

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Alexandre Gonçalves Doria

Novas Metodologias de Extração Verde para Aplicação em Biorrefinarias

Araraquara
2023

Alexandre Gonçalves Doria

Novas Metodologias de Extração Verde para Aplicação em Biorrefinarias

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Química

Orientador: Dr Ian Castro Gamboa
Coorientador: Dr Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2023

D696n	Doria, Alexandre Gonçalves Novas metodologias de extração verde para aplicação em biorrefinarias / Alexandre Gonçalves Doria. -- Araraquara, 2023 50 f. : il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Ian Castro Gamboa Coorientador: Alberto José Cavalheiro 1. Sustentabilidade. 2. Extração com fluido supercrítico. 3. Café. 4. Biomassa vegetal. 5. Metabólitos secundários. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Alexandre Gonçalves Doria

Novas Metodologias de Extração Verde para Aplicação em Biorrefinarias

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Química.

Araraquara, 09 de Janeiro de 2023.

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 IAN CASTRO GAMBOA
Data: 18/01/2023 12:42:44-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

Documento assinado digitalmente
 ISABEL DUARTE COUTINHO
Data: 18/01/2023 15:51:32-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa Dra. Isabel Duarte Coutinho



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao pai celestial por permitir essa experiência maravilhosa que foi desenvolver esse trabalho de conclusão de curso. Em segundo lugar agradeço imensamente o apoio de meus pais, Alexandre Pereira Doria e Sonia Maria Gonçalves Doria, que nunca permitiram que algo me faltasse ou que as adversidades da vida interrompessem essa jornada, me presentearam também com o amor e carinho necessários a cada dia. Agradeço ao meu tio Nilson Moacir Theves por ter me presenteado com o computador que utilizei durante toda a graduação, assim como deixo meus agradecimentos ao apoio de todos os familiares e em especial a minha avó Amélia Martins Penna Gonçalves que me deu incentivos sem precedentes e que sempre acreditou no meu crescimento. Deixo também agradecimentos às amizades construídas nesse caminho, em especial à Driely Lima e Paloma Regina pelas risadas, carinho e muitas horas compartilhadas na biblioteca, Flavia Reis pelo carinho, incentivo, muito estudo e por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer o NuBBE. Ao Laerte Ganéo pela ajuda recorrente com dúvidas e pela humildade de seu ser, Gustavo Poli por compartilhar muitos momentos de alegria e estudos, a Lara Gimenez por momentos de crescimento pessoal e carinho, Leonardo Colombo, Marianne Cristine e Gleice Ramos pelas risadas e momentos de muita felicidade. Agradeço também pela amizade de Angelica Sousa e Rafaela Zendron, por compartilharem comigo as etapas finais do curso e do presente trabalho, permitindo executar minhas atividades com mais leveza a medida que me proporcionaram muito divertimento e carinho. Por último, mas com toda certeza, não menos importante, agradeço ao meu Orientador Dr Alberto José Cavalheiro por ter acreditado em mim e recuperado o meu prazer interior pela química após momentos de adversidade, assim como por ter me apresentado à uma mulher incrível, Dra Isabel Duarte Coutinho, que me deu tamanha oportunidade de crescer e que transformou a tensão de um dia sério de trabalho em amizade verdadeira e em anseio de levantar todos os dias e tentar contribuir com uma ideia. Agradeço também ao Dr Luiz Antonio Dutra pela amizade e camaradagem nos recorrentes dias no laboratório.

Uma vez me disseram que quanto maior o desafio, maior a vitória. Isso se mostrou verdadeiro, minha gratidão tende ao infinito.

Obrigado, IQ - Unesp de Araraquara.

RESUMO

Um dos grandes desafios do século XXI são as chamadas mudanças climáticas. Pensando dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de novos processos e tecnologias para o setor produtivo, pautados pela inovação sustentável e valorização dos recursos naturais. Neste contexto, insere-se as chamadas biorrefinarias, modelo de produção baseado no não desperdício de matérias primas, atuando na produção de novos produtos, baseados em uma economia circular e atuando no combate ao desperdício de alimentos e na geração de produtos de maior valor agregado para a indústria brasileira e na geração de energia.

A literatura tem apresentado inúmeras soluções possíveis para a criação de técnicas de extração verdes, como a chamada Extração com fluidos supercríticos (SFE) abordado no presente trabalho, considerando suas vantagens e desafios de operação para um possível uso nas biorrefinarias de resíduos agroindustriais. Além Disso, o estudo da biomassa resultante da extração de óleo do *coffea arábica* demonstra ao leitor a oportunidade de prospecção de metabólitos secundários dessa abundante matriz, indicando que o teor de ácido clorogênico ronda os 6%, assim como 1,5% de cafeína e trigonelina, todos extraídos com soluções de água e etanol, com baixo custo energético e rendimento geral de 24,4% em massa.

Palavras-chave: Biorrefinarias; Extração com Fluidos Supercríticos; *Coffea Arábica*; Biomassa Residual, Metabólitos Secundários.

ABSTRACT

One of the great challenges of the 21st century is the so-called climate change. Thinking in this way, it is necessary to develop new processes and technologies for the productive sector, guided by sustainable innovation and appreciation of natural resources. In this context, the so-called biorefineries are inserted, a production model based on the waste of raw materials, which existed in the production of new products, resulted in a circular economy and existed in the fight against food waste and in the generation of products with greater added value for Brazilian industry and power generation. The literature has presented numerous possible solutions for the creation of green extraction techniques, such as the so-called Extraction with supercritical fluids (SFE) discussed in this work, considering its advantages and challenges of operation for a possible use in biorefineries of agro-industrial residues. In addition, the study of the biomass resulting from the extraction of *coffee arabica* oil demonstrates to the reader the opportunity to prospect for secondary metabolites of this abundant matrix, indicating that the chlorogenic acid content is around 6%, as well as 1.5% of caffeine and trigonelline, all extracted with water and ethanol solutions, with low energy cost and overall yield of 24.4% by mass.

Keywords: Biorrefieries, Supercritical Fluids Extractions, *Coffea Arabica*, Residual Biomass, Secondary Metabolites.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMED	Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento
ONU	Organização das Nações Unidas
EMPRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
PIB	Produto Interno Bruto
ITC	Instituto de Tecnologia Canavieira
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
SC CO ₂	Extração com Dióxido de Carbono em Estado Supercrítico
SWE	Extração com Água em Estado Subcrítico
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
MAE	Extração Assistida por micro-ondas
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
UV	Ultravioleta
MPLC	Cromatografia Líquida de Média Pressão

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	10
1.1 - BIORREFINARIAS	11
1.2 - BIORREFINARIAS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	12
1.3 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NÃO CONVENCIONAIS	15
1.4 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUBCRÍTICOS E SUPERCRÍTICOS	17
2 - OBJETIVOS	20
2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 - RESULTADOS	21
3.1 - DEGRADAÇÃO TÉRMICA	23
3.2 - EXTRATOS COM ELEVADA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
3.3 - USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS COMBINADOS	27
3.4 DEMONSTRAÇÃO DO POTENCIAL DA VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA RESULTANTE DA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS DE CAFÉ VERDE.	29
4 - CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS	45

1 - INTRODUÇÃO

O agravamento das mudanças climáticas tem levado a comunidade internacional a intensificar a busca por um novo arranjo na produção, economia e relações de consumo (CMED)², um que permita aos países emergentes a continuidade do desenvolvimento econômico, e a manutenção do estado de bem-estar social nos países desenvolvidos. Os esforços se concentram na busca pelo desenvolvimento sustentável, ressaltando que uma relação amistosa com o meio ambiente, isto é, o uso consciente dos recursos naturais e principalmente a preservação dos diversos biomas, passam a ser uma espécie de ativo econômico em uma economia mundial de baixo carbono. (Teixeira. I.)³¹

Segundo a Comissão Mundial do Meio Ambiente, “O desenvolvimento sustentável é o desenvolvimento que atende às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atender às suas próprias necessidades” (ONU 1987)², em outras palavras, a sustentabilidade é um conceito que vai muito além da preservação da fauna e flora, como é popularmente utilizado, abrangendo em sua totalidade, as esferas: sociais, meios de produção, economia e meio ambiente. Uma excelente ilustração deste conceito são os chamados “cinco P’s” da Sustentabilidade: Planeta, Pessoas, Prosperidade, Paz e Parcerias (Agenda 2030 de Sustentabilidade), domínios de atuação necessários para a criação da substância de um modelo de desenvolvimento sustentável.

FIGURA 01: Os Cinco P's da Sustentabilidade: Planeta, Pessoas, Prosperidade, Paz e Parcerias.



Fonte: Plataforma Agenda 2030¹

1.1 - BIORREFINARIAS

Conceber um modelo sustentável de produção, implica ainda no não desperdício dos recursos, em outras palavras, na utilização completa das matérias primas, ampliando o número de produzíveis de uma indústria, isto é, mantendo o portfólio característico da companhia, mas adicionando outros, para a utilização completa da matriz, ampliando proporcionalmente os lucros, eliminando os resíduos e muitas vezes, produzindo energia.

O conceito de biorrefinaria não é algo completamente definido, não existindo, portanto, um modelo fixo, sendo uma ideia ainda em desenvolvimento. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, “Biorrefinaria é uma instalação que integra processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia. O objetivo de uma biorrefinaria é otimizar o uso de recursos e minimizar os resíduos, maximizando os benefícios e o lucro.” (Embrapa Agroenergia)³.

A indústria petroquímica, apesar de definitivamente não ser um exemplo de sustentabilidade, é um modelo de refinaria muito eficiente e lucrativo, já que por meio

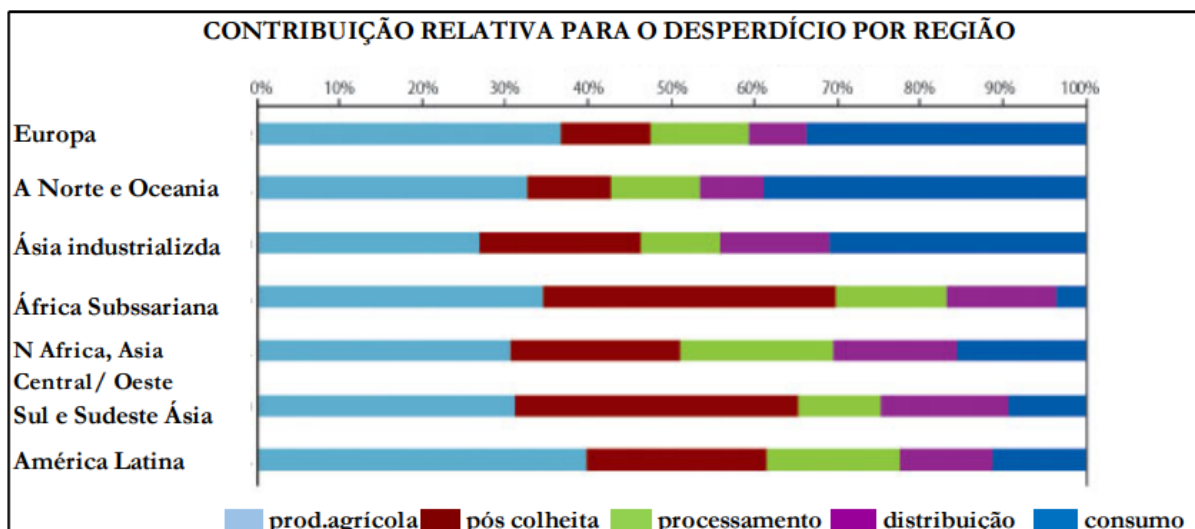
do fracionamento do petróleo bruto, produz uma série de derivados, que encontram aplicação na área de combustíveis, lubrificantes, polímeros e fertilizantes. Dessa maneira, seus resíduos são em sua quase totalidade, comercializáveis, sendo transformados em parafina, ureia, entre outros, colocando-se, portanto, como um exemplo de aproveitamento máximo da matriz, característica necessária no desenvolvimento de biorrefinarias. Outro exemplo de sucesso no aproveitamento total de matriz, é o setor sucroenergético do Brasil. Responsável por 20% do Agronegócio do país e 2% do PIB (Finguerut, Diretor do ITC), é conhecido pela produção de etanol e açúcares, mas também é um grande produtor de energia advinda da biomassa residual da cana-de-açúcar. Além disso, o modelo ainda produz fertilizantes, colocando-se como uma indústria que se torna mais eficiente a cada ano, aproximando-se, cada vez mais, das características desejáveis de um modelo sustentável de produção.

1.2 - BIORREFINARIAS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Segundo estudos de projeções demográficas, por volta de 2050 a população humana estará na casa dos 9 bilhões de pessoas (Nascimento, S.P.⁶), sendo, portanto, uma adição de ao menos 1 bilhão na população atual, crescimento que pode causar uma grande insegurança alimentar no mundo. Esse aumento populacional trará a necessidade de ampliar em cerca de 60% a produção de alimentos no mundo, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, (FAO)⁷.

Apesar dos grandes avanços na tecnologia de produção de alimentos, um montante de 20% do total produzido é desperdiçado devido a diversas ocorrências. (FAO)⁷. A figura 02 permite a visualização percentual da perda na produção de alimentos no mundo, dividido em 7 regiões, por etapa da cadeia produtiva.

FIGURA 02: Perda na produção de alimentos em termos relativos para cada etapa da cadeia produtiva.



