRY, G. S., RAO, M. A. *Biotechnology and Food Process Engineering*. IFT Basic Symposium Series. Marcel Dekker Inc. New York. 1990.

McHUGH, M. A., KRUKONIS, V. J. *Supercritical Fluid Extraction: principles and Practice*. 2 ed. Butterworth Heinemann: Boston. 1994.

MILLER, E. G., FORMBY, W. A., RIVERA-HIDALGO, F., WRIGHT, J. M. Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by green coffee beans. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 65, p. 745-749. 1988.

MILLER, E. G., GONZALES-SANDERS, A. P., COUVILLON, A. M., WRIGHT, J. M., HASEGAWA, S., LAM, L. K. T., SUNAHARA, G. I. Inhibition of oral carcinogenesis by green coffee beans and limonoid glucosides. In.: WANG, M.

T., OSAWA, T., HO, C. T., ROSEN, R. T. Food phytochemicals for cancer prevention I. Fruits and vegetables. ACS Symposium Series 546. ACS: Washington, DC. 1994.

MILLER, E. G., McWHORTER, K., RIVERA-HIDALGO, F., WRIGHT, J. M., HISBRUNNER, P., SUNAHARA, G. I. Kahweol and cafestol: Inhibitors of hamster buccal pouch carcinogenesis. *Nutr. Cancer*, v. 15, p. 41-46. 1991.

MISHRA, V. K., TEMELLI, F., OORAIKUL, B. Supercritical CO₂ extraction of oil from a seaweed, *Palmaria palmata*. In.: RIZVI, S. S. H. Supercritical fluid processing of food and biomaterials. Blackie Academic & Professional. Glasgow. 1994.

MODEY, W. K., MULHOLLAND, D. A., RAYNOR, M. W. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*, v. 7, p. 1-15, 1996.

MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 14, p. 344-353, 1997.

MOLERO GÓMEZ, A., LÓPEZ, C. P., DE LA OSSA, E. M. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal*, v. 61, p. 227-231. 1996.

MONTCILLIAC. Disponível em: <<http://www.perso.wanadoo.fr/montcilliac.com/html>>. Acesso em: 23 de março de 2002.

MORALES, M. T., BERRY, A. J., McINTYRE, P. S., APARICIO, R. Tentative analysis of virgin olive oil aroma by supercritical fluid extraction – high-resolution gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 819, p. 267-275. 1998.

MURATORE, G., LUPO, M. C. C., FIORENZA, F., ASMUNDO, C. N. La frazione lipídica del café in relazione al processo di tostatura. *Industrie Alimentari*, v. 37, p. 161-164, 1998.

MYIAKE, Y., KONO, S., NISHIWAKI, M., HAMADA, H., NISHIKAWA, H., KOGA, H., OGAWA, S. relationship of coffee consumption with serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *AEP*, v. 9, p. 121-126. 1999.

NACKUNSTZ, B., MAIER, H. G. Diterpenoide im kaffee. *Z Lebensm Unters Forsch*, v. 184, p. 494-499. 1987.

NATURE'S FLAVORS. Disponível em: <<http://www.naturesflavors.com/coffee.oils.html>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2002.

NIGAM, S., GHOSH, S. Aflatoxin, its metabolism and carcinogenesis – a historical review. *Journal of Toxicology*, v. 13, p. 179-203. 1997.

NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; VELIKOVA, R.; JHAM, G. N. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. *Food Research International*, v. 31, p. 479-486. 1998.

NILSSEN, O., FORDE, O. H. Seven-year longitudinal population study of change in gamma-GT: the Tromso study. *American Journal of Epidemiology*, v. 139, p. 787-792. 1994.

NILSSON, W. B. Supercritical fluid extraction and fractioning of fish oils. In.: KING, J. W., LIST, G. R. *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*. AOCS Press: Champaign. 1996.

PALMER, M. V., TING, S. S. T. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*, v. 52, p. 345-352. 1995.

PAPAMICHAIL, I., LOULI, V., MAGOULAS, K. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 18, p. 213-226. 2000.

PELLE, E. Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis. United States Patent n°. 5,855,897. US Patent & Trademark Office, 1999.

PERRUT, M. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 39, p. 4531-4535. 2000.

PEZZUTO, J. M., NANAKAYAKKARA, N. P., COMPADRE, C. M., SWANSON, S. M., KINGHORN, A. D., GUENTHNER, T. M., SPARNINS, V. L., LAM, L. K. Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione-S-transferase en mice. *Mutation Research*, v. 169, p. 93-103. 1986.

PINTO, M. R. G., CARVALHO, A. Observações preliminares sobre a porcentagem de óleo nas sementes de variedades e progênies selecionadas de café. *Bragantia*, v. 20, p. 579-589, 1961.

PORTER, S. R. Supercritical fluid extraction of nylon 6,6 fiber finish and oligomers. Master of Science in Chemistry. Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia. 1997.

POST, S. M.; WIT, C. M. de; PRINCEN, H. M. G. Cafestol, the cholesterol-raising factor in boiled coffee, suppresses bile acid synthesis by down regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase in rat hepatocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 7, p 3064-3070, 1997.