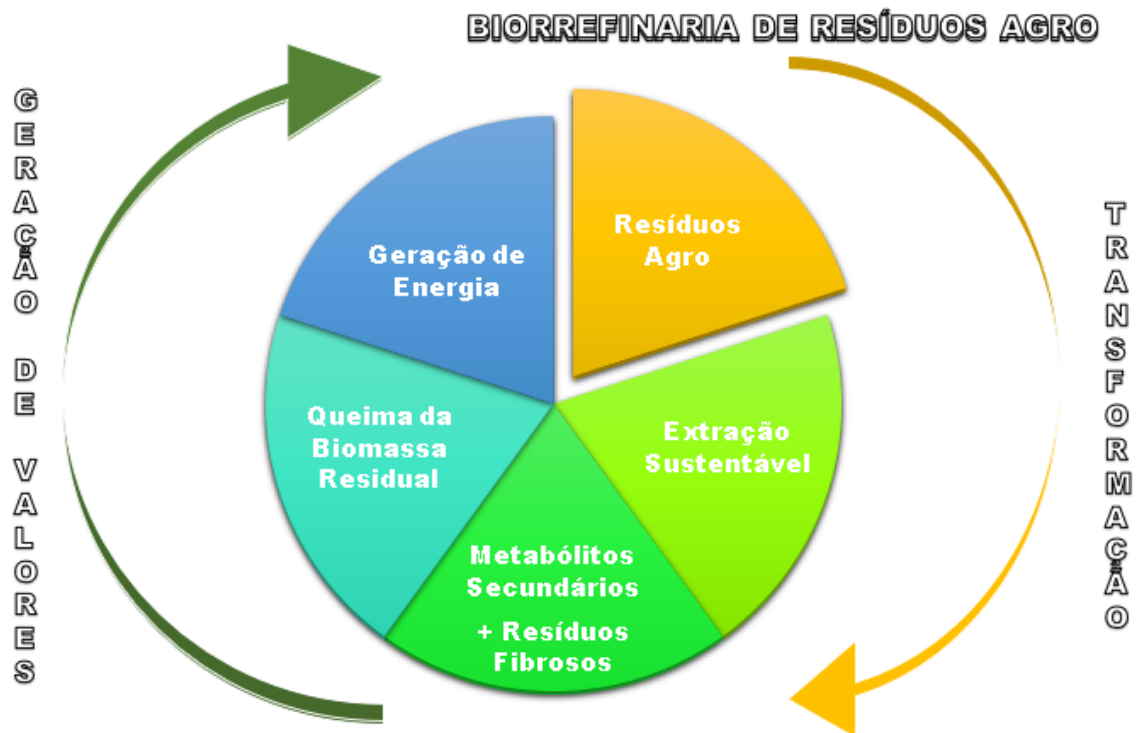
Fonte: Segurança Alimentar Nutricional, Campinas, v. 25, n.1 p 85-91, jan/ abr 2018 8

O desperdício de alimentos não é apenas um fator que pode agravar a insegurança alimentar, sendo também um responsável pela perda de uma fatia considerável dos lucros do agronegócio e da indústria.

Conceber uma biorrefinaria de produtos agroindustriais não é trivial. Apesar disso, tendo em vista o enorme desperdício (Nascimento)⁶, a fonte de matéria prima, ou seja, a matriz de extração, seria abundante e garantida, principalmente no Brasil. O Aproveitamento de cascas, talos, folhas, sementes, bagaço e outras partes de frutas e vegetais processados, permitiria a geração de um novo modelo de industrialização no país e no mundo, este modelo, cria um maior número de etapas após o processamento primário dos produtos, ou seja, a obtenção das frações alimentícias e afins, adicionando portanto posteriores processos mais sofisticados de extração que permitam a obtenção de valiosos metabólitos secundários, como compostos fenólicos e flavonoides com reconhecida atividade bioativa, que muitas vezes estão presentes como compostos majoritários nessas matrizes, permitindo ainda a queima da biomassa fibrosa residual para a produção de energia. Um esquema geral do raciocínio está descrito no esquema 01, onde metodologias de extração não convencionais podem ser adicionadas na concepção de um modelo que considera a

rentabilidade, preservação das propriedades das substâncias e os princípios da química verde e a sustentabilidade produtiva. (Anastas & Warner)⁹.

ESQUEMA 01: Economia Circular e Biorrefinarias de resíduos agroindustriais.



Fonte: Autoria Própria

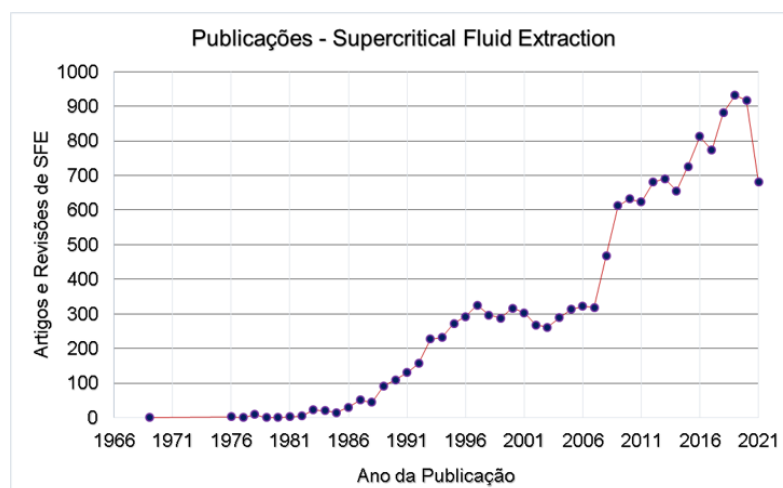
O esquema 01 ilustra como os resíduos agroindustriais que hoje são considerados lixo, são na realidade, em sua maioria, oportunidade de negócio nesse novo arranjo econômico. No caso particular brasileiro, é uma oportunidade latente para a industrialização agregada ao multilateralismo ambiental do mundo (Teixeira. A.)³¹, desenvolvimento esse que passa pelo investimento em massa em parques de biotecnologia, e afins. Tal processo permitiria uma nova geração de empregos e principalmente a valorização dos recursos naturais, já que indústrias de processamento primário teriam a oportunidade de adicionar ao seu portfólio, inúmeros produtos de maior valor agregado, ou a ocorrência de novas indústrias em um setor mais sofisticado e valorizado por uma economia de baixo carbono.

A extração de polifenóis, flavonoides, isoflavonoides, ácidos clorogênicos e outras substâncias bioativas, são de grande interesse das indústrias farmacêuticas, cosméticas, precursores de síntese química ou de aditivos, já que possuem em sua maior parte, atividade antioxidante, antimicrobiana, dentre outras funcionalidades interessantes que muitas vezes estão presentes em quantidades majoritárias nos resíduos agroindustriais, como ilustrado na tabela 01.

1.3 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NÃO CONVENCIONAIS

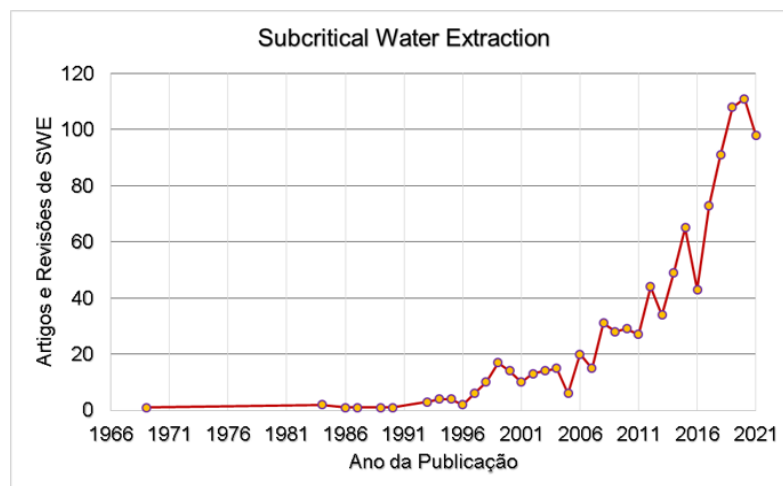
A extração convencional dos metabólitos secundários geralmente não segue os 12 princípios da química verde (Anastas & Warner)⁹. Para a criação das biorrefinarias de resíduos agroindustriais; é necessário considerar que o modelo deve promover a conversão de resíduos em produtos comercializáveis, portanto, o modelo não deve produzir novos resíduos ou consumir excessiva quantidade de energia, assim como não deve operar com matrizes ou solventes não renováveis. A literatura tem apresentado diversas técnicas não convencionais de extração para modelos de biorrefinarias (Katarzyna. et al, Durante. et al, Pilar . A. et al.)^{10 19 23}. Dentre elas, a Extração com Dióxido de Carbono Supercrítico (SC CO₂) e a Extração com Água Subcrítica (SWE), vem ganhando destaque, tendo em vista que os estudos físico-químicos das propriedades de substâncias em estado supercrítico são cada vez maiores como se pode observar nos gráficos 01 e 02.

GRÁFICO 01: Artigos e revisões com o tema (Extração com Fluido Supercrítico)



Fonte: Autoria Própria (Palavras Chave: Supercritical Fluid Extraction, SciFinder 2021).

GRÁFICO 02: Artigos e revisões com o tema (Extração com água subcrítica)

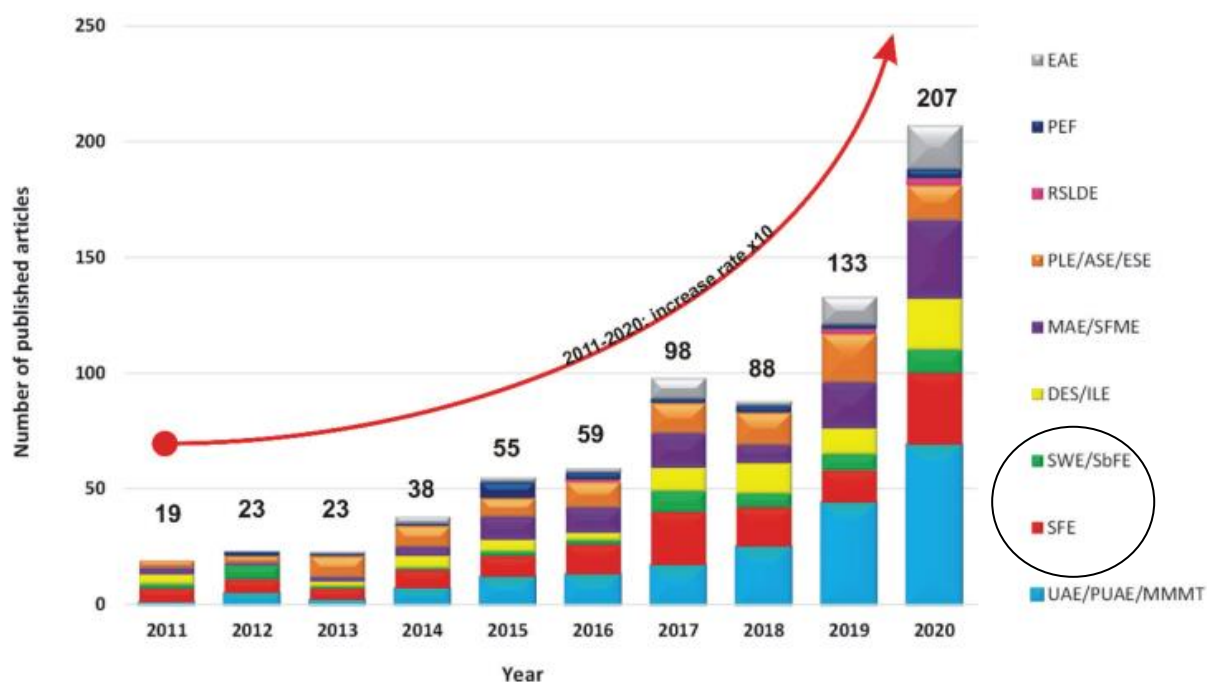


Fonte: Autoria Própria (Palavras Chave: Subcritical Water Extraction, SciFinder 2021).

Observa-se facilmente que a partir de 2006, a tecnologia de extração com fluidos subcríticos e supercríticos (SFE) ganharam destaque, com a publicação de cerca de 15000 trabalhos em SFE e 1000 destas referências em SWE, montante que não deve ser desconsiderado para possíveis aplicações em biorrefinarias.

Além das duas técnicas mencionadas, existem diversas outras que estão caminhando com destaque em número de publicações (Katarzyna. et al)¹⁰, como pode-se observar no gráfico 03, onde é apresentado uma tendência de crescimento bastante pronunciada em aplicações não convencionais de extração em biorrefinarias.

GRÁFICO 03: Número de artigos com aplicações em extração verde de resíduos agroindustriais, Scopus 30/01/2021.



Fonte: Katarzyna. G. et al. Crucial Challenges of Green extraction¹⁰

1.4 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO POR FLUIDOS SUBCRÍTICOS E SUPERCRÍTICOS

Dentre várias novas tecnologias de extração (Katarzyna. G. et al)¹⁰, a Extração com Fluidos Supercríticos ou Subcríticos (SFE), são alvo de grande número de estudos de desenvolvimento, tendo em vista suas características únicas, provenientes de substâncias em estado crítico ou bastante próximas dos parâmetros necessários para atingir essa característica. Uma substância que atinge o estado crítico, tem suas propriedades físico-químicas pronunciadamente alteradas, como a diminuição de sua viscosidade, aumentando a permeabilidade como solvente e, portanto, ampliando sua difusão na matriz. Além disso, o valor da densidade da substância em estado gasoso; passa a ser numericamente muito próximo da densidade em estado líquido, portanto há convergência das propriedades de ambas as fases, permitindo que nesse novo estado, haja a diminuição da constante dielétrica e, portanto, a diminuição da polarizabilidade, permitindo que substâncias conhecidamente mais polares como a

água, apresente características de solventes orgânicos mais apolares como acetonitrila ou DMSO por exemplo. (Chemat. F & Strube. J.)¹¹.

FIGURA 03: Temperatura que a água deve atingir para equiparar sua constante dielétrica à alguns solventes de uso comum.

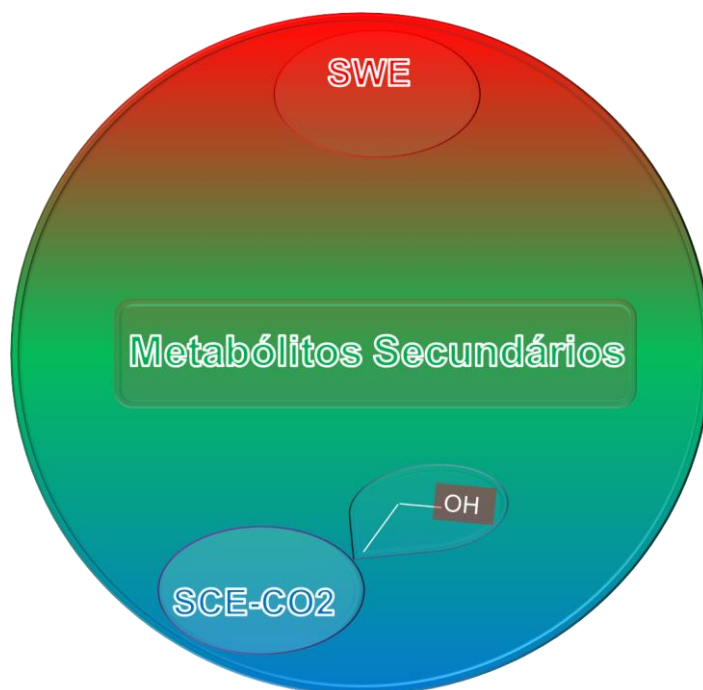
Table 7.2 Organic solvents properties, Hansen parameters, and subcritical water temperature equivalent.

Solvent	Dielectric constant ϵ	Hansen parameter δ_d (MPa ^{1/2})	Hansen parameter δ_p (MPa ^{1/2})	Hansen parameter δ_h (MPa ^{1/2})	Subcritical water temperature (°C)
DMSO	48	18.4	16.4	10.2	150
Acetonitrile	38	15.3	18.0	6.1	175
Methanol	33	14.7	12.3	22.3	200
Ethanol	24	15.8	8.8	19.4	275
Acetone	21	15.5	10.4	7.0	300
Chloroform	5	17.8	3.1	5.7	<374 T _C

Fonte: Chemat. F & Strube. J. Green Extraction of Natural Products - Theory and Practice¹¹.

Para alcançar essas propriedades, se fazem necessárias as modificações de dois parâmetros, temperatura e pressão, sendo esses os principais fatores para a regulação da força do solvente em técnicas de SFE. Notavelmente, o estudo da SFE vem crescendo de maneira mais abrupta no caso particular de dois solventes, água e dióxido de carbono. As chamadas Extrações com Água Subcrítica (SWE) e com Dióxido de Carbono em Estado Supercrítico (SC CO₂). Parte dessa atenção se deve ao preço e disponibilidade da água, baixa temperatura crítica do dióxido de carbono, além de serem amigáveis do ponto de vista ambiental, ocupacional e de uso químico como solventes, fazendo deles as substâncias mais amplamente estudadas nessa área

FIGURA 04: Polarizabilidade comparativa entre SWE e SC CO₂ e sua relação com metabólitos secundários.



Fonte: Autoria Própria.

A Figura 04 é ilustrativa na demonstração das diferenças entre as duas técnicas em destaque, sendo as cores as responsáveis por demonstrar o caráter mais polar em vermelho e apolar em azul, como convencionalmente ilustrado em modelos de substâncias moleculares e seus respectivos graus de polaridade. A SWE é um método que proporciona um ótimo rendimento de extração (Katarzyna. G. et al, Ersan. S. et al, Safranko. S. et al, Salami. A. et al.)^{10 16 24 26}, com um tempo de operação em torno de 2 horas e meia, com temperaturas mais elevadas e pressões mais baixas quando comparadas com a SC CO₂, sendo mais adequada para substâncias mais polares, como flavonoides ou polifenóis de modo geral e, portanto, menos seletiva que a segunda. Esta técnica é geralmente controlada por meio da chamada força do solvente, parâmetro essencial na extração que define o quanto uma substância vai eluir com o solvente, que para ambas as técnicas, dependem fundamentalmente da temperatura e pressão. Para o ajuste do método, a temperatura passa a ser o parâmetro principal quando se trata de SWE, já que a água só atinge seu estado crítico quando em uma temperatura de 374° C e 222 atm, sendo necessário

proporcionalmente um valor muito menor dessa temperatura quando comparado com o dióxido de carbono, que atinge o estado crítico em 31,04° C e 73 atm. Logo, o parâmetro de maior importância no caso do controle da força do solvente do método SC CO₂ é o inverso da primeira, sendo, portanto, a pressão, mas diferentemente da primeira, necessita de um cossolvente para desempenhar um bom rendimento, como o etanol, quando utilizada para extração de substâncias com grau de polaridade mais elevada. A SC CO₂ é, portanto, um método para substâncias de caráter mais apolar, como carotenoides e óleos essenciais, geralmente é um processo que leva 3 horas para se concluir, possuindo maior seletividade, em função da mistura com o cossolvente, além de sua grande vantagem de operar em temperaturas mais baixas, e portanto, mantém um menor o risco de degradação das substâncias, além de resultar em um extrato limpo de solvente na maioria dos casos, tendo em vista as propriedades intrínsecas do dióxido de carbono em condições normais de temperatura e pressão (Chemat. F & Strube. J)¹¹.

Ambos os métodos são especialmente interessantes quando o extrato deve manter suas propriedades antioxidantes ao final do processo, já que são métodos que vem demonstrando a manutenção dessas características em diversas matrizes agroindustriais como manga, brócolis, pistache e uva. (Katarzyna. G. et al, Ersan. S. et al, Martínez-Borja. M. et al, Durante. M. et al, Ferrentino. G. et al, Sánchez-Camargo. P. A. et al, Sánchez- Camargo. P. A. et al.)^{10 16 17 19 20 21 23}.

2 - OBJETIVOS

Estudar o conceito de biorrefinaria e metodologias de extração não convencionais, SWE e SC CO₂, e verificando as matrizes agroindustriais testadas, entendendo os principais desafios para uso em grande escala e demonstrando de maneira prática a extração de metabólitos secundários da biomassa residual da extração de óleos nobres do café verde.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

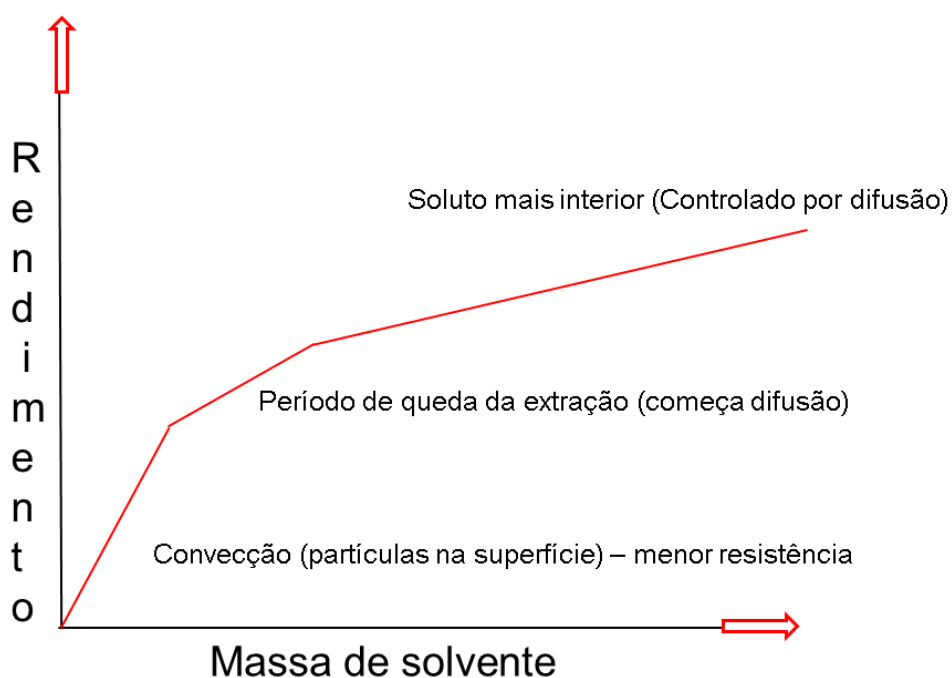
Compreender e apresentar os parâmetros mais utilizados em ambas as técnicas, equipamentos utilizados e a possibilidade da combinação dos SFE para a criação de métodos de extração para biorrefinarias.

Demonstrar a presença de metabólitos secundários de alto valor agregado na biomassa residual da extração de óleos nobres de café verde.

3 - RESULTADOS

O processo de extração de resíduos agroindustriais não se traduz em uma reta de perfil frontal, onde o eixo das ordenadas representa o rendimento de extração e o eixo das abscissas a massa de solvente utilizado, ou seja, o volume de solvente utilizado em função da extração. Na realidade, o mecanismo de extração de uma matriz vegetal passa por três inclinações diferentes, em outras palavras, três etapas, convecção, onde a resistência dos extraíveis é menor e, portanto, a extração é maior, poros superficiais, onde a extração tem uma queda pequena em função da necessidade de difusão do solvente por poros da superfície, seguida da etapa de difusão interior, última etapa, onde o período de extração é mais longo e constante, em função da necessidade de difundir o solvente nos poros mais interiores da matriz, etapa que se mantém até o esgotamento da material. O esquema 02 demonstra esse mecanismo.

Esquema 02 – Etapas dos mecanismos de extração.

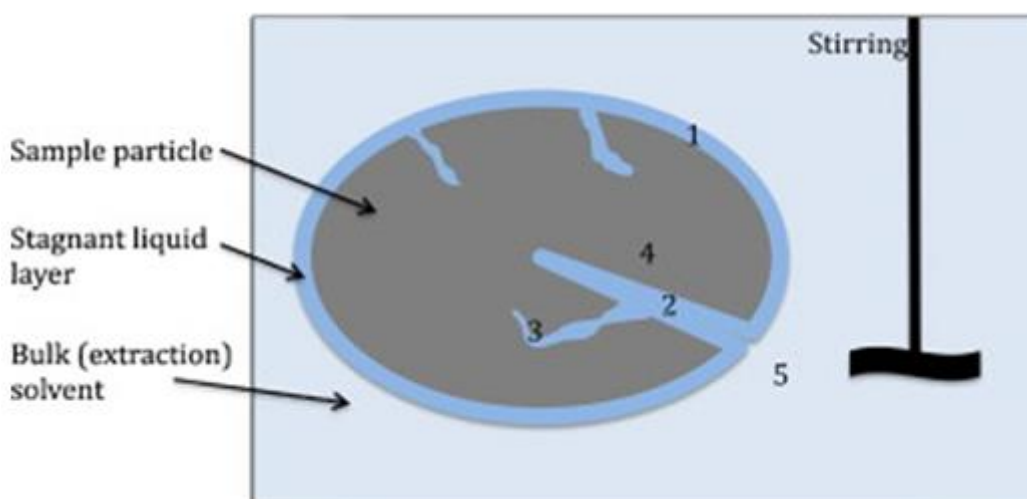


Fonte: Adaptado do livro Rostagno. M. A. and Prado. M. J. Natural Product Extraction: Principles and Applications; Cap 6, p 204.

Tal mecanismo acontece devido às paredes vegetais e seus poros, assim como pela característica química intrínseca do material, como a hidrofobia encontrada nas regiões da superfície de uma folha e o contraste com a hidrofilia em seu interior. O aumento da pressão é um dos fatores que auxilia na extração de uma substância, tendo em vista que as forças de repulsão presentes no exemplo já mencionado, podem ser superadas por forças externas, permitindo a difusibilidade do solvente com o soluto. A figura 05 é a ilustração de uma célula vegetal, onde pode-se observar os interstícios, poros e paredes que o solvente deve atravessar para ter acesso às substâncias de interesse.

FIGURA 05 - Distribuição das substâncias em uma célula vegetal.

- 1: Adsorvido na superfície da matriz
- 2: Dissolvido/adsorvido nos poros superficiais
- 3: Dissolvido/adsorvido em micro/nano poros da matriz
- 4: Quimicamente ligados à matriz
- 5: Solvente



Fonte: (Adaptado) Mustafa. A. and Turner. C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta*,

Volume 703, Issue 1, 2011³².

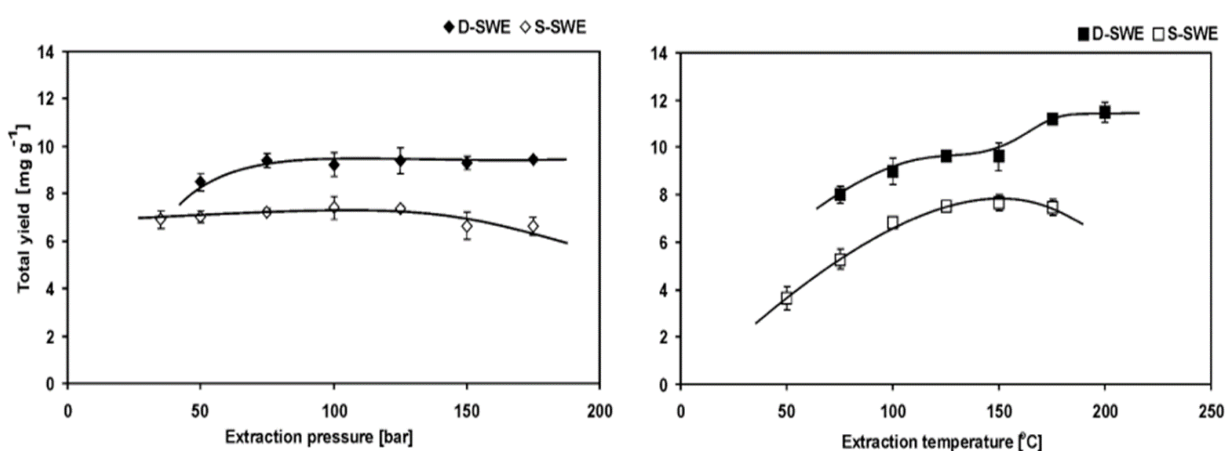
Tendo sido apresentado alguns dos mecanismos que um solvente exerce na extração de uma substância, é possível compreender melhor as vantagens da SFE em relação à questão abordada. Como os fluidos supercríticos apresentam maior difusibilidade em função das miscibilidades de propriedades dos estados líquido e gasoso, o solvente passa a ter maior acesso ao interior da matriz e consequentemente maior interação com as substâncias de interesse. Logo, o rendimento de extração é acrescido, como demonstrado por Teresa Fernández-Ponce e colaboradores¹⁴ característica essa que colabora com as demandas de sustentabilidade, tendo em vista que um meio de extração aprimorado, é também uma metodologia que consequentemente poderá reduzir os custos de operação, como energia e volume de solvente.