RAMSAY, M. E., HSU, J. T., NOVAC, R. A., TAYLOR, B. J. Processing rice bran by supercritical fluid extraction. *Food Technology*, v. 45, p. 98-104, 1991.

RATNAYAKE, W. M. N., HOLLYWOOD, R., O'GRADY, E. O., STAVRIC, B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food Chemical Toxicology*, v. 31, p. 263-269, 1993.

REVERCHON, T., TADDEO, R., DELLA PORTA, G. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 8, p. 302-309. 1995.

RIZVI, S. S. H., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A., DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. *Food Technology*, v. 40, n. 6, p. 55-65, 1986a.

RIZVI, S. S. H., DANIELS, J. A., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A., Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. *Food Technology*, v. 40, n. 7, p. 57-64. 1986b.

ROOS, B., CASLAKE, M. J., STALENHOF, A. F. H., BEDFORD, D., DEMACKER, P. N. M., KATAN, M. B., PACKARD, C. J. The coffee diterpene cafestol increases plasma triacylglycerol by increasing the production rate of large VLDL apolipoprotein B in the healthy normolipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p. 45-52. 2001.

ROOS, B., KATAN, M. B. Possible mechanisms underlying the cholesterol-raising effect of the coffee diterpene cafestol. *Current Opinion in Lipidology*, v. 10, p. 41-45, 1999.

ROSELIUS, W., VITZTHUM, O., HUBERT, P. Method of extracting coffee oil containing aroma constituents from roasted coffee. United States Patent n°. 4,328,255, US Patent & Trademark Office, 1982.

ROSEMARIN, P.C., APPLGATE, W. B., SOMES, G. W. Coffee consumption and serum lipids: a randomized crossover clinical trial. *American Journal of Medicine*, v. 88, p. 349-356. 1990.

ROY, B. C., GOTO, M., HIROSE, T., NAVARO, O., HORTACSU, O. Extraction rates of oil from tomato seeds with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Jpn.* V. 27, p. 768-772. 1994.

ROYCHOUDHURY, R. N., RATHINDRA, N. Coffee oil treatment. United States Patent n°. 4,517,120, US Patent & Trademark Office, 1985.

ROZZI, N. L., SINGH, R. K., VIERLING, R. A., WATKINS, B. A. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2638-2643. 2002.

SALDAÑA, M. D. A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R. S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO₂ supercrítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, p. 371-376, 1997.

SCHARF, G., PRUSTOMERSKY, S., HUBER, W. W. Elevation of glutathione levels by coffee components and its potential mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 500, p. 535-539. 2001.

SCHILTER, B., PERRIN, I., CAVIN, C., HUGGETT, C. Placental glutathione S-transferase (GST-P) induction as a potential mechanism for the anti-carcinogenic effect of the coffee-specific components cafestol and kahweol. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1377-2384. 1996.

SCHLECHT, K., WEHRSPANN, O. Obtention and use of coffee oil. United States Patent nº. 5,236,729, US Patent & Trademark Office, 1993.

SEDOR, F. A., SCHNEIDER, K. A., HEYDEN, S. Effect of coffee on cholesterol and apolipoproteins, corroborated by caffeine levels. *American Journal of Preventive Medical*, v. 7, p. 391-396. 1991.

SIHVONEN, M., JÄRVEPÄ, E., HIETANIEMI, V., HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 217-222. 1999.

SMITH, A. W. Introduction. In.: CLARKE, R. J., MACRAE, R. *Coffee*, volume I: Chemistry. Elsevier Applied Science: London, 1989.

SNOI INTERNATIONAL. Product information: specifications and typical properties of RBWD coffee oil. Disponível em: <<http://www.snoi.com/products/coffee.html>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2000.

STAHL, E., QUIRIN, K. W., MANGOLD, H. K. Extraction and fractionation of complex lipid mixtures with dense carbon dioxide on a micro scale. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 31, p. 319-324, 1982.

STAHL, E., SCHUTZ, E., MANGOLD, H. K. Extraction of seed oils with liquid and supercritical CO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, p. 1153-1157, 1980.

STAVRIC, B. An update on research with coffee/caffeine. *Food Chemical Toxicology*, v. 30, p. 533-555. 1992.

STENSVOLD, I., TVERDAL, A., JACOBSEN, B. K. Cohort study of coffee intake and death from coronary heart disease over 12 years. *British Medical Journal*. v. 312, p. 544-555, 1996.

STOECKLI, O. W., BERRY, D. J. Coffee aromatizing method. United States Patent nº. 4,871,564, US Patent & Trademark Office, 1989.

SUPERKO, H. R., BORTZ, W., WILLIAMS, P. T., ALBERS, J. J., WOOD, P. D. Caffeinated and decaffeinated coffee effects on plasma lipoprotein cholesterol,

apolipoproteins, and lipase activity: a controlled, randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 54, p 599-605. 1991.

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

TANAKA, K., TOKUNAGA, S., KONO, S., TOKUDOME, S., AKAMATSU, T., MORIYAMA, T., ZAKOUJI, H. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *International Journal of Epidemiology*, v. 27, p. 438-443. 1998.