3.1 - DEGRADAÇÃO TÉRMICA

Um ponto muito importante a considerar em extrações que façam uso de temperaturas mais elevadas, é a possibilidade de degradação térmica das substâncias. Essa possibilidade deve ser mais considerada na metodologia de SWE, já que esse processo faz uso de temperaturas mais elevadas. Para a demonstração desses aspectos e a avaliação das condições ótimas de operação, no estudo de SWE aplicado a cascas de pistache realizado por Sevcan Erşan e colaboradores¹⁶, avaliou-se que compostos polifenólicos e flavonoides sofrem degradação significativas em temperaturas acima de 150°C, sendo, portanto, uma evidência dos desafios que a SWE pode enfrentar. Apesar disso, vale ressaltar que ambas as técnicas de SFE abordadas, possuem dois modos de operação, sendo eles o estático ou o dinâmico. A diferença entre essas operações é a forma de contato da matriz com o solvente na câmara de extração, onde no modo estático, o solvente é injetado e permanece em contato com a matriz por todo o tempo de extração. Já no modo dinâmico, temos a adição de um novo parâmetro, a vazão, logo o solvente que entra em contato com a matriz, passa a circular pela câmara sucessivas vezes e, portanto, há diferenças nos níveis de exposição ao solvente. Nesse contexto, existem diferenças nas considerações feitas envolvendo a degradação térmica. Segundo o estudo da Universidade Marie Curie-Skalodowska da Polónia¹⁵, verificou-se que o modo dinâmico proporciona uma faixa mais elevada de temperatura permitida, sem causar

com isso, a degradação térmica, como se observa na figura 06. Tal observação se deve provavelmente a maior velocidade de extração que a vazão contínua de um solvente proporciona, e consequência disso é a menor exposição à elevadas temperaturas.

FIGURA 06 - Comparação no rendimento entre SWE Dinâmico (D) e Estático (E) em função da temperatura (Figura da direita) e da Pressão (Esquerda).



Fonte: (Adaptada) Original Paper; Static and dynamic superheated water extraction of essential oil components from Thymus; Faculty of Chemistry, Maria Curie-Sklodowska University, Lublin, Poland.

Apesar da importância dessas considerações, a literatura não apresenta muitos trabalhos de SWE que utilize temperaturas acima de 120°C, já que apesar dos resultados demonstrados pela figura 06, vale ressaltar que os testes foram realizados para a extração de óleos essenciais (Maria Curie-Sklodowska University) ¹⁵, e, portanto, há variações quando comparados com flavonóides, por exemplo. Portanto, pode se caracterizar como uma limitação conhecida da SWE a não possibilidade de operação com água subcrítica em temperaturas maiores que 120°C para os fins mencionados.

As propriedades físico-químicas do dióxido de carbono não exigem elevadas temperaturas para seu uso como fluido supercrítico. Nesse contexto, a SC CO₂, é operada de forma geral em temperaturas que variam de 40 a 60°C e, portanto, é

garantido a não degradação térmica dos metabólitos secundários. Apesar disso, existe a necessidade do uso de elevadas pressões, em geral de 250 atm, mas que em muitos casos, podem chegar a 440 atm ou mais (Borja-Martinez. M. et al).¹⁷

Dessa maneira, configura-se um desafio a necessidade de operação em altas pressões (Borja-Martinez. M. et al, Lima. A. M et al, Durante. M. A. et al, Ferrentino. G. et al)^{17 18 19 20}, que eventualmente acabam por resultar em desgaste do equipamento, ou em um maior uso de energia elétrica.

3.2 - EXTRATOS COM ELEVADA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Além de um elevado rendimento de extração, as SFE geram extratos com um notável nível de atividade antioxidante (Katarzyna & Tuberoso) ¹⁰. No estudo realizado pela pesquisadora Pilar Sánchez-Camargo e colaboradores²¹, a extração de compostos fenólicos e carotenoides de cascas de manga, foi realizada com SC CO₂, em 60°C, 247 atm e 15% de etanol, com uma vazão de 6,7g/min, durante 3 horas. O trabalho também fez uso da extração assistida por micro-ondas (MAE), onde a intenção era melhorar ainda mais o rendimento, resultado esse que foi de 92,34% de compostos fenólicos e flavonoides como a mangiferina. Após a extração, verificou-se que a atividade antioxidante presente no extrato era bastante elevada, assim como elevada atividade antiproliferativa. Essa característica está presente em todos os estudos consultados, sendo verdadeiro para SWE e SC CO₂, apresentando-se como uma das características mais vantajosas desse tipo de extração, tendo em vista que na maioria dos casos o extrato possui essa atividade em níveis mais elevados se comparado com processos tradicionais de extração (Katarzyna & Tuberoso, Fernández-Ponce. et al, Lima. M. et al, Ferrentino. G. et al, Sánchez-Camargo. P. et al, Borja-Martínez. M. et al).^{10 14 18 20 21 22}. Os parâmetros e matrizes onde as técnicas foram estudadas podem ser consultados na tabela 01.

TABELA 01 – Resumo das condições gerais utilizadas nas SFE apresentadas.

Matriz	Mét Extração	Condições	Classes subs	Ref
--------	--------------	-----------	--------------	-----

Casca Tangerina	SC CO ₂	40° C cte/ 98,5 -296 atm/90min/ vazão 2 kg/h	Aromáticos/ Voláteis	24,25
	SWE modo estático	130-220° C/10,5 -18,75atm/ 5-15 min	Compostos polifenólicos	
Casca Abóbora	SWE dinâmico	12g/ 120° C/ 3h / 49,35 atm/ 1 mL/min	Carotenóides e compostos fenólicos	26
	SC CO ₂ dinâmico	12g/60° C/ 3h/ 247 atm; vazão CO ₂ 15 ml/min; etanol+água(80:20)/0,25 mL/min;	Carotenóides e compostos fenólicos	
Casca de Pistache	SWE dinâmico	110-190° C; 68 atm; vazão 4 mL/min; 30 min (120ml coletados)	Compostos fenólicos, flavonoides	16
Casca de Manga	1º:SC CO ₂ dinâmico/2º:M AE	60° C; 247 atm; 15% etanol; vazão Mistura 6,7 g/min/ 3h// 600W; 50mL/g e 120seg (etanol/água "60%v/v")	Carotenóides/Compostos Fenólicos	21
Casca de Manga	SC CO ₂ dinâmico	60° C; 247 atm; 15% etanol; vazão Mistura 6,7 g/min/ 3h	Carotenóides	23
Casca de Batata	SC CO ₂ dinâmico	80 °C; 345 atm; MeOH 20%, e vazão de 18,0 g/min	Compostos Fenólicos	18
Folhas e Caules de Brócolis	SC CO ₂ dinâmico	40 °C; 443 bar; 7% etanol; 31 g/ min de vazão e 68 min.	β-caroteno, compostos fenólicos, clorofilas e fitosteróis	17
Casca de Cacau	SC CO ₂ dinâmico//PLE	40°C; 197 atm; vazão 11 g CO ₂ / Min; 2h // 70°C; 99 atm	Compostos fenólicos	27
Sementes de Uva	SC CO ₂ dinâmico	40°C; 345 atm; vazão 4 mL/min; 1h/2h/2h	Compostos fenólicos, flavonóides, Taninos condensados	19
Sementes de Romã				
Sementes de Tomate				

Bagaço de Maçã (casca/polpa)	SC CO ₂ + etanol 5% estático (1h) e dinâmico (1h)	45°C; 296 atm; vazão 2 L/h ; 2h no total	Compostos Fenólicos	20
Folhas de Manga	SC CO ₂ Dinâmico + etanol 20%	55°C; 98 atm; vazão 20g/min; 3h	Compostos fenólicos	14
	SWE dinâmico	100°C; 40 atm; vazão 10g/min; 3h		
Resíduo de Pimentão (Casca e sementes)	SC CO ₂ estático (30min)/ Dinâmico (2,5h)	60° C; 247 atm; vazão 3g/min/ total 3h	Compostos fenólicos, Flavonoides, B-caroteno e Licopeno	28
Casca de Tangerina	SC CO ₂ Dinâmico em duas etapas I e II (1,5h total)	I: 40°C; 150 atm; vazão 2 mL/min/ por 30 min / II: 40°C; 100 atm; vazão 2 mL/min + 7% acetona e 60 min	B caroteno e Licopeno	29
Casca de Laranja				
Casca e pele de Tomate				

Fonte: Autoria Própria.

3.3 - USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS COMBINADOS

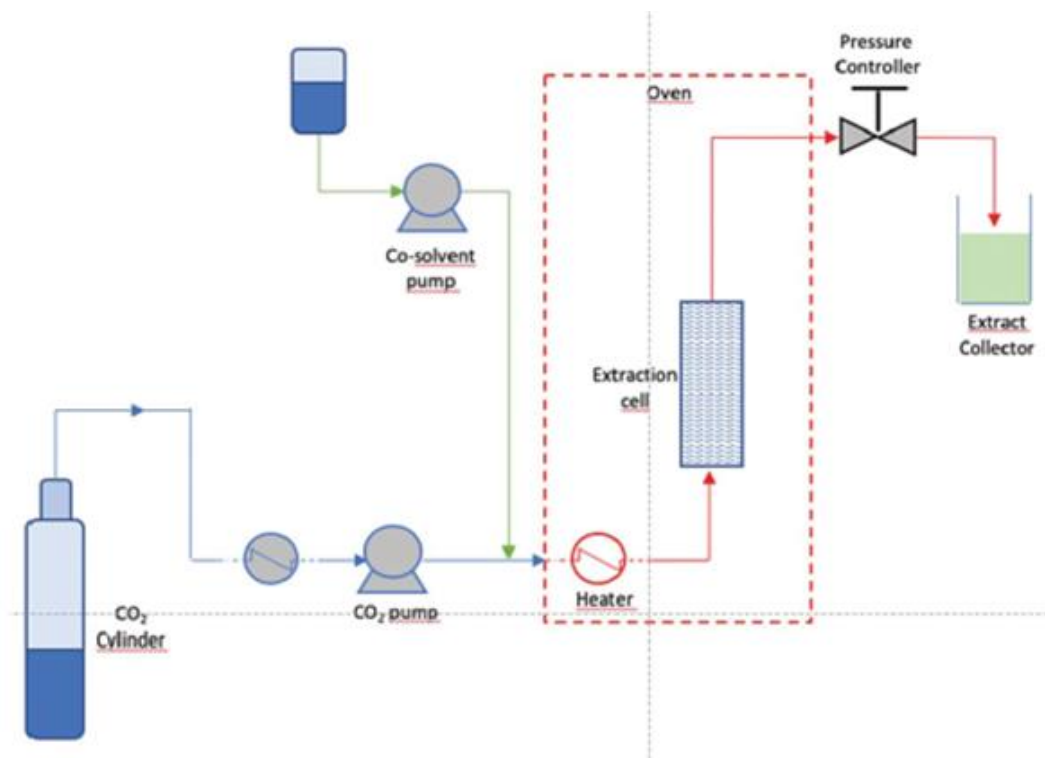
O método SFE utiliza um sistema de tubulações e conexões que são adaptáveis para muitos tipos de fluidos supercríticos (Min-Jung Ko. Et al) ²⁵. Dessa forma, uma maneira de se contornar as limitações da SWE, passa pela combinação do uso desse método junto ao SC CO₂, sendo possível a extração de polifenóis e flavonoides com maior facilidade, fazendo uso da primeira técnica, e realizando uma extração consecutiva com o segundo método, de modo a obter os compostos mais apolares como os carotenóides. Exemplo dessa combinação é o trabalho de Šafranko e seus colaboradores²⁴, onde a extração de cascas de tangerina foi realizada primeiramente com SC CO₂ dinâmico, a 40° C e 296 atm, sendo uma metodologia adequada para um bom rendimento de compostos aromáticos voláteis, seguida de uma extração por SWE com parâmetros em 130°C e 11 atm, seletiva para compostos

polifenólicos. A primeira etapa durou 90 minutos, enquanto a segunda levou 15 minutos. O trabalho de Salami, A e colaboradores²⁶ também fez uso da combinação das técnicas, esse aplicado às cascas de abóbora, começando com SWE dinâmico, 120° C, 49 atm e 3 horas, extraíndo compostos polifenólicos. A segunda etapa foi realizada com SC CO₂, também dinâmico, em condições de 60° C, 247 atm, 20% de etanol, por 3 horas, resultando em bom rendimento de carotenóides e compostos fenólicos voláteis.

A combinação das técnicas pode ser a chave para contornar as limitações das condições necessárias para suas aplicações. Vale ressaltar que todos os trabalhos apresentados na tabela 01, tiveram um preparo de extrato a partir da matriz, como a moagem e peneiração das partículas, etapa bastante comum em processos de extração, mas que podem ser uma futura área de estudo, de modo a criar metodologias que permitam a extração das moléculas de interesse, a partir da matriz, diretamente, economizando energia, solvente e tempo com o preparo dessas amostras, fazendo com que a operação de Biorrefinarias sejam bastante beneficiadas.

Além dos desafios das SFE já descritos e desenvolvidos, outro bastante relevante é a dificuldade de escalar as metodologias para patamares industriais, sendo que atualmente a maior parte dos trabalhos estão sendo realizados em escala piloto ou em laboratório, designações que permitem a venda de padrões de substâncias ou de extração em escalas menores de fármacos, mas que ainda não conseguem exercer influência suficiente para as grandes indústrias, tendo em vista o alto custo de fabricação de plantas que permitam esse trabalho, além da necessidade da continuidade dos estudos para validação de técnicas baseadas em fluidos supercríticos. Apesar disso, existem algumas empresas já atuantes em escala industrial, com atividades mais específicas como a extração de cafeína e produção de bebidas descafeinadas, como é o caso da Maxwell House Coffee, divisão da General Foods, grande produtora de café e chá descafeinados, que fazem uso de uma planta industrial que processa em torno de 80 mil toneladas de café por ano. A figura 7 exibe uma representação básica para o uso de SFE, geralmente aplicada em escala piloto para qualquer um dos fluidos supercríticos discutidos.

FIGURA 7 - Representação esquemática da estrutura de equipamentos de SFE.



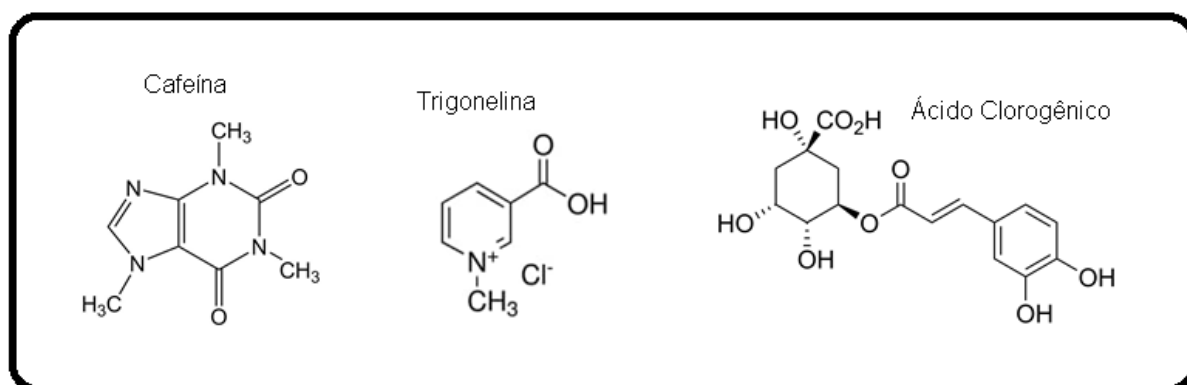
Fonte: (Chemat. F. et al)³⁰ A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products.