TANGO, J. S., CARVALHO, A. Teor de óleo e de cafeína em variedades de café. *Bragantia*, v. 22, p. 793-798, 1963.

TAYLOR, S. L., KING, J. W., LIST, G. R. determination of oil content in oilseeds by analytical supercritical fluid extraction. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, v. 70, p. 437-439. 1993.

TEJA, A. S., ECKERT, C. A. Commentary on supercritical fluids: research and applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* V. 39, p. 4442-4444. 2000.

TEPELLI, F., CHEN, C. S., BRADDOCK, R. J. Supercritical fluid extraction in citrus processing. *Food Technology*, Chicago, v. 42, p. 145-150. 1988.

THELLE, D. S. HEYDEN, S., FODOR, J. G. Coffee and cholesterol in epidemiological and experimental studies. *Atherosclerosis*, v. 67, p. 97-103. 1987.

TISNES, P., MOULET-SCOTT, A. M. Monographies des principales plantes utilisées en cosmétologie. In.: MARTINI, M. C., SEILLER, M. Actifs & additifs en cosmétologie. *Technique & Documentation*. Ed. Lavoisier: Paris. 1992.

UHDE. High-Pressure extraction. *Boletim Técnico*. (n. d.).

URGERT, R., ESSED, N., WEG, G., KOSMEIJER-SCHUIL, T. G., KATAN, M. B. Separate effects of the coffee diterpenes cafestol and kahweol on serum lipids and liver aminotransferases. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 65, p. 519-524, 1997.

URGERT, R., VAN VLIET, T., ZOCK, P. L., KATAN, M. B. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 72, p. 1107-1110. 2000.

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

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annual Review Nutr.*, v. 17, p. 305-324. 1997.

VAN DE WOUW, M. P. M. E. W., KATAN, M. B., VIANI, R., HUGGELT, A. C., LIARDON, R., LUND-LARSEN, P. G., THELLE, D. S., AHOLA, I., ARO, A., MEYBOON, S., BEYNEN, A. C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. *Journal of Lipids Research*. V. 35, p. 721-733. 1994.

VAN DUSSELDORP, M., KATAN, J. B., DEMACHER, P. N. M. Effect of decaffeinated versus regular coffee on serum lipoproteins. *American Journal of Epidemiology*, v. 132, p. 33-40. 1990.

VAN ROOIJ, J. V., STEGEN, G., SCHOEMAKER, R. C., KROON, C., BURGGRAAF, J., HOLLAR, L., VROON, T., SMELT, A., COHEN, A. F. A placebo-controlled parallel study of the effect of two types of coffee oil on serum lipids and transaminases: identification of chemical substances involved in the cholesterol-raising effect of coffee. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, p. 1277-1283, 1995.

VARGAS-ZAPATA, A. M., SÁNCHEZ-HORMAZA, A. F., CASTAÑO-CASTRILLÓN, J. J. Microencapsulación del aceite de café. *Cenicafé*, v. 47, p. 32-41, 1996.

VEJROSTA, J., KARÁSEK, P., PLANETA, J. Analyte collection in off-line supercritical fluid extraction. *Analytical Chemistry*, v. 71, p. 905-909. 1999.

VIANI, R. Physiologically active substances. In.: CLARKE, R. J., MACRAE, R. *Coffee*, volume III: Physiology. Elsevier Applied Science: London, 1989.

WANG, H-C., CHEN, C-R., CHANG, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. *Food Chemistry*, v. 72, p. 505-509. 2001.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Research*, v. 43, suppl. 5, p. 2448s-2453s. 1983.

WATTENBERG, L. W., LAM, L. K. T. Protective effects of coffee constituents on carcinogenesis in experimental animals. In: McMahan, B., SUGIMURA, T. *Banbury Report n° 17. Coffee and Health; Symposium*. October. 1983. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 137-145.

WEI, M., MACERA, C. A., HORNING, C. A., BLAIR, S. N. The impact of changes in coffee consumption on serum cholesterol. *Journal Clin. Epidemiol.*, v. 48, p. 1189-1196. 1995.

WILDMAN, R. E. C. Classifying nutraceuticals. In.: WILDMAN, R. E. C. *Handbook of nutraceutical and functional foods*. CRC Press:Boca Raton. 2001. p. 19.

YOON, J., HAN, B. S., KANG, Y. C., KIM, K. H., JUNG, M. Y., KWON, Y. A. Purification of used frying oil by supercritical carbon dioxide extraction. *Food - Chemistry*, v. 71, p. 275-279. 2000.

ZHAO, W., SHISHIKURA, A., FUJIMOTO, K., ARAI, K., SITO, S. Fractional extraction of rice bran oil with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, v. 51, p. 1773-1777. 1987.

ZOCK, P. L., KATAN, M. B., MERKUS, M. P., VAN DUSSELDORP, M., HARRYVAN, J. L. Effect of a lipid-rich fraction from boiled coffee on serum cholesterol. *Lancet*. V. 335, p. 1235-1237. 1990.