3.4 DEMONSTRAÇÃO DO POTENCIAL DA VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA RESULTANTE DA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS NOBRES DE CAFÉ VERDE.

Tendo demonstrado o valor teórico intrínseco das biorrefinarias, assim como o potencial de colaboração com as políticas de redução do desperdício e da valorização dos recursos naturais, o presente trabalho se direciona para a demonstração da extração verde de metabólitos secundários de matrizes agroindustriais. Para isso, utilizou-se amostras comerciais da biomassa resultante da extração de óleos do café verde (*Coffea Arabica*), isto é, um material já processado de onde já foram removidos os óleos essenciais da matriz. O experimento visa demonstrar a viabilidade da extração dos compostos fenólicos majoritários ainda presentes nesse material. De acordo com o trabalho de Hu. G. L. et al ³⁶ essa matriz apresenta como composição majoritária em termos componentes bioativos, substâncias como os ácidos clorogênicos, trigonelina ,cafeína, alcalóides do triptofano e diterpenos. Para fins de

facilitação do estudo, o experimento se concentra na identificação e quantificação relativa das três primeiras substâncias, cujas fórmulas estruturais podem ser vistas na figura 08.

FIGURA 08: Estrutura das moléculas dos constituintes ativos cafeína, trigonelina e ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico).



Fonte: Autoria Própria.

Os ácidos clorogênicos além de serem os principais compostos fenólicos no café, com níveis de até 14% em massa seca segundo Farah. A, e Donangelo. M.C,³⁸ possuem conhecida atividade antioxidante, hepatoprotetora, hipoglicêmica e antimicrobiana, sendo uma classe de substâncias bastante estudada e utilizada pelos setores de suplementação, farmacêutico e dermatológico. Quimicamente trata-se de uma molécula que possui um éster conjugado ao anel aromático com hidroxilas fenólicas e o agrupamento de ácido quínico. Vale ressaltar que o ácido clorogênico em questão é o ácido 3-cafeoilquínico. A cafeína por sua vez é popularmente conhecida como estimulante, já que possui atividade psicotrópica, estimulando o sistema nervoso central. É utilizada em produtos de suplementação alimentar e farmacologia. Representa cerca de 1,5% em massa seca. Já a trigonelina por sua vez, tem conhecidas atividades hipoglicêmica, hipolipidêmica, sedativa e neuroprotetora. (J. Zhou. et al.)³⁹ É um alcalóide bastante estudado por apresentar tais atividades, também compondo cerca de 1,5% em massa seca dos extratos de café verde.

3.4.1 CAFÉ VERDE: *Coffea arabica*

O *Coffea arabica* é a espécie de cafeeiro mais cultivada no Brasil e no mundo. De acordo com o levantamento realizado por Aguiar, Adriano Tosoni da Eira et al,³³ cerca de 70% de toda a produção brasileira de café e de proporções correspondentes por todo o mundo, advém dessa cultivar. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), essa quantia representa 32,41 milhões de sacas de 60 kgs produzidos anualmente, contribuindo para um aumento de 5,6% da produção de café brasileiro no ano de 2022, tendo sido esses números publicados no terceiro levantamento nacional da produção de café em setembro de 2022. (Embrapa.Br/Noticias).³⁴ A espécie é originária do Sudeste da Etiópia, e foi introduzida no Brasil por volta de 1727 pelo Império Português. Prefere temperaturas tropicais não muito superiores a 24º C e 150 metros cúbicos de chuvas por ano, desenvolvendo-se facilmente em elevações de 600 a 1800 metros acima do nível do mar. (AICC)³⁵

3.4.2 Preparo da Amostra e Desenvolvimento do Experimento de quantificação.

A amostra da biomassa residual de café verde foi fornecida pela GreenTech Natcrom³⁷ em parceria com o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais NuBBE ® do Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

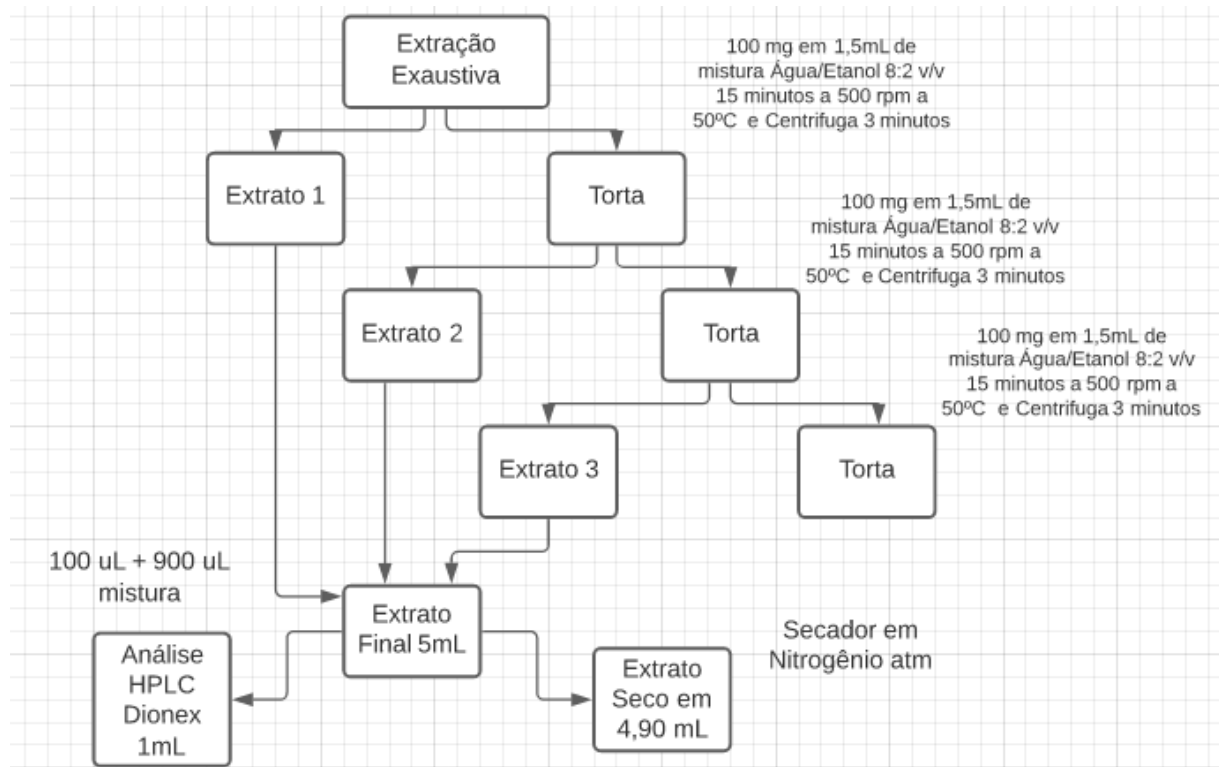
A matriz já moída, seca e devidamente armazenada em câmara fria a -20°C, foi tamisada em partículas maiores que 350 µm utilizando um tamisador da já referida dimensão. O material vegetal pode ser visto na figura 09.

Figura 09: Biomassa residual da extração do óleo de Café Verde.



Fonte: Autoria Própria.

Para o preparo do extrato, utilizou-se uma extração exaustiva da matriz, adotando o processo desenvolvido pela Natcrom³⁷, podendo ser consultado no esquema 03. O processo foi realizado em triplicata, com amostras de 100,6, 100,8 e 100,3 mg colocadas em tubos do tipo eppendorf de 2 mL, sendo adicionado 1,5 mL do diluente água/etanol, 8:2, levado para o bloco de agitação e aquecimento com 15 minutos, à 50°C e 500 rpm. Ao final dessa etapa, os tubos foram centrifugados por 3 minutos, a 100 rpm, permitindo a fácil transferência do extrato sobrenadante para frascos de secagem tipo penicilina, ver figura 10. O mencionado processo é realizado 3 vezes no total, garantindo uma extração quantitativa dos analitos da figura 08. Ao final do processo o volume de extrato de cada amostra é de 4,5 mL, quantia que é transferida para um balão volumétrico de 5 mL e completado até o menisco. Após término de todas as etapas de extração, 100µL de cada extrato é coletado e transferido para um vial de 1,5 mL, adicionando-se mais 900 µL do mesmo diluente, estando após essa etapa prontos para a análise no HPLC Dionex. O restante 4,90 mL é levado para o secador de amostras, esse equipamento utiliza jatos de nitrogênio para agilizar o processo de evaporação do solvente, secando o material e permitindo a obtenção da massa dos extraíveis sem riscos de oxidação pela presença do ar atmosférico.

ESQUEMA 03: Fluxograma da Extração Exaustiva adotada.

Fonte: Fluxograma adaptado do Processo desenvolvido pela Natcrom.³⁷.

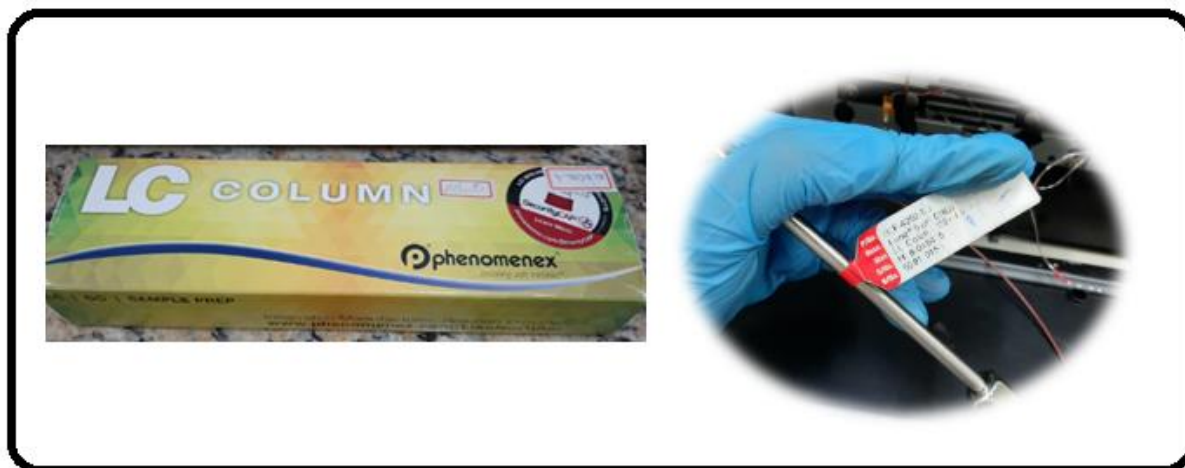
FIGURA 10: Imagem do extrato da matriz sendo realizado.

Fonte: Autoria Própria.

Tendo a extração sido realizada, iniciou-se a avaliação da reprodutibilidade do detector de arranjo de diodos (modelo DAD 3000) em conjunto com a coluna

cromatográfica LUNA 5 μ m, C18, 150 X 4,5 mm, figura 11, com o objetivo de verificar a confiabilidade dos dados que a serem obtidos.

FIGURA 11: Coluna Cromatográfica - LUNA 5 μ m, C18



Fonte: Autoria Própria.

De acordo com os estudos e monitoramento da linha de base, autodiagnóstico do sistema e cromatogramas da figura 13, verifica-se que o padrão de cafeína em todos os 5 testes apresentou o mesmo tempo de retenção, em 10,05 minutos para as condições utilizadas, demonstrando reprodutibilidade da instrumentação.

Prosseguiu-se com a construção de uma curva analítica para o cálculo de rendimento percentual da extração de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico. Vale ressaltar que estão presentes muitas substâncias derivadas do ácido clorogênico na matriz estudada. Apesar disso, serão apenas quantificados percentualmente o ácido clorogênico já mencionado por ser o majoritário, com a intenção de simplificar o estudo e processo envolvido.

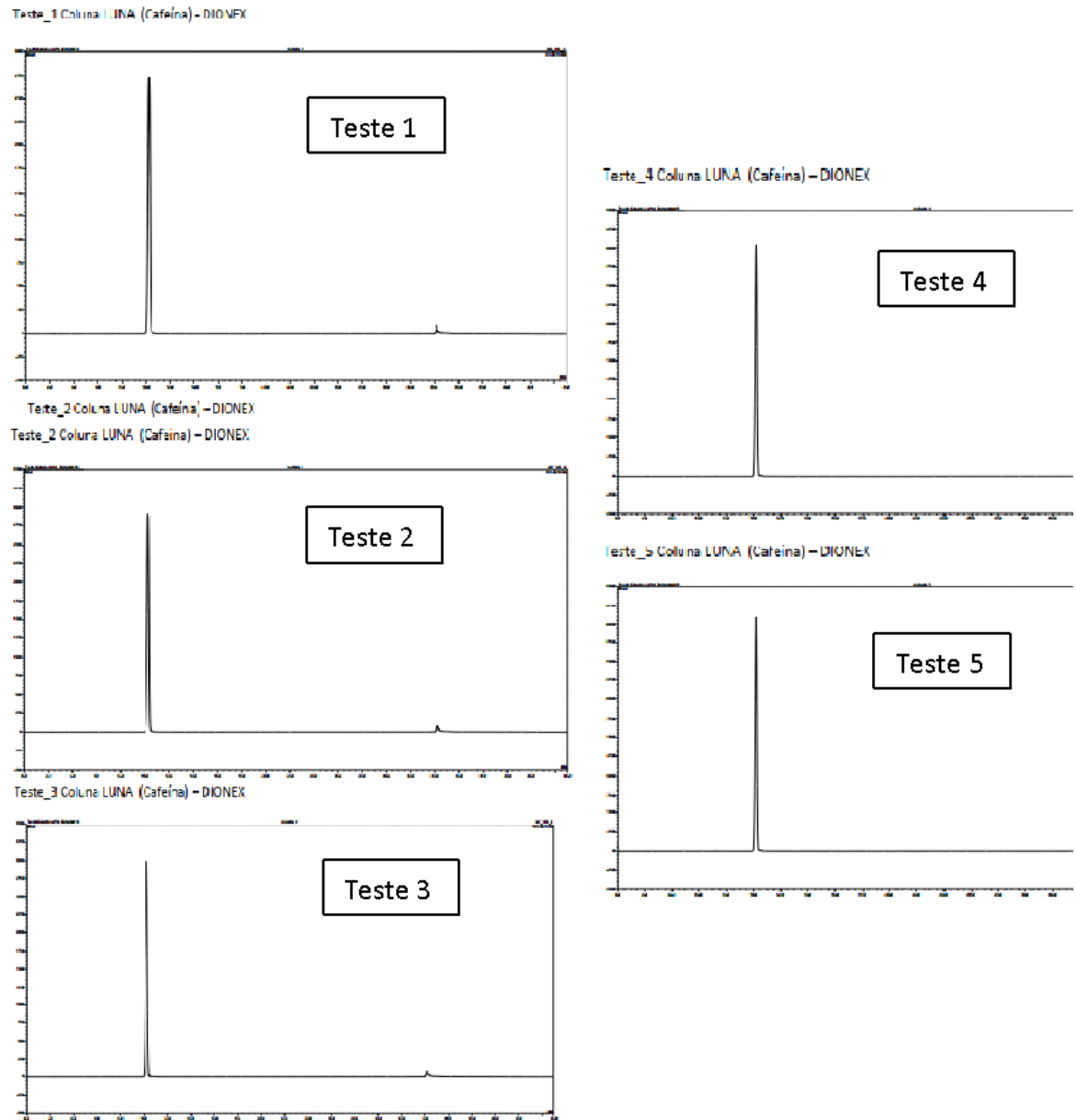
Dessa maneira, foram construídas três curvas a partir dos padrões das substâncias selecionadas, preparando-se misturas em seis diferentes soluções em ordem crescente de concentrações, sendo que para cada concentração, há três réplicas, garantindo três pontos para cada nível da curva analítica. O método cromatográfico utilizado pode ser visualizado na tabela 03. Além disso, os dados obtidos pela análise no HPLC/UPLC Ultimate 3000 – Dionex podem ser verificados na tabela 02.

TABELA 02: Dados obtidos para a construção das curvas analíticas.

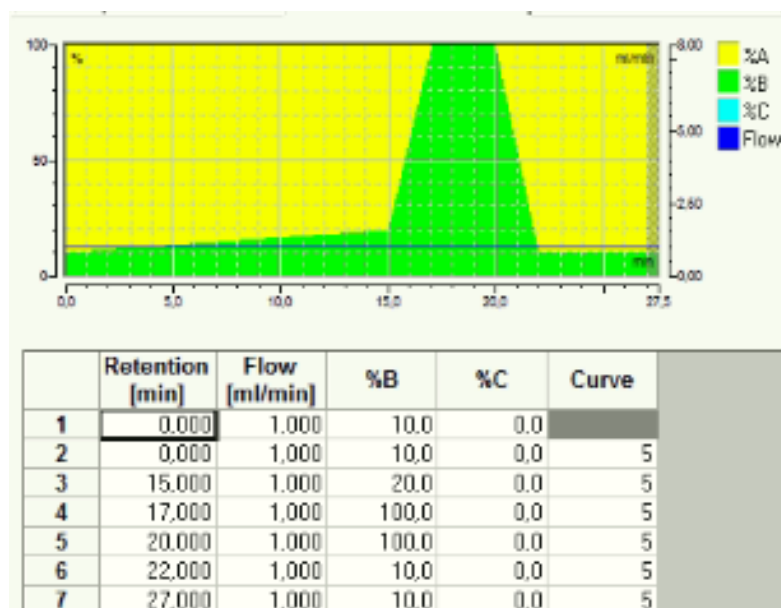
Triplicatas	Area Obtida (mAu*Min) - Dionex		
Concentração (mg/mL)	Cafeína	Trigonelina	Ácido Clorogênico
0,01	2,9363	0,9188	0,9586
0,01	3,0159	1,0125	0,9396
0,01	2,8626	0,9525	1,0632
0,025	7,1067	2,4478	2,4916
0,025	7,5658	2,5207	2,5563
0,025	7,1863	2,4970	2,7021
0,05	15,145	5,2756	5,4680
0,05	14,8009	4,9811	5,2835
0,05	15,2575	4,9862	5,3948
0,1	29,2094	10,2743	10,4878
0,1	29,8065	10,4355	10,7724
0,1	27,2673	10,4120	10,6495
0,125	35,9081	12,8372	13,1417
0,125	36,6645	12,6732	13,0208
0,125	36,838	12,9433	12,8990
0,25	73,1718	25,3519	25,5098
0,25	71,4677	24,8613	25,7244
0,25	75,0385	25,8497	26,8209
Intercepto	0.002831401126	0.003489654411	0.07319
Slope	2.923.341.589	1.02E+02	29.416.093

Fonte: Autoria Própria.

FIGURA 13: Teste de Reprodutibilidade da Coluna Luna C18.



Fonte: Autoria Própria.

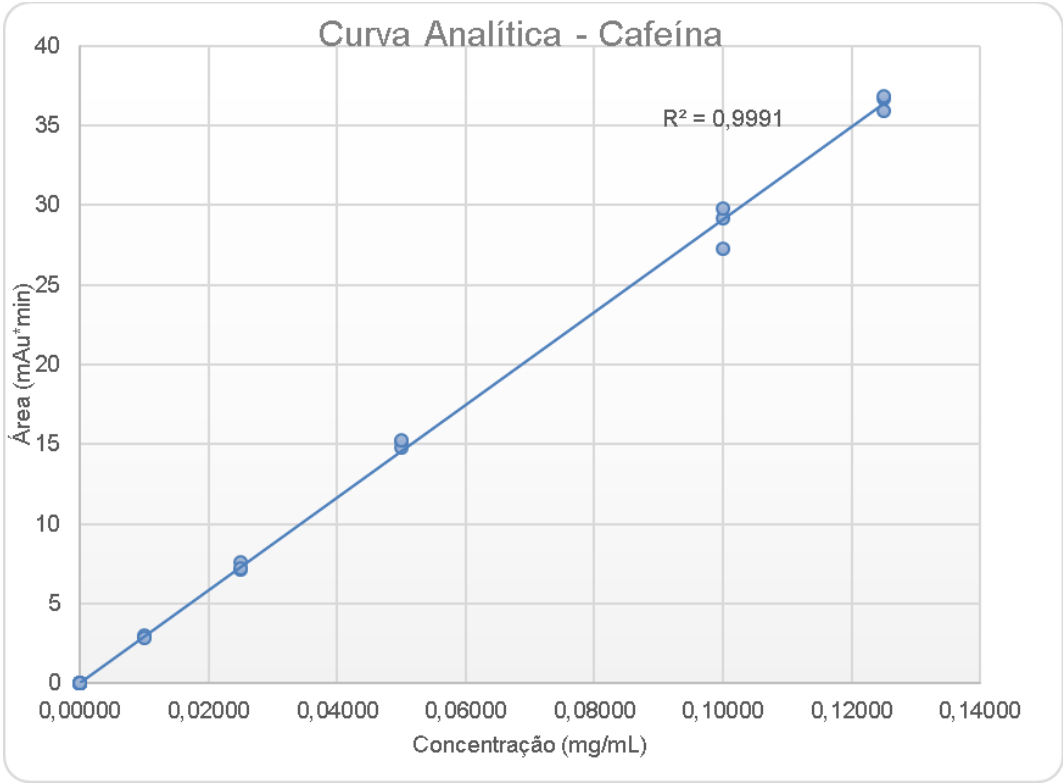
TABELA 03: Condições Cromatográficas utilizadas.

Fonte: Autoria Própria.

O método opera com uma vazão de 1 mL por minuto, sendo o solvente A a Água 0,1% de ácido fórmico e a fase B temos acetonitrila 0,1% ácido fórmico. O forno da coluna foi utilizado à 25° C.

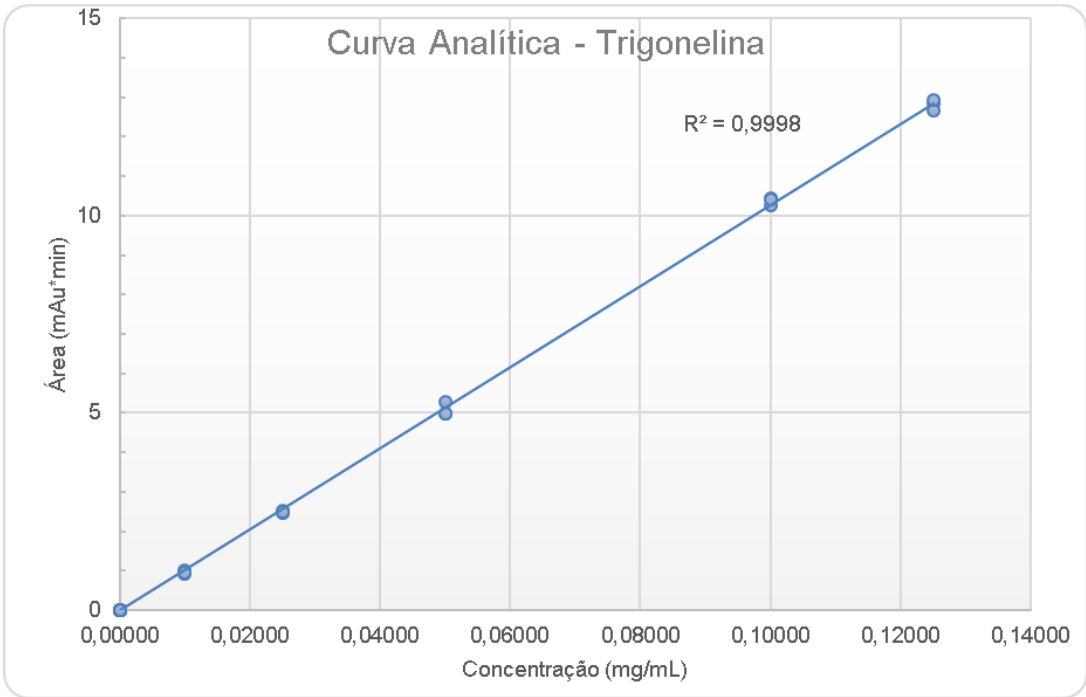
Com base nos dados obtidos e dispostos na tabela 02, foi possível construir as três curvas analíticas de interesse para a interpolação dos dados e quantificação das substâncias. Os gráficos 01, 02 e 03 são derivados dos dados da cafeína, trigonelina e ácido clorogênico respectivamente. Vale ressaltar que os valores de Intercepto e Slope obtidos estão dispostos na tabela 02.

GRÁFICO 01: Curva Analítica da Cafeína.

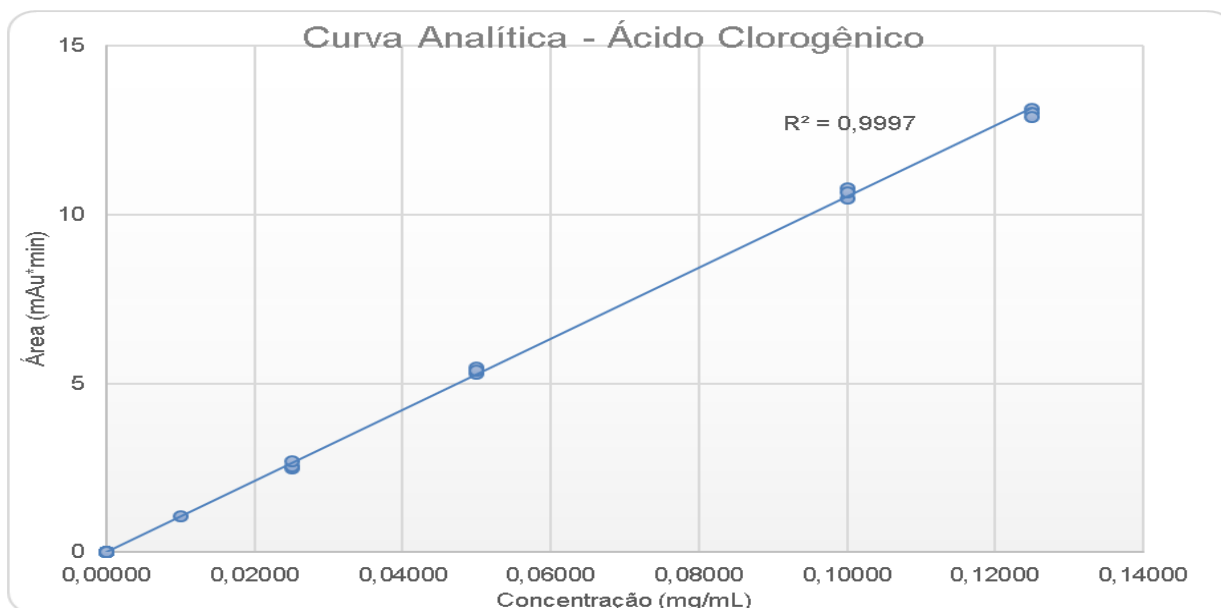


Fonte: Autoria Própria.

GRÁFICO 02: Curva Analítica da Trigonelina.



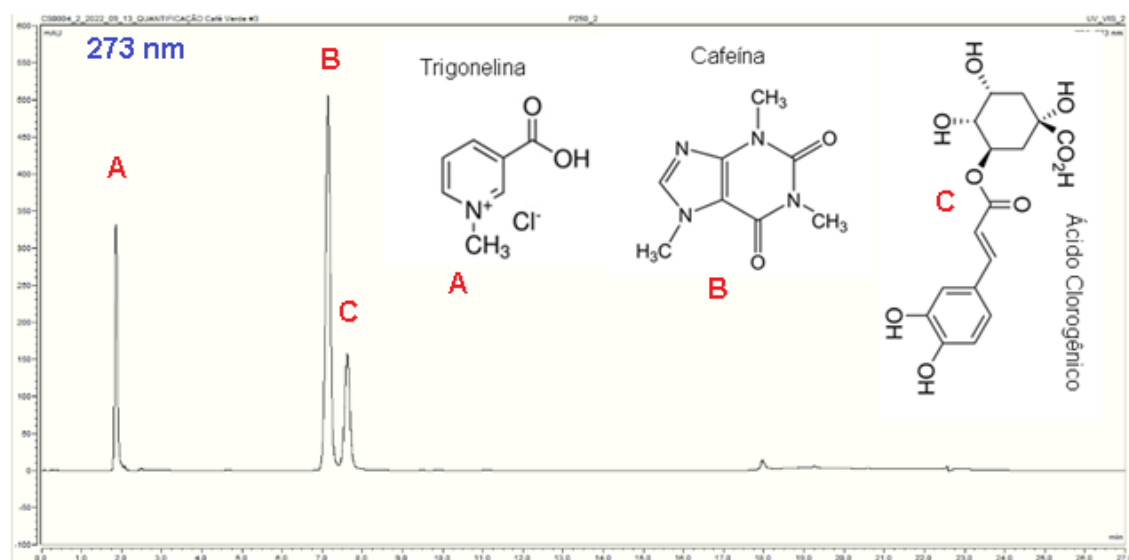
Fonte: Autoria Própria.

GRÁFICO 03: Curva Analítica do Ácido Clorogênico.

Fonte: Autoria Própria.

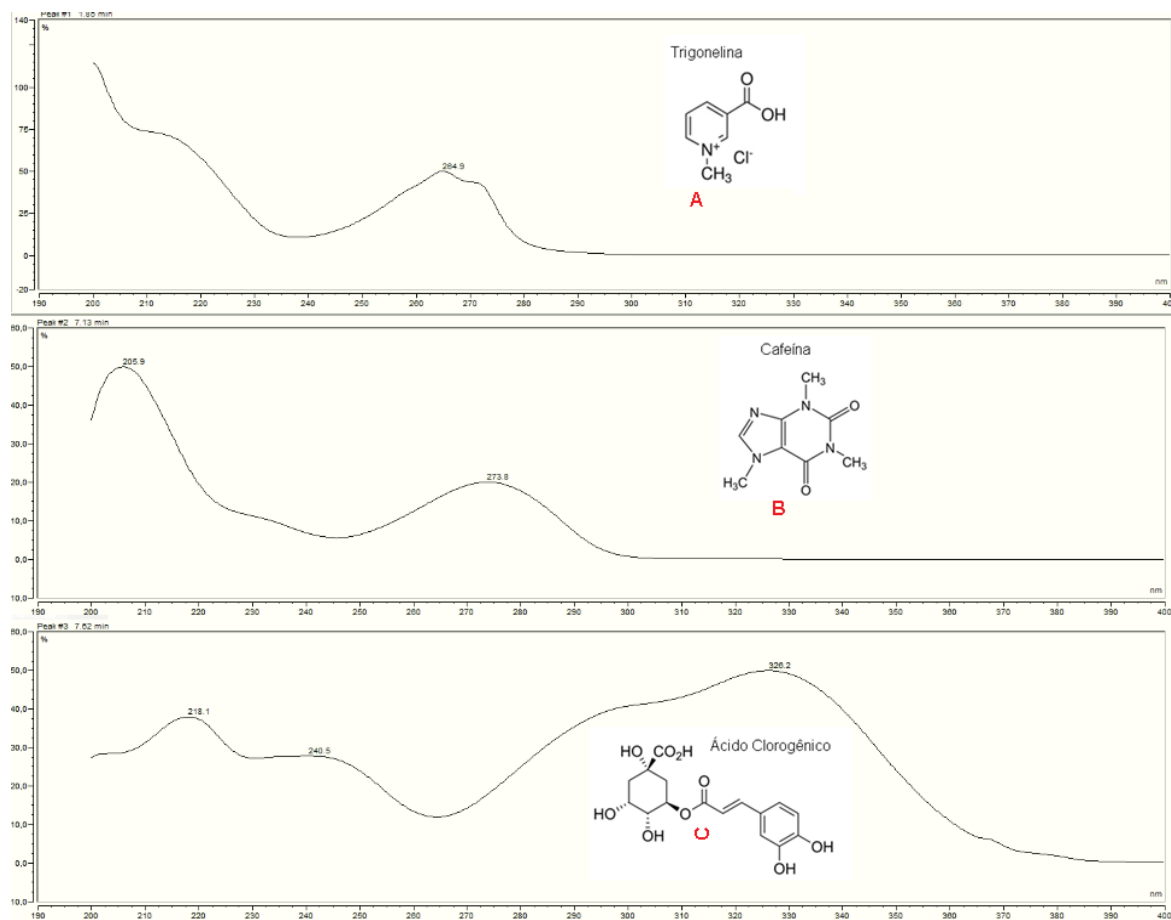
Tendo obtido os valores de coeficientes das retas, seguiu-se com a interpolação dos dados e determinação do percentual dos analitos selecionados em cada uma das réplicas dos extratos. Os resultados podem ser vistos nas tabelas 04, 05 e 06, cafeína, trigonelina e ácido clorogênico respectivamente. O cromatograma das misturas de padrão injetadas no HPLC, Dionex pode ser conferido na figura 14, sendo a figura 15 os espectros UV das respectivas substâncias.

FIGURA 14: Cromatograma – Trigonelina / Cafeína/ Ácido Clorogênico.



Fonte: Autoria Própria.

FIGURA 15: Espectro UV – Trigonelina/ Cafeína/ Ácido Clorogênico.



Fonte: Autoria Própria.

TABELA 04: Quantificação da Cafeína.

Coffe Arabica	Massa droga vegetal (mg)	Volume de amostra (mL)	Volume injetado (µL)	Fator de diluição da amostra	Intercepto	Slope
Replica 1	100,06	5,0000	10,0000	10,0000	0,0028314	292,33416
Replica 2	100,08	5,0000	10,0000	10,0000	0,0028314	292,33416
Replica 3	100,03	5,0000	10,0000	10,0000	0,0028314	292,33416
Coffe Arabica	Concentração do extrato (mg/mL)	Y (Área)	X (mg/mL)	Massa do analito (mg)	Cafeína mg/g extrato	% analito na droga vegetal
Replica 1	6,4000	9,0220	0,0309	1,5426	48,2067	1,5417
Replica 2	6,4800	8,9068	0,0305	1,5229	47,0034	1,5217
Replica 3	6,4800	8,6570	0,0296	1,4802	45,6847	1,4797
Média	6,4533	8,8619	0,0303	1,5152	46,9649	1,5144
Desvio Padrão	0,05	0,19	0,001	0,03	1,26	0,03

Fonte: Autoria Própria.

TABELA 05: Quantificação da Trigonelina.

Coffe Arabica	Massa droga vegetal (mg)	Volume de amostra (mL)	Volume injetado (µL)	Fator de diluição da amostra	Intercepto	Slope
Replica 1	100,06	5,0000	10,0000	10,0000	0,0034897	1,02E+02
Replica 2	100,08	5,0000	10,0000	10,0000	0,0034897	1,02E+02
Replica 3	100,03	5,0000	10,0000	10,0000	0,0034897	1,02E+02
Coffe Arabica	Concentração do extrato (mg/mL)	Y (Área)	X (mg/mL)	Massa do analito (mg)	Trigonelina mg/g extrato	% analito na droga vegetal
Replica 1	6,4000	3,2716	0,0321	1,6047	50,1468	1,6037
Replica 2	6,4800	3,2959	0,0323	1,6166	49,8960	1,6153
Replica 3	6,4800	3,2024	0,0314	1,5707	48,4790	1,5702
Média	6,4533	3,2566	0,0319	1,5973	49,5072	1,5964
Desvio Padrão	0,05	0,05	0,000	0,02	0,90	0,02

Fonte: Autoria Própria.

TABELA 06: Quantificação do Ácido Clorogênico.

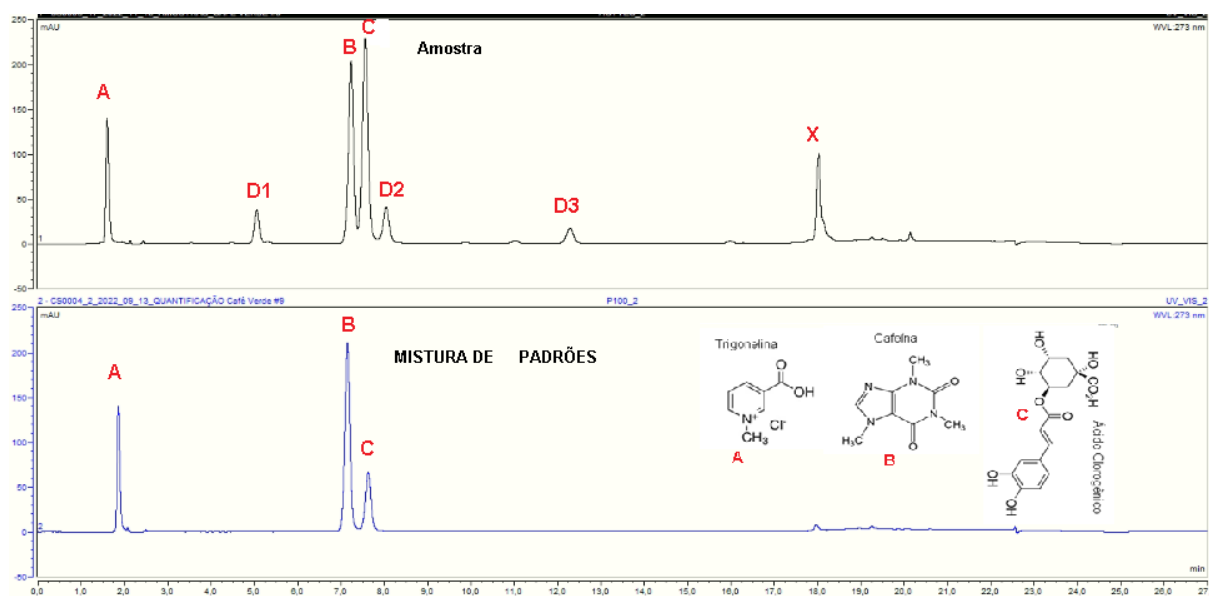
Coffe Arabica	Massa droga vegetal (mg)	Volume de amostra (mL)	Volume injetado (µL)	Fator de diluição da amostra	Intercepto	Slope
Replica 1	100,06	5,0000	10,0000	10,0000	0,07319	294,16093
Replica 2	100,08	5,0000	10,0000	10,0000	0,07319	294,16093
Replica 3	100,03	5,0000	10,0000	10,0000	0,07319	294,16093
Coffe Arabica	Concentração do extrato (mg/mL)	Y (Área)	X (mg/mL)	Massa do analito (mg)	Ac Clorogênico mg/g extrato	% analito na droga vegetal
Replica 1	6,4000	34,478	0,1170	5,8479	182,7481	5,8444
Replica 2	6,4800	35,201	0,1194	5,9709	184,2860	5,9661
Replica 3	6,4800	35,384	0,1200	6,0020	185,2466	6,0002
Média	6,4533	35,0211	0,1188	5,9403	184,0936	5,9369
Desvio Padrão	0,05	0,48	0,002	0,08	1,26	0,08

Fonte: Autoria Própria.

Dessa maneira, obteve-se teores de 1,51 % de cafeína, 1,60% de trigonelina e 5,94% de ácido clorogênico. Tais valores estão de acordo com as literaturas já mencionadas G.L. Hu. Et al.³⁶ e Farah. A, Donangelo. M.C.³⁸

O experimento demonstrou a presença desses ativos de interesse na biomassa residual do café verde pós extração dos óleos sendo, portanto, um indicativo de oportunidade da ampliação da cadeia produtiva dessa matriz. Além disso, o método de extração utilizou solventes classificados como recomendado em termos de toxicidade, demonstrando também a viabilidade da química verde no desenvolvimento de processos mais sustentáveis. A Figura 16 é o cromatograma referente aos extratos analisados.

FIGURA 16: Cromatograma do Extrato da Biomassa Residual do Café Verde.



Fonte: Autoria Própria

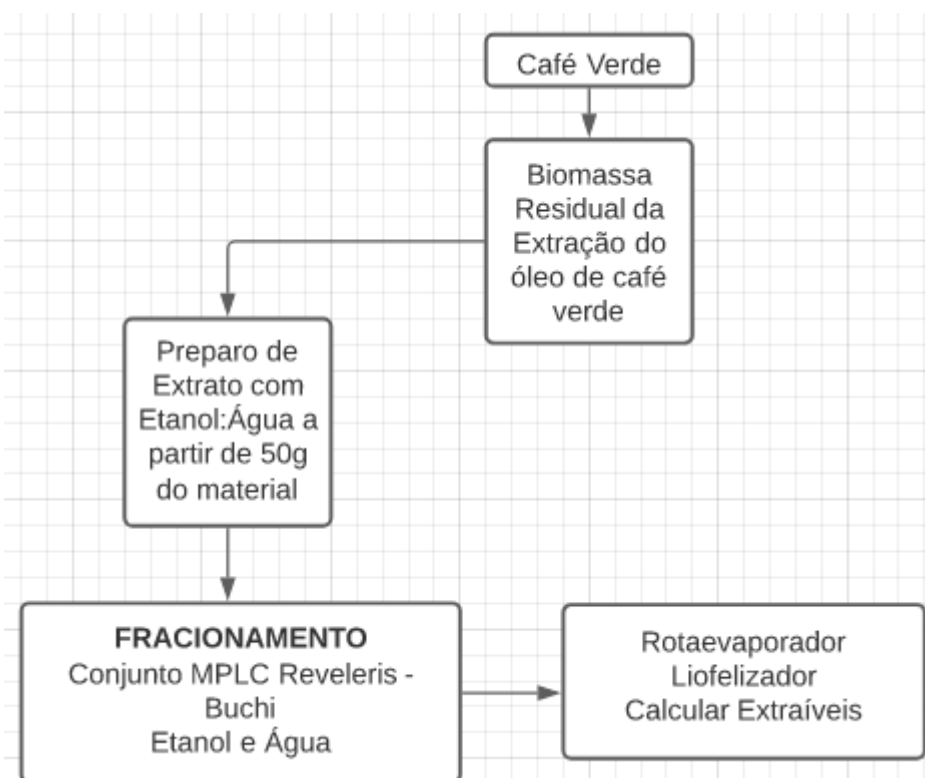
Vale ressaltar que as substâncias marcadas como D1, D2 e D3 são outros ácidos clorogênicos de acordo com seus padrões de espectro UV característicos como na figura 16. Apesar disso, o estudo não buscou identificá-los. Sabe-se da presença de ao menos 4 tipos de ácidos clorogênicos, segundo Farah. A, Donangelo. M.C.³⁸ Já a substância definida como X não foi identificada por não ser o foco do experimento.

3.4.3 – DEMONSTRAÇÃO DO FRACIONAMENTO DA MATRIZ UTILIZANDO ETANOL E ÁGUA

Tendo realizado a identificação das substâncias escolhidas e avaliado o teor presente no resíduo, iniciou-se em parceria com a Natcrom³⁷ o fracionamento do material utilizando etanol e água.

O experimento teve início com a extração utilizando misturas de etanol água em 50 gramas da biomassa residual do café verde. O processo utilizado é demonstrativo de um método verde por não fazer uso de solventes agressivos à saúde humana ou ambiental. Após a obtenção do extrato vegetal sobrenadante, foi a vez de iniciar o fracionamento, fazendo o uso de um MPLC Reveleris da Buchi e uma coluna cromatográfica genérica empacotada com resina comercial, o processo pode ser visualizado no esquema 04.

ESQUEMA 04: Fluxograma



Fonte: Autoria Própria.

O processo consiste no fracionamento do material, remoção do etanol por rotaevaporação, congelamento da fração aquosa resultante e posterior liofilização.

Os dados obtidos após a secagem do material e cálculo do rendimento bruto das frações estão dispostos na tabela 07.

TABELA 07: Rendimento Bruto do Fracionamento.

Demonstração - Café Verde				
	m1	m2	Massa Final (g)	Majoritário
Fração 1	5,508	6,7435	1,2355	Açúcares
Fração 2	10,1268	15,9914	5,8646	Trigonelina
Fração 3	10,4259	10,9403	0,5144	Ácido clorogênico
Fração 4	10,5108	10,7682	0,2574	Ácido clorogênico
Fração 5	10,3313	14,6573	4,326	Ácido clorogênico + Cafeína
TOTAL	-	-	12,1979	
Rend %	-	-	24,3958	

Fonte: Autoria Própria em parceria com a Natcrom.³⁷

O rendimento bruto obtido foi de 24,4%. Vale ressaltar a possibilidade da presença de algum teor de água no material. A determinação dos compostos majoritários para cada fração foi determinada utilizando o mesmo método do experimento anterior, sendo utilizado para isso o HPLC Dionex novamente.

4 - CONCLUSÃO

Espera-se que o presente trabalho tenha demonstrado as grandes vantagens das SFE, assim como seus maiores desafios, e que com isso, tenha proporcionado ao leitor a compreensão das necessidades do Brasil atuar na pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias e processos sustentáveis, garantindo conhecimentos estratégicos para economia vindoura baseada na valorização dos recursos naturais. A utilização dos fluidos supercríticos para a extração de substâncias ativas advindas de resíduos agroindustriais ainda se encontra em sua maioria em escala piloto, mas já demonstram um grande diferencial na preservação

das atividades antioxidantes aprimoradas de compostos polifenólicos e flavonoides, mostrando-se competitivas quando considerado a necessidade da remodelagem da química tradicional, para uma química verde inovadora.

O Brasil possui um enorme potencial para atuar no ramo das biorrefinarias por possuir uma vasta disponibilidade de biomassa residual advindas do competitivo agronegócio nacional. Os resultados da análise da biomassa resultante da extração de óleo de café verde demonstraram oportunidade para valorização desse recurso, possuindo um teor médio de 6% de ácido clorogênico e 1,5% de cafeína e trigonelina, compostos com conhecidas atividades biológicas. Essa biomassa é apenas um exemplo de inúmeras matrizes amplamente disponíveis que são hoje em grande parte descartadas, mas que possuem quantidades significativas de substâncias ativas, oportunidade para o desenvolvimento de uma química de produtos naturais ainda mais forte, conectada com as necessidades climáticas e de escassez mundial, e contribuindo para a criação de um novo modelo de industrialização do país, baseado em tecnologia, formação de pessoal qualificado e a busca da sustentabilidade.

REFERÊNCIAS:

1 Escritório de Assuntos Internacionais – **EAI DF, Plataforma Agenda 2030**; Disponível em < Agenda 2030: Objetivos do Desenvolvimento Sustentável – Escritório de Assuntos Internacionais (internacional.df.gov.br) >; Acesso em 18/11/2021.

2 A ONU e o Meio Ambiente - **Comissão Mundial Sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento – ONU 1987**; Disponível em < A ONU e o meio ambiente | As Nações Unidas no Brasil >; Acesso em 18/11/2021

3 **Portal Embrapa Agroenergia** - biorrefinaria-modificado-web.pdf (embrapa.br), 2011. Disponível em < Biorrefinarias. - Portal Embrapa >; Acesso em 02/08/2021

4 Nações Unidas Brasil - **Índice de Desperdício de Alimentos 2021 | UNEP - UN Environment Programme**; Disponível em < ONU: 17% de todos os alimentos disponíveis para consumo são desperdiçados | As Nações Unidas no Brasil >; Acesso em 08/11/2021.

5 OPPORTUNITIES IN BRAZILIAN SUGAR & ETHANOL PRODUCTION & TRADE; Disponível em < **Sugar & Ethanol Brazil 2020** (informaconnect.com) >; Acesso em 08/11/2021.

6 NASCIMENTO, S. P. Desperdício de alimentos: fator de insegurança alimentar e nutricional. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, v. 25, n. 1, p. 85–91, 2018. DOI: 10.20396/san.v25i1.8649917. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8649917>. Acesso em: 8 Nov. 2021.

7 FAO. **Global food losses and food waste** – Extent, causes and prevention. Rome: FAO; 2011, Germany. Disponível em < Global food losses and food waste (fao.org) >; Acesso em 10/08/2021.

8 Segurança Alimentar Nutricional, Campinas; **SISAN**. Disponível em < SISAN - Secretaria Municipal de Assistência Social e Segurança Alimentar > Governo | Prefeitura Municipal de Campinas >; Acesso em 10/08/2021.

9 Paul T. Anastas. & John C. Warner. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press: New York, 1998.

10 Gil, Katarzyna & Tuberoso, Carlo. (2021). Crucial Challenges in the Development of Green Extraction Technologies to Obtain Antioxidant Bioactive Compounds from Agro-industrial By-Products. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. 35. 10.15255/CABEQ.2021.1923. Disponível em < (PDF) Crucial Challenges in the Development of Green Extraction Technologies to Obtain Antioxidant Bioactive Compounds from Agro-industrial By-Products (researchgate.net) >; Acesso em 10/10/2021.

¹¹ Farid Chemat and Jochen Strube - **Green Extraction of Natural Products - Theory and Practice**, cap 7, 2019.

¹² Mauricio A Rostagno and Juliana M Prado, Campinas, UNICAMP; RSC Green Chemistry - **Natural Product Extraction: Principles and Applications**; Cap 6. Published on 24 May, 2013.

13 Arwa Mustafa, Charlotta Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: **A review, Analytica Chimica Acta, Volume 703, Issue 1, 2011, Pages 8-18**. Disponível em <

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267011009597>) >; Acesso em 12/08/2021.

14 Teresa Fernández-Ponce, Lourdes Casas, Casimiro Mantell, Miguel Rodríguez, Enrique Martínez de la Ossa, - Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies, **The Journal of Supercritical Fluids**, Volume 72, 2012, Pages 168-175, Disponível em: <(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844612002562>)>; Acesso em 21/08/2021.

15 Original Paper; Static and dynamic superheated water extraction of essential oil components from Thymus; **Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland**

16 Sevcan Erşan, Özlem Güçlü Üstündağ, Reinhold Carle, Ralf M. Schweiggert, - Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls, **Food Chemistry**, Volume 253, 2018, Pages 46-54, Disponível em <(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618301316>)>; Acesso em 23/08/2021.

17 Borja-Martínez, M.; Lozano-Sánchez, J.; Borrás-Linares, I.; Pedreño, M.A.; Sabater-Jara, A.B. Revalorization of Broccoli By-Products for Cosmetic Uses Using Supercritical Fluid Extraction. **Antioxidants** **2020**, *9*, 1195. Disponível em < <https://doi.org/10.3390/antiox9121195> >; Acesso em 03/08/2021.

18 Andrade Lima, M.; Andreou, R.; Charalampopoulos, D.; Chatzifragkou, A. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Phenolic Compounds from Potato (*Solanum tuberosum*) Peels. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3410. Disponível em < <https://doi.org/10.3390/app11083410> >; Acesso em 03/08/2021.

19 Miriana Durante, Anna Montefusco, Pier Paolo Marrese, Mario Soccio, Donato Pastore, Gabriella Piro, Giovanni Mita, Marcello S. Lenucci, Seeds of pomegranate, tomato and grapes: An underestimated source of natural bioactive molecules and antioxidants from agri-food by-products, **Journal of Food Composition and Analysis**, Volume 63, 2017, Pages 65-72. Disponível em <

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157517301801>) >; Acesso em 05/08/2021.

20 Giovanna Ferrentino, Ksenia Morozova, Ornella Kongi Mosibo, Mohsen Ramezani, Matteo Scampicchio, Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction, **Journal of Cleaner Production**, Volume 186, 2018, Pages 253-261. Disponível em < (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652618308369>) >; Acesso em 09/08/2021.

21 Andrea del Pilar Sánchez-Camargo, Diego Ballesteros-Vivas, Luis Miguel Buelvas-Puello, Hugo A. Martinez-Correa, Fabián Parada-Alfonso, Alejandro Cifuentes, Sandra R.S. Ferreira, Luis-Felipe Gutiérrez, Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant and anti-proliferative activities from supercritical CO₂ pre-extracted mango peel as valorization strategy, **LWT**, Volume 137, 2021. Disponível em < (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382031402X>) >; Acesso em 19/10/2021.

22 Borja-Martínez, M.; Lozano-Sánchez, J.; Borrás-Linares, I.; Pedreño, M.A.; Sabater-Jara, A.B. Revalorization of Broccoli By-Products for Cosmetic Uses Using Supercritical Fluid Extraction. *Antioxidants* **2020**, 9, 1195. Disponível em < <https://doi.org/10.3390/antiox9121195> >; Acesso em 23/08/2021. (

23 Andrea del Pilar Sánchez-Camargo, Luis-Felipe Gutiérrez, Sandra Milena Vargas, Hugo A. Martinez-Correa, Fabián Parada-Alfonso, Carlos-Eduardo Narváez-Cuenca, Valorisation of mango peel: Proximate composition, supercritical fluid extraction of carotenoids, and application as an antioxidant additive for an edible oil, **The Journal of Supercritical Fluids**, Volume 152, 2019. Disponível em < (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844619302980>) >; Acesso em 19/10/2021.

24 Šafranko, S.; Ćorković, I.; Jerković, I.; Jakovljević, M.; Aladić, K.; Šubarić, D.; Jokić, S. Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu* var. *Kuno*): **Phytochemical Analysis and Process**

Optimization. *Foods* **2021**, *10*, 1043. Disponível em < <https://doi.org/10.3390/foods10051043> >; Acesso em 02/08/2021.

25 Min-Jung Ko, Hye-Lim Kwon, Myong-Soo Chung, Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (Citrus unshiu Markovich) peel, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Volume 38, Part A, 2016, Pages 175-181. Disponível em < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856416304416> >; Acesso em 02/08/2021.

26 Salami, A., Asefi, N., Kenari, R.E. *et al.* Extraction of pumpkin peel extract using supercritical CO₂ and subcritical water technology: Enhancing oxidative stability of canola oil. **J Food Sci Technol** **58**, 1101–1109 (2021). Disponível em < <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04624-x> >; Acesso em 02/08/2021.

27 Simone Mazzutti, Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues, Natália Mezzomo, Valentina Venturi, Sandra Regina Salvador Ferreira, Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (Theobroma cacao) bean hulls, **The Journal of Supercritical Fluids**, Volume 135, 2018, Pages 52-59. Disponível em < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617307398> >; Acesso em 10/09/2021.

28 Ana Carolina Fornereto Soldan, Sarah Arvelos, Érika Ohta Watanabe, Carla Eponina Hori, Supercritical fluid extraction of oleoresin from Capsicum annum industrial waste, **Journal of Cleaner Production**, Volume 297, 2021. Disponível em < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652621008131> >; Acesso em 10/09/2021.

29 Rubashvili, Imeda & Tsitsagi, Mzia & Ebralidze, Ketevan & Tsitsishvili, V. & Eprikashvili, Luba & Chkhaidze, Mariam & Zautashvili, Marine. (2018). Extraction and Analysis of the Major Carotenoids of Agro-Industrial Waste Materials Using Sequential Extraction Techniques and High Performance Liquid Chromatography. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**. 13. Disponível em < 10.29333/ejac/82931 >; Acesso em 02/08/2021.

30 Chemat, Farid and Abert Vian, Maryline and Fabiano-Tixier, Anne-Sylvie and Nutrizio, Marinela and Režek Jambrak, Anet and Munekata, Paulo E. S. and Lorenzo, Jose M. and Barba, Francisco J. and Binello, Arianna and Cravotto, Giancarlo", "A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products", - **The Royal Society of Chemistry, Journal ou Green Chen**, 2020, V 22. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1039/C9GC03878G> >; Acesso em 26/09/2021.

31 Teixeira, I. et al. **Sustainability, the state of the art**, Andrea Jakobsson Estúdio. 2019.

32 Mustafa. A. and Turner. C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: **A review, Analytica Chimica Acta**, Volume 703, Issue 1, 2011.

33 Aguiar, Adriano Tosoni da Eira et al. Caracterização de cultivares de Coffea arabica mediante utilização de descritores mínimos. **Bragantia** [online]. 2004, v. 63, n. 2 [Acessado 6 Julho 2022], pp. 179-192.

34 Embrapa.br/Noticias/Terceiro Levantamento da Safra produtiva de Café no Brasil, Setembro de 2022. Disponível em <https://www.embrapa.br>, Acesso em 13 de Outubro de 2022.

35 Associação Comercial e Industrial do Café (**AICC**). Disponível em <aicc.pt>, Acesso em 14 de outubro de 2022.

36 G.L. Hu. Et al. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. A article from **The Jornal: Food & Function**, issue 6, 2019.

37 GreenTech **Natcrom Soluções Sustentáveis**. Disponível em: <Natcrom.com>. Acesso em 12 de Semembro de 2022.

38 Farah. A, Donangelo. M.C. Phenolic Compounds in coffe. A minireview from Brazilian. **Jornaul. Plant Physiol**. 18, Mar 2006.

39 Zhou J, Chan L, Zhou S. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. **Curr Med Chem**. 2012